

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE ESTUDOS GERAIS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA**

MARIA EMMERICK GOUVEIA

**ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO EM GENES
SUPRESSORES DE TUMOR NA LEUCEMIA MIELÓIDE
CRÔNICA**

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE
FEDERAL FLUMINENSE VISANDO A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM NEUROIMUNOLOGIA

Orientadora: Ilana Zalcborg Renault

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARIA EMMERICK GOUVEIA

**ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO EM GENES SUPRESSORES
DE TUMOR NA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Neuroimunologia da Universidade
Federal Fluminense, como
requisito para obtenção do Grau
de Mestre.**

Orientadora: Dra. Ilana Zalcborg Renault

**Niterói
2007**

Gouveia, Maria Emmerick

Análise do padrão de metilação em genes supressores de tumor na Leucemia Mielóide Crônica / Maria Emmerick Gouveia – Niterói: UFF, 2007.

123 f.

Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense, 2007.

1. Metilação do DNA. 2. LMC. 3. Genes Supressores de Tumor.

I. Universidade Federal Fluminense – Instituto de Biologia. II. Título.

MARIA EMMERICK GOUVEIA

ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO EM GENES SUPRESSORES
DE TUMOR NA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Neuroimunologia da Universidade
Federal Fluminense, como requisito
para obtenção do Grau de Mestre.

Aprovada em 12 de junho de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Izabel Cristina de Palmer Paixão
Instituto de Biologia – UFF

Dra. Lídia Maria da Fonte Amorim
Instituto de Biologia – UFF

Dr. José Cláudio Casali da Rocha
Banco Nacional de Tumores - INCa

Niterói
2007

AGRADECIMENTOS

À minha família. Por ser a melhor família do mundo! Por termos sempre o apoio uns dos outros, em todas as situações. Pelo apoio, amor e união, essenciais na minha vida.

Ao meu primo Lucas (*in memoriam*). Por ter sido um exemplo de amor, luta, garra e força. Por ter me ensinado a nunca desistir, a não me deixar abater por obstáculos que possam surgir em minha vida, pessoal e profissional. Por me fazer lembrar da importância de estudar e entender as leucemias.

À Ilana, por acreditar no meu potencial e sempre me incentivar a continuar. Por ter me proporcionado trabalhar em um laboratório de qualidade, e me servir como exemplo para nunca deixar de fazer a ponte pesquisa e clínica.

Ao Esteban, por ter me aceitado, me estimulado, me ensinado, me entendido, me compreendido, me ajudado. Muito obrigada pela paciência, pelos ensinamentos, pelas risadas, pelas broncas e principalmente pela amizade. Não tenho palavras suficientes para descrever como foi bom e importante pra mim ter trabalhado com você. Obrigada por tudo!

À Ana Carolina (Feit), Lyanna, Marina, Priscilla, Vanesa e Deisy, por terem agüentado meus suspiros, minhas loucuras, por terem compartilhado gargalhadas, momentos de tristeza, de angústia e de felicidade. Por termos nos tornado grandes amigas e companheiras. Obrigada pelas conversas e pelo apoio, tanto pessoal quanto profissional.

Aos demais colegas de laboratório: Gustavo, Virgínia, Telma, Rocio, Ana Paula, Fernanda, Marina, Roberta e Gisele.

Ao Dr. Zé Cláudio Rocha, pela enorme ajuda na análise dos meus dados.

Ao Prof. Maurício Gama, pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos meus pais, Roberto e Maria Christina, obrigada por tudo!

Às minhas primas – amigas – companheiras – irmãs Jules e Nanda, por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus amigos da UFF, Bel, Tininha, Renata, Bruno, Rodrigo, Liana, Gabi e Mari, e especialmente à Sabrina, por me apoiar, me estimular e por não deixar eu desistir.

Obrigada a todos vocês!

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Neuroimunologia, em especial à Ana Ventura e Roberto Paes de Carvalho.

“Podemos dizer que o cientista vive em dois mundos. De um lado, o mundo ordinário, o mundo público, que ele divide com os outros seres humanos. De outro, um mundo privado onde a pesquisa transcorre; um mundo com paixões, exaltações, desesperos; mundo onde se pode subir aos céus ou descer aos infernos”.

François Jacob

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. GENÉTICA DA LMC	2
1.2. ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO NA LMC	5
1.3. METILAÇÃO DO DNA COMO PROCESSO EPIGENÉTICO	10
1.3.1. Processo de metilação	11
1.3.2. Funções da Metilação	16
1.3.3. Metilação e câncer	18
1.3.4. Metilação em neoplasias hematológicas	22
1.4. METILAÇÃO NA LMC	26
1.5. METILAÇÃO COMO ALVO TERAPÊUTICO	27
2. OBJETIVOS	31
3. PACIENTES E MÉTODOS	32
3.1. PACIENTES	32
3.1.1. Amostras	33
3.2. APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	33
3.3. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	34
3.4. EXTRAÇÃO DE DNA	35
3.5. QUANTIFICAÇÃO DE DNA	35
3.6. GEL DE AGAROSE 0,8%	35
3.7. TRATAMENTO DO DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO	36
3.8. PCR ESPECÍFICA DO ESTADO DE METILAÇÃO DO DNA (MSP – METHYLATION SPECIFIC PCR)	37
3.9. GEL DE POLIACRILAMIDA 7,5%	40
3.10. SEQÜENCIAMENTO	40
3.11. LINHAGENS CELULARES	41
3.12. ENSAIOS DE DEMETILAÇÃO	42
3.13. EXTRAÇÃO DE RNA	43

3.14. QUANTIFICAÇÃO DE RNA POR ESPECTROFOTOMETRIA	44
3.15. SÍNTESE DE cDNA	44
3.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
4. RESULTADOS	46
4.1. PACIENTES	46
4.1.1. SOBREVIDA GLOBAL DOS PACIENTES COM LMC	48
4.2. ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO EM DIVERSOS GENES SUPRESSORES DE TUMOR	51
4.2.1. ESPECIFICIDADE	51
4.2.1.1. MSP a partir de DNA não modificado	51
4.2.1.2. MSP em amostras não tumorais	51
4.2.1.3. Seqüenciamento de fragmentos amplificados de MSP-U e MSP-M	52
4.2.2 SENSIBILIDADE	53
4.2.3. MSP DOS GENES SUPRESSORES DE TUMOR NAS LINHAGENS CELULARES	54
4.2.3.1. Tratamento da linhagem celular KMS-11 com 5-aza-2'-deoxicitidina	55
4.2.4. MSP NOS PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA	57
4.2.4.1. Correlação do padrão de metilação nas diferentes fases da doença	61
4.2.4.2. Correlação do padrão de metilação com as respostas ao Imatinibe	65
4.2.4.3. Correlação do padrão de metilação com os diferentes tratamentos	67
4.2.4.4. Correlação do padrão de metilação com a sobrevida global	69
5. DISCUSSÃO	70
6. CONCLUSÕES	85
7. REFERÊNCIAS	86
ANEXO I. Aprovação do projeto intitulado “Análise do Padrão de metilação de genes envolvidos na patogênese e progressão de leucemias, linfomas e mielomas” pelo Comitê de Ética e Pesquisa.	102
ANEXO II. Características do tratamento de cada paciente com LMC incluído no estudo.	103
ANEXO III. Resultado da metilação dos genes supressores de tumor sob estudo nas diferentes linhagens celulares.	107
ANEXO IV. Coloração de géis de poliacrilamida com Nitrato de Prata	108

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig.1	Formação do cromossomo Philadelphia.	3
Fig.2	Estrutura Molecular dos genes <i>BCR</i> e <i>ABL</i> e dos principais transcritos formados pela fusão destes dois genes.	4
Quadro 1	Cr�terios de Remiss�o na LMC.	5
Fig.3	Mecanismo de a�o do mesilato de Imatinibe.	8
Fig. 4	Representa�o de ilha CpG n�o metilada e dinucleot�deos CpG metilados.	11
Fig. 5	Adi�o do grupamento metil na citosina forma a 5-metilcitosina.	12
Fig. 6	Esquema da metila�o <i>de novo</i> .	13
Fig. 7	Esquema da metila�o de manuten�o.	14
Fig.8	Representa�o das duas hip�teses que tentam explicar a intera�o entre metila�o do DNA e estrutura da cromatina.	16
Fig. 9	Diferen�a no padr�o de metila�o entre c�lulas normais e c�lulas tumorais.	19
Fig. 10	Diferente perfil de metila�o entre leucemias e linfomas.	23
Fig. 11	Diferen�a na estrutura entre citidina, 5-metil-citidina e os inibidores da metila�o azacitidina (5-aza-citidina) e decitabina (5-aza-2'-deoxitidina).	28
Fig. 12	Esquema do tratamento do DNA com bissulfito de s�dio.	37
Fig.13	Exemplo da diferen�a na seq�ncia do DNA ap�s tratamento com bissulfito de s�dio.	38
Fig. 14	Gr�fico representativo da sobrevida global nas diferentes fases ao diagn�stico.	49
Fig. 15	Gr�fico representativo da sobrevida global versus resposta citogen�tica ao Imatinibe.	50
Fig. 16	Rea�o de MSP no promotor do gene <i>p16</i> em doadores sadios de medula �ssea	51
Fig. 17	Eletroferogramas de seq�ncias modificadas com bissulfito de s�dio.	53
Fig. 18	Porcentagem de metila�o dos diferentes genes nas linhagens celulares derivadas de neoplasias hematol�gicas.	54
Fig. 19	Tratamento da linhagem celular KMS-11 com 5-aza-2'-deoxicitidina.	56
Fig. 20	Amplifica�o por RT-PCR qualitativo de cDNAs sintetizados a partir da linhagem KMS-11 ap�s tratamento com diferentes doses de 5-aza-2'-deoxicitidina.	57
Fig. 21	Exemplos de MSP dos genes sob estudo em pacientes com LMC.	58
Fig. 22	Porcentagem de metila�o dos genes supressores de tumor em 80 amostras de pacientes com LMC.	59
Fig. 23	Distribui�o das amostras dos pacientes com LMC baseada na quantidade de genes metilados.	60
Fig. 24	Perfil de metila�o das amostras inclu�das no estudo.	60

Fig. 25	Associação da metilação aberrante entre os diferentes genes.	61
Quadro 2	Distribuição das amostras das diferentes fases da LMC baseada na quantidade de genes metilados.	62
Fig. 26	Diferença no número de genes metilados entre as diferentes fases.	63
Quadro 3	Gráficos representativos da quantidade de amostras metiladas para cada gene nas diferentes fases.	63
Fig. 27	Gráfico representativo da porcentagem de metilação dos 12 genes sob estudo nas diferentes fases.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Genes hipermetilados em diversos tipos de câncer.	21
Tabela 2	Genes freqüentemente metilados nas doenças hematológicas.	22
Tabela 3	Relação da seqüência dos iniciadores e condições de PCR para cada gene estudado.	39
Tabela 4	Características das linhagens utilizadas neste trabalho.	42
Tabela 5	Iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR.	43
Tabela 6	Características clínicas dos pacientes com LMC do estudo ao diagnóstico.	46
Tabela 7	Diferentes tratamentos utilizados nos pacientes com LMC em estudo.	47
Tabela 8	Resposta citogenética ao Imatinibe.	47
Tabela 9	Diferença na resposta citogenética entre pacientes tratados com IFN- α e Imatinibe e pacientes tratados com só com Imatinibe.	48
Tabela 10	Resultados do estado de metilação dos 12 genes supressores de tumor estudados nos controles sadios.	53
Tabela 11	Sensibilidade obtida na reação da M-MSP nos diferentes genes sob estudo.	55
Tabela 12	Relação entre concentrações de 5-aza-2'-deoxicitidina utilizadas e viabilidade celular <i>in vitro</i> , após o tratamento demetilante.	58
Tabela 13	Quantidade de genes metilados por cada fase da LMC.	63
Tabela 14	Associação da metilação de cada gene entre as diferentes fases da LMC.	65
Tabela 15	Comparação das respostas ao Imatinibe entre pacientes que apresentaram amostras metiladas e não metiladas para os genes <i>p15</i> , <i>p73</i> , <i>BNIP-3</i> , <i>MGMT</i> , <i>RAR-β</i> , <i>CDH1</i> , <i>ER</i> , <i>SHP-1</i> , <i>SOCS-1</i> e <i>SYK</i> .	67
Tabela 16	Diferença no perfil de metilação dos genes <i>p16</i> , <i>p15</i> , <i>p73</i> , <i>BNIP-3</i> , <i>MGMT</i> e <i>RAR-β</i> entre as amostras ao diagnóstico e as amostras referentes aos diferentes tipos de tratamento.	69
Tabela 17	Diferença no perfil de metilação dos genes <i>DAP-k</i> , <i>CDH1</i> , <i>ER</i> , <i>SHP-1</i> , <i>SOCS-1</i> e <i>SYK</i> entre as amostras ao diagnóstico e as amostras referentes aos diferentes tipos de tratamento.	69
Tabela 18	Valores da probabilidade dos genes estarem associados com a sobrevida global (em meses) dos pacientes com LMC.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL	Abelson Leukemia Virus
AdoHcy	S-adenosilhomocisteína
AdoMet	S-adenosilmetionina
BCR	Breakpoint Cluster Region
BNIP-3	Bcl-2/Adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3
bp	Pares de bases
BRCA1	Breast cancer 1
CpG	Dinucleotídeo CpG (5'-CpG-3')
DAP-K	Death-associated protein kinase 1
DLI	Infusão de Linfócitos do Doador
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMT	DNA - metiltransferase
CDH1	E-caderina
ER	Estrogen receptor
hMLH1	Mut L homologue 1
IFN- α	Interferon - α
IM	Índice de metilação
JAK	Janus kinase
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LNH	Linfoma não Hodgkin
MGMT	O ⁶ methylguanine-DNA methyltransferase
MO	Medula Óssea
MBD	Domínio de ligação a DNA metilado
MBP	Proteínas ligadoras a DNA metilado
MSP	PCR metilação específica
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Ph	Cromossomo <i>Philadelphia</i>
RAR- β	Retinoic Acid Receptor β

RCC	Resposta citogenética maior completa
RCM	Resposta citogenética maior parcial
RHC	Resposta hematológica completa
RNA	Ácido ribonucléico
SHP-1	SH2-containing Phosphatases 1
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SOCS-1	Supressor of cytokine signaling 1
SP	Sangue Periférico
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SYK	Spleen Tyrosine Kinase
TAE	Tampão 0,04M Tris acetato; 0,002 M EDTA pH 8,5
TBE	Tampão Tris-borato 0,045 M; EDTA 1 mM; pH 8,0
TMO	Transplante de Medula Óssea

RESUMO

Leucemia mielóide crônica (LMC) é uma neoplasia decorrente da expansão clonal de células tronco hematopoiéticas pluripotentes. A característica genética da LMC é a presença da translocação (9;22), formando o cromossomo Filadélfia, que gera o gene de fusão BCR-ABL. A LMC é caracterizada por três fases distintas: crônica, acelerada e crise blástica. O tratamento atual mais utilizado na LMC é o inibidor do BCR-ABL Mesilato de Imatinibe. Porém, vários pacientes tornam-se resistentes a este medicamento, tornando necessária a utilização de outros tipos de drogas. Atualmente, os mecanismos epigenéticos estão sendo relacionados com o início e a progressão de diversos tumores. Por serem alterações reversíveis, tem sido alvo de agentes capazes de restaurar a expressão gênica. Já existem estudos fase I e fase II com agentes demetilantes na LMC. Entretanto, pouco se sabe a respeito do perfil de metilação desta doença. Neste trabalho, analisamos o estado de metilação de 12 genes supressores de tumor por PCR metilação-específico (MSP) após tratamento do DNA com bissulfato de sódio em 70 pacientes com LMC, bem como a associação da metilação destes genes com a resposta ao Imatinibe. Além disso, realizamos ensaios *in vitro* com a droga 5-aza-2'-deoxicitidina e analisamos a relação entre sua ação demetilante e a re-expressão gênica. Nossos resultados mostraram que em 76% dos casos havia pelo menos um gene metilado. Das 80 amostras de pacientes com LMC analisadas, 56% apresentaram metilação no gene *SOCS-1*, 23% em *CDH1*, 20,78% no gene *MGMT*, 15% no *p73*, 11,7% em *ER*, 8% no *p15^{INK4b}*, 6,4% no *BNIP-3*, 3,85% no *RAR-β*, 3,8% no *SHP-1*, 2,6% no *SYK*, e apenas 1,3% no gene *p16^{INK4a}*. Nenhuma amostra apresentou metilação no gene *DAP-k*. Apesar de termos encontrado metilação em todas as fases da doença, não observamos uma diferença significativa no índice de metilação nem com a metilação de algum gene específico entre as fases distintas. A metilação de nenhum dos genes estudados está relacionada com a resposta clínica e citogenética ao Imatinibe, nem com a sobrevida global destes pacientes. Ao realizar os ensaios com a droga 5-aza-2'-deoxicitidina na linhagem celular KMS-11, observamos que a droga foi capaz de reverter o processo de metilação dos genes estudados e restaurar a expressão dos genes anteriormente silenciados pela metilação. Podemos concluir que a metilação do DNA, principalmente do gene *SOCS-1* é um evento freqüente na LMC. Entretanto, não está relacionada com a progressão da doença.

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML) results from the neoplastic transformation of a hematopoietic stem cell. The hallmark genetic abnormality of CML is the presence of the “Philadelphia chromosome”, which results from the t(9;22)(q34;q11) translocation and generates the BCR/ABL fusion gene. The treatment of CML has been revolutionized by Imatinib mesylate, a potent and selective BCR-ABL inhibitor. However, many patients are resistant or intolerant to Imatinib and until now few effective therapeutic options exist for those cases. Epigenetic mechanisms have been associated with development and progression of many kinds of tumor and, as they are reversible, are target for new anti-tumor drugs. There are studies phase I and phase II testing demethylating agents such as Decitabine in CML patients. Nevertheless, there aren't many studies showing the methylation profile of CML. In this present work, we analyzed the methylation status of 12 tumor suppressor genes by MSP after bisulfite treatment in 70 patients with CML, as well as its association with response to Imatinib. Besides, we made *in vitro* studies using the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine and analysed its association with gene reexpression. Our results showed that a total of 76% of samples had at least one gene methylated. Of the 80 samples analysed, 56% showed methylation in *SOCS-1*, 23% in *CDH1*, 20,78% in *MGMT*, 15% in *p73*, 11,7% in *ER*, 8% in *p15^{INK4b}*, 6,4% in *BNIP-3*, 3,85% in *RAR-β*, 3,8% in *SHP-1*, 2,6% in *SYK*, and only 1,3% in *p16^{INK4a}*. None of them showed methylation in *DAP-k*. Despite our findings, we didn't observe any differences on the methylation index nor on the methylation status of a specific gene among the different phases of CML. The methylation status of the studied genes is not related to cytogenetic and clinical response to Imatinib, nor with global survival of CML patients. The results from the tests with 5-aza-2'-deoxycytidine showed that the drug was able to revert the methylation status of the studied genes and to restore their expression. We can conclude that DNA methylation, specially of *SOCS-1*, is a common event on CML. However, it is not related to disease progression.

1. INTRODUÇÃO

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma neoplasia hematológica caracterizada pela proliferação clonal de células mielóides, resultado da transformação maligna de uma célula tronco hematopoiética (Shteper, 2001). Do ponto de vista hematológico, as células neoplásicas mantêm a capacidade de se diferenciar nas linhagens granulocíticas (Thijsen *et al.*, 1999).

Esta neoplasia representa cerca de 14% de todas as leucemias, e 20% das leucemias do adulto (Quintás-Cardana e Cortes, 2006), tendo sua maior incidência na quarta década de vida, mas também podendo afetar crianças e idosos (Morrison, 1994).

Os principais sintomas da LMC são fadiga, rápida perda de peso e anorexia. Porém, a maioria dos pacientes encontra-se assintomática ao diagnóstico, e a doença é detectada por alterações na contagem de leucócitos (leucocitose) e plaquetas (trombocitopenia) no hemograma, e esplenomegalia. A esplenomegalia causada pela hematopoese extramedular pode causar sintomas relacionados com problemas mecânicos, e a alta contagem leucocitária pode levar à leucostase (Savage *et al.*, 1997).

O curso clínico da LMC é caracterizado por estádios hematológicos e temporais diferentes. A LMC pode ser dividida em três fases: crônica, acelerada e crise blástica.

A fase crônica (FC) é a fase inicial e indolente da doença. A maioria dos pacientes (cerca de 90%) é diagnosticada nesta fase. Geralmente, o diagnóstico é feito após exames hematológicos de rotina, pois pacientes com LMC na fase crônica ficam assintomáticos por muito tempo. Quando os sintomas aparecem, eles geralmente estão relacionados com a expansão das células leucêmicas, e consistem em perda de peso, desconforto causado pela esplenomegalia, entre outros (Quintás-Cardana e Cortes, 2006). Por nem sempre apresentar sintomas, esta fase pode ser detectada tardiamente, já em evolução para fases mais avançadas. Os primeiros 18

meses da doença em FC são considerados FC inicial. Após 18 meses, se o paciente ainda estiver em FC, esta é considerada como FC tardia.

Após um período de quatro a seis anos, os pacientes em fase crônica que não foram tratados invariavelmente progridem para uma fase mais agressiva e agudizada da doença, altamente refratária à quimioterapia e rapidamente fatal (Quintás-Cardana e Cortes, 2006). Porém, novos tratamentos têm permitido um estacionamento na fase crônica, impedindo ou demorando a progressão da doença.

O aparecimento da fase acelerada (FA) é marcado clinicamente pelo aumento de células blásticas (15 a 30%) no sangue periférico e medula óssea, presença de mais de 20% de basófilos e eosinófilos circulantes, trombocitopenia (contagem de plaquetas inferior a $100 \times 10^9/L$) não relacionada ao tratamento e aumento progressivo do baço com presença de citopenia. Adicionalmente, esta fase é caracterizada pelo aumento na resistência a diferentes tratamentos (Savage *et al.*, 1997; Kantarjian *et al.*, 1998). A sobrevida média dos pacientes em FA é de 1-2 anos (Cortes e Kantarjian, 2003 *apud* Quintás e Cortes, 2006).

Os critérios clássicos definem a crise blástica (CB) pela presença de pelo menos 30% de blastos no sangue periférico ou medula óssea (Baccarani *et al.*, 2006). Clinicamente, a maioria dos pacientes em CB apresenta sinais e sintomas relacionados ao aumento da carga tumoral, como incapacidade de controlar a contagem de leucócitos mesmo com doses estáveis de medicamento, febre, anorexia, suores noturnos, perda de peso, dor nos ossos, hemorragia e aumento no risco a infecções (Quintás-Cardana e Cortes, 2006). Quase todos os pacientes que entram em crise blástica acabam indo a óbito após alguns meses (cerca de 3 a 6 meses), independente do tratamento utilizado (Shteper e Ben-Yehuda, 2001).

1.1. GENÉTICA DA LMC

A LMC foi a primeira síndrome mieloproliferativa associada a uma alteração cromossômica (Rowley, 1973 *apud* Kantarjian *et al.*, 1993). Em 95% a 98% dos casos, o diagnóstico da LMC é baseado na presença do cromossomo *Philadelphia* (Ph) (Figura 1). O Cromossomo Ph é o resultado de uma translocação recíproca

entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 [t(9;22)(q34;q11)], gerando dois cromossomos derivados: Chr 22q⁻ (Ph) e o Chr 9q⁺. Essa translocação funde um segmento do gene *BCR* (*Breakpoint Cluster Region*) do cromossomo 22 a uma região anterior ao segundo éxon do gene *ABL* (*Abelson tyrosine kinase*) do cromossomo 9 (O'Dwyer, 2002). O produto da fusão dos genes forma um gene quimérico denominado *BCR/ABL*, que codifica uma proteína híbrida com atividade tirosina quinase constitutiva, responsável pela transformação maligna das células, levando ao desenvolvimento da LMC e, em alguns casos, a leucemia linfocítica aguda (LLA) (Kelliher *et al.*, 1990; Schindler *et al.*, 2000).

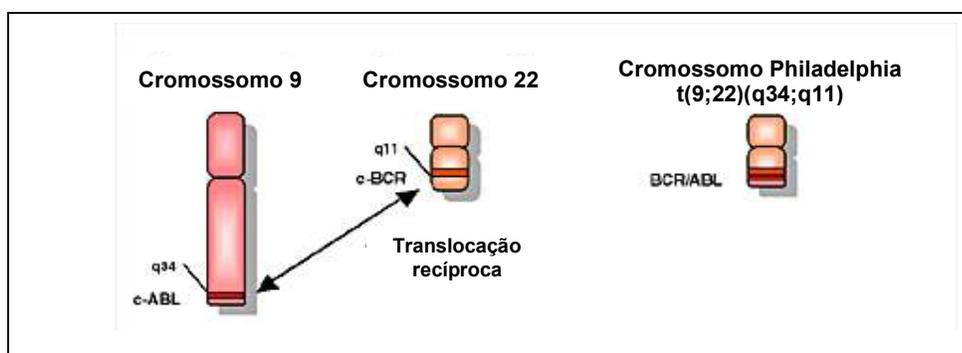


Figura 1. Formação do cromossomo Philadelphia. Uma translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 origina um cromossomo 22 mais encurtado, conhecido como cromossomo *Philadelphia*. Esta translocação gera um gene híbrido de fusão, o *BCR/ABL*. **Fonte:** www.medscape.com/viewarticle/416483_2

A identificação do cromossomo *Philadelphia* é realizada através do exame citogenético que revela tal alteração em 95% dos pacientes com diagnóstico clínico de LMC. Nos outros 5%, quando não se têm amostras de boa qualidade e o cromossomo *Philadelphia* não pode ser identificado, são utilizadas técnicas citomoleculares para identificação do gene quimérico *BCR/ABL*, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Hibridização “*in situ*” fluorescente (FISH).

Podem ocorrer quebras em regiões distintas dos genes *BCR* e *ABL*, originando genes quiméricos diferentes e, conseqüentemente, transcritos e proteínas quiméricas diferentes. No cromossomo 22, o ponto de quebra pode estar na região m-bcr (*minor break point cluster region*), resultando na fusão do primeiro éxon deste gene (e1) com o segundo éxon do gene *ABL* (a2), originando o transcrito e1a2, o qual codifica uma proteína híbrida de 190 kDa (P190). Por outro lado, a quebra do gene *BCR* pode ocorrer na região localizada na porção central do gene

chamada M-bcr (*major break point cluster region*). O ponto exato da quebra varia de um indivíduo a outro, ocorrendo geralmente no segundo (*b2*) ou terceiro éxon (*b3*). Essa translocação resulta em um transcrito uniforme de 8,5 kb constituído dos éxons 2 ou 3 do gene da região M-bcr fundidos ao éxon 2 do *ABL* (*a2*), chamadas translocações *b2a2* ou *b3a2*, respectivamente. Ambos codificam uma proteína de 210 kDa (P210). Ainda existe um outro tipo de quebra, porém menos comum, na região μ -bcr, a qual resulta na fusão do éxon 19 (*e19*) do *BCR* com o éxon 2 do *ABL*, gerando o transcrito *e19a2*. Este codifica uma proteína de 230 kDa (P230) (Shteper e Ben-Yehuda, 2001; Figura 2). Na LMC, a grande maioria das translocações ocorre na região M-bcr (Laurent *et al.*, 2001). Os raros casos da expressão única da P190 ou P230 na LMC estão associados com monocitose e leucemia neutrofílica crônica, respectivamente (Shteper e Ben-Yehuda, 2001).

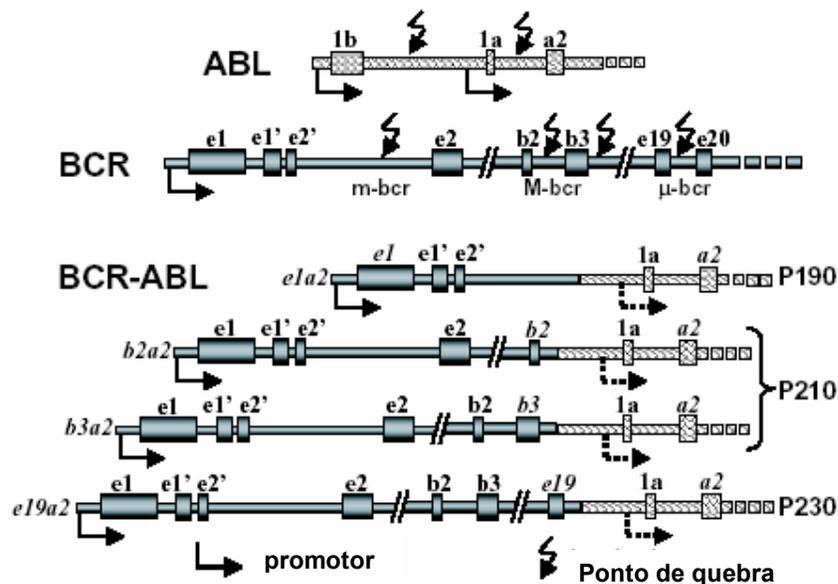


Figura 2. Estrutura Molecular dos genes *BCR* e *ABL* e dos principais transcritos formados pela fusão destes dois genes. Dependendo do ponto de quebra no cromossomo 22, pelo menos quatro transcritos diferentes do *BCR/ABL* podem ser formados: e1a2, b2a2, b3a2 e e19a2. Os mais freqüentes na LMC são b2a2 e b3a2. Fonte: *Cancer Biology* vol 11, 2001.

Embora os mecanismos moleculares responsáveis pela transição de fase crônica para crise blástica não sejam totalmente conhecidos, a aparição de alterações cromossômicas recorrentes adicionais na CB sugere fortemente a intervenção de eventos genéticos subjacentes. Estas alterações incluem o ganho de um segundo cromossomo *Philadelphia*, trissomia do cromossomo 8, trissomia do

cromossomo 9, isocromossomo 17, 22q- e, mais raramente, inv(3), t(3;3), t(3;21), inv(16) e t(15;17) (Nowicki *et al.*, 2003).

1.2. ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO NA LMC

A detecção da resposta ao tratamento pode ser estabelecida em diferentes níveis de sensibilidade: análise morfológica (clínica/hematológica - 10^{-2}), citogenética (10^{-2}) e molecular (10^{-6}). A rotina de acompanhamento das respostas hematológica, citogenética e molecular são de extrema importância, pois permite avaliar a eficácia do tratamento no paciente e a reorientação terapêutica em pacientes não respondedores a um determinado medicamento. Os critérios de remissão hematológica, citogenética e molecular estão resumidos no Quadro 1.

Quadro 1. Critérios de Remissão na LMC. Fonte: Baccarani *et al.*, 2006.

Resposta		Critérios	
Resposta hematológica	Completa	Normalização da leucometria $< 10 \times 10^9/L$ Normalização da plaquetometria $< 450 \times 10^9/L$ Diferencial sem granulócitos imaturos Nenhuma evidência de doença extramedular Desaparecimento de todos sinais e sintomas de doença	
	Parcial	Normalização da leucometria com esplenomegalia persistente ou células periféricas imaturas ou trombocitose $< 50\%$ do pré-tratamento	
Resposta citogenética	Maior	Completa	0% de metáfases c/ cromossomo Ph+
		Parcial	1% a 35% de metáfases c/ cromossomo Ph+
	Menor	36% a 65% de metáfases c/ cromossomo Ph+	
	Mínima	66% a 95% de metáfases c/ cromossomo Ph+	
	Nenhuma	$> 95\%$ de metáfases c/ cromossomo Ph+	
Resposta citogenética maior $\Rightarrow < 35\%$ de metáfases com cromossomo Ph+			
Resposta Molecular	Maior	Diminuição ≥ 3 logs de acordo com a linha de base (em unidades internacionais)	
	Completa	PCR para BCR-ABL negativo na sensibilidade de 10^{-6}	

A primeira droga descrita a ser usada no tratamento da LMC foi o arsênico (Forkner e Scott, 1931 *apud* Hehlmann *et al.*, 2005). Nas décadas seguintes, o tratamento da LMC foi meramente paliativo, e era baseado em drogas citostáticas, como o Bussulfan 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.

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 alogênico (alo-TMO), introduzido na década de 1970 (Hehlmann *et al.*, 2005), 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 recaída da doença representa a causa principal de falha do tratamento. Os pacientes que recaem depois do alo-TMO podem ser re-induzidos para segundas remissões duradouras com estratégias terapêuticas distintas, que incluem infusões de linfócitos do doador (DLI), 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 *apud* 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).

Outra modalidade terapêutica da LMC é o tratamento com IFN- α , principalmente em terapia combinada com hidroxiuréia ou baixas doses de citarabina (ara-C). Neste caso, a citogenética é o principal parâmetro de resposta estabelecido para estes pacientes. Cerca de 40% dos pacientes tratados com IFN- α atingem resposta citogenética maior parcial (RCM), enquanto quase 25% atingem resposta citogenética maior completa (RCC) (Kantarjian *et al.*, 1995 *apud* Quintás-Cardama e Cortes, 2006). A proporção de pacientes refratários ao IFN- α é alta, apenas cerca de 10-20% dos casos respondem ao tratamento. Além disso, este medicamento causa efeitos colaterais severos, e comprometem a qualidade de vida do paciente. Entretanto, os pacientes que alcançam a resposta citogenética completa apresentam uma mediana de sobrevida livre de doença longa (10 anos) (Hehlmann *et al.*, 2005). Vale ressaltar que mesmo tendo atingido a resposta citogenética maior completa, a maioria desses pacientes apresenta positividade para o gene de fusão BCR/ABL quando avaliados por RT-PCR.

Nos últimos anos, as pesquisas por novos medicamentos começaram a se focar nos mecanismos moleculares envolvidos nas neoplasias. A capacidade da proteína quimérica Bcr/Abl de produzir doenças como a leucemia mielóide crônica (LMC) foi comprovada em modelos animais (Daley *et al.*, 1990, Kelliher *et al.*, 1990). Este fato estimulou o desenvolvimento e teste de inibidores da atividade quinase, entre eles o fármaco Mesilato de Imatinibe (STI571 ou Glivec®). O Imatinibe é utilizado para o tratamento da leucemia mielóide crônica em todos os estádios da doença (Druker, 2002). Seu mecanismo de ação está baseado na inibição do sítio de ligação ao ATP, pois ele atua bloqueando a ligação do ATP no domínio quinase (Figura 3).

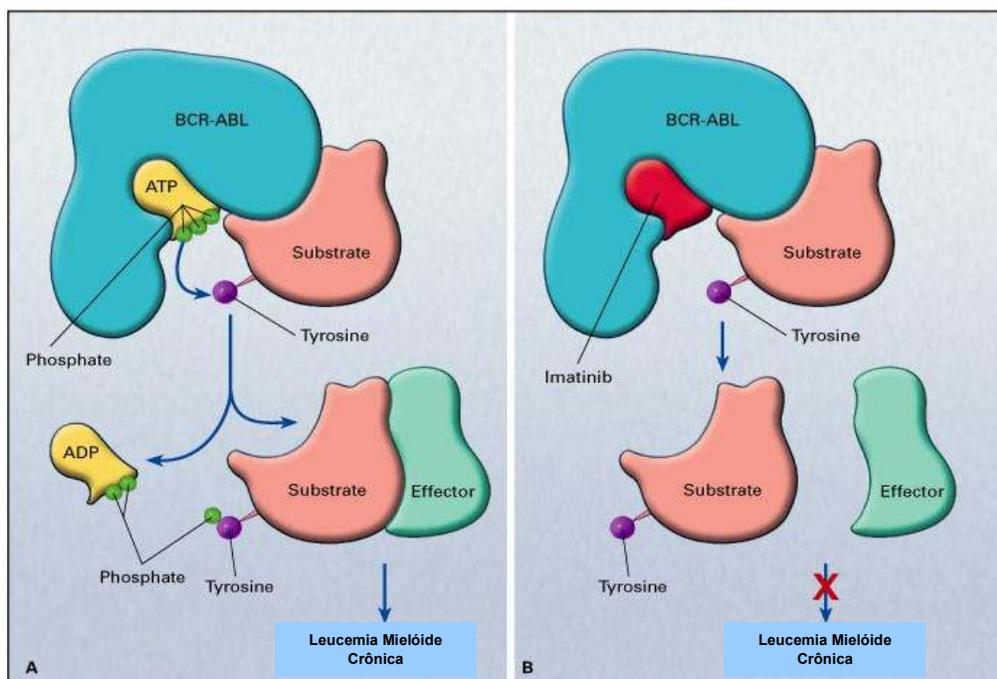


Figura 3. Mecanismo de ação do mesilato de Imatinibe. O Imatinibe (em vermelho no quadro da direita) atua ligando-se ao sítio específico de ligação do ATP no domínio quinase da proteína quimérica Bcr/Abl, impedindo a ativação de proteínas que atuam nas vias de proliferação do clone maligno. **Fonte:** *New England Journal of Medicine* vol 346, 2002.

Esta droga modificou o paradigma do tratamento da LMC, assim como de outras doenças como o tumor gastrointestinal (GIST). Suas vantagens em relação aos outros tipos de tratamentos são: poucos efeitos colaterais, não tem risco de mortalidade associado ao tratamento, apresenta grande eficácia e é um medicamento simples de ser administrado (por comprimido). Quando comparado ao IFN- α , o Imatinibe apresenta uma eficácia maior, apresentando uma taxa de resposta hematológica completa de 95% versus 55%, uma taxa de resposta citogenética completa de 76% versus 15% e uma taxa de resposta molecular de 40% versus 2% no 12º mês de tratamento (Baccarani *et al.*, 2006).

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.*, 2002). 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.

Alguns pacientes tornam-se resistentes ao Imatinibe, ou seja, as células leucêmicas tornam-se insensíveis à sua ação inibidora. Existem dois tipos de resistência: a) primária, referente aos pacientes que nunca obtiveram resposta ao Imatinibe. Menos de 5% dos pacientes em FC apresentam resistência primária hematológica ao Imatinibe, contudo cerca de 30% destes apresentam resistência citogenética, isto é, não atingem resposta citogenética maior parcial dentro do primeiro ano de tratamento. A resistência primária é mais comum em pacientes em FA e CB do que nos pacientes em FC (Sawyers e Shah, 2003); b) secundária, referente aos pacientes que apresentam uma resposta inicial ao Imatinibe, mas que depois param de responder durante o tratamento (Quintás-Cardama e Cortes, 2006). Pacientes com estágio avançado ou crise blástica apresentam, em 60% dos casos, desenvolvimento de resistência ao Imatinibe com o tratamento continuado (Sawyers et al., 2002; von Bubnoff et al., 2002; Gorre et al., 2001). Na maioria das vezes este tipo de resistência adquirida é causada por mutações pontuais na proteína quimérica Bcr/Abl, principalmente no sítio de ligação com o fármaco (Tauchi e Ohyashiki, 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 testadas nos pacientes resistentes a este medicamento. Outros medicamentos como Bosutinibe (SKI-606) e MK0457 também estão sendo testadas em pacientes resistentes ao Imatinibe.

Outros tipos de drogas, como agentes desmetilantes, estão sendo testados para o uso em pacientes resistentes ao Imatinibe. Devido ao fato de que os agentes desmetilantes e o Imatinibe apresentam mecanismos de ação diferentes, está sendo proposto o uso de agentes desmetilantes nos pacientes com LMC resistentes/intolerantes ao Imatinibe (Kantarjian *et al.*, 2003; Issa *et al.*, 2005). Nos últimos anos, múltiplos estudos Fase I e Fase II utilizando a Azacitidina (5-azacitidina) ou Decitabina (5-aza-2'-deoxicidina) como monoterapia ou combinada com outros agentes estão sendo realizados em pacientes com Síndrome Mielodisplásica (SMD), Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e LMC (Fonte: National Health Institute, USA, <http://www.clinicaltrials.gov/ct>).

1.3. METILAÇÃO DO DNA COMO PROCESSO EPIGENÉTICO

Enquanto existe um conhecimento considerável sobre as alterações genéticas e cromossômicas envolvidas na patogênese da LMC, e sobre tratamentos tendo como alvo estas alterações, o mesmo não acontece em relação à presença de modificações epigenéticas na doença, assim como a sua associação com parâmetros clínicos, o seu valor prognóstico, sua relação com as fases da doença e com novas formas de tratamento.

As alterações epigenéticas são modificações caracterizadas pela alteração na estrutura da cromatina, porém não afetam a seqüência dos nucleotídeos e são herdáveis no genoma durante a divisão celular (Momparker, 2003). Como não alteram a seqüência do DNA, estas alterações podem ser reversíveis (Feinberg, 2004). A metilação do DNA e a desacetilação de histonas são exemplos de mecanismos epigenéticos.

Em 1948, foi descoberta a “quinta base” do DNA, a 5-metilcitosina (Weissbach, 1993). A 5-metilcitosina (5-mC) é uma citosina metilada, isto é, tem um grupamento metil adicionado ao carbono 5 do seu anel. Porém, nem toda citosina presente no genoma pode ser metilada. Para que ocorra o processo de metilação é necessário que a citosina esteja na seqüência 5'- CG - 3', conhecido como dinucleotídeo CpG (Singal e Ginder, 1999). Os dinucleotídeos CpG estão distribuídos heterogeneamente no genoma, encontrando-se principalmente em regiões de DNA altamente repetitivo e heterocromatina (Fazzari e Greally, 2004), e na maioria das vezes (cerca de 80%) estão altamente metilados. No entanto, existem regiões no genoma ricos em CpG, que normalmente não estão metilados ou estão metilados em baixa freqüência. Trata-se de pequenas regiões do DNA variando entre 0,5 a 5 Kb, ocorrendo em média a cada 100Kb, conhecidas como Ilhas CpG (Figura 4). Em 1987, Gardiner-Garden e Frommer determinaram que uma ilha CpG apresenta em média um tamanho de 200bp, contendo mais de 50% de GC e uma proporção de CpG observada/esperada maior ou igual a 0,6. Normalmente são encontradas nas extremidades 5' dos genes, em geral na região promotora, freqüentemente estendendo-se para o interior do primeiro éxon. Entretanto, nem

todas as ilhas CpG estão nas regiões promotoras, e algumas podem ser encontradas dentro de éxons e íntrons (Rush e Plass, 2002).

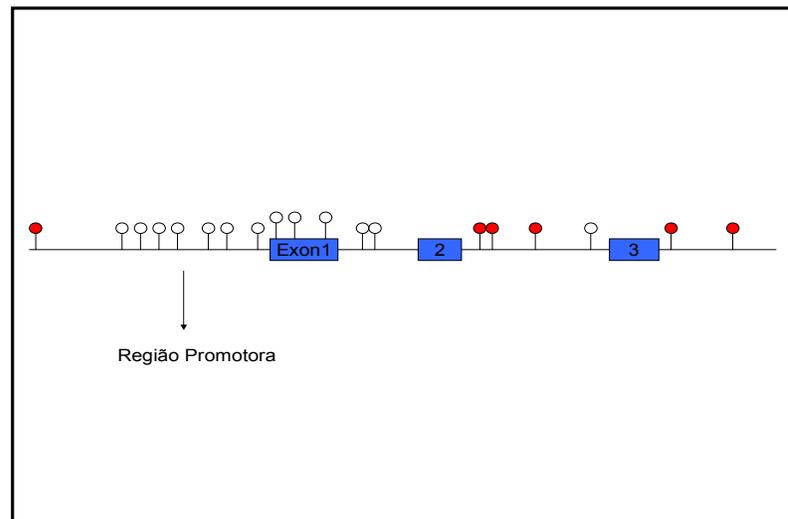


Figura 4. Representação de ilha CpG não metilada e dinucleotídeos CpG metilados. As ilhas CpG são encontradas principalmente na região promotora dos genes. Os CpGs encontrados nas ilhas CpGs estão freqüentemente não metilados (representados pelos círculos vazios). Os dinucleotídeos CpG dispersos pelo genoma normalmente encontram-se metilados (representados pelos círculos vermelhos).

1.3.1. Processo de metilação

O processo de metilação é catalisado por uma família de enzimas denominadas DNA-metiltransferases (DNA-MTases). Para as DNA-MTases transferirem um grupamento metil para o carbono 5 do anel da citosina, ela precisa de um doador de metil, o S-adenosilmetionina (AdoMet). A DNA-MTase catalisa a transferência do metil do AdoMet para o DNA resultando em um DNA metilado e em uma S-adenosilhomocisteína (AdoHcy), produto do AdoMet sem o metil (Wu e Santi 1985; Cheng e Roberts, 2001) (figura 5).

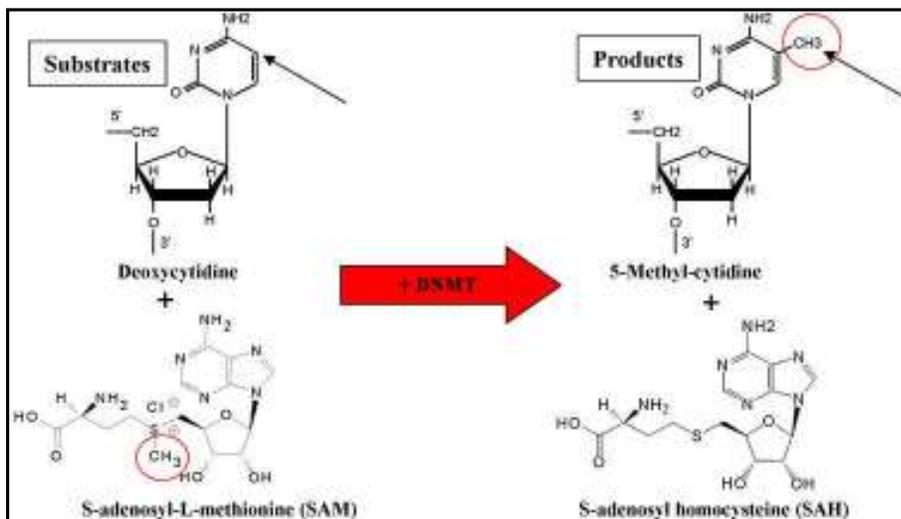


Figura 5. Adição do grupamento metil na citosina forma a 5-metilcitosina. O processo de metilação do DNA ocorre através da adição de um grupamento metil (CH_3) no carbono 5 da citosina que está no contexto 5'-CpG-3'. Este processo é catalisado por enzimas DNA-metiltransferases, que transferem o CH_3 do doador (S-adenosil-L-metionina) para a citosina. DNMT, DNA-Metiltransferase. **Fonte:** www.med.ufl.edu/biochem/keithr/fig1pt1.html

Em 1964, Gold e Hurwitz (apud Bestor, 2000) identificaram a primeira DNA metiltransferase em *Escherichia coli*. Hoje já são conhecidas metiltransferases em diversos organismos, desde procaríotos ao homem, excluindo algumas linhagens de levedura. A primeira DNA-MTase descoberta em mamíferos foi denominada DNMT1. Hoje existem mais três DNMTs descritas em mamíferos, DNMT2, DNMT3a e DNMT3b (Bestor, 2000).

A DNMT1 de vertebrados é a principal ativadora enzimática responsável pela metilação de manutenção do DNA a partir de uma fita molde em células somáticas. Como achava-se que a DNMT1 era uma metiltransferase semi-conservativa que só poderia copiar padrões de metilação, mas não poderia introduzir nova metilação ao DNA, foi sugerido que outras metiltransferases deveriam existir para realizar a metilação em DNA não metilado. Já foram descritas duas DNA-MTases responsáveis pela metilação em DNA não metilado em mamíferos, DNMT3a e DNMT3b (Szyf, 2003). Diferente da DNMT1, as DNMT3a e DNMT3b não mostram preferência para sítios hemimetilados, daí sua associação com metilação *de novo*.

Existem dois mecanismos diferentes de metilação dentro da célula:

- 1) Metilação *de novo* – ocorre quando citosinas anteriormente não metiladas tornam-se metiladas. De maneira geral, o processo de metilação *de novo* é catalisado pelas enzimas DNMT3a e DNMT3b (figura 6). Foi proposto que a

metilação *de novo* teria um papel importante no silenciamento de DNAs externos integrados (Doerfler et al., 1997);

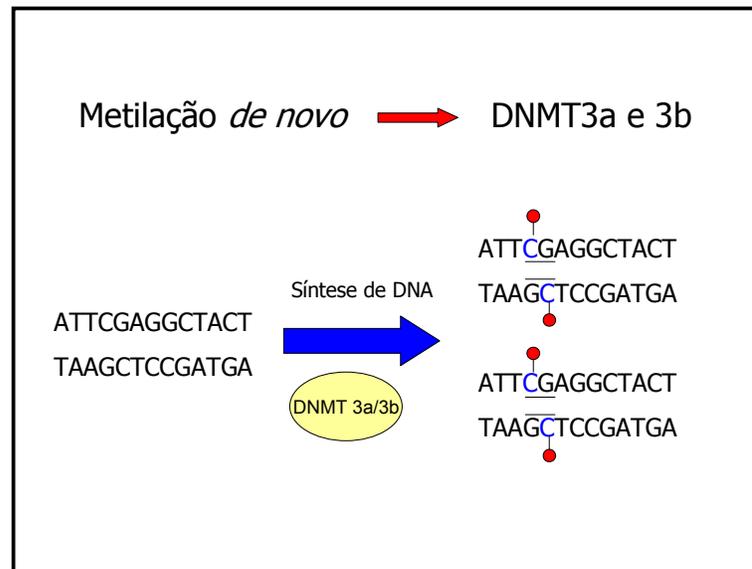


Figura 6. Esquema da metilação *de novo*. O processo de metilação *de novo* ocorre em seqüências do DNA previamente não metiladas. De maneira geral, as enzimas catalisadoras da adição do grupamento metil na citosina são as DNMT3a ou DNMT3b. DNMT, DNA-metiltransferases; grupamento metil está representado pelo círculo preenchido em vermelho; as citosinas capazes de serem metiladas estão representadas em azul.

- 2) Metilação de manutenção - de acordo com o modelo proposto por Razin e Riggs (1980), a metilação de manutenção é responsável pela cópia dos padrões de metilação do DNA durante a divisão celular, tendo preferência por DNA hemimetilado. Assim, quando uma nova seqüência CpG é gerada pela replicação do DNA, um sítio hemimetilado é formado se o CpG da fita parental estiver metilado, servindo como substrato para a DNA-MTase. A principal enzima responsável pela metilação de manutenção é a DNMT1 (Figura 7).

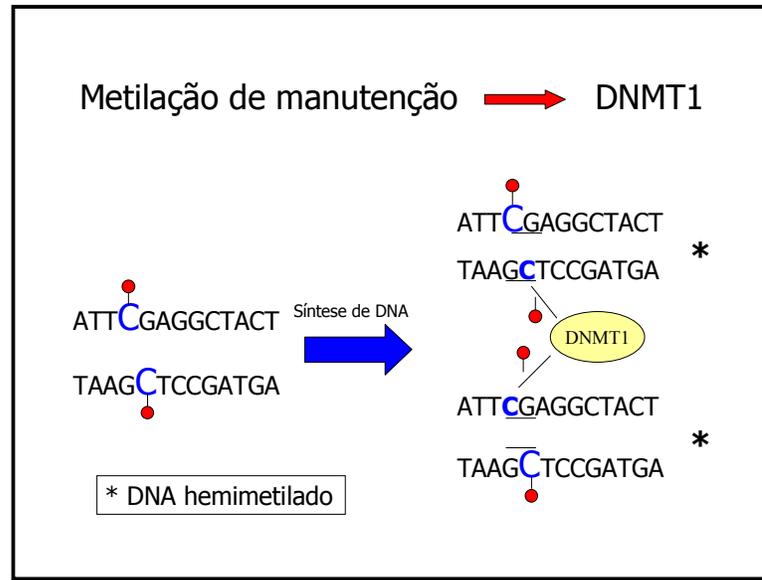


Figura 7. Esquema da metilação de manutenção. O processo de metilação de manutenção é responsável pela cópia dos padrões de metilação do DNA durante a divisão celular, tendo uma preferência por DNA hemimetilado (representado por *). A principal enzima catalisadora deste tipo de metilação é a DNMT1. DNMT, DNA-metiltransferases; DNA hemimetilado, quando uma das fitas do DNA, durante a replicação, encontra-se metilada e a outra não; a bolinha vermelha representa o grupamento metil; o C em azul representa as citosinas metiladas.

Szyf e colaboradores (1985) propõem que o estado de metilação do DNA é um equilíbrio de reações entre metiltransferases e demetilases, e a direção do equilíbrio é determinada pela estrutura da cromatina.

Existem dois processos de demetilação que podem ocorrer normalmente dentro de uma célula:

- 1) Demetilação passiva - ocorre uma perda da metilação quando a atividade da metilação de manutenção é suprimida no decorrer de rodadas de replicação do DNA ou quando a metiltransferase é impedida de interagir com seu substrato durante a divisão celular (Razin e Riggs, 1980).
- 2) Demetilação ativa - ocorre uma perda da metilação por via enzimática na ausência de replicação do DNA. Existem duas hipóteses para demetilação ativa: a primeira diz que uma reação que realmente revertesse a metilação do DNA envolveria a clivagem da ligação entre o resíduo metil e o anel da citosina, liberação do metil como um composto de monocarbono e regeneração da citosina com a adição de um hidrogênio na posição onde estava o grupamento metil. A segunda propõe um modelo que explicaria a perda da metilação pela retirada da citosina metilada por uma glicosilase, a qual clivaria a ligação entre

a base da metilcitosina e a desoxiribose, deixando um nucleotídeo sem base no DNA. O sítio sem a base seria reparado por um mecanismo de reparo de bases do DNA (Szyf, 2003).

As demetilases seriam enzimas responsáveis por um dos processos de demetilação ativa. Szyf (2003) sugere que a hipermetilação de um gene deve ser consequência de uma inibição regional de demetilases por proteínas que alteram a estrutura da cromatina, sendo que um dos novos mecanismos propostos para que a estrutura da cromatina defina os padrões de metilação do DNA é pela permissão do acesso de demetilases ao DNA metilado. Cromatina ativa recruta demetilases enquanto cromatina inativa recruta DNMTs. Isso explicaria o fato de haver hipermetilação na presença demetilases ativas, pois na cromatina inativa, onde os genes estão hipermetilados, a demetilase não consegue agir.

Um fato intrigante é a presença, na mesma célula, de processos de hipermetilação e hipometilação. A partir daí observaram que existe uma forte ligação entre o estado de metilação do DNA e a estrutura da cromatina. Foi visto que cromatina inativa tinha DNA hipermetilado, enquanto a cromatina ativa estava associada com DNA hipometilado (Razin e Cedar, 1977, apud Szyf 2003). A hipótese ligando estrutura da cromatina e metilação do DNA também significa que, uma vez sendo dinâmica a estrutura da cromatina, também o é o padrão de metilação do DNA. Portanto, a metilação do DNA não é um processo irreversível.

Há uma relação estreita entre metilação do DNA e acetilação de histonas com a conformação da cromatina. Existem duas hipóteses que tentam explicar a interação entre metilação do DNA, desacetilação de histonas e estrutura da cromatina (Szyf, 2003b) (figura 8):

- 1) Metilação causa mudança na estrutura da cromatina - um determinado gene sofre metilação *de novo*. A metilação do DNA leva à ligação de proteínas que se ligam a DNA metilado neste gene. Uma vez ligadas ao DNA, estas proteínas recrutam deacetilases e metiltransferases de histonas. A desacetilação e metilação das histonas levam à inativação da cromatina e silenciamento gênico.
- 2) Mudança na estrutura da cromatina causa metilação - um repressor *trans*-atuante interage com um determinado gene. Este repressor recruta deacetilases e metiltransferases de histonas resultando na inativação da cromatina. As deacetilases e metiltransferases de histonas, por sua vez, recrutam DNA metiltransferases resultando em metilação *de novo* do gene.

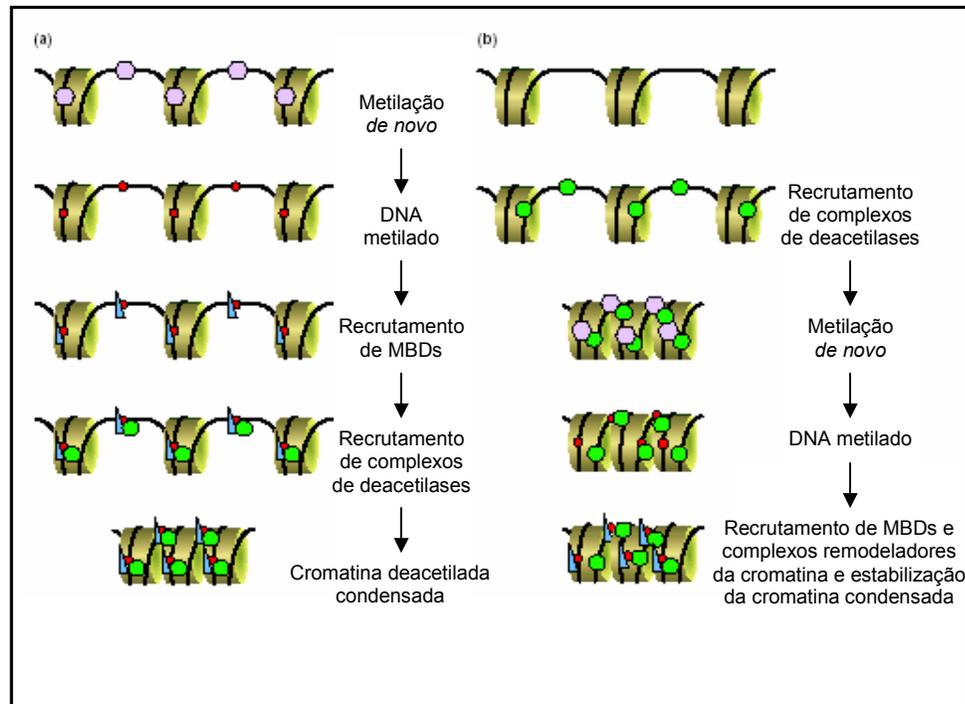


Figura 8. Representação das duas hipóteses que tentam explicar a interação entre metilação do DNA e estrutura da cromatina. DNA está representado pela linha preta em volta das histonas; a) metilação é a causadora da mudança na estrutura da cromatina pelo recrutamento de deacetilases de histonas. b) cromatina determina o estado de metilação. MBDs, domínios de ligação à metilcitosina; círculos preenchidos com lilás: metilação *de novo*; círculos preenchidos com vermelho: citosina metilada; triângulos azuis: proteínas MBDs; círculos preenchidos com verde: complexos de deacetilases. Adaptado de Newell-Price *et al.*, TEM vol 11, 2000.

Atualmente, está bem entendido que a maquinaria da metilação do DNA deve incluir um certo número de DNA-MTases, proteínas que dirigem as DNA-MTases para promotores específicos, demetilases e enzimas modificadoras de histonas e da cromatina.

1.3.2. Funções da Metilação

A função da 5-metilcitosina nos procarionotos é bem conhecida, já que ela forma a base do sistema que protege a bactéria do DNA externo. O sistema bacteriano de restrição/modificação faz uso da metilação para marcar o DNA próprio. Enzimas de restrição bacterianas checam essa marcação em todo DNA da célula, e qualquer seqüência que não tenha o padrão correto de metilação será clivada. Desta forma, a maioria do DNA externo será identificado e degradado antes de ser expresso (Bickle e Kruger, 1993).

Em eucariotos, a função da 5-metilcitosina é, de certa forma, mais complexa. Em contraste com o DNA bacteriano, onde quase todos os sítios metiláveis estão metilados, apenas uma fração dos CpGs está metilada nos eucariotos (Szyf, 2003).

Alguns estudos realizados na década de 1980 revelaram que regiões regulatórias de genes inativos estão freqüentemente metiladas (Razin e Riggs, 1980). Este fato levou à hipótese de que a metilação do DNA está envolvida com o silenciamento da expressão gênica (Razin, 1998; Razin e Shemer, 1999). Na verdade, existem dois modelos que tentam explicar a principal função da metilação do DNA nas células animais. O modelo de defesa do hospedeiro diz que a principal função da metilação do DNA nas células animais é conferir uma maneira de proteção ao genoma controlando a dispersão de transposons (Yoder et al., 1997). O modelo de regulação gênica diz que a função da metilação é o silenciamento da transcrição de genes que não precisam ser expressos em uma determinada célula, reduzindo o ruído da transcrição (Bird, 1995).

Nos mamíferos, a metilação do DNA é essencial para o desenvolvimento embrionário, uma vez que este mecanismo epigenético é necessário para a viabilidade do embrião. Após a fertilização, há uma onda de reorganização da maquinaria epigenética (Feinberg, 2004). O processo durante o desenvolvimento embrionário envolve metilação *de novo*, metilação de manutenção e demetilação. Além disso, a metilação desempenha papéis importantes na inativação do cromossomo X no sexo homogamético, na proteção do genoma contra seqüências de DNA invasivos, no imprinting parental, na compartimentalização do genoma em regiões ativas e condensadas, na inativação de oncogenes e na repressão da expressão de genes supressores de tumor no câncer (Turker e Bestor, 1997; Newell-Price et al., 2000). Regiões intergênicas, que consistem predominantemente em elementos de seqüência repetida, também são altamente metiladas na maioria dos tecidos. A metilação não desempenha somente uma função na célula, mas está claro que seu papel principal é o silenciamento gênico, por não permitir que os genes metilados sejam transcritos.

A metilação do DNA exerce um papel importante na manutenção da repressão da transcrição, e pode atuar evitando que fatores de transcrição liguem-se nos seus sítios específicos na região promotora ou favorecendo a ligação de alguns repressores transcricionais. Além de evitar a ligação direta de fatores de transcrição, a metilação auxilia a cromatina a ficar no seu estado inativo.

Hoje está claro que a metilação do DNA é uma das facetas de um sistema múltiplo e complexo que envolve metilação, acetilação e desacetilação de histonas, recrutamento de complexos co-repressores e mudanças na estrutura da cromatina. Entender os mecanismos que ligam todas essas facetas é de extrema importância para desvendar os papéis do padrão de metilação em tecidos normais, possíveis alterações no padrão de metilação durante a vida, durante o processo de envelhecimento e no câncer.

1.3.3. Metilação e câncer

Durante décadas houve uma discussão se a origem e progressão do câncer eram causadas por eventos genéticos ou epigenéticos. Múltiplas evidências obtidas nas décadas 80 e 90, sugerindo que as alterações genéticas estavam envolvidas no surgimento do câncer, levaram a uma diminuição no interesse dos eventos epigenéticos. Esta situação mudou de forma considerável nos últimos dez anos, quando novos achados em relação ao papel das alterações epigenéticas no silenciamento gênico em células cancerosas foram sendo publicados (Jones e Laird, 1999; Baylin e Herman, 2000; Jones e Baylin, 2002). Hoje em dia, a hipótese de que os eventos genéticos somam-se aos epigenéticos na origem e progressão do câncer está sendo bem aceita, uma vez que os modelos genéticos e epigenéticos do câncer não se contradizem, complementam-se.

Após a descoberta de que a metilação do DNA estava relacionada com o silenciamento gênico, foi proposto que a relação da metilação com o câncer estava baseada na hipometilação dos oncogenes (Feinberg e Vogelstein, 1983 apud Szyf, 2003). Na década de 1990 surgiram novas evidências de que o câncer estaria relacionado com a inativação de genes supressores de tumor através da hipermetilação do DNA. Vários estudos seguintes sugeriram aberrações na atividade das DNA-MTases em células tumorais (Laird et al., 1995; Baylin et al., 1998; Laird e Jaenisch, 1996), corroborando com a hipótese de que a hipermetilação de genes supressores de tumor estaria relacionada com o câncer.

Nos tecidos normais, as regiões promotoras dos genes encontram-se frequentemente hipometiladas, enquanto há uma hipermetilação nos CpGs dispersos pelo genoma. Em geral, DNA de tumores apresenta níveis reduzidos de metilação em comparação ao tecido normal (Szyf, 2003). Nas células tumorais, é

encontrada hipermetilação das regiões promotoras dos genes, ricas em ilhas CpG, e hipometilação global (figura 9). A hipometilação global em tumores abrange extensas regiões do genoma e ocorre principalmente nas seqüências de dinucleotídeo CpG dispersas pelo genoma, localizadas nas seqüências de DNA repetitivo e regiões intergênicas. Este estado hipometilado pode contribuir ao fenótipo maligno afetando a estabilidade funcional dos cromossomos, a reativação dos elementos transponíveis do genoma e a perda dos padrões normais de *imprinting* parental (Ehrlich, 2002). A demetilação em grande escala no genoma pode favorecer a recombinação mitótica com a conseqüente perda de heteroziguidade e promover rearranjos cromossômicos. Além disso, a hipometilação nas regiões centroméricas pode contribuir à aneuploidia em células malignas (Gaudet *et al.*, 2003).

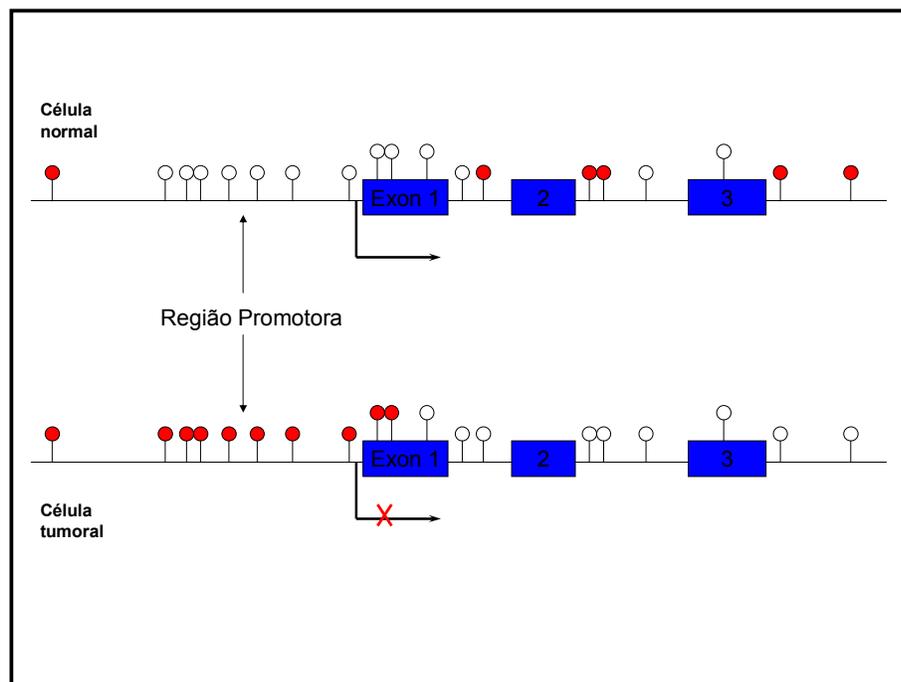


Figura 9. Diferença no padrão de metilação entre células normais e células tumorais. Nas células normais, os CpGs da ilha CpG localizada na região promotora do gene encontram-se hipometilados (círculos brancos), enquanto os CpGs dispersos pelo genoma encontram-se metilados (círculos vermelhos). Nas células tumorais, os CpGs dispersos pelo genoma encontram-se hipometilados (círculos brancos), enquanto a região promotora encontra-se densamente metilada (círculos vermelhos). Neste caso, os fatores de transcrição, os co-ativadores e as acetilases de histonas não são capazes de interagir com a região promotora, e o gene não é transcrito.

Um dos paradoxos da metilação do DNA é a co-existência da hipometilação global e da hipermetilação regional dentro da mesma célula. O simples fato destes dois processos ocorrerem simultaneamente e de maneira independente sugere que

o padrão de metilação do DNA é determinado por múltiplos fatores (Szyf, 2003). O fato da hipometilação global e a hipermetilação regional visarem CpGs em contextos distintos sugere que fatores diferentes são responsáveis pelo controle do estado de metilação em ilhas CpG e nos CpGs distribuídos esparsamente pelo genoma. Existem hipóteses de que a hipometilação global é um resultado do aumento da atividade demetilase nas células tumorais (Szyf, 2003).

O gene *Rb1* foi o primeiro gene supressor de tumor no qual a hipermetilação das ilhas CpG foi detectada (Sakai et al., 1991). Logo surgiram estudos com o gene da calcitonina em amostras primárias de câncer de pulmão e linfomas, mostrando que este gene estava hipermetilado (Baylin et al., 1986 apud Ramsahoye et al., 1996) nestes tipos de câncer.

Estudos realizados com tumores de cérebro, de cólon e leucemia mielóide aguda mostraram altos níveis de metilação nas regiões promotoras dos genes, enquanto tumores testiculares e de mama apresentaram níveis relativamente baixos de metilação na região promotora (Szyf, 2003).

Um estudo realizado por Esteller e colaboradores (2001) abordou a hipermetilação de vários genes em diferentes tipos de tumor, visando a obtenção de um “mapa” desta alteração na transformação maligna. Um total de 12 genes supressores de tumor foi estudado em 15 tipos de tumores primários. Seus resultados mostraram que pelo menos um gene estava hipermetilado em cada um dos tipos de tumor. Entretanto, o perfil de hipermetilação dos genes estudados diferiu para cada tipo de câncer, indicando a existência de um padrão de metilação gene-específico para cada tipo de tumor. Por outro lado, alguns genes mostram-se hipermetilados em vários tipos de câncer, como é o caso do *p16^{ink4a}*, que foi encontrado metilado em câncer colorretal, de pulmão, mama, linfomas, estômago, pâncreas, esôfago, entre outros. O gene *p15^{ink4b}* foi encontrado metilado apenas em leucemias e linfomas; *MGMT* estava metilado em câncer de cólon, pulmão, cabeça e pescoço, leucemias, linfomas, cérebro, esôfago, estômago e pâncreas; a metilação do gene *DAP-kinase (DAP-K)* esteve associada com câncer de cólon, mama, ovário, pulmão, cabeça e pescoço, leucemias e linfomas; *CDH1 (E-caderina)* foi encontrado metilado em leucemias, câncer de mama e de esôfago, enquanto *p73* estava metilado em câncer de cólon, bexiga, esôfago, estômago, pâncreas e fígado (tabela 1).

Outro ponto interessante neste mesmo estudo foi a observação de que genes de diferentes vias envolvidas na imortalização e transformação celular são afetados simultaneamente pela metilação aberrante de suas regiões promotoras. Como exemplo, a metilação do $p16^{ink4a}$, *hMLH1* e *TIMP3* foi encontrada em tumor coloretal, enquanto em câncer de pulmão foi encontrada metilação em $p16^{ink4a}$, *MGMT* e *DAP-K*, e em câncer de mama, metilação em *BRCA1*, $p16^{ink4a}$ e *CDH1*. O silenciamento epigenético de vários genes deve conferir uma vantagem de sobrevivência à célula afetada, uma vez que aparentemente genes supressores de tumor de todas as vias celulares relacionadas com o câncer estão silenciados por metilação.

A metilação aberrante de determinados genes reflete seu envolvimento específico em determinados tipos de tumores ou grupos de tumores. Por exemplo, a hipermetilação do gene *BRCA1* foi encontrada em carcinomas esporádicos de mama e ovário, enquanto a metilação do gene *hMLH1* esteve restrita a três tipos de tumores esporádicos: coloretal, endometrial e gástrico (Esteller *et al.*, 2001).

Tabela 1. Genes hipermetilados em diversos tipos de câncer. Fontes: Baylin e Herman, 2000; Esteller *et al.*, 2001; Murai *et al.*, 2005; Pluta *et al.*, 2006.

Gene	Localização cromossômica	Função	Tipos de tumor
$p16^{ink4a}$	9p21	Controle do ciclo celular	a maioria dos tumores sólidos e linfomas
$p15^{ink4b}$	9p21	Controle do ciclo celular	LMA, LLA, linfomas
<i>p73</i>	1p36	Controle do ciclo celular	Linfomas, LMA, cólon, bexiga, esôfago, estômago, pâncreas e fígado
<i>DAP-K</i>	5p15.2	Apoptose	Pulmão, linfomas, cólon, cabeça e pescoço, leucemias, mama, ovário
<i>BNIP-3</i>	Não determinada	Apoptose induzida por hipóxia	LLA, LMA, mieloma múltiplo, coloretal, estômago e pâncreas
<i>CDH1</i>	16q22.1	Adesão celular	Tireóide, gástrico, leucemia, esôfago e mama
<i>MGMT</i>	10q26	Reparo do DNA	Cólon, pulmão, cabeça e pescoço, leucemias, linfomas, cérebro, estômago, pâncreas e esôfago
<i>BRCA1</i>	17q21	Reparo do DNA	Mama e ovário esporádicos
<i>hMLH1</i>	3p21.3	Reparo do DNA	Cólon, útero, estômago e fígado
<i>RAR-β</i>	3p24	Resposta a fatores de crescimento	Linfomas não Hodgkin, LMA, útero, próstata, pulmão, LLA de adulto
<i>ER</i>	6q25.1	Resposta a fatores de crescimento	Mama, cólon, leucemias
<i>SOCS-1</i>	16p13.2	Resposta à sinalização de citocinas	Hepático, LMA, MM
<i>SYK</i>	9q22	Resposta à sinalização de citocinas	Mama
<i>SHP-1</i>	12p13	Resposta à sinalização de citocinas	Mieloma múltiplo, leucemias, linfomas

LMA, Leucemia Mielóide Aguda; LLA, Leucemia Linfoblástica Aguda.

1.3.4. Metilação em neoplasias hematológicas

Numerosos genes têm sido identificados em estado hipermetilado em diferentes doenças hematológicas (Esteller *et al.*, 2001; Jones e Baylin, 2002; Herman e Baylin, 2003), como mostrado na tabela 2. A grande maioria destes possui função supressora de tumor e está envolvida em diferentes vias metabólicas, como regulação do ciclo celular, reparo do DNA, apoptose, adesão celular, resistência a drogas, diferenciação, angiogênese e metástase. Entretanto, as neoplasias hematológicas possuem alterações epigenéticas diferentes dos tumores sólidos (Esteller *et al.*, 2001).

Tabela 2. Genes frequentemente metilados nas doenças hematológicas.

Tumor	Genes
LMC	$p15^{ink4b}$, <i>abl</i> , <i>ER</i> , <i>calcitonina</i>
LMA	$p15^{ink4b}$, <i>CDH1</i> , <i>SOCS1</i> , <i>p73</i> , <i>DAP-k</i> , <i>HIC1</i> , <i>RARβ</i> , <i>CRBP1</i> , <i>ER</i>
LLA	<i>CDH1</i> , $p16^{ink4a}$, $p15^{ink4b}$, <i>p73</i> , <i>DAP-k</i> , <i>MGMT</i> , <i>RAR-β</i>
LLC	<i>hTERT</i> , <i>CDH1</i> , <i>MGMT</i>
SMD	$P15^{ink4b}$, <i>calcitonina</i> , <i>DAP-K</i> , <i>FHIT</i>
MM	$p16^{ink4a}$, <i>SOCS1</i> , <i>CDH1</i> , <i>p73</i>
LNH	<i>DAP-k</i> , <i>p57</i> , $p16^{ink4a}$, <i>MGMT</i> , <i>GST</i> , <i>RARβ</i> , <i>CRBP1</i> , <i>calcitonina</i>

LMC, Leucemia Mielóide Crônica; LMA, Leucemia Mielóide Aguda; LLA, Leucemia Linfoblástica Aguda; LLC, Leucemia Linfocítica Crônica; SMD, Síndrome Mielodisplásica; MM, Mieloma Múltiplo; LNH, Linfoma Não Hodgkin.

Mesmo entre as doenças hematológicas é encontrada uma diferença significativa nos genes metilados. Leucemias e linfomas são entidades distintas, e apresentam um perfil epigenético diferente entre si, como mostrado na figura 10 (Esteller, 2003). De maneira geral, ao mesmo tempo em que a hipermetilação de $p15^{ink4b}$ é extremamente comum em leucemias, é muito rara em linfomas, e o inverso ocorre com a hipermetilação do gene $p16^{ink4a}$: bastante comum em linfomas e quase não encontrada em leucemias (Herman *et al.*, 1997).

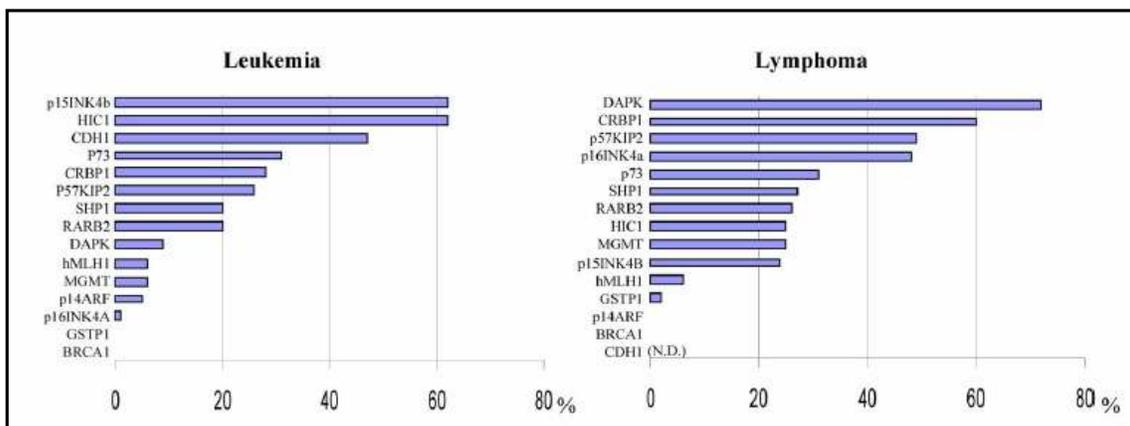


Figura 10. Diferente perfil de metilação entre leucemias e linfomas. O eixo x representa a porcentagem dos genes supressores de tumor com hipermetilação das ilhas CpG nas neoplasias hematológicas. **Fonte:** *Clinical Immunology* vol 109, 2003.

A síndrome mielodisplásica (SMD) e as leucemias agudas são as doenças hematológicas melhor caracterizadas a nível epigenético. Nos últimos anos também têm sido identificados marcadores relacionados com o prognóstico e com a progressão em outras entidades. Na SMD, os genes da calcitonina e do $p15^{ink4b}$ foram encontrados metilados em 65% dos casos em um estudo realizado por Leone e colaboradores (2002, *apud* Das e Singal, 2004). Um estudo recente com 13 genes em 21 pacientes também encontrou os genes *calcitonina* e $p15^{ink4b}$ hipermetilados em pacientes pediátricos com SMD. Os demais genes estudados não apresentaram metilação aberrante (Vidal *et al.*, 2006). A metilação aberrante de $p15^{ink4b}$ na SMD foi mais freqüente em pacientes de alto risco (Uchida *et al.*, 1997) e mais prevalente durante a progressão da doença (Quesnel *et al.*, 1998) e na transformação a LMA (Wong *et al.*, 2000; Chim *et al.*, 2001).

A hipermetilação também está associada à leucemia mielóide aguda (LMA). Em um estudo realizado por Melki *et al.* (1999), eles analisaram a metilação em regiões promotoras de oito genes e viram que 95% dos pacientes com LMA tinham pelo menos um gene hipermetilado e 75% tinham pelo menos dois genes hipermetilados. Estudos indicam que o $p15^{ink4b}$ está freqüentemente metilado nos pacientes com LMA, enquanto o gene da p16 é bem menos metilado nestes pacientes (Toyota *et al.*, 2001; Dodge *et al.*, 2001; Dodge *et al.*, 1998). Herman *et al.* (1997) viram que a LMA é caracterizada pela metilação do $p15^{ink4b}$ na ausência de metilação do $p16^{ink4a}$. No estudo de Galm e colaboradores (2005), foi analisado o estado de metilação da região promotora de 11 genes em 60 pacientes adultos com

LMA. Seus resultados mostraram hipermetilação nos genes *SOCS-1* (45%), *p15^{ink4b}* (31,7%), *RAR-β* (20%), *p73* (13,3%), *CDH1* (13,3%), *MGMT* (5%) e *DAP-K* (3,3%). Outros genes com alta freqüência de metilação na LMA são os genes de receptor de estrogênio (*ER*) e *HIC1* (Rush e Plass, 2002b).

Vários genes que aparecem metilados na LMA também estão hipermetilados na leucemia linfocítica aguda (LLA), como os genes *p15^{ink4b}*, *ER*, *HIC1* e *CDH1* (Rush e Plass, 2002b). Além destes genes, parece que há uma hipermetilação do gene *p73* na LLA (Kawano et al., 1999). A metilação do DNA é um evento freqüente tanto nas LLAs de adultos (Garcia Manero et al., 2002) quanto nas LLAs de criança (Garcia Manero et al., 2003). No estudo de Garcia-Manero e colaboradores (2002), em 86% dos casos de LLA de criança foi detectada a metilação de pelo menos um gene de um painel de nove supressores de tumor estudados, sendo que em 42,5% dos pacientes foram detectados pelo menos três genes hipermetilados. Em outro estudo realizado por Yang e colaboradores (2006), foi mostrado que *p15^{ink4b}*, *p16^{ink4a}*, *RAR-β* e *FHIT* encontravam-se metilados tanto em LLA de crianças quanto de adultos. Entretanto, os genes *APC* e *RIZ* encontravam-se metilados apenas na LLA de adulto, e a metilação de *RAR-β* era mais freqüente nos adultos do que nas crianças. Román-Gómez et al. (2004), analisaram o status de metilação em 15 genes supressores de tumor em 251 pacientes com LLA (124 crianças e 127 adultos). Um maior número de genes hipermetilados ao diagnóstico foi associado com uma diminuição na sobrevida livre de doença e sobrevida total. A hipermetilação de *p21* foi documentada em 41% dos pacientes com LLA e análises multivariadas demonstraram que também é um fator prognóstico independente desfavorável (Roman-Gómez et al., 2002).

Poucos estudos associam a hipermetilação com a LLC. Bechter et al (2002) relataram que a metilação do gene da sub-unidade catalítica da telomerase, o hTERT, está correlacionado com a diminuição dos níveis da atividade da telomerase nos pacientes com LLC. A metilação do gene da E-caderina (*CDH1*) foi descrita em três de cinco pacientes com LLC (Melki, 2000). Em um estudo feito por Chim e colaboradores (2006), foi avaliado o papel da metilação dos genes das famílias INK4 e CIP/KIP em 56 pacientes chineses com LLC ao diagnóstico. Seus resultados mostraram a presença de metilação nos genes *p15^{ink4b}*, *p16^{ink4a}* e *p57* (35,7%, 14,3% e 7,1%, respectivamente). Os genes *p18*, *Rb*, *p21* e *p27* não apresentaram

metilação nestas amostras. Porém, mais estudos devem ser feitos para determinar a associação da metilação com a LLC.

No mieloma múltiplo (MM), a metilação do gene da *DAP-K* também parece estar associada com este tipo de câncer (Ng *et al.*, 2001; Braggio, 2006). Em análises univariadas, a metilação de *DAP-K* e *RAR β* foi identificada como fatores de prognóstico desfavorável. Até o momento, foram publicados três estudos do perfil de metilação de múltiplos genes supressores de tumor (Galm *et al.*, 2004; Seidl *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2004) e vários trabalhos focalizados em genes específicos no MM. No estudo realizado por Braggio (2006) com 68 pacientes com MM, foi encontrada metilação aberrante em 79% dos casos, sendo que em 51,5% estiveram afetados dois ou mais genes simultaneamente. O gene que tem sido mais estudado é o *p16^{ink4a}*. Ele tem sido identificado hipermetilado em diversos trabalhos com uma frequência que variou entre 10 e 50%. Mateos *et al* (2002), detectaram este gene em estado hipermetilado em 41 de 98 pacientes (42%) com MM ao diagnóstico. Um estudo recente realizado por Galm *et al* (2004) procurou a metilação em 11 genes em 5 linhagens celulares com MM, entre eles os genes *p16^{ink4a}*, *p15^{ink4b}*, *p73*, *CDH1*, *DAP-K*, *TIMP-3*, *MGMT*, *RASSF1A*, *RAR β* , *hMLH1* e *SOCS-1*. Foram encontrados padrões de metilação aberrantes em até oito dos 11 genes analisados, e todos os genes, exceto *p15^{ink4b}* e *hMLH1* estavam hipermetilados em pelo menos uma linhagem celular de MM. Apesar deste estudo mostrar uma associação do MM com alguns genes metilados, mais estudos precisam ser realizados para achar uma associação entre a hipermetilação, o mieloma múltiplo e seu prognóstico.

Um estudo realizado por Siu *et al* (2002) mostrou que o linfoma de células natural killer tem pelo menos dois genes hipermetilados em 88% dos casos. Os autores acharam altos níveis de metilação nos genes *p73*, *hMLH1*, *p16^{ink4a}*, *p15^{ink4b}* e *RAR β* .

No linfoma de Burkitt e no linfoma de células B, foi descrito a metilação do *DAP-K*. Outros genes associados à hipermetilação em outros tipos de linfoma incluem *p15^{ink4b}*, *p16^{ink4a}*, *ER*, *HIC1* e *Myf-3* (Rush e Plass, 2002b). Nos linfomas difusos de células grandes B, foi postulado recentemente que o silenciamento por metilação do gene *MGMT*, relacionado ao reparo do DNA, poderia inibir a capacidade das células neoplásicas de reparar o DNA lesionado por agentes alquilantes (Esteller *et al.*, 2002a). Alguns genes como *p73*, *p15^{ink4b}*, *p16^{ink4a}*,

DAP-K e *RAR β* apresentam uma metilação aberrante em alguns outros linfomas não Hodgkin (Baur *et al.*, 1999; Siu *et al.*, 2002).

A maioria das doenças hematológicas parece ter algum grau de desregulação epigenética, e a identificação dos padrões de metilação pode ajudar na determinação do diagnóstico e pode servir como alvo terapêutico.

1. 4. METILAÇÃO NA LMC

Em relação à leucemia mielóide crônica (LMC), poucos estudos foram publicados até hoje associando-a com mecanismos epigenéticos, e os trabalhos existentes tentam relacionar eventos de metilação com as diferentes fase da doença (Mills *et al.*, 1996; Issa *et al.*, 1999; Asimakopoulus *et al.*, 1999; Nagy *et al.*, 2003; Roman-Gomez *et al.*, 2005). Alguns grupos têm realizado este tipo de estudo com o objetivo de descobrir os mecanismos responsáveis pela progressão da doença. A LMC possui três estágios da doença, e é importante determinar as diferenças nos padrões de metilação entre estas fases para explorá-las como alvo terapêutico.

Um dos primeiros trabalhos relacionando a metilação aberrante com a LMC foi feito com o gene da calcitonina (Nelkin *et al.*, 1991), mostrando que a metilação aberrante deste gene estava relacionada com a progressão da doença. O gene *calcitonina* encontrou-se metilado em 6% dos pacientes em fase crônica, em 63% dos pacientes em fase acelerada e em 92% dos pacientes em crise blástica. Foi proposto que a hipermetilação da *calcitonina* poderia prever a progressão da LMC para a crise blástica com uma mediana de antecipação de seis meses em relação aos achados clínicos (Malinen *et al.*, 1991). Outros trabalhos corroboraram com o achado de que a metilação do gene *calcitonina* estava envolvida com a progressão da doença (Mills *et al.*, 1996).

Estudos posteriores foram realizados analisando a região promotora do gene *ABL* localizada dentro do gene de fusão *BCR/ABL*. A expressão do gene híbrido *BCR/ABL* é controlada pelo promotor do *BCR*. Entretanto, na maioria dos casos, um dos dois promotores do gene *ABL* é carregado durante a translocação e fica dentro do gene híbrido. Este promotor (Pa1) é capaz de transcrever um RNA mensageiro normal do *ABL* de dentro do cromossomo Ph. Contudo, alguns estudos mostraram

que este promotor do *ABL* que está dentro do gene híbrido encontra-se não metilado ao diagnóstico, porém adquire metilação ao longo da progressão da doença (Zion *et al.*, 1994; Issa *et al.*, 1999; Asimakopoulos *et al.*, 1999; Nguyen *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2001).

Outros trabalhos foram realizados buscando a correlação entre metilação dos genes da família INK4 com a LMC. Nagy e colaboradores (2003) encontraram uma associação entre metilação dos genes *p16^{ink4a}* e *p14* com a progressão da LMC para fase acelerada em quase 50% das amostras estudadas. Todavia, outros trabalhos não encontraram metilação nestes dois genes em nenhuma das fases da doença (Herman *et al.*, 1997; Kusy *et al.*, 2003). Em relação ao *p15^{ink4b}*, outro gene membro da família INK4, três trabalhos foram publicados relacionando seu estado de metilação com a LMC (Herman *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 2000; Kusy *et al.*, 2003). Entretanto, em apenas um deles (Nguyen *et al.*, 2000) foi encontrada metilação do *p15^{ink4b}*, sem correlação significativa com a progressão da doença.

Outros genes, como *JunB* (Yang *et al.*, 2003), *SOCS-1* (Liu *et al.*, 2003), *CDH13* (Roman-Gomez *et al.*, 2003), *IRF-4* (Ortmann *et al.*, 2005), *PARK2* e *PACRG* (Agirre *et al.*, 2006) e *hPER3* (Yang *et al.*, 2006) também foram encontrados metilados na LMC. Entretanto, até hoje poucos estudos foram realizados associando a metilação de múltiplos genes supressores de tumor com a LMC.

Embora existam alguns estudos, o panorama da metilação na LMC ainda é confuso, com dados escassos e de certa forma, pouco informativos a respeito desta doença.

1.5. METILAÇÃO COMO ALVO TERAPÊUTICO

As mudanças epigenéticas, ao contrário das alterações genéticas, são reversíveis, tornando-se alvos atrativos para intervenções terapêuticas. Toda a maquinaria envolvendo o processo de metilação tem sido estudada para achar um alvo específico que bloqueie a hipermetilação de um determinado gene.

Existe uma super expressão da DNMT1 em vários tipos de tumores, levando à metilação aberrante de genes supressores de tumor (Szyf, 2003). Se a hipermetilação das ilhas CpG em regiões promotoras destes genes pode levar ao

desenvolvimento tumoral, é possível reverter este processo através de agentes farmacológicos desmetilantes com a conseqüente reativação da expressão gênica.

A 5-azacitidina (azacitidina, Vidaza) e a 5-aza-2'-deoxicidina (decitabina, DAC) são análogos da citosina (figura 11) que interagem com as DNMTs, resultando na inibição da ação destas enzimas e conseqüentemente na hipometilação do DNA (Santini *et al.*, 2001). Estudos *in vitro* têm demonstrado a associação da demetilação com a reativação de múltiplos genes, incluindo os supressores de tumor (Herman e Baylin, 2003).

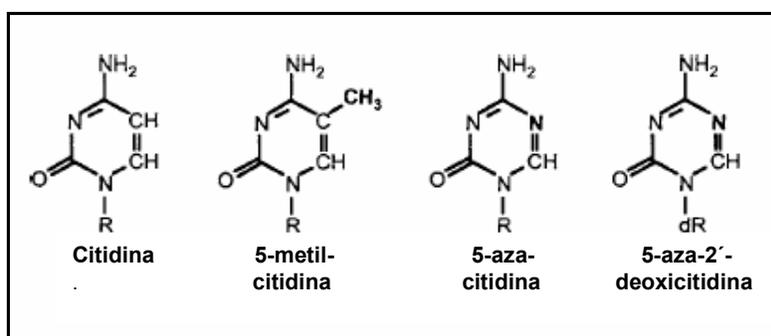


Figura 11. Diferença na estrutura entre citidina, 5-metil-citidina e os inibidores da metilação azacitidina (5-aza-citidina) e decitabina (5-aza-2'-deoxicitidina). DR: desoxirribose, R: ribose. Fonte: Oncogene vol 22, 2003.

A decitabina e a azacitidina são análogos da 2'-deoxicidina, e a diferença das duas drogas para a 2'-deoxicidina consiste na troca de um carbono por um nitrogênio na posição cinco do seu anel pirimidínico. A decitabina é ativada pela fosforilação através da deoxicidina quinase, resultando em 5-aza-dCMP, o qual é rapidamente convertido em 5-aza-dCTP, um excelente substrato para a DNA polimerase alfa (Bouchard e Momparler, 1983 *apud* de Vos, 2005). Entretanto, a decitabina pode ser deaminada por uma enzima citidina deaminase antes de ser ativada. Se isso ocorrer, a droga perde sua função (Momparler, 2005).

Quando incorporada ao DNA, a decitabina não permite que a DNMT insira um grupamento metil na posição cinco da citosina, impedindo a metilação do DNA, além de se ligar covalentemente à DNMT, inibindo esta enzima (Jüttermann *et al.*, 1994 *apud* Momparler, 2005). A decitabina exerce um efeito duplo nas células tratadas. Em altas doses, as células tratadas morrem por apoptose; em baixas doses, as

células sobrevivem, porém mudam o perfil de expressão gênica pela reativação de genes supressores de tumor através da demetilação (Issa *et al.*, 2004).

As propriedades antileucêmicas da decitabina foram descritas pela primeira vez em 1968 (Sorm e Vesely, 1968 *apud* Von Vos e van Overveld, 2005). Atualmente, a utilização destas drogas desmetilantes tem tido um impacto significativo no paradigma do tratamento da síndrome mielodisplásica (SMD), tratada principalmente por transplante de células precursoras hematopoiéticas. Os pacientes com SMD de alto risco tratados com azacitidina apresentaram taxas de resposta total de 49% (Wijermans *et al.*, 2000). Outro estudo, realizado pelo Grupo de Câncer e Leucemia B (CALGB) mostrou uma eficácia de 50% em pacientes tratados com azacitidina em baixas doses (Silverman *et al.*, 1993). A utilização desta droga como monoterapia em um grupo de pacientes com SMD esteve associada com resposta citogenética e aumento na sobrevida (Tuzuner *et al.*, 1995).

A experiência clínica positiva observada na SMD, associada à confirmação da relação entre a hipermetilação e o câncer, levou à exploração do valor terapêutico dos inibidores das DNMTs em leucemias (Jones e Laird, 1999). Os principais dados obtidos fora da SMD são os provenientes da LMA (Shadduck *et al.*, 2004; Issa *et al.*, 2004) e, em menor escala, da LMC e da LLA (Kantarjian *et al.*, 2003; Issa *et al.*, 2005). Múltiplos estudos Fase I e Fase II utilizando azacitidina ou decitabina como monoterapia ou combinada com outros agentes estão sendo realizados (Fonte: National Health Institute, USA, <http://www.clinicaltrials.gov/ct>). Baixas doses de agentes desmetilantes combinadas com inibidores de deacetilases de histona estão mostrando bons resultados no tratamento dos pacientes com leucemia (Fenaux, 2005).

Os estudos mais recentes associando o uso da decitabina na LMC utilizam pacientes resistentes ao Imatinibe (Rosenfeld, 2005). Quando linhagens celulares resistentes ao Imatinibe, que ainda possuem alguma sensibilidade a este medicamento, são tratadas com uma combinação de decitabina com o mesilato de imatinibe, há uma inibição do crescimento destas células (La Rosee *et al.*, 2004 *apud* Rosenfeld, 2005). Em um estudo realizado por Issa e colaboradores (2004), 35 pacientes com LMC resistentes ou intolerantes ao Imatinibe foram tratados com baixas doses de decitabina (15mg/m²/d). Resposta hematológica completa foi alcançada em 34% dos casos, e resposta hematológica parcial em 20%. Resposta citogenética major foi alcançada em 20% dos pacientes, enquanto resposta

citogenética minor foi encontrada em 26%. A duração média da resposta foi de três meses. Dois pacientes morreram durante este estudo, ambos relacionados com trombocitopenia e hemorragia.

Devido ao fato que as drogas desmetilantes estão começando a ser utilizadas na LMC, principalmente em pacientes resistentes ao Imatinibe, é importante conhecer o perfil de metilação desta doença e tentar encontrar alguma diferença na metilação entre suas diferentes fases e entre os pacientes que respondem e os que não respondem a um determinado tratamento.

Nos últimos anos, a diminuição das doses destas drogas e a sua utilização em combinação com inibidores das deacetilases de histonas (ácido valpróico, trichostatina, depsipeptideo, SAHA, fenilbutirato, butirato de sódio) têm demonstrado resultados promissores (Cameron *et al.*, 1999; Villar-Garea e Esteller, 2003; Murgu, 2005). A estratégia combinada usa doses menores, reduzindo os efeitos colaterais de cada agente.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO PRINCIPAL

- ✓ Definir o perfil de metilação de múltiplos genes supressores de tumor pertencentes a diferentes vias metabólicas em pacientes com LMC ao diagnóstico e no acompanhamento pós-tratamento.

2.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- ✓ Analisar a resposta clínica ao Imatinibe em 70 pacientes com LMC;
- ✓ Analisar o perfil de metilação nos pacientes com LMC como um todo;
- ✓ Determinar as diferenças nos perfis de metilação entre as diferentes fases da doença (crônica, acelerada, blástica), visando descobrir modificações relacionadas com a progressão de doença;
- ✓ Comparar os perfis de metilação observados em pacientes respondedores e não respondedores ao Imatinibe;
- ✓ Comparar o perfil de metilação entre amostras de pacientes em uso de diferentes medicamentos;
- ✓ Realizar estudos *in vitro* com o agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina utilizando linhagens celulares e testando o efeito das drogas no status de metilação dos genes sob estudo, correlacionando a hipermetilação do DNA com o silenciamento gênico.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1. PACIENTES

No período de 01/01/2001 a 30/04/2006 entraram 1901 amostras referentes a 284 pacientes com LMC no laboratório de Biologia Molecular do Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO) do Instituto Nacional de Câncer (INCa). Estas amostras são provenientes do Serviço de Hematologia e do Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO) do INCa. Do total de 284 pacientes, escolhemos os pacientes que, em alguma etapa do tratamento, utilizaram o medicamento Mesilato de Imatinibe. Desta maneira, foram selecionados 131 pacientes. Contudo, 61 pacientes foram excluídos deste estudo por não terem amostras de DNA suficientes para o estudo ou por não termos os dados clínicos completos destes pacientes.

Desta forma, foram incluídos 70 pacientes com Leucemia Mielóide Crônica provenientes do Serviço de Hematologia e do Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO) do INCa. De maneira geral, os pacientes com LMC iniciam tratamento com hidroxiuréia. Posteriormente, estes pacientes passam por diferentes tratamentos, como IFN- α e mesilato de imatinibe e, em alguns casos, transplante de medula óssea. Na maioria das vezes, os pacientes iniciam o tratamento com Imatinibe após não responderem mais ao IFN- α . Porém, alguns pacientes em uso do Imatinibe também adquirem resistência a este medicamento, e são inseridos em testes para novas drogas inibidoras, como o BMS354825 (Dasatinibe). Como grupo controle foram incluídas amostras de sangue periférico de 15 indivíduos doadores de medula óssea saudáveis.

Os pacientes estudados foram categorizados em dois grupos: respondedor e não respondedor ao Imatinibe. A resposta ao tratamento pode ser avaliada em 3 níveis: hematológico, citogenético e molecular. O critério de resposta abordado neste estudo foi a resposta citogenética. São caracterizados como não respondedores os

pacientes que não atingiram uma resposta citogenética com menos de 65% de cromossomos Ph presentes (100 a 66% Ph+ é considerado não respondedor).

Os paciente não respondedores ao Imatinibe foram sub-classificados de acordo com resistência ou intolerância ao medicamento. A intolerância é caracterizada principalmente por toxicidade hematológica ou orgânica, e o medicamento é suspenso. A resistência é causada quando as células tumorais não respondem mais à ação do medicamento, e pode ser primária (quando o paciente nunca respondeu ao remédio), ou secundária (quando o paciente responde temporariamente, mas depois perde a resposta).

As informações clínicas dos pacientes foram obtidas através dos dados contidos em seus prontuários médicos.

3.1.1. AMOSTRAS

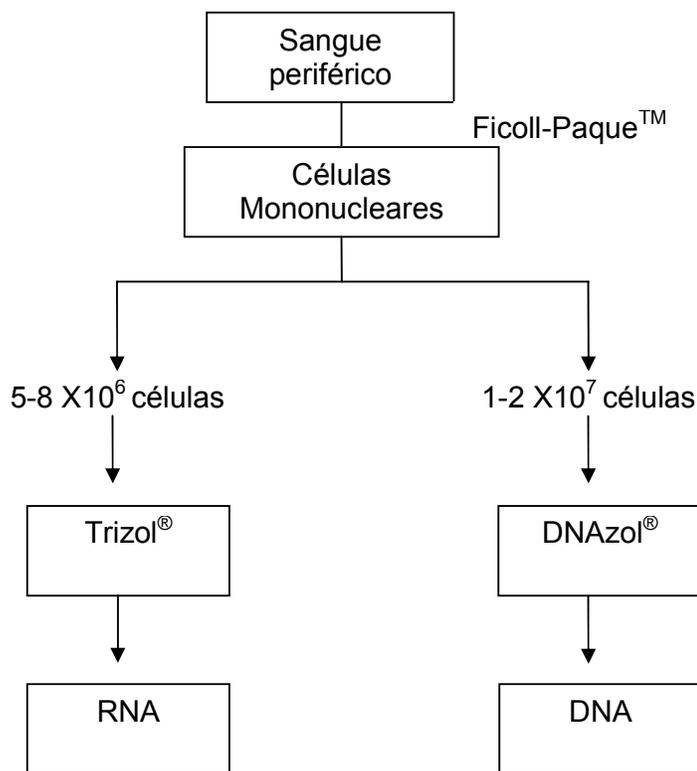
Para os estudos relacionando metilação com as variáveis clínicas (resposta citogenética, recaída e resposta ao Imatinibe), utilizamos uma amostra de cada paciente (n=70). Para as análises entre os diferentes genes e para a correlação da metilação com as diferentes fases, utilizamos 80 amostras, uma vez que analisamos amostras de diferentes fases de um mesmo paciente em 9 casos. No estudo correlacionando metilação com os diferentes tratamentos utilizamos 90 amostras dos 70 pacientes. Estas amostras são referentes a diferentes fases e a diferentes tratamentos administrados.

3.2. APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Projeto de pesquisa intitulado “Análise do padrão de metilação de genes envolvidos na patogênese e progressão de leucemias, linfomas e mielomas” foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto Nacional do Câncer, registro 104/04, em 15 de abril de 2005 (anexo 1).

3.3. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

A partir de 5-10 mL de sangue periférico ou medula óssea, foram separadas as células mononucleares através da centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare). Foi colocado um volume de Ficoll em um tubo Falcon e adicionado o sangue ou medula. Os tubos foram centrifugados a 25°C por 20 min a 2000rpm. Após a centrifugação, foi formado um anel composto pelas células mononucleares na interfase entre o sobrenadante e o Ficoll. Este anel foi retirado e transferido para outro tubo Falcon limpo. As células foram lavadas com 14 mL de tampão PBS 1X duas vezes a 1500 rpm por sete minutos. Para fazer a contagem das células, foi colocado 45µL de ácido acético 0,5% em um eppendorf limpo e a ele foram adicionados 5µL da amostra previamente ressuspensa em 1 mL de PBS 1X. As amostras foram estocadas em Trizol® (Invitrogen) ou DNAzol® (Invitrogen) para posterior extração de RNA e DNA, respectivamente. O Fluxograma abaixo representa o processamento das amostras:



3.4. EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído a partir de células mononucleares estocadas em DNAzol. Para cada 1 mL de DNAzol, foi adicionado 1 mL de etanol 100% gelado para precipitar o DNA. Este foi lavado com etanol 95% até não conter mais DNAzol. O DNA foi ressuscitado com quantidade variada de NaOH 8mM, dependendo do tamanho do pellet. O NaOH foi neutralizado com 4,2 μ L de HEPES 1M para cada 100 μ L de NaOH colocado.

3.5. QUANTIFICAÇÃO DE DNA

Uma alíquota do DNA foi diluída 500 vezes e quantificada através de leitura em espectrofotômetro usando-se comprimento de onda de 260 nm. A pureza do DNA foi verificada a partir da relação 260/280 nm, (este último comprimento de onda é utilizado para detectar proteínas). Quando a relação das densidades ópticas (260/280) eram iguais ou maiores que 1,7, o material era considerado como tendo boa qualidade para uso.

3.6. GEL DE AGAROSE 0,8%

Os géis foram preparados utilizando-se agarose na concentração de 0,8% em tampão TAE (0,04M Tris acetato; 0,001 M EDTA pH 8,0) contendo 0,5 μ g/mL de brometo de etídeo. Uma alíquota de 5 μ L de DNA foi misturada ao tampão de corrida (30% glicerol em água, 0,25% azul de bromofenol e 0,25% xileno cianol) e aplicada no gel para testar a integridade do DNA. A eletroforese foi realizada submetendo o gel a uma voltagem de 4 V/cm durante 45 minutos. O DNA foi visualizado através de um transiluminador de luz ultravioleta.

3.7. TRATAMENTO DO DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO

Na década de 1990, Frommer *et al.* desenvolveram um procedimento utilizando bissulfito de sódio para distinguir citosinas de 5-metilcitosinas no DNA. Os autores utilizaram bissulfito para deaminar DNA genômico em condições nas quais as citosinas são convertidas em uracilas e as 5-metilcitosinas permanecem inalteradas (figura 12).

O protocolo utilizado por Frommer *et al.* (1992) foi adaptado e utilizado em nosso estudo da seguinte maneira: cerca de 10 μ g de DNA foram diluídos em 50 μ L de água e desnaturados em uma solução de NaOH 0,2M por 15 minutos a 37° C. A este foram adicionados 500 μ L de uma solução de bissulfito/hidroquinona (bissulfito de sódio 3 M, hidroquinona 10 mM e NaOH 10M; pH 5), de acordo com o protocolo estabelecido por Herman *et al.* (1996). Após 16-20 horas em banho-maria a 55° C, o DNA foi limpo com kit Wizard Clean-Up System (Promega) de acordo com as especificações do fabricante, precipitado com etanol 100%, lavado com etanol 70% e ressuspenso em tampão TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1mM).

Após este tratamento, todas as citosinas não metiladas foram convertidas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permaneceram inalteradas. Desta maneira, é possível distinguir entre DNA metilado e DNA não metilado, uma vez que a presença de citosinas após este tratamento é um indicativo de seqüência metilada.

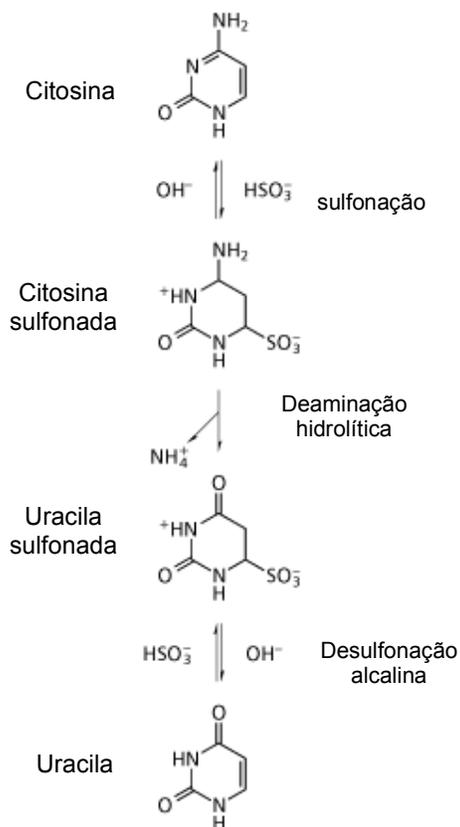


Figura 12. Esquema do tratamento do DNA com bissulfito de sódio. as citosinas não metiladas são convertidas em uracila por um processo de deaminação. As citosinas metiladas não são capazes de sofrer o processo inicial de sulfonação, portanto não são sujeitas ao posterior processo de deaminação, não sendo convertidas em uracila.

3.8. PCR ESPECÍFICA DO ESTADO DE METILAÇÃO DO DNA (MSP – METHYLATION SPECIFIC PCR)

Após o tratamento do DNA com bissulfito de sódio, as seqüências de DNA metilado e não metilado ficam diferentes (figura 13). A técnica do MSP baseia-se nas diferenças entre as seqüências após este tratamento, pois as citosinas não metiladas transformam-se em uracila. Duas reações de PCR são feitas para cada amostra de DNA; em uma são usados iniciadores específicos para detectar DNA metilado e na outra, iniciadores específicos para detectar DNA não metilado. A vantagem desta técnica é que ela pode ser usada para amplificar pequenos fragmentos de DNA, permitindo o uso de DNA altamente degradado, como os extraídos de blocos de parafina. Além disso, esta metodologia não está restrita às

Tabela 3. Relação da seqüência dos iniciadores e condições de PCR para cada gene estudado. De maneira geral, as condições dos PCRs foram: 2,5 µL de tampão 10X (Invitrogen), 2,5 µL de gelatina 1:100, 0,2 µL de dNTP 25 mM, 20 pmol de cada primer, MgCl₂ e Taq Platinum de acordo com a tabela e 1µL de DNA 1:10 para um volume final de 25 µL em cada reação. Foram feitos 40 ciclos de 94°C (30 segundos), temperatura de anelamento (TM) (30 segundos) e 72° C (45 segundos). U- Não metilado; M- metilado.

gene		Foward	Reverse	Tamanho (bp)	TM (°C)	MgCl ₂ (mM)	Taq (U)	Referência
<i>p16^{ink4a}</i>	U	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCCAAACCACAACCATAA	151	60	2	0,5	Herman et al, 1996.
	M	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACC GCGACCGTAA	150	66	2	0,5	
<i>p15^{ink4b}</i>	U	TGTGATGTGTTTGTATTTTGTGGTT	CCATAACAATAACCAAACAACCAA	154	60	2	0,5	Herman et al, 1996.
	M	GCGTTCGTATTTTGC GGTT	CGTACAATAACCGAACGACCGA	148	60	2	0,5	
<i>P73</i>	U	AGGGGATGTAGTGAAATTGGGGTTT	ATCACAACCCCAAACATCAACATCCA	69	66	2	0,5	Siu et al, 2002.
	M	GGACGTAGCGAAATCGGGGTTT	ACCCCGAACATCGACGTCCG	60	62	2	0,5	
<i>CDH1</i>	U	GGTGGGTGGGTTGTTAGTTTTGT	AACTCACAAATCTTTACAATTCCAACA	174	58	2	0,5	Graff et al, 1997.
	M	GTGGGCGGGTCGTTAGTTTC	AACTCACAAATCTTTACAATTCCAACA	172	58	2	0,5	
<i>ER</i>	U	ATGAGTTGGAGTTTTTGAATTGTTT	ATAAACCTACACATTAACAACAACCA	158	60	2	0,5	Lapidus et al, 1998.
	M	CGAGTTGGAGTTTTTGAATCGTTC	CTACGCGTTAACGACGACCG	151	60	2	0,5	
<i>DAPK</i>	U	GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT	CAAATCCCTCCCAAACACCAA	106	60	2	0,5	Katzenellenbogen et al, 1999.
	M	GGATAGTCGGATCGAGTTACCGTC	CCCTCCCAAACGCCGA	98	60	2	0,5	
<i>RARβ</i>	U	TTGGGATGTTGAGAATGTGAGTGATTT	CTTACTCAACCAATCCAACCAAAACAA	120	60	2	0,5	Galm et al, 2004.
	M	TGTCGAGAACGCGAGCGATTC	CGACCAATCCAACGAAACGA	120	60	2	0,5	
<i>MGMT</i>	U	TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTGT	AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA	93	58	2	0,5	Esteller et al, 2000.
	M	TTTCGACGTTTCGTAGTTTTTCGC	GCACTCTTCCGAAAACGAAACG	81	54	2	0,5	
<i>BNIP-3</i>	U	TAGGATTTGTTTTGTGTATG	ACCACATCACCCATTAACCACA	98	58	2	0,5	Braggio, 2006.
	M	TAGGATTCGTTTCGCGTACG	ACCGCGTCGCCATTAACCGCG	78	64	2	0,5	
<i>SOCS1</i>	U	GTTGTAGGATGGGGTTGTGGTTGT	CTACTAACCAAACTAAAAATCCACA	149	63	5	1	Nagai et al, 2003.
	M	GTTGTAGGATGGGGTCGCGGTCGC	CTACTAACCAAACTAAAAATCCACA	149	63	5	1	
<i>SHP1</i>	U	GTGAATGTTATTATAGTATAGTGTGG	TTCACACATACAAACCCAAACAAT	158	60	2	0,5	Oka et al, 2002.
	M	GAACGTTATTATAGTATAGCGTTC	TCACGCATACGAACCCAAACG	158	60	2	0,5	
<i>SYK</i>	U	ATTTTGTGGGTTTTGTTTGGTG	ACTTCCTTAACACACCCAAAC	140	67	5	1	Yuan et al, 2001.
	M	CGATTTTCGCGGGTTTCGTTT	AAAACGAACGCAACGCGAAAC	243	67	4	1	

3.9. GEL DE POLIACRILAMIDA 7,5%

A visualização dos resultados dos MSP foi feita em géis de poliacrilamida 7,5% sob condições não denaturantes. Foi utilizada acrilamida na proporção 19:1 (acrilamida: bis acrilamida) por se tratar de fragmentos pequenos (100-250 pb).

Para catalisar a polimerização, foram adicionados 400 μ L de persulfato de amônio e 30 μ L de TEMED (Amresco®). A solução foi rapidamente aplicada nas placas (19X19,5 cm) contendo espaçadores de 0,8 cm. Após polimerização, os géis foram montados em cuba eletroforética vertical V16 (GIBCO/BRL). Os produtos foram aplicados com tampão de corrida e corridos em condições de voltagens e tempo constantes em tampão TAE 1X à temperatura ambiente até percorrerem aproximadamente 75% da distância entre o início da corrida e a base do gel.

O gel foi fixado em uma solução contendo 10% de metanol e 0,5% de ácido acético, posteriormente corado em uma solução contendo nitrato de prata 20% e revelado em uma solução contendo NaOH 15% e 0,3% de formaldeído, possibilitando a visualização dos resultados.

3.10. SEQÜENCIAMENTO

Após amplificação por PCR, alelos metilados e não metilados de cada gene foram seqüenciados para confirmar o sucesso da conversão do DNA e a especificidade do MSP.

Os produtos escolhidos para seqüenciamento foram purificados com o kit de purificação GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit® (Amersham Biosciences), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Uma alíquota de 5 μ L de produto amplificado foi posteriormente corrida em gel de agarose (2%) para confirmar a presença do produto. Cada reação de seqüenciamento continha 2 μ L de solução proveniente do Kit de Seqüenciamento (DYEamyc™ ET Terminator Cycle Sequencing Premix Kit®; GE Healthcare), 2

pmol do primer específico para cada reação (Senso e Anti-senso) e 4 μ L de produto purificado, em um volume final de 10 μ L. O perfil térmico utilizado consistiu em 30 ciclos de 95°C (20 segundos), 50°C (15 segundos) e 60°C (um minuto).

Os produtos seqüenciados foram precipitados com 40 μ L de etanol 95% e 1 μ L de acetato de sódio, lavados com 150 μ L de etanol 70% e posteriormente dissolvidos em 3 μ L de formamida. O gel para análise do seqüenciamento foi composto por 18 g de uréia, 26,25 mL de água, 5 mL de TBE 10X (Tris-borato 0,045 M; EDTA 1 mM; pH 8,0) 4,75 mL de Long Ranger Gel Solution[®] (FMC Bioproducts), 250 μ L de PSA e 35 μ L de TEMED. Após polimerização na placa de aplicação, o gel foi colocado no seqüenciador automático ABI PRISM[™] 377 (Applied Biosystems), as amostras foram aplicadas e o gel correu em tampão TBE 1X durante 10 horas. Para a análise dos dados, foi utilizado o programa Sequence Navigator, Version 1.0.1[®] (Applied Biosystems).

3.11. LINHAGENS CELULARES

Linhagens celulares obtidas a partir de pacientes com diferentes neoplasias hematológicas foram incluídas como controles positivos no estudo do perfil de metilação e nos tratamentos com o agente desmetilante 5-aza-2´deoxicidina. As características das linhagens encontram-se descritas na tabela 4. As linhagens KASUMI, NB4, HUT-78, BC1, GRANTA 519, DHL16, KARPAS 422, NALM6, REH, RS 4,11, CEM, JURKAT, NAMALWA, RAMOS e HLB2 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Introna do Instituto Mario Negri de Milão, Itália, e as linhagens KMS-11 e ARH77 pelo Dr. Marco Ladetto da Universidade de Torino, Itália. A linhagem CEMO1 foi estabelecida no Serviço de Atividades Laboratoriais do CEMO (Silva *et al.*, 1996). As linhagens celulares foram cultivadas em suspensão e mantidas na concentração de 10⁶ células/mL em meio de cultivo completo RPMI-1640 (Sigma) suplementado com 20% de SFB (Gibco), 100 U/mL de penicilina (Sigma) e 50 μ g/mL de estreptomicina (Sigma), em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C em condições de esterilidade.

Tabela 4. Características das linhagens utilizadas neste trabalho. DSMZ: *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*; ATCC: *American Type Culture Collection*.

Nome	Origem	Referência
K562	Leucemia Mielóide Crônica	[ATCC CCL-243]
KASUMI	Leucemia Mielóide Aguda	[DSMA ACC220]
NB4	Leucemia Mielóide Aguda	[DSMZ ACC-207]
NALM6	Leucemia Linfóide Aguda pré B	[DSMZ-ACC128]
REH	Leucemia Linfóide Aguda pré B	[ATCC CRL-8286]
RS 4,11	Leucemia Linfóide Aguda pré B	[DSMZ-ACC508]
CEMO1	Leucemia Linfóide Aguda B	Silva <i>et al.</i> , 1996
CEM	Leucemia Linfóide Aguda T	[DSMZ-ACC 240]
JURKAT	Leucemia Linfóide Aguda T	[DSMZ-ACC282]
B-JAB	Linfoma de Burkitt	Clements <i>et al.</i> , 1975
NAMALWA	Linfoma de Burkitt	[DSMZ-ACC224]
RAMOS	Linfoma de Burkitt	[ATCC CRL-1596]
HLB2	Linfoma não Hodgkin B	
DHL16	Linfoma Folicular	[DSMC ACC577]
KARPAS 422	Linfoma Folicular	[DSMZ ACC32]
GRANTA 519	Linfoma de Manto	[DSMZ ACC342]
HUT-78	Linfoma Cutâneo T	Gootenberg <i>et al.</i> , 1981
BC1	Linfoma de Efusão Pleural	[ATCC CRL-2230]
ARH-77	Linfoblastóide	[DSMZ-ACC512]
KMS11	Leucemia de Células Plasmáticas	Namba <i>et al.</i> , 1989

3.12. ENSAIOS DE DEMETILAÇÃO

Os ensaios de demetilação foram realizados com a linhagem celular KMS-11 porque a maioria dos genes estudados neste trabalho estava metilada nesta linhagem. Portanto, ela tornou-se um bom modelo para este tipo de ensaio. A linhagem celular KMS-11 foi cultivada em suspensão e mantida na concentração de $1-2 \times 10^6$ células/mL em meio de cultivo RPMI-1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, glutamina, 100U/mL de penicilina e 50 g/mL de estreptomicina, e em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37° C. Foram realizados quatro testes simultâneos com diferentes concentrações de 5-aza: 2 µM, 5 µM, 10 µM e controle (PBS). Foi adicionado à linhagem o agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina (decitabina) nos dias 1 e 3 do experimento. No quinto dia a cultura foi sacrificada, sendo estocado DNA e RNA. Posteriormente foi analisado o perfil de metilação sob o efeito das diferentes concentrações de 5-aza através do MSP.

A expressão dos transcritos dos diferentes genes estudados foi confirmada por RT-PCR qualitativo, utilizando iniciadores exônicos específicos. A seqüência dos iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho do fragmento estão detalhados na tabela 5. Os critérios utilizados na escolha dos pares de iniciadores foram: temperatura de anelamento igual ou superior a 55°C, diferença na temperatura de anelamento entre os iniciadores do mesmo par menor ou igual a 2°C, ausência de estruturas secundárias e presença de C ou G no extremo 3'. Após desenho, os iniciadores foram comparados com as bases de dados existentes para confirmar a especificidade com a seqüência alvo e a ausência de anelamentos com seqüências inespecíficas. O programa utilizado foi o BLAST (www.ncbi.nlm.nih/BLASTN).

Tabela 5. Iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR, condições de anelamento e tamanho dos fragmentos (bp). F: Direto, R: Reverso.

Iniciador	Seqüência (5' - 3')	Temp de anelamento(°C)	Tamanho (bp)
P16-F	GCT GCC CAA CGC ACC GAA TA	52	454
P16-R	ACC ACC AGC GTG TCC AGG AA		
P15-F	TGG GGG CGG CAG CGA TGA G	52	180
P15-R	AGG TGG GTG GGG GTG GGA AAT		
CDH1-F	GTA ACC GAT CAG AAT GAC	52	384
CDH1-R	CGT GGT GGG ATT GAA GAT		
ER-F	GCA CCC TGA AGT CTC TGG AA	48	470
ER-R	TGG CTA AAG TGG TGC ATG AT		
DAPK-F	CAG TTT GCG GTT GTG AAG AA	50	227
DAPK-R	CCT GCA ACG AGT TCC AAG AT		
SHP1-F	GCCCTGATGACGCTAAG	50	212
SHP1-R	CCCGCAGTTGGTCACAGA		
RARβ-F	AAT TCA GTG AAC TGG CCA CC	48	259
RARβ-R	GGC AAA GGT GAA CAC AAG GT		
BNIP3-F	CCA CCT CGC TCG CAG ACA CCA C	50	317
BNIP3-R	GAG AGC AGC AGA GAT GGA AGG AAA AC		
MGMT-F	GCC GGC TCT TCA CCA TCC CG	50	211
MGMT-R	GCT GCA GAC CAC TCT GTG GCA CG		

3.13. EXTRAÇÃO DE RNA

O trizol contendo as células foi descongelado e mantido à temperatura ambiente por cerca de dois minutos. A ele foram adicionados 300 µL de clorofórmio. A amostra foi centrifugada, e a fase aquosa foi transferida para outro eppendorf. Adicionou-se 500 µL de isopropanol e foi deixado à temperatura ambiente por 10

minutos. Para precipitar o RNA, a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos. A lavagem foi feita com etanol 75%. O RNA foi ressuscitado em água tratada com DEPC.

O RNA extraído teve sua integridade avaliada a partir da eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão fosfato (Na_2HPO_4 0,01M) corado com brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e conseguinte avaliação sob luz ultravioleta da intensidade das duas bandas predominantes do RNA ribossômico, 28S e 18S.

3.14. QUANTIFICAÇÃO DE RNA POR ESPECTROFOTOMETRIA

A quantificação e o grau de pureza do RNA foram acessados em um espectrofotômetro GeneQuant II (Pharmacia Biotech), através da leitura no comprimento de onda de 260nm, considerando-se uma unidade de densidade óptica (DO) correspondendo a aproximadamente 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para RNA de fita simples. A pureza das amostras foi estimada em relação à DO na faixa de 280nm (proteínas).

3.15. SÍNTESE DE cDNA

A retrotranscrição do RNA para obtenção de cDNA foi feita a partir de 2 μg do RNA total, utilizando iniciadores hexâmeros randômicos (Invitrogen), enzima transcriptase reversa (Superscript TM[®] Invitrogen) e inibidor de RNase (RNAguard[®] Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante.

O sucesso da síntese foi confirmado por meio da amplificação de um fragmento de 454 pb pertencente ao gene constitutivo *GAPDH*. Os iniciadores utilizados foram *GAPDH65* (direto) 5'CATCTCTGCCCCCTCTGCTG3' e *GAPDH67* (reverso) 5'CCCTCCGACGCCTGCTTCAC3'. A temperatura de anelamento foi de 58°C.

3.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi criado um banco de dados com os resultados obtidos para ser utilizado no programa SPSS 10.0 para futura associação e pesquisa de valores estatísticos.

A correlação entre os achados moleculares e os fatores de risco foi realizada utilizando os testes χ^2 ou o teste exato de Fisher e o teste t de Student.

A sobrevida global foi estimada desde a data do diagnóstico até a última visita ou até o óbito. As curvas de sobrevida foram construídas de acordo com o método de Kaplan-Meier. As diferenças entre as curvas de sobrevida foram estimadas utilizando o teste log-rank.

As associações foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. PACIENTES

O grupo estudado foi constituído por 70 pacientes, 42 homens e 28 mulheres, com uma mediana de idade de 42 anos (15 - 82 anos). O diagnóstico molecular da LMC foi baseado na presença do cromossomo Ph ou do gene de fusão BCR-ABL.

Ao diagnóstico, 63 pacientes encontravam-se em fase crônica, enquanto cinco estavam em fase acelerada e dois em crise blástica (tabela 6). Estes pacientes foram submetidos a diferentes modalidades terapêuticas, que incluíram 1) Hidroxiuréia, 2) IFN- α e 3) inibidores de tirosina quinase, como Mesilato de Imatinibe e Dasatinibe. Além disso, alguns pacientes foram submetidos ao transplante alogênico de medula óssea (alo-TMO). O número de pacientes submetidos às diferentes modalidades terapêuticas é apresentado na tabela 7. Um detalhamento das diferentes abordagens terapêuticas aplicadas para cada paciente dos é apresentado no anexo 2. Dos 70 pacientes que utilizaram Imatinibe, 24 não responderam ao tratamento: sete foram intolerantes e 17 adquiriram resistência.

Tabela 6. Características clínicas dos pacientes com LMC do estudo ao diagnóstico. M, masculino; F, feminino.

Características ao diagnóstico	N=70
Mediana de idade (anos)	42 (15 – 82)
Sexo M:F	42:28
Fase crônica	63 (90%)
Fase Acelerada	5 (7,15%)
Crise Blástica	2 (2,85%)

Tabela 7. Diferentes tratamentos utilizados nos pacientes com LMC em estudo. IFN- α , Interferon- α ; TMO, transplante de medula óssea

Fase ao diagnóstico	n ^o amostras	Hidroxiuréia	IFN- α	Imatinibe	Dasatinibe	TMO após Imatinibe	TMO antes do Imatinibe
Fase crônica	63	63	57	63	4	4	8
Fase acelerada	5	5	1	5	0	2	1
Crise Blástica	2	2	0	2	0	0	1

A resposta citogenética foi o fator avaliado nas diferentes modalidades terapêuticas. O acompanhamento da resposta citogenética é de grande importância clínica, pois é capaz de determinar se o paciente está respondendo ou não ao tratamento. A tabela 8 apresenta a resposta citogenética obtida dos pacientes submetidos ao Imatinibe. Oitenta e dois por cento dos pacientes que iniciaram Imatinibe na FC inicial atingiram resposta citogenética maior completa (RCC), enquanto 55% dos que iniciaram em FC tardia e 43,75% dos que iniciaram Imatinibe em FA alcançaram RCC. Dos pacientes que iniciaram Imatinibe em CB, nenhum atingiu resposta citogenética. A proporção de pacientes que não atingiram resposta citogenética foi maior de acordo com o avanço das fases (8,7% em FC inicial, 30% em FC tardia, 56,25% em FA e 100% em CB). O tempo médio de obtenção da RCC foi de 13 meses, e de resposta citogenética maior parcial (RCM), de nove meses.

Tabela 8. Resposta citogenética ao Imatinibe.

Resposta citogenética	Fase do início do Imatinibe			
	Fase Crônica inicial (n=24)	Fase Crônica tardia (n=23)	Fase Acelerada (n=16)	Crise Blástica (n=6)
Maior Completa	19	11	7	0
Maior Parcial	2	3	0	0
Sem resposta	2	6	9	6
Sem resultado	1	3	0	0

Foi verificado se existia alguma diferença na resposta citogenética entre dois grupos de pacientes submetidos ao Imatinibe: a) tratados previamente com IFN- α e b) não tratados previamente com IFN- α . A RCC dos pacientes tratados com IFN- α e Imatinibe foi significativamente maior quando comparada com os pacientes que não utilizaram IFN- α ($p=0,005$). Já a RCM não apresentou diferença significativa entre esses dois grupos de pacientes ($p=0,45$). O número de pacientes que não

apresentaram resposta citogenética ao Imatinibe foi significativamente maior nos pacientes não tratados com IFN- α anteriormente ($p=0,008$) (tabela 9).

Tabela 9. Diferença na resposta citogenética entre pacientes tratados com IFN- α e Imatinibe e pacientes tratados com só com Imatinibe. RCC, resposta citogenética maior completa; RCM, resposta citogenética maior parcial.

	INF- α + Imatinibe (N=54)	Imatinibe (N=12)	p
RCC	34	3	0,005
RCM	4	1	0,458
Sem resposta	16	8	0,008

4.1.1. SOBREVIDA GLOBAL DOS PACIENTES COM LMC

A mediana de acompanhamento dos pacientes foi de 52 meses (variando entre 5 e 137 meses). Ao final do estudo, 18 pacientes (25,7%) foram a óbito. Foi avaliada a sobrevida global de acordo com a fase em que o paciente encontrava-se ao diagnóstico (figura 14) e de acordo com a resposta citogenética (figura 15). Os pacientes diagnosticados nas fases mais agudas possuem sobrevida significativamente menor quando comparados aos pacientes diagnosticados na fase inicial da doença ($p<0,0005$). Os pacientes que atingiram resposta citogenética possuem sobrevida maior (aproximadamente 94% em 10 anos) quando comparado aos pacientes que não alcançaram resposta citogenética (aproximadamente 70% em 10 anos). Esta diferença na resposta citogenética é significativa ($p=0,01$). Os pacientes que não foram a óbito foram censurados para a análise de sobrevida na data da última consulta de acompanhamento.

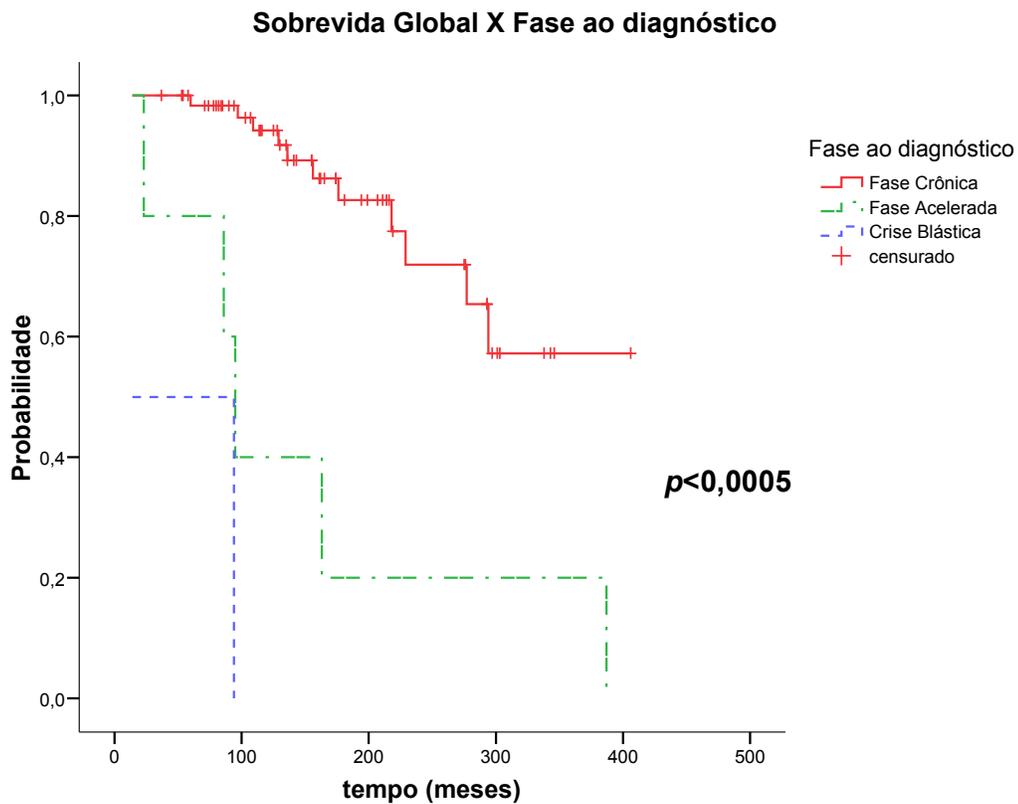


Figura 14. Gráfico representativo da sobrevida global nas diferentes fases ao diagnóstico. Comparação da sobrevida global entre pacientes diagnosticados nas diferentes fases.

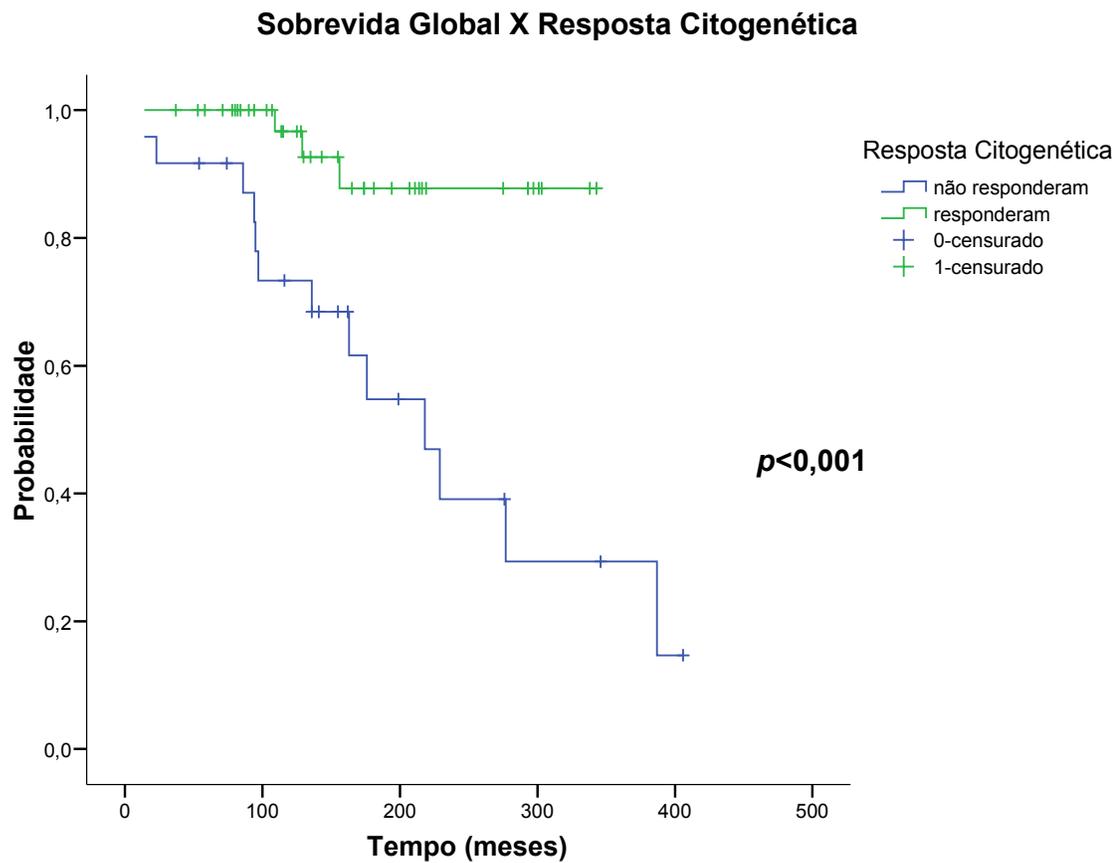


Figura 15. Gráfico representativo da sobrevida global versus resposta citogenética ao Imatinibe. Comparação da sobrevida global entre pacientes que atingiram resposta citogenética e os que não atingiram resposta.

4.2. ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO EM DIVERSOS GENES SUPRESSORES DE TUMOR

Antes do estudo do perfil de metilação nos pacientes, foram analisadas a especificidade e a sensibilidade da técnica MSP.

4.2.1. ESPECIFICIDADE

Para confirmar a especificidade das reações de MSP, foram utilizados diferentes controles da reação:

4.2.1.1. MSP a partir de DNA não modificado

Para confirmar que os iniciadores escolhidos foram específicos para seqüências de DNA modificadas pelo tratamento com bissulfito de sódio, foram realizadas duas reações de PCR com DNA não modificado para cada gene, utilizando dois pares de iniciadores diferentes (específicos para DNA não metilado e para DNA metilado). Em nenhuma das reações foi obtida a amplificação de fragmentos.

4.2.1.2. MSP em amostras não tumorais

Uma vez confirmada a inexistência de amplificação a partir de DNA não modificado, procedeu-se a realização das MSP em DNA de indivíduos sadios tratado com bissulfito de sódio. DNAs obtidos a partir de 15 doadores de medula óssea sadios foram utilizados como controles para testar a reação MSP-U e para confirmar a ausência de DNA metilado. Observou-se a amplificação de DNA nas reações MSP-U e a ausência de amplificação nas reações MSP-M em nove dos 12 genes estudados (figura 16). Três genes (*CDH1*, *BNIP-3* e *SOCS-1*) apresentaram amostras metiladas (tabela 10).

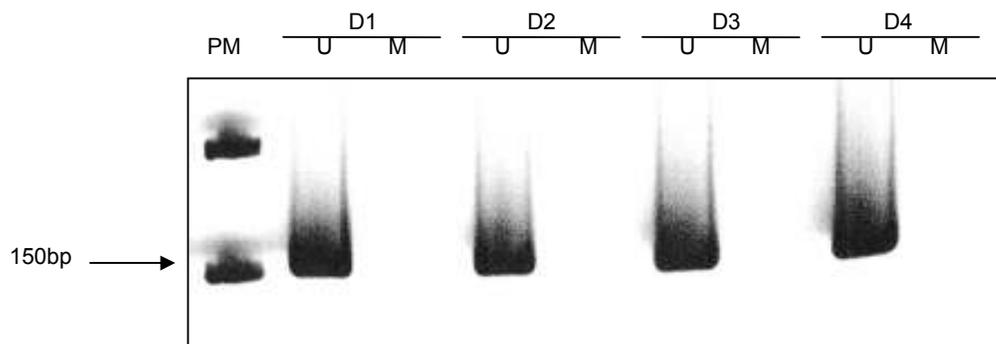


Figura 16. Reação de MSP no promotor do gene $p16^{ink4a}$ em doadores saudáveis de medula óssea (D1-D4). Observe que em todos os casos foi detectada a presença de DNA não metilado (poços U), mas em nenhum deles foi identificado DNA metilado (M). PM: peso molecular, U: MSP-U, M: MSP-M.

Tabela 10. Resultados do estado de metilação dos 12 genes supressores de tumor estudados nos controles saudáveis. U, não metilado; M, metilado. D1-D15 representam a amostra de cada doador (controles saudáveis).

	$p15^{ink4b}$	$p16^{ink4a}$	p73	DAPk	BNIP-3	MGMT	CDH1	ER	RAR- β	SHP-1	SYK	SOCS1
D1	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
D2	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
D3	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
D4	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	M
D5	U	U	U	U	U	U	M	U	U	U	U	M
D6	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
D7	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
D8	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
D9	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
D10	U	U	U	U	M	U	U	U	U	U	U	U
D11	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
D12	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
D13	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
D14	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
D15	U	U	U	U	U	U	M	U	U	U	U	M

4.2.1.3. Seqüenciamento de fragmentos amplificados de MSP-U e MSP-M

Fragmentos amplificados com os iniciadores U (amostras de doadores) e M (amostras de linhagens celulares) a partir de todos os genes sob estudo foram seqüenciados para confirmar ambos os processos: modificação e metilação de DNA. Na figura 17 estão representados os eletroferogramas obtidos do seqüenciamento da região promotora do gene $p16^{INK4a}$ a partir de uma amostra metilada e de uma não metilada, respectivamente. Em todos os genes sob estudo, o fragmento

amplificado correspondeu-se com a região alvo e o status de metilação foi o esperado.

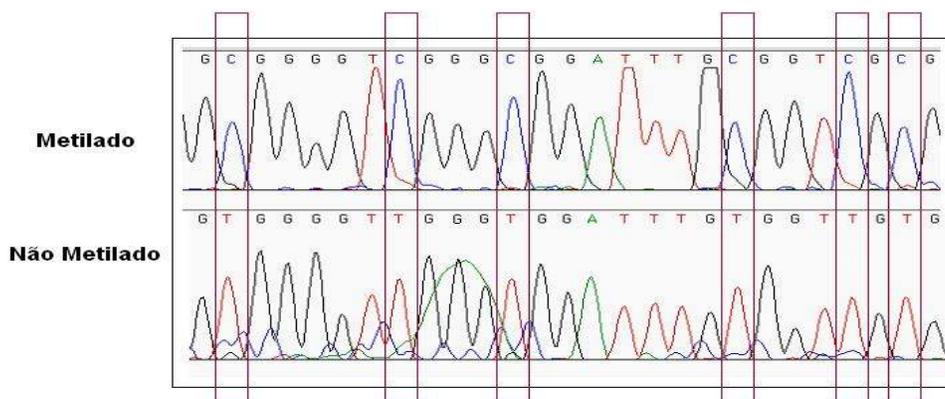


Figura 17. Eletroferogramas de seqüências modificadas com bissulfito de sódio. Na parte superior está representada uma região do promotor do gene *p16^{INK4a}* em sua forma metilada, como pode se observar pela preservação das C localizadas nos dinucleotídeos CpG. Na parte inferior, observa-se a mesma região não metilada. Nas caixas estão ressaltadas as modificações C>T originadas no tratamento do DNA. Adaptada de Braggio, 2006.

4.2.2 SENSIBILIDADE

Uma das principais vantagens desta metodologia é a alta sensibilidade que ela possui, permitindo detectar DNA tumoral presente em pequenas quantidades e não sendo necessária a separação da população de células tumorais. Foram realizadas diluições seriadas (1:10, 1:100, 1:1.000 e 1:10.000) entre linhagens celulares com padrão de metilação previamente conhecido (com DNA metilado X não metilado). Após a diluição entre as linhagens, o DNA foi extraído e modificado por bissulfito de sódio. Posteriormente, foram realizadas as reações de MSP-M. A sensibilidade da técnica variou dentre 10^{-2} e 10^{-3} , dependendo do gene estudado (tabela 11).

Tabela 11. Sensibilidade obtida na reação da M-MSP nos diferentes genes sob estudo.

Gene	Sensibilidade da M-MSP
<i>p16^{ink4a}</i>	10 ⁻³
<i>p15^{ink4b}</i>	10 ⁻³
<i>p73</i>	10 ⁻³
<i>ER</i>	10 ⁻³
<i>DAP-k</i>	10 ⁻³
<i>SHP1</i>	10 ⁻³
<i>RARβ</i>	10 ⁻³
<i>CDH1</i>	10 ⁻³
<i>BNIP3</i>	10 ⁻²
<i>MGMT</i>	10 ⁻²
<i>SYK</i>	10 ⁻²
<i>SOCS-1</i>	10 ⁻²

4.2.3. MSP DOS GENES SUPRESSORES DE TUMOR NAS LINHAGENS CELULARES

Foi caracterizado o padrão de metilação de 20 linhagens celulares previamente estabelecidas (tabela 4 dos materiais e métodos). Foi detectada metilação aberrante na região promotora do gene *CDH1* em 90% das linhagens, no *ER* em 85%, no *DAP-k* e *p73* em 70%, no *RARβ* em 55%, no *p16^{INK4a}* e *BNIP3* em 50%, no *SHP1* em 45%, no *SOCS-1* em 40%, no *p15^{INK4b}* e *MGMT* em 20% e no *SYK* em 10% (figura 18). Um quadro com os resultados da metilação nas linhagens celulares encontra-se no anexo 3.

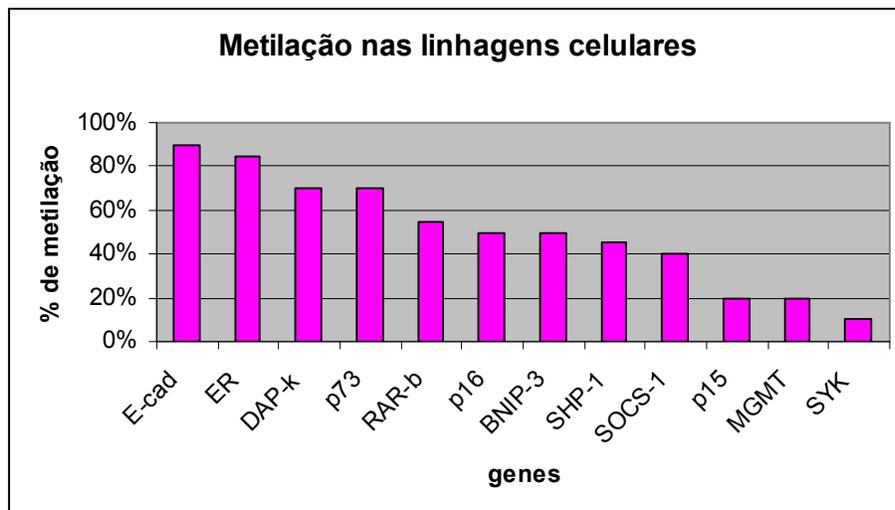


Figura 18. Porcentagem de metilação dos diferentes genes nas linhagens celulares derivadas de neoplasias hematológicas.

Foi calculado o índice de metilação, definido como o número total de genes metilados dividido pelo total de genes estudados. A mediana do índice de metilação da totalidade das linhagens foi de 6 genes metilados por linhagem (intervalo de 2–11 genes metilados). O maior índice foi observado na linhagem celular KMS-11 (11 genes metilados), a qual apresentou hipermetilação na região promotora de todos os genes sob estudo, menos no gene SYK.

4.2.3.1. Tratamento da linhagem celular KMS-11 com 5-aza-2'-deoxicitidina

Por ser uma linhagem com alto índice de metilação, a KMS-11 foi escolhida para os ensaios de demetilação *in vitro*. A linhagem KMS-11 foi crescida em meio RPMI-1640 acrescentado com diferentes concentrações de 5-aza: 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M e placebo (PBS 1X). Todas as culturas foram realizadas em duplicatas.

Em todos os experimentos realizados com placebo, o perfil de metilação foi coincidente com o obtido a partir da linhagem sem tratamento. Nas culturas tratadas com a droga desmetilante, foi re-estabelecido o padrão de DNA não metilado, sendo que o surgimento deste variou de um gene para outro, dependendo da concentração de 5-aza utilizada. Assim, nos genes *CDH1*, *DAP-k* e *BNIP3*, o DNA não metilado foi

detectado após tratamento com 2 μ M de 5-aza. Nos demais genes, a presença de DNA não metilado foi detectada após tratamento com 5 μ M de 5-aza (figura 19). Contudo, sob nenhum dos tratamentos foi possível eliminar totalmente o DNA hipermetilado.

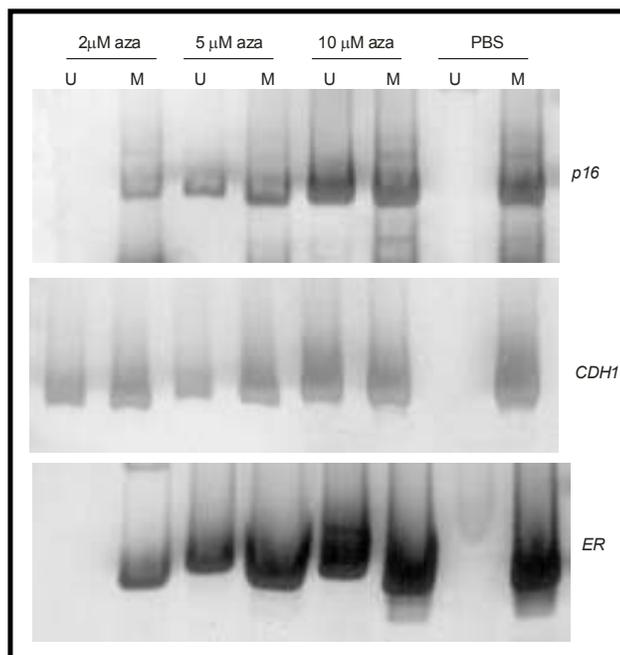


Figura 19. Tratamento da linhagem celular KMS-11 com 5-aza-2'-deoxicitidina. Análise do padrão de metilação dos genes $p16^{ink4a}$, $CDH1$ e ER sob o uso diferentes concentrações da droga desmetilante. Na presença de placebo (PBS) não se detecta DNA não metilado (U) em nenhum dos casos. Somente pode-se detectar a presença de DNA não metilado após tratamento com 2 mM ($CDH1$) ou 5 mM ($p16^{ink4a}$ e ER) de 5-aza. Nota-se que com as concentrações utilizadas não foi possível eliminar totalmente o DNA metilado (M) em nenhum dos testes.

Para confirmar que a metilação aberrante esteve relacionada com níveis inferiores ou ausentes de transcrito, foi realizada a amplificação por RT-PCR qualitativo a partir de cDNA obtidos dos diferentes tratamentos. A presença de DNA não metilado esteve correlacionada com um aumento nos níveis de transcritos de mRNA (figura 20). A integridade dos cDNA foi confirmada mediante amplificação de um fragmento do gene constitutivo $GAPDH$.

Maiores concentrações de 5-aza utilizadas no tratamento se corresponderam com uma maior morte celular *in vitro* (tabela 12).

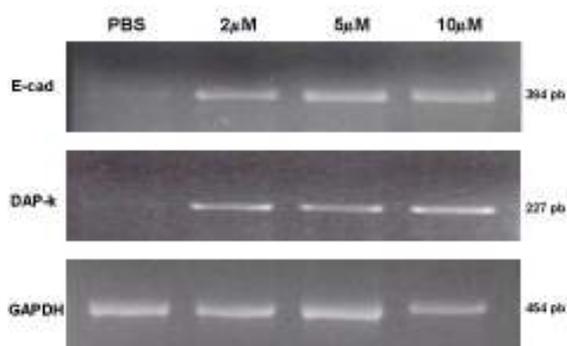


Figura 20. Amplificação por RT-PCR qualitativo de cDNAs sintetizados a partir da linhagem KMS-11 após tratamento com diferentes doses de 5-aza-2'-deoxicitidina. Observa-se que tanto *CDH1* como *DAP-k* apresentam níveis de transcrito muito baixos nas culturas tratadas com placebo (PBS), sendo que estes aumentam consideravelmente após tratamento com 2 μ M de 5-aza. A qualidade dos cDNA foi confirmada por meio da amplificação de um fragmento do gene constitutivo *GAPDH*. À direita estão especificados os tamanhos dos fragmentos amplificados.

Tabela 12. Relação entre concentrações de 5-aza-2'-deoxicitidina utilizadas e viabilidade celular *in vitro*, após o tratamento desmetilante.

Concentração (μ M)	Viabilidade (%)
Placebo	96
2	75
5	65
10	56

4.2.4. MSP NOS PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

Foi estabelecido o perfil de metilação em 70 pacientes com leucemia mielóide crônica. Foram analisadas as regiões promotoras de 12 genes supressores de tumor: *p15^{INK4b}*, *p16^{INK4a}*, *p73*, *SHP-1*, *SYK*, *SOCS-1*, *ER*, *RAR β* , *MGMT*, *CDH1*, *DAP-k* e *BNIP-3* (figura 21).

Das 80 amostras analisadas, 56,16% apresentaram metilação na região promotora do gene *SOCS-1*; em 23,08% foi detectada metilação na região promotora da *CDH1*; em 20,78%, no gene *MGMT*; em 15%, no gene *p73*; em 11,69%, no gene *ER*; em 8% no *p15^{INK4}*; em 6,41% no *BNIP-3*; em 3,85% no *RAR- β* ; em 3,8% no gene *SHP-1*; em 2,6% dos casos houve metilação do gene *SYK*; e apenas 1,3% das amostras mostrou metilação no gene *p16^{INK4a}*, enquanto não houve nenhuma amostra com metilação no gene *DAP-k* (figura 22). A metilação do

gene *SOCS-1* no grupo de pacientes com LMC foi significativamente maior quando comparada com a metilação dos demais genes ($p < 0,00001$).

Em 61 amostras (76,25%) foi identificado pelo menos um gene hipermetilado: 26 amostras (32,5%) apresentaram metilação aberrante da região promotora em um gene, 18 (22,5%) em dois, 14 (17,5%) em três e três amostras (3,75%) apresentaram quatro genes metilados ao mesmo tempo (figura 23). O perfil de metilação das amostras incluídas no estudo está representado na figura 24.

A mediana do índice de metilação das 80 amostras foi de 0,08 (mediana de 1 gene metilado por paciente), consideravelmente inferior ao obtido a partir das linhagens celulares.

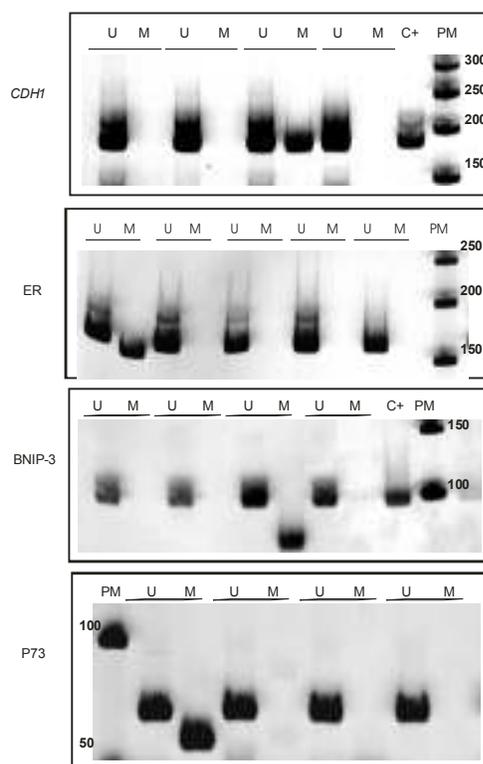


Figura 21. Exemplos de MSP dos genes sob estudo em pacientes com LMC. Em cada gel está representada a amplificação por MSP-U e MSP-M de alguns pacientes. Somente as amostras que possuem DNA metilado foram amplificadas nas reações MSP-M. PM, padrão de peso molecular; U, não metilado; M, metilado; C+, controle positivo (linhagem celular KMS-11). Quando uma amostra apresenta a banda U e a banda M ao mesmo tempo, consideramos a amostra metilada.

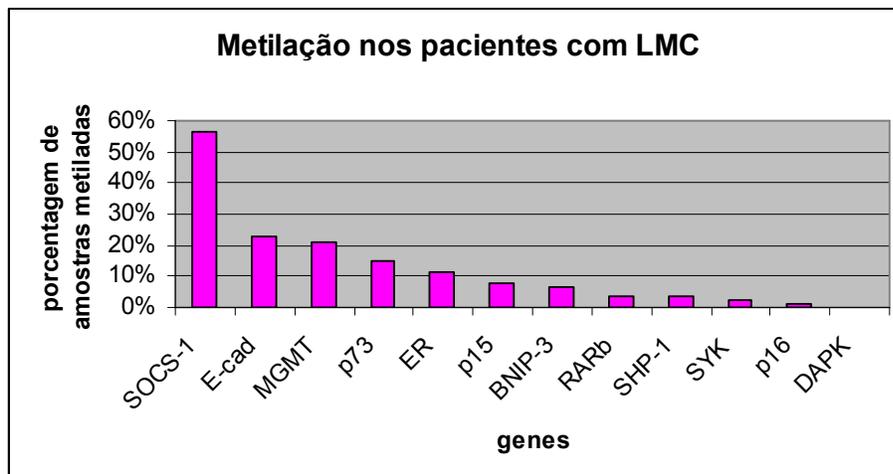


Figura 22. Porcentagem de metilação dos genes supressores de tumor em 80 amostras de pacientes com LMC.

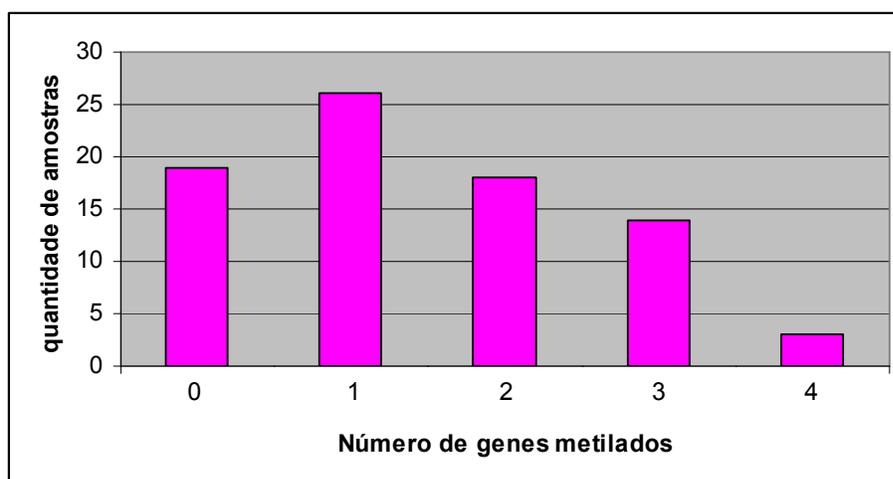


Figura 23. Distribuição das amostras dos pacientes com LMC baseada na quantidade de genes metilados.

Figura 24. Perfil de metilação das amostras incluídas no estudo. Os espaços em branco representam as amostras não metiladas; os espaços em preto representam as amostras metiladas; os espaços preenchidos em cinza representam as amostras sem resultados.

Quando analisada a associação entre o status de metilação dos diferentes genes nas 80 amostras estudadas, observou-se que o gene *CDH1*, o qual estava metilado em 18 amostras, encontrou-se metilado concomitantemente com o gene *MGMT* em 7 amostras ($p=0,023$). A hipermetilação de *CDH1* também estava associada com o gene *p15^{ink4b}* ($p= 0,027$). Os demais genes não apresentaram associação significativa (quadro 2).

Quadro 2. Associação da metilação aberrante entre os diferentes genes. Os valores correspondem ao p calculado pelo teste exato de Fisher entre cada gene.

	<i>p15^{ink4b}</i>	<i>p16^{ink4a}</i>	<i>P73</i>	<i>CDH1</i>	<i>ER</i>	<i>DAP-k</i>	<i>RARβ</i>	<i>SHP1</i>	<i>BNIP3</i>	<i>MGMT</i>	<i>SYK</i>	<i>SOCS1</i>
<i>p15^{ink4b}</i>		0,919	0,41	0,027	0,401	1	0,776	0,843	0,711	0,265	0,843	0,311
<i>p16^{ink4a}</i>			0,857	0,763	0,883	1	0,961	0,961	0,935	0,8	0,974	0,452
<i>P73</i>				0,291	0,392	1	0,659	0,336	0,457	0,146	0,733	0,536
<i>CDH1</i>					0,232	1	0,421	0,444	0,415	0,023	0,58	0,094
<i>ER</i>						1	0,681	0,28	0,528	0,118	0,779	0,38
<i>DAP-k</i>							1	1	1	1	1	1
<i>RARβ</i>								0,923	0,815	0,088	0,922	0,171
<i>SHP1</i>									0,175	0,375	0,923	0,499
<i>BNIP3</i>										0,862	0,874	0,187
<i>MGMT</i>											0,324	0,062
<i>SYK</i>												0,499
<i>SOCS</i>												

4.2.4.1. Correlação do padrão de metilação nas diferentes fases da doença

Foi verificada a quantidade de genes metilados por amostra nas cinco diferentes fases (fase crônica inicial, fase crônica tardia, fase acelerada, crise blástica e segunda fase crônica) da LMC. A tabela 13 e a figura 25 representam a quantidade de genes metilados em cada fase da doença. Entretanto, não houve diferença significativa na quantidade de genes metilados por amostra ao comparar as diferentes fases (quadro 3).

Tabela 13. Quantidade de genes metilados por cada fase da LMC.

	Genes metilados por amostra				
	0	1	2	3	4
FC inicial (n=32)	8	11	3	8	2
FC tardia (n=17)	5	3	6	3	0
FA (n=21)	4	8	8	0	1
CB (n=8)	2	3	0	3	0
2ª FC (n=2)	0	1	1	0	0

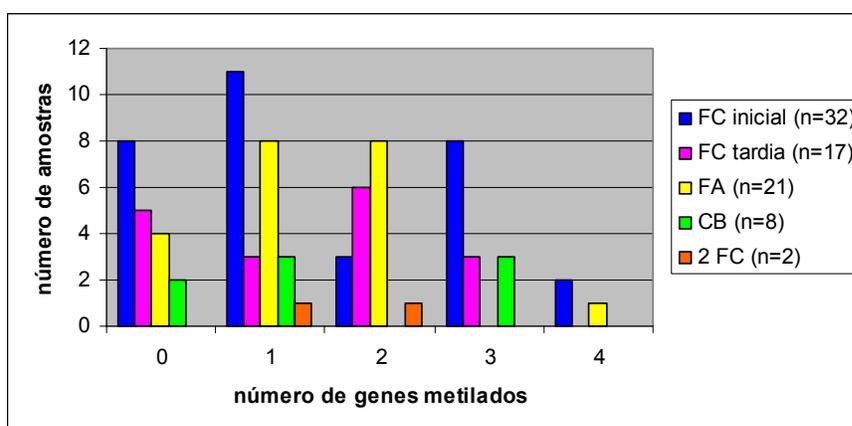


Figura 25. Distribuição das amostras das diferentes fases da LMC baseada na quantidade de genes metilados.

Quadro 3. Diferença no número de genes metilados entre as diferentes fases. Os valores correspondem ao p calculado pelo teste t de Student entre as proporções de genes metilados encontrados em cada fase da doença.

	FC tardia	FA	CB	2ª FC
FC inicial	0,26	0,18	0,39	0,44
FC tardia		0,41	0,43	0,46
FA			0,36	0,5
CB				0,42

Dentro de cada fase, foi encontrado um painel diferente de genes metilados por amostra. Um painel com o número de amostras metiladas para cada gene está representado na figura 26.

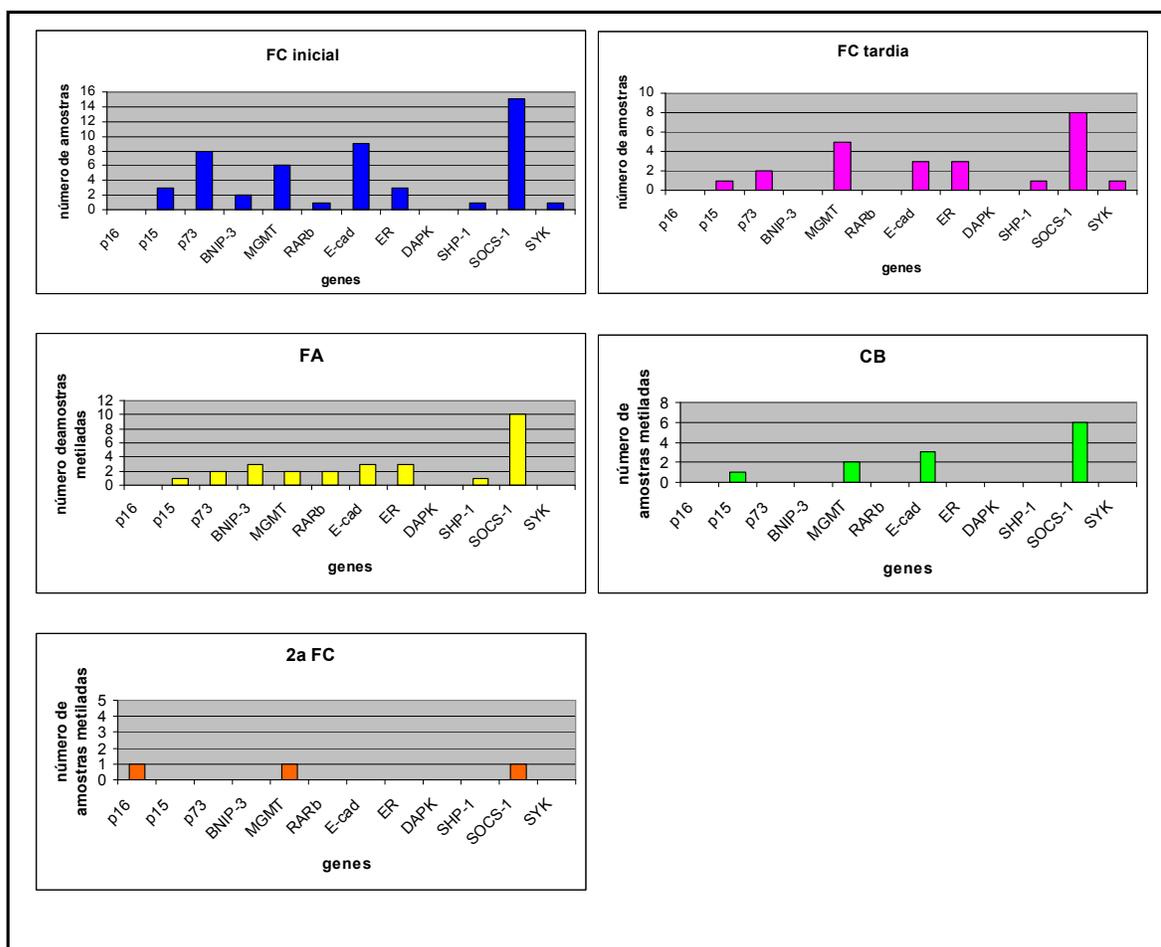


Figura 26. Gráficos representativos da quantidade de amostras metiladas para cada gene nas diferentes fases.

Foi analisada a frequência de metilação de cada gene entre as diferentes fases da LMC (figura 27). O gene *SOCS-1* foi o que apresentou maior porcentagem de metilação em todas as fases quando comparado com os outros genes: estava metilado em 47% das amostras de FC inicial e de FC tardia, em 52% na FA, em 75% na CB e em 50% das amostras de 2ª FC.

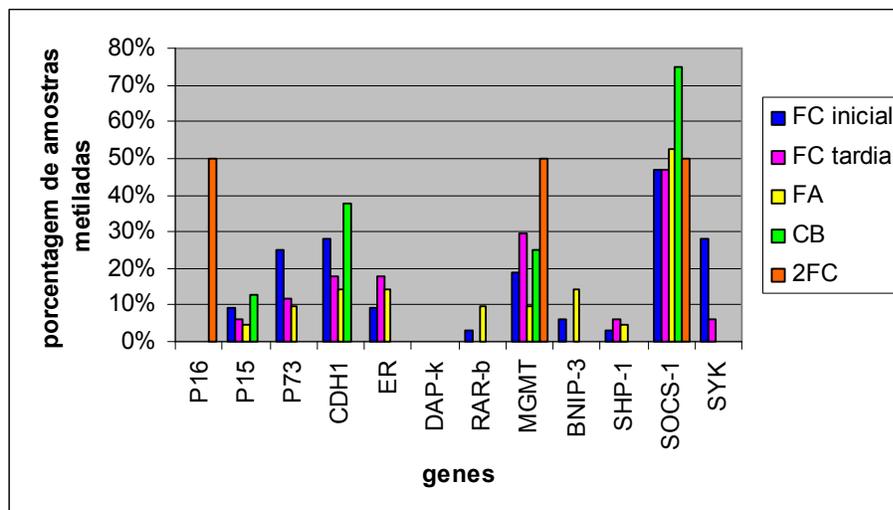


Figura 27. Gráfico representativo da porcentagem de metilação dos 12 genes sob estudo nas diferentes fases.

Posteriormente, foi analisado se havia diferença significativa na metilação dos diferentes genes entre as fases distintas (tabela 14). A metilação dos genes $p16^{ink4a}$, $MGMT$, $RAR-\beta$, $SHP-1$ e $SOCS-1$ não está relacionada com nenhuma fase específica. A hipermetilação de $p73$ está associada com a FC inicial quando comparada com CB ($p=0,001$). A hipermetilação de $BNIP-3$ está associada com a FA. Só não houve diferença significativa quando comparada a metilação de $BNIP-3$ entre FA e FC inicial. A metilação do gene $CDH1$ está associada com FA e CB, quando comparado com 2ª FC ($p=0,04$ e $p=0,03$, respectivamente). A metilação de ER está associada com as fases crônicas e acelerada quando comparadas com CB e 2ª FC.

Tabela 14. Associação da metilação de cada gene entre as diferentes fases da LMC. As associações significativas em azul indicam que havia mais metilação na fase da esquerda; as associações em vermelho indicam que havia mais metilação na fase da direita.

	$p16^{ink4a}$	$p15^{ink4b}$	$p73$	$BNIP-3$	$MGMT$	$RAR\beta$	$CDH1$	ER	$SHP-1$	$SOCS-1$	SYK
FC inicial X FC tardia	0,5	0,30	0,12	0,08	0,22	0,16	0,16	0,24	0,34	0,36	0,43
FC inicial X FA	0,5	0,21	0,06	0,2	0,19	0,19	0,09	0,3	0,37	0,48	0,16
FC inicial X CB	0,5	0,45	0,001	0,08	0,37	0,16	0,35	0,04	0,16	0,14	0,16
FC tardia X FA	0,5	0,42	0,41	0,03	0,08	0,07	0,39	0,41	0,45	0,38	0,15
FC tardia X CB	0,5	0,32	0,07	0,5	0,41	0,5	0,16	0,03	0,16	0,19	0,16
FA X CB	0,5	0,27	0,07	0,04	0,2	0,07	0,11	0,04	0,16	0,15	0,5
FA X 2a FC	0,09	0,16	0,08	0,05	0,14	0,08	0,04	0,04	0,16	0,33	0,5
CB X 2a FC	0,1	0,16	0,5	0,5	0,27	0,5	0,03	0,5	0,5	0,27	0,5

4.2.4.2. Correlação do padrão de metilação com as respostas ao Imatinibe

A metilação de cada um dos 12 genes foi correlacionada com resposta citogenética ao Imatinibe, com recaída citogenética pós Imatinibe, e com a resposta ao Imatinibe nos 70 pacientes. Para este tipo de análise, foram utilizadas 70 amostras, não sendo avaliadas as amostras de fases diferentes de um mesmo paciente. Neste caso, os genes *p16^{ink4a}* e *DAP-k* não foram analisados, pois não apresentaram metilação em nenhuma das 70 amostras analisadas. A metilação dos demais genes foi correlacionada com as respostas ao Imatinibe (tabela 15). A presença de metilação de cada gene não está correlacionada com nenhum dos parâmetros avaliados.

Tabela 15. Comparação das respostas ao Imatinibe entre pacientes que apresentaram amostras metiladas e não metiladas para os genes $p15^{ink4b}$, $p73$, $BNIP-3$, $MGMT$, $RAR-\beta$, $CDH1$, ER , $SHP-1$, $SOCS-1$ e SYK . RCC, resposta citogenética completa; RCM, resposta citogenética major.

Características		$p15^{ink4b}$			$p73$			$BNIP-3$			$MGMT$			$RAR-\beta$			$CDH1$			ER			$SHP-1$			$SOCS-1$			SYK			
		M	U	<i>p</i>	M	U	<i>p</i>	M	U	<i>p</i>	M	U	<i>p</i>	M	U	<i>p</i>	M	U	<i>p</i>	M	U	<i>p</i>	M	U	<i>p</i>	M	U	<i>p</i>				
Resposta Citogenética ao Imatinibe	Sem Resposta	3	21	0,14	4	20	0,53	1	23	0,53	5	18	0,52	1	23	0,56	6	18	0,43	3	20	0,43	1	22	0,72	11	12	0,3	2	21	0,13	
	RCC	1	33	0,16	5	32	0,5	3	33	0,5	7	28	0,47	1	35	0,49	8	29	0,5	6	30	0,5	2	35	0,68	20	13	0,25	0	36	0,15	
	RCM	0	3	0,7	1	4	0,45	0	4	0,86	1	4	0,45	0	4	0,86	0	3	0,46	0	3	0,46	0	5	0,82	1	2	0,42	0	4	0,72	
Recaída Citogenética pós Imatinibe	Não	4	50		10	49		4	53		12	44		2	55		14	43		8	48		2	56		28	24		2	54		
	Sim	0	6	0,65	1	5	0,69	6	0	0,66	1	5	0,63	0	6	0,82	1	5	0,56	1	5	0,63	1	5	0,26	3	3	0,32	0	6	0,81	
Resposta ao Imatinibe	Respondedores	3	32		8	32		3	35		7	31		1	37		9	29		6	32		2	38		19	15		0	38		
	Não Respondedores			0,36			0,25	1	23	0,36			0,26			0,48			0,15			0,15			0,45			0,53		0,15		
	Intolerantes	0	7	0,49	1	6	0,67		0	7	0,71	2	5	0,27	0	7	0,71	1	6	0,66	1	6	0,66	0	7	0,71	5	2	0,26	1	6	0,43
	Resistentes	2	15		3	14		1	16		2	15		1	16		2	15		2	15		1	16		9	8		1	16		

4.2.4.3. Correlação do padrão de metilação com os diferentes tratamentos

Foi verificado se o tratamento utilizado pelos pacientes com LMC poderia, de alguma maneira, interferir no padrão de metilação. Foram selecionadas 90 amostras dos 70 pacientes referentes a diferentes tratamentos utilizados. As amostras foram agrupadas de acordo com o medicamento que estava sendo administrado na época da coleta da amostra: a) diagnóstico, quando o paciente ainda não havia tomado nenhum medicamento; b) Hidroxiuréia, quando o paciente estava sendo tratado com hidroxiuréia antes de iniciar IFN- α ou Imatinibe; c) IFN- α , quando o paciente estava sendo tratado com IFN- α ; d) Imatinibe, quando os pacientes estavam em uso do Mesilato de Imatinibe; e) pós-Imatinibe, quando os pacientes pararam de utilizar o Imatinibe devido à falta de resposta a este medicamento. A proporção de metilação de cada gene nos grupos dos distintos tratamentos foi comparada com a proporção de metilação de cada gene ao diagnóstico. Os resultados de cada gene estão mostrados nas tabelas 16 e 17.

Ouve uma diferença significativa entre a metilação do gene *p73* ao comparar o grupo de pacientes ao diagnóstico com os tratados com IFN- α ($p=0,003$) e Imatinibe ($p=0,01$). Esta diferença é resultado da ausência de metilação do *p73* nas amostras de pacientes tratados com IFN- α e Imatinibe. O gene *CDH1* também apresentou uma diferença significativa entre o grupo sem tratamento e o grupo tratado com Imatinibe (proporção de metilação menor durante o tratamento com Imatinibe $p=0,05$), enquanto o gene *MGMT* foi diferente no grupo pós Imatinibe ($p=0,04$), mostrando-se mais metilado nas amostras pós Imatinibe do que nas amostras ao diagnóstico.

Tabela 16. Diferença no perfil de metilação dos genes $p16^{ink4a}$, $p15^{ink4b}$, $p73$, $BNIP-3$, $MGMT$ e $RAR-\beta$ entre as amostras ao diagnóstico e as amostras referentes aos diferentes tipos de tratamento.

Tratamentos	$p16^{ink4a}$			$p15^{ink4b}$			$p73$			$BNIP-3$			$MGMT$			$RAR-\beta$		
	M	U	p	M	U	p	M	U	p	M	U	p	M	U	p	M	U	p
Diagnóstico (n=17)	0	17		3	14		6	11		0	17		2	15		0	17	
Hidroxiuréia (n=26)	1	25	0,16	1	24	0,09	5	25	0,09	2	26	0,07	8	19	0,07	2	25	0,07
IFN- α (n=13)	0	13		1	11	0,23	0	13	0,003	1	12	0,15	3	10	0,21	0	13	
Imatinibe (n=18)	0	18		1	16	0,14	1	17	0,01	2	15	0,07	1	15	0,29	1	17	0,16
Pós Imatinibe (n=9)	0	9		2	7	0,39	1	8	0,07	1	8	0,15	4	5	0,04	2	7	0,06

Tabela 17. Diferença no perfil de metilação dos genes $DAP-k$, $CDH1$, ER , $SHP-1$, $SOCS-1$ e SYK entre as amostras ao diagnóstico e as amostras referentes aos diferentes tipos de tratamento.

Tratamentos	$DAP-k$			$CDH1$			ER			$SHP-1$			$SOCS-1$			SYK		
	M	U	p	M	U	p	M	U	p	M	U	p	M	U	p	M	U	p
Diagnóstico (n=17)	0	17		6	11		3	14		0	17		8	8		1	16	
Hidroxiuréia (n=26)	0	28		7	21	0,24	3	23	0,29	1	27	0,16	17	7	0,09	0	26	0,16
IFN- α (n=13)	0	13		2	10	0,12	1	12	0,2	1	12	0,15	6	6	0,5	1	12	0,42
Imatinibe (n=18)	0	18		2	15	0,05	3	14	0,5	1	17	0,16	10	8	0,37	0	17	0,16
Pós Imatinibe (n=9)	1	8	0,15	5	4	0,16	2	7	0,39	1	8	0,15	5	4	0,4	0	9	0,16

4.2.4.4. Correlação do padrão de metilação com a sobrevida global

Foi feita análise de sobrevida global correlacionando a metilação de cada gene. Entretanto, não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre metilação de nenhum dos genes estudados e sobrevida global (em meses) (tabela 18).

Tabela 18. Valores da probabilidade dos genes estarem associados com a sobrevida global (em meses) dos pacientes com LMC.

Gene	Associação com Sobrevida Global (<i>p</i>)
p15 ^{<i>ink4b</i>}	0,25
p73	0,5
BNIP-3	0,31
MGMT	0,57
RAR-b	0,56
CDH1	0,43
ER	0,45
SHP-1	0,33
SOCS-1	0,40
SYK	0,5

5. DISCUSSÃO

O diagnóstico da LMC é bem estabelecido devido à detecção do cromossomo Ph ou do gene de fusão BCR-ABL. Entretanto, os mecanismos responsáveis pela progressão da doença não são bem conhecidos. A procura de marcadores moleculares preditivos de progressão da doença é, portanto, fundamental. A existência destes permitirá uma melhor escolha terapêutica, assim como o desenho de novas drogas “fase-específicas”.

A proteína BCR-ABL tornou-se um alvo potencial para o tratamento da LMC nos últimos anos. Drogas inibidoras da atividade tirosina quinase desta proteína marcaram uma nova era na luta contra esta doença. Com a implementação do Mesilato de Imatinibe como mais uma modalidade terapêutica, os pacientes com LMC passaram a apresentar respostas terapêuticas efetivas, permitindo um melhor controle da doença. Além disso, os pacientes tratados com Imatinibe apresentam menos efeitos colaterais e conseqüentemente uma melhor qualidade de vida em comparação com as terapias utilizadas anteriormente (Hochhaus, 2003).

No entanto, independente dos altos níveis de resposta hematológica ou citogenética alcançadas com o uso do Imatinibe, são observados pacientes que desenvolvem refratariedade ou resistência a este medicamento (Quintás-Cardama e Cortes, 2006). No grupo de 70 pacientes avaliados neste estudo, após uma mediana de acompanhamento de 55 meses, sete foram intolerantes e 17 desenvolveram resistência ao Imatinibe. Destes últimos, 16% dos que iniciaram em FC inicial desenvolveram resistência, em contraste com 4,3% de FC tardia, 56,25% de FA e 50% de CB. De acordo com Guilhot (2004, *apud* Shah, 2005), após 42 meses de acompanhamento, 16% dos pacientes que iniciaram tratamento com Imatinibe na FC inicial desenvolveram resistência, o mesmo observado em nosso estudo. Além disso, após 48 meses de acompanhamento, a incidência de resistência ou progressão da doença em pacientes que iniciaram Imatinibe em FC inicial após o uso do IFN- α foi de 26%; esta taxa foi substancialmente maior em pacientes que

iniciaram Imatinibe em FA (73%) e CB (95%). Apesar da proporção de resistentes ao Imatinibe nas fases mais agudas vista em nossos resultados não terem sido tão altas como as do estudo mencionado, elas foram maiores que as observadas na fase crônica da doença, o que está de acordo com a literatura (Shah, 2005; Quintás-Cardama e Cortes, 2006; Bacarani *et al.*, 2006).

Há cerca de 20 anos atrás foi descrito que era possível induzir uma resposta citogenética nos pacientes com LMC após o tratamento com IFN- α . A partir de então, a resposta citogenética tem sido a ferramenta de avaliação mais utilizada para definir respondedores e não respondedores a qualquer abordagem terapêutica (Rosti *et al.*, 2003). No presente estudo foi avaliada a diferença na resposta citogenética ao Imatinibe entre as diferentes fases da doença. Nossos resultados mostraram que pacientes que iniciaram Imatinibe na FC apresentaram uma melhor resposta citogenética quando comparados aos pacientes que iniciaram o tratamento nas fases mais agudas. Estes resultados estão de acordo com dados publicados na literatura (Kantarjian *et al.*, 2002; Druker *et al.*, 2001), os quais indicam que as melhores taxas de resposta citogenética ao Imatinibe são encontradas em pacientes em FC inicial. A sobrevida global dos pacientes respondedores ao Imatinibe também foi significativamente maior quando comparada a dos pacientes não respondedores. Não há dúvidas de que a obtenção da resposta citogenética maior, completa ou parcial, está associada com aumento da sobrevida.

Um dos objetivos deste estudo foi comparar a resposta citogenética entre os pacientes que utilizaram IFN- α e Imatinibe e os pacientes que não utilizaram IFN- α antes do Imatinibe. Nossos resultados mostraram que a RCC dos pacientes tratados com IFN- α e Imatinibe foi significativamente maior quando comparada com os pacientes que não utilizaram IFN- α ($p=0,005$), e o número de pacientes que não apresentaram resposta citogenética ao Imatinibe foi significativamente maior nos pacientes não tratados com IFN- α anteriormente ($p=0,008$). Nossos resultados indicam que o tratamento do IFN- α previamente ao uso do Imatinibe aumenta a chance dos pacientes responderem ao tratamento e atingirem RCC. De acordo com Kantarjian e colaboradores (2002), a taxa de resposta citogenética ao Imatinibe é maior nos pacientes que tiveram recaída citogenética ao IFN- α e menor nos pacientes que apresentaram resistência hematológica. Provavelmente as células

leucêmicas remanescentes do tratamento com IFN- α tenham uma maior sensibilidade ao Imatinibe. Todavia, os dados encontrados em nosso estudo diferem dos descritos na literatura (Druker *et al.*, 2001; Kantarjian *et al.*, 2002; Cervantes *et al.*, 2003; O'Brien *et al.*, 2003). Em 2002 foram apresentados os resultados preliminares de um estudo randomizado com pacientes tratados com IFN- α + citarabina versus tratados com Imatinibe (IRIS – International Randomized Study of IFN- α + Ara-C versus STI571) (O'Brien *et al.*, 2003). Um total de 1106 pacientes foram randomizados em dois grupos com 556 pacientes cada: um tratado com IFN- α e citarabina e outro tratado com Imatinibe. Com uma mediana de acompanhamento de 19 meses, a taxa de RCC e de RCM ao Imatinibe foi de 74% e 85%, respectivamente. Em contraste, as taxas de RCC e RCM ao IFN- α + citarabina foram de 8% e 22%, respectivamente ($p < 0,001$), mostrando que, de fato, o Imatinibe aumenta consideravelmente a resposta citogenética quando comparada com o IFN- α . Em 2003, Cervantes e colaboradores mostraram que, de 150 pacientes não respondedores ao IFN- α tratados com Imatinibe, 44% e 22% atingiram RCC e RCM em 12 meses, respectivamente. Entretanto, nossos achados contrastam com os de Druker (2001), Kantarjian (2002) e Cervantes (2003) e ao IRIS. Estes mostram que o grupo de pacientes tratados apenas com Imatinibe tem taxas de resposta citogenética maiores que o grupo de pacientes tratados com IFN- α previamente ao uso do Imatinibe, ao contrário dos dados obtidos neste trabalho. Esta discrepância está provavelmente relacionada ao n amostral deste trabalho e também pelo fato da maioria dos pacientes submetidos diretamente o Imatinibe terem iniciado o tratamento nas fases mais avançadas da doença.

Apesar de haver um grande conhecimento sobre os eventos genéticos relacionados com a patogênese da LMC, os mecanismos epigenéticos associados com o início e progressão desta doença, e também com o desenvolvimento de resistência aos inibidores de tirosina quinase são pouco conhecidos. Uma vez definidas as características clínicas do grupo de pacientes com LMC estudado, a associação do *status* de metilação de diversos genes supressores de tumor com esta neoplasia foi pesquisada, uma vez que as mudanças no padrão de metilação da célula tumoral constituem um dos mais promissores biomarcadores na investigação da progressão da LMC (Herman e Baylin, 2003).

Uma vantagem da utilização da metilação do DNA como marcador é que sua detecção pode ser simples e rápida, dependendo da técnica utilizada, comparada com as técnicas utilizadas na pesquisa de mutações gênicas. Enquanto as mutações variam de um paciente a outro referente à posição e tipo, no estudo da hipermetilação é necessário um ensaio simples e padrão para todos os pacientes (Herman e Baylin, 2003). Várias metodologias são utilizadas para o estudo da metilação do DNA (Oakley, 1999; Dahl e Guldborg, 2003). As técnicas podem ser divididas em análise não específica de metilação (cromatografia líquida de alta performance, eletroforese capilar, etc) e análise de metilação gene-específica (enzimas de restrição combinadas com southern-blotting ou PCR ou sequenciamento, MSP, etc.) Dentre estas metodologias, a MSP é a mais comumente utilizada, e tem sido incorporada à pesquisa laboratorial por apresentar uma série de vantagens: 1) rapidez e facilidade de realização; 2) alta sensibilidade (os testes realizados neste trabalho com diluições seriadas confirmaram a sensibilidade desta técnica com valores de 10^{-3}); 3) pode ser usada para amplificar pequenos fragmentos de DNA, permitindo o uso de DNA altamente degradado, como os extraídos de bloco de parafina; 4) não está restrita às regiões que possuem sítios de restrição, pois não precisa de enzimas de restrição, permitindo que qualquer lugar do genoma com CpGs possa ser amplificado, desde que seja feito um iniciador específico para a região a ser estudada; e 5) baixo custo de realização quando comparada com as outras técnicas.

Nas doenças hematológicas em geral, têm sido realizados muitos estudos associando a metilação de diversos genes com a tumorigênese. Por outro lado, os trabalhos publicados até hoje relacionando a metilação do DNA com a LMC focaram-se no estudo de apenas um gene (Liu *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003; Asimakopoulos *et al.*, 1999; Issa *et al.*, 1999; Litz *et al.*, 1996; Mills *et al.*, 1996; Zion *et al.*, 1994; Nelkin *et al.*, 1991) ou de genes relacionados com o controle do ciclo celular (Nagy *et al.*, 2003; Kusy *et al.*, 2004) e genes relacionados com reparo do DNA ou resposta ao estresse (Asimakopoulos *et al.*, 1999), diferente do observado nas demais neoplasias hematológicas. Em relação a LMA, LLA, LLC, SMD e MM, diversos trabalhos foram publicados analisando o *status* de metilação de múltiplos genes, tais como *RB1*, *p15^{ink4b}*, *p16^{ink4a}*, *p14*, *p73*, *DAP-k*, *MGMT*, *CDH1*, *RAR-b*, *FHIT*, *hMLH1*, *APC*, *TIMP-3*, *SOCS-1*, *CALCA*, entre outros. Em todos os casos foi comprovado

que a metilação da região promotora do gene está relacionada com o silenciamento do mesmo por meio de estudos de análise da expressão gênica utilizando a técnica de RT-PCR (Galm *et al.*, 2004; Galm *et al.*, 2005; Esteller *et al.*, 2001; Esteller *et al.*, 2003; Chim *et al.*, 2006; Rush e Plass, 2002).

Em nosso conhecimento, nenhum estudo até o momento abordou o estudo da metilação de múltiplos genes pertencentes a diferentes vias na LMC. Devido a isto, nós incluímos genes supressores de tumor representativos das principais vias metabólicas geralmente alteradas nas células tumorais, priorizando a escolha de genes os quais já tivessem sido associados com outras neoplasias hematológicas ou tumores sólidos anteriormente. Por isso, os genes escolhidos foram *p15^{ink4b}*, *p16^{ink4a}* e *p73* (controle do ciclo celular), *DAP-k* e *BNIP-3* (pró-apoptóticos), *SOCS-1*, *SHP-1* e *SYK* (reposta à sinalização de citocinas), *ER* e *RAR-β* (resposta a fatores de crescimento), *MGMT* (reparo do DNA) e *CDH1* (adesão celular). É importante analisar o status de metilação de diversos genes uma vez que em uma célula tumoral, vários genes estão metilados ao mesmo tempo devido à desregulação na maquinaria epigenética. É interessante observarmos que uma célula tumoral não possui apenas um gene metilado. Vários estudos mostraram que existe uma superexpressão de enzimas DNMT em células tumorais, favorecendo a hipermetilação de genes supressores de tumor (Szyf, 2003). Desta forma, é observado uma série de genes metilados nas células tumorais, pertencentes a diversas vias regulatórias. Para uma célula desregulada sobreviver, é necessário que várias vias estejam desreguladas, seja por hipermetilação da região promotora do gene ou por outro mecanismo de silenciamento gênico, como mutação.

Em nosso trabalho, foi detectado pelo menos um gene hipermetilado em 76% do total das amostras analisadas. De maneira interessante, a maioria dos genes representativos das principais vias metabólicas analisados mostrou-se metilado na LMC, indicando que a metilação da região promotora de genes supressores de tumor é um evento comum no grupo de pacientes com LMC estudado.

Nos estudos de metilação da LMC, não existem dados a respeito da quantidade de genes metilados por amostra. Nosso objetivo foi calcular uma estimativa, estabelecendo um índice de metilação (IM) na LMC baseado no estudo de genes representativos das principais vias metabólicas. Ao compararmos o índice

aqui encontrado aos obtidos em estudos de outras neoplasias hematológicas, constatamos que o IM observado na LMC foi semelhante aos descritos no mieloma múltiplo (Braggio, 2006), na LLA (Roman-Gomez *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006) e na LMA (Galm *et al.*, 2005). Esta comparação é válida porque nos demais trabalhos, o IM foi calculado a partir de uma quantidade de genes analisados semelhante a nossa, além da maioria dos genes serem os mesmos analisados no presente estudo. No entanto, o índice de metilação não foi um parâmetro adequado para distinguir as diferentes fases da LMC, já que não apresentou diferenças significativas quando comparados os índices obtidos nas amostras dos pacientes das fases FC, CB e FA.

Nossos resultados mostraram que a metilação de múltiplos genes reguladores de vias fundamentais para o funcionamento normal de uma célula é um evento comum na LMC. Todavia, isto não implica que o silenciamento causado pela metilação de todos os genes esteja necessariamente relacionado com a patogênese da LMC. Ao avaliar a doença em geral, o gene *SOCS-1* esteve metilado em mais de 50% das amostras, sugerindo que a metilação deste gene seja um evento comum na LMC. Estes dados estão de acordo com os achados de Liu e colaboradores (2003), os quais observaram que a metilação do *SOCS-1* estava relacionada não só com o silenciamento deste gene, mas também estava associado com a patogênese da LMC. Apesar de também termos encontrado metilação do *SOCS-1* em controles sadios, este fato não foi valorado, pois a diferença na frequência de metilação entre controles e pacientes foi significativa.

Os mecanismos responsáveis pela progressão da FC para as fases mais avançadas não são conhecidos. Existe uma procura de marcadores específicos de cada fase ou de alterações que causam a mudança para uma fase mais avançada que forneçam formas de prever a progressão da doença. O índice de metilação encontrado em nosso estudo não foi capaz de nos prover um marcador das diferentes fases da doença. Desta forma, procuramos uma diferença no padrão de metilação dos genes supressores de tumor entre as fases distintas, uma vez que poucos são os estudos analisando a diferença no perfil de metilação de determinados genes nas diferentes fases da LMC (Roman-Gomez *et al.*, 2005; Nagy *et al.*, 2003; Hernandez-Boluda *et al.*, 2003; Kusy *et al.*, 2003). Ao analisar a

metilação nas diferentes fases da LMC separadamente, observamos que o gene *SOCS-1* foi o que apresentou maior frequência de metilação em todas as fases quando comparado com os demais genes, mas que não houve uma diferença na metilação deste gene entre as fases distintas. Nossos resultados não estão de acordo com os achados por Liu e colaboradores (2003), os quais observaram que a frequência de metilação de *SOCS-1* era muito maior na crise blástica do que na fase crônica ($p < 0,0001$). Esta diferença entre os dois trabalhos pode ser devida à diferença na seqüência de iniciadores utilizados nos dois estudos e ao número pequeno de pacientes em CB do nosso estudo. De qualquer maneira, nossos resultados sugerem que o *SOCS-1* não é um marcador de progressão da doença.

SOCS-1 pertence a uma família de proteínas intracelulares que regulam a resposta de células do sistema imunológico a citocinas. Em uma célula estimulada por citocinas como IL-1, IL3, IL-6 e IFN- γ , há uma ativação de proteínas Janus kinase (JAK). A ativação de JAK leva à ligação de uma família de fatores de transcrição (STAT), os quais dirigem-se ao núcleo onde estimulam a transcrição de genes responsivos a citocinas e do gene *SOCS-1*, o qual vai regular negativamente esta via. A proteína *SOCS-1* atua inibindo a ação de proteínas da via JAK/STAT, extinguindo a transdução do sinal (Alexander, 2002). A falta de inibição da via JAK/STAT pela metilação do *SOCS-1* deixa esta via constitutivamente ativa, levando a uma desregulação na proliferação celular (Liu *et al.*, 2003). De maneira interessante, a via JAK/STAT é uma das vias ativadas pela ação constitutiva da proteína quimérica BCR-ABL. Nas células leucêmicas da LMC, a proteína BCR-ABL é capaz de ativar a via JAK/STAT promovendo um estímulo mitogênico (Shteper e Ben-Yehuda, 2001). Este fato, somado aos achados que o gene *SOCS-1* está metilado na LMC, sugere que esta via está, de fato, desregulada na LMC e pode estar relacionada com a patogênese desta doença.

A frequência de metilação dos genes *CDH1*, *MGMT*, *p73*, *ER*, *p15^{INK4b}*, *BNIP-3*, *RAR- β* , *SHP-1*, *SYK* e *p16^{INK4a}*, foi consideravelmente menor.

Em nosso estudo, *p15^{ink4b}* foi encontrado metilado em 8% das amostras analisadas, semelhante aos resultados obtidos por dois outros estudos (Herman *et al.*, 1999; Kusy *et al.*, 2003), porém diferente dos 24% encontrados por Nguyen e colaboradores (2000). A proteína p15 está relacionada com o controle do ciclo

celular. É uma das proteínas responsáveis pela inibição das quinases dependentes de ciclinas (CDKs). Uma vez silenciado o gene $p15^{ink4b}$, a proteína não é transcrita sendo assim, a célula perde um dos mecanismos de controle do sinal de proliferação. Contudo, parece que esta via não está afetada de maneira significativa na LMC. A diferença encontrada entre os trabalhos citados pode estar relacionada com as diferentes metodologias empregadas nos trabalhos, uma vez que nos estudos em que a frequência de metilação do $p15^{ink4b}$ na LMC foi baixa, a técnica utilizada foi o MSP, enquanto no estudo de Nguyen e colaboradores (2000), foi usada a técnica MS-SNuPE.

Da mesma maneira que $p15$, $p16$ é uma proteína da família das inibidoras de CDKs. Quando silenciado, este gene também perde a capacidade de inibir as CDKs, permitindo que elas ativem a via de proliferação celular através da fosforilação da proteína Rb. Em relação ao $p16^{ink4a}$, nossos resultados mostraram que este gene está metilado em somente uma amostra (1,3%), sugerindo que a metilação do $p16^{ink4a}$ é um evento pouco freqüente na LMC. Estes dados estão de acordo com três trabalhos relacionando a metilação deste gene com a LMC, os quais não encontraram metilação em nenhuma amostra estudada (Hernandez-Boluda *et al.*, 2003; Kusy *et al.*, 2003; Herman *et al.*, 1999). Apesar de termos encontrado $p16^{ink4a}$ metilado em somente uma amostra, esta diferença com os resultados obtidos pelos demais grupos pode estar relacionada com o número de pacientes estudados. Somente um trabalho encontrou $p16^{ink4a}$ metilado em quase 50% das amostras de pacientes em fase acelerada (Nagy *et al.*, 2003). Esta discrepância nos resultados deve estar associada com um número maior de amostras na FA contidas neste último trabalho, o qual mostrou que das 30 amostras de FC analisadas, nenhuma apresentava metilação do $p16^{ink4a}$, enquanto 40% (12/30) das amostras de FA tinham $p16^{ink4a}$ hipermetilado. De qualquer maneira, parece que a metilação de $p16^{ink4a}$ não está relacionada com a patogênese da LMC.

O gene *CDH1* (E-caderina) é conhecido como “supressor de metástase”, pois a proteína E-caderina é capaz de suprimir a invasão celular e a metástase (Melki *et al.*, 2000), além de ter a capacidade de inibir a proliferação celular através da regulação da proteína p27 (Roman-Gomez *et al.*, 2004). A metilação do gene *CDH1* foi encontrada em 23% das amostras de LMC analisadas. Ao compararmos a

metilação de *CDH1* entre as fases distintas, observamos uma diferença significativa entre 2ª FC e FA e CB. Essa diferença deve-se à presença de metilação deste gene nestas duas fases, e a ausência na 2ª FC, e ao fato de que há somente duas amostras de 2ª FC. Duas amostras (2/15) de controles sadios também apresentaram metilação de *CDH1*. A diferença entre os achados nos pacientes e nos controles não é significativa. Desta forma, não podemos considerar que a metilação do gene *CDH1* encontrada nos pacientes seja um evento característico da LMC. Um estudo realizado por Roman-Gomez e colaboradores (2003) abordou a metilação do gene *CDH13*, o qual gera a proteína T-caderina (também conhecida como H-caderina). Assim como E-caderina, a T-caderina tem função de adesão celular nas células normais, além de estar envolvida com a inibição do crescimento celular por contato através da indução do arresto do ciclo celular. Neste estudo, eles observaram que o gene *CDH13* estava metilado em 55% (99/179) dos pacientes em FC estudados, e que a hipermetilação estava relacionada com a falta de expressão deste gene. Provavelmente as proteínas da família das caderinas desenvolvem um papel importante na LMC. Porém, parece que a T-caderina, e não a E-caderina, desempenha uma função que está sendo suprimida pela metilação de seu gene na LMC, mostrando que a metilação de *CDH13*, e não de *CDH1*, está envolvida com a patogênese desta doença.

A frequência de metilação do gene *ER* foi estudada em câncer de mama (Giacinti et al., 2006) e em diversas neoplasias hematológicas, tais como MM, LMA, LLA e LMC (Issa et al., 1996). Neste último estudo, eles encontraram 50% das amostras de FC e 100% das amostras de CB da LMC metiladas, mostrando que a metilação de *ER* parece estar relacionada com a progressão da doença. Devido a este achado, nós pesquisamos se a metilação do gene *ER* estava envolvida com a progressão da LMC no nosso grupo de pacientes. No entanto, nossos resultados não estão de acordo com os dados de Issa e colaboradores: observamos 11% de amostras metiladas e, ao comparar a metilação de *ER* nas diferentes fases da LMC, observamos que a presença de metilação está associada com as FC inicial, FC tardia e FA, quando comparadas com CB e 2ª FC. Provavelmente esta discrepância vista nos dois estudos deve estar relacionada com as técnicas empregadas para o estudo da metilação, uma vez que utilizamos a metodologia de MSP e os outros autores usaram a técnica menos específica Southern blotting. Ao comparar os

resultados obtidos pela técnica MSP em outras neoplasias hematológicas, observamos que *ER* estava metilado em 19% dos pacientes com LMA estudados (Aggerholm *et al.*, 2006), e em 16% dos pacientes com LLA (Garcia-Manero *et al.*, 2002). Parece que a metilação do gene *ER* não é um evento comum nas leucemias.

Até hoje, a metilação dos demais genes não foi avaliada em pacientes com LMC, porém foram analisadas nas demais neoplasias hematológicas. Nosso objetivo, ao estudar os genes ainda não descritos na LMC, foi saber se a metilação de algum destes genes está relacionada com a LMC, assim como estão para outros tumores.

A metilação do gene *p73* está associada com a LMA em 10% a 13% dos casos (Ekmekci *et al.*, 2004; Galm *et al.*, 2005), semelhante aos 15% encontrados em nosso estudo nos pacientes com LMC. De maneira interessante, o tratamento com decitabina em células de LMA com o gene *p73* metilado é capaz de induzir apoptose nestas células via ativação de caspases pela reativação da expressão de *p73* (Tamm *et al.*, 2005). Pluta e colaboradores (2006) reportaram em seu estudo que a proteína *p73* tem função de induzir apoptose, e está envolvida na regulação do ciclo celular, morte celular e desenvolvimento, desempenhando um papel importante na carcinogênese e na sensibilidade a tratamentos.

O gene *MGMT* foi encontrado metilado em 21% das amostras de LMC estudadas. Esta porcentagem está próxima dos 17% encontrados em pacientes com SMD (Vidal *et al.*, 2006). Entretanto, há uma grande diferença na proporção encontrada em pacientes com LLA, nos quais a hipermetilação de *MGMT* aparece em 56% dos casos (Matsushita *et al.*, 2004), na encontrada nos pacientes com LMA, nos quais a frequência de metilação do *MGMT* varia entre zero e 5% (Lenz *et al.*, 2004; Galm *et al.*, 2005), e no MM, onde este gene aparece metilado em somente 0 - 1,8% dos casos (Braggio, 2006; Galm *et al.*, 2004). Mais estudos devem ser feitos utilizando a mesma metodologia e os mesmos pares de iniciadores para que haja uma maneira de comparar as frequências encontradas em cada doença, possibilitando a associação da metilação deste gene com as neoplasias hematológicas.

O gene *RAR-β* está metilado em apenas 3,85% das amostras de LMC analisadas neste estudo, similar à baixa frequência (1,8%) observada no MM (Galm *et al.*, 2004) e em contraste com uma frequência de 18-20% observada na LMA (Ekmekci *et al.*, 2004; Galm *et al.*, 2005) e uma variação de 10% e 44% na LLA (Yang *et al.*, 2006; Matsushita *et al.*, 2004).

Assim como o gene *RAR-β*, o gene *SHP-1* estava metilado em 3,8% das amostras estudadas. Esta frequência observada na LMC é muito menor quando comparada com os dados encontrados por Chim e colaboradores (2004a e 2004b), os quais observaram *SHP-1* metilado em 79,4% das amostras de MM, em 84,6% dos pacientes com linfoma do manto e em todos os pacientes com linfoma folicular. Nossos resultados também diferem dos encontrados na LMA (11%), e SMD (0%) (Johan *et al.*, 2005).

O gene *SYK* foi encontrado metilado em apenas duas amostras de pacientes com LMC. A metilação deste gene foi pouco estudada nas neoplasias hematológicas (Roman-Gomez *et al.*, 2005b; Reddy *et al.*, 2005). *SYK* esteve metilado em 49% dos 50 pacientes com LLA-T estudados por Roman-Gomez e colaboradores (2005b), mostrando que a metilação deste gene está relacionada com a LLA e não com a LMC. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para avaliar o papel da metilação deste gene nas neoplasias hematológicas.

Assim como nossos resultados, os quais mostram que a metilação do gene *DAP-k* não foi encontrada na LMC, os dados existentes na literatura mostram que este gene não está metilado na LLA (Yang *et al.*, 2006; Matsushita *et al.*, 2004), na SMD (Vidal *et al.*, 2006) e está metilado em apenas 2/60 pacientes com LMA (Galm *et al.*, 2005), e em 6-12% dos pacientes com MM (Braggio, 2006; Galm *et al.*, 2004). No caso do MM, a hipermetilação de *DAP-k* parece estar associada com fator prognóstico desfavorável. Além disso, a metilação de *DAP-k* está associada com neoplasias de células B tais como linfoma folicular (85%) e linfoma de MALT (72%) (Rossi *et al.*, 2004). Provavelmente a metilação de *DAP-k* esteja relacionada com tumores originários de células B, enquanto outros genes pró-apoptóticos devem estar metilados na LMC.

Em relação ao gene *BNIP-3*, nossos resultados mostram que este está metilado em 6,4% (5/78) das amostras analisadas, e que a proporção de genes metilados na FA é significativamente maior que na FC tardia, na CB e na 2ª FC. *BNIP-3* é uma proteína pró-apoptótica ativada em condições de hipóxia. Recentemente foi descrita a associação da metilação do gene *BNIP-3* com tumor pancreático (Okami *et al.*, 2004). Desde então, alguns estudos focaram-se no estudo da metilação deste gene em outros tipos de tumor, mas até agora, apenas um trabalho relacionou a metilação do *BNIP-3* com neoplasias hematológicas (Murai *et al.*, 2005), o qual mostrou que este gene estava metilado em 15% das amostras primárias de LLA (5 de 34 pacientes), em 17% das amostras de LMA (6 de 35) e em 21% (3 de 14) das amostras de MM. No trabalho de Braggio (2006), foi mostrado que *BNIP-3* estava metilado em 13,2% dos pacientes com MM. Quando foi realizada a análise em indivíduos sadios em nosso trabalho, observamos a presença de metilação em uma amostra (1/15). A presença de metilação nesta amostra pode indicar que a metilação do *BNIP-3* encontrada em nossas amostras não está relacionada com a LMC.

Ao comparar os resultados obtidos em nosso trabalho com os demais estudos relacionando metilação de genes supressores de tumor com a LMC ou com as demais neoplasias hematológicas, observamos dados bastante controversos. Esta diferença deve-se à heterogeneidade das metodologias empregadas. Mesmo quando a técnica usada é a mesma, é necessário que haja a utilização de reagentes padrões, tais como mesmos iniciadores ou mesmas enzimas de restrição. Ou seja, é preciso que haja um padrão na técnica adotada para permitir uma melhor comparação entre os dados obtidos pelos diferentes grupos. Provavelmente, as diferenças obtidas entre os resultados do nosso trabalho e os demais podem estar relacionadas, além das diferentes metodologias empregadas, com baixo número de amostras de cada fase da doença, principalmente com as poucas amostras de CB e 2ª FC. Apesar de não termos encontrado um marcador da progressão da doença com o estudo da metilação destes 12 genes, começamos a traçar o perfil de metilação da LMC.

Um dos objetivos deste trabalho foi tentar encontrar alguma correlação entre a metilação dos genes estudados com as respostas ao Imatinibe, isto é, se a

metilação de algum gene estaria relacionada com uma pior resposta ao Imatinibe. Entretanto, não observamos nenhuma diferença significativa ao correlacionar a metilação de cada gene com resposta e recaída citogenética e resposta ao Imatinibe. A resistência ao Imatinibe pode ser consequência de dois processos: 1) mutações no domínio quinase da proteína BCR-ABL, impedindo a ligação do Imatinibe, as quais representam 50-90% dos casos (Shah, 2005); 2) alterações oncogênicas secundárias, as quais geram sinais proliferativos não mais dependentes da BCR-ABL (Tauchi e Ohyashiki, 2004). Este segundo mecanismo de indução à resistência ao Imatinibe poderia estar relacionado com alterações no padrão de metilação da célula. Nossos resultados mostram que nenhum dos genes estudados parece estar associado a este processo. É provável que a metilação do DNA não seja um processo relacionado com a resposta ao Imatinibe.

Nossos resultados também não mostraram nenhuma associação entre a sobrevida global dos pacientes e a metilação dos genes estudados. Como a sobrevida dos pacientes do nosso estudo está diretamente relacionada com a resposta ao Imatinibe, esta falta de associação com a sobrevida provavelmente está relacionada com a falta de associação entre metilação e resposta ao Imatinibe. A associação entre sobrevida livre de evento e a metilação não foi realizada devido à falta de informação suficiente para tal.

Outro objetivo foi analisar se havia diferença na frequência de metilação de cada gene entre as amostras ao diagnóstico e as amostras referentes aos diversos tratamentos administrados ao grupo de pacientes estudados. Nosso objetivo era avaliar se as células com determinado perfil de metilação seriam mais resistentes ao medicamento utilizado. Os genes *p73* e *CDH1* apareceram menos metilados nas amostras analisadas durante o tratamento com Imatinibe quando comparadas com as amostras ao diagnóstico, e essa diferença foi significativa ($p=0,01$ e $p=0,05$, respectivamente). A metilação do gene *p73* também foi menos freqüente nos pacientes em tratamento com IFN- α ($p=0,003$). Apesar de nenhum dos medicamentos convencionais utilizados no tratamento da LMC ter ação desmetilante, parece que, de certa forma, o Imatinibe e o IFN- α selecionam as células que não estejam com os genes *p73* e *CDH1* metilados. Por outro lado, o gene *MGMT* aparece mais metilado nas amostras pós Imatinibe quando comparado

com as amostras ao diagnóstico. Pode-se sugerir que este gene está relacionado com alguma vantagem seletiva de células leucêmicas em relação ao Imatinibe, uma vez que a maioria destas amostras é de pacientes não respondedores a este medicamento. Entretanto, o n amostral dos diferentes tratamentos foi pequeno, e essas associações precisam ser revistas com um número maior de pacientes.

Muitos estudos comprovaram que a metilação de um gene está relacionada com a ausência de sua expressão (Murai *et al.*, 2005, Liu *et al.*, 2006; Esteller *et al.*, 2001), e que este processo pode ser revertido com uso de agentes desmetilantes. De fato, alguns estudos fase I e fase II com a Decitabina já foram realizados em pacientes com SMD, LMA, LLA e LMC (Shadduck *et al.*, 2004; Issa *et al.*, 2004; Kantarjian *et al.*, 2003; Issa *et al.*, 2005; Oki *et al.*, 2007). Um estudo realizado com 17 pacientes com LMC em fase acelerada e 20 em crise blástica tratados com Decitabina mostrou que 25% e 53% dos pacientes em CB e em FA, respectivamente, responderam ao tratamento (Kantarjian *et al.*, 1997). Em outro trabalho, 130 pacientes com LMC foram tratados com Decitabina (Kantarjian *et al.*, 2003). A taxa de resposta na FC foi de 63%, na FA 55% e na CB de 28%. O efeito colateral mais significativo encontrado nestes pacientes foi a mielossupressão. A conclusão foi que a Decitabina possui uma atividade “anti-LMC” significativa, e que baixas doses da droga por um maior período seriam a melhor alternativa de uso para esta droga na LMC.

Nossos estudos funcionais *in vitro* realizados usando a linhagem KMS-11 demonstraram que a Decitabina pode reverter os genes ao estado não metilado. Além disso, foi demonstrado que esta diminuição nos níveis de metilação esteve relacionada com um aumento considerável dos níveis de transcrito gênico. Esta potencialidade de reverter o estado de metilação do DNA e a conseqüente re-expressão dos genes afetados é uma opção atrativa para ser explorada na clínica.

A utilização de drogas desmetilantes, principalmente em pacientes com LMC resistente ao Imatinibe, faz com que a atenção seja voltada aos mecanismos epigenéticos relacionados com a LMC. O presente trabalho apresentou um perfil da metilação de 12 genes supressores de tumor na LMC e, apesar de não ter encontrado nenhuma associação com os parâmetros clínicos, começou a traçar o padrão de metilação desta doença, uma vez que é sabido que cada tipo de tumor

tem um padrão de metilação característico. Nossos resultados permitem que comecemos a entender o cenário de metilação na LMC para que possamos traçar uma plataforma de uso potencial de drogas desmetilantes sozinhas ou em combinação com outros agentes terapêuticos. No entanto, é necessária a realização de estudos em grande escala, incluindo maior número de pacientes, mais genes supressores de tumor analisados e tempo mais prolongado de acompanhamento para definir com maior exatidão o perfil de metilação da doença.

6. CONCLUSÕES

Os pacientes tratados com IFN- α previamente ao uso do Imatinibe apresentam uma resposta citogenética melhor quando comparados aos pacientes que não usaram IFN- α antes.

A metilação do DNA é um evento freqüente na LMC, envolvendo genes de diversas via metabólicas.

A hipermetilação do gene *SOCS-1* é um evento freqüente na LMC.

O status de metilação dos genes supressores de tumor incluídos neste estudo não está envolvido na progressão da doença.

A metilação dos genes estudados não está relacionada com resposta ao Imatinibe nem com sobrevida global dos pacientes.

A confirmação da hipermetilação em múltiplos genes na LMC permite que esta doença seja considerada para adoção de estratégias terapêuticas baseadas em drogas desmetilantes.

7. REFERÊNCIAS

Aggerholm A, Holm MS, Guldborg P, Olesen LH, Hokland P. Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *Eur J Haematol* 76: 23-32, 2006.

Agirre X, Roman-Gomez J, Vazquez I, Jimenez-Velasco A, Garate L, Montiel-Duarte C, Artieda P, Cordeu L, Lahortiga I, Calasanz MJ, Heiniger A, Torres A, Minna JD, Prosper F. Abnormal methylation of the common PARK2 and PACRG promoter is associated with downregulation of gene expression in acute lymphoblastic leukemia and chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer* 118: 1945-1953, 2006.

Alexander WS. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nature Rev Immunol* 2:1-7, 2002.

Asimakopoulos FA, Shteper PJ, Krichevsky S et al. ABL1 methylation is a distinct molecular event associated with clonal evolution of chronic myeloid leukemia. *Blood* 94: 2452-2460, 1999.

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.

Baur AS, Shaw P, Burri N, Delacretaz F, Bosman FT, Chaubert P. Frequent methylation silencing of p15(INK4b) (MTS2) and p16(INK4a) (MTS1) in B-cell and T-cell lymphomas. *Blood* 94(5):1773-81, 1999.

Baylin S, Herman J. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 16: 168-74, 2000.

Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: A fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.* 72: 141, 1998.

Baylin SB, Hoppener JWM, de Bustros A, Steenbergh PH, Lips CJM, Nelkin BD. DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. *Cancer Res* 46: 2917-2922, 1986.

Bechter OE, Eisterer W, Dlaska M, Kuhr T, Thaler J. CpG island methylation of the hTERT promoter is associated with lower telomerase activity in B-cell lymphocytic leukemia. *Exp Hematol* 30: 26-33, 2002.

Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Gen* 9(16): 2395-2402, 2000.

Bickle TA, Kruger DH. Biology of DNA restriction. *Microbiol Ver.* 57: 434-450, 1993.

Bird AP. Gene number, noise reduction and biological complexity. *Trends Genet.* 11: 94, 1995.

Bouchard J, Momparler RL. Incorporation of 5-aza-2'-deoxycytidine 5'-triphosphate into DNA. Interactions with mammalian DNA polymerase and DNA methylase. *Mol Pharmacol* 24: 109-114, 1983.

Braggio E. Alterações citogenéticas e epigenéticas no mieloma múltiplo e a sua aplicação potencial como valor prognóstico. Rio de Janeiro, 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina, UFRJ, Rio de Janeiro, 2006.

Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Druker B, Lydon N. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* 56:100-104, 1996.

Cameron E, Bachman K, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 21:103–107, 1999.

Cervantes F, Hernández-Boluda JC, Steegmann JL, Conde E, Alvarez-Larrán A, López-Jiménez J, Osorio S, Villalón L, Camós M, García-Conde J, Odriozola J. Imatinib mesylate therapy of chronic phase myeloid leukemia resistant or intolerant to interferon: results and prognostic factors for response and progression-free survival in 150 patients. *Haematologica* 88: 1117-1122, 2003.

Cheng X, Roberts RJ. AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping. *Nucleic Acids Res.* 29: 3784-3795, 2001.

Chim CS. SOCS1 and SHP1 hypermethylation in mantle cell lymphoma and follicular lymphoma: implications for epigenetic activation of the JAK/STAT pathway. *Leukem* 18: 356-372, 2004b.

Chim CS, Fung TS, Cheung WC, Liang R, Kwong YL. SOCS1 and SHP1 hypermethylation in multiple myeloma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway. *Blood* 130: 4630-4635, 2004a.

Chim CS, Fung TK, Wong KF, Lau LS, Law M, Liang R. Methylation of INK4 and CIP/KIP families of cyclin-dependent kinase inhibitor in chronic lymphocytic leukemia in Chinese patients. *J Clin Pathol* 59: 921-926, 2006.

Chim CS, Liang R, Tam CY, Kwong YL. Methylation of p15 and p16 genes in acute promyelocytic leukemia: potential diagnostic and prognostic significance. *J Clin Oncol* 19: 2033-40, 2001.

Claus R, Lübbert M. Epigenetic targets in hematopoietic malignancies. *Oncogene* 22: 6489-6496, 2003.

Clements GB, Klein G, Povey S. Production by EBV infection of an EBNA-positive subline from an EBNA-negative human lymphoma cell line without detectable EBV DNA. *Int J Cancer* 16: 125-33, 1975.

Cortes J, Kantarjian H. Advanced-phase chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol* 40: 79-86, 2003.

Dahl C, Guldborg P. DNA methylation analysis techniques. *Biogerontology* 4: 233-250, 2003.

Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 247:824-830, 1990.

Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol* 22: 4632-4642, 2004.

Deninger MWN. Cytogenetic studies in patients on Imatinibe. *Sem in Hematol* 40: 50-55, 2003.

de Vos D, van Overveld W. Decitabine: a historical review of the development of an epigenetic drug. *Ann Hematol* 84: 3-8, 2005.

de Vos D. Epigenetic drugs: a longstanding story. *Sem Oncol* 32: 437-442,

2005.

Dodge JE, List AF, Futscher. Selective variegated methylation of the p15 CpG island in acute myeloid leukemia. *Int J Cancer* 78: 561-567, 1998.

Dodge JE, Munson C, List AF. KG-1 and KG-1^a model the p15 CpG island methylation observed in acute myeloid leukemia patients. *Leuk Res* 25: 917-925, 2001.

Doerfler W, Schubbert R, Heller H, Kammer C, Hilger-Eversheim K, Knoblauch M, Remus R. Integration of foreign DNA and its consequences in mammalian systems. *Trends Biotechnol.* 15: 297, 1997.

Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of bcr-abl positive cells. *Nat Med* 2:561-566, 1996.

Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344:1031-7, 2001.

Druker BJ. Perspectives on the development of a molecularly targeted agent. *Cancer Cell* 1:31-36, 2002.

Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 21: 5400-13, 2002.

Ekmekci CG, Gutierrez MI, Siraj AK, Ozbek U, Bhatia K. Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 77: 233-240, 2004.

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile in human cancer. *Cancer Res* 61: 3225-3229, 2001.

Esteller M, Gaidano G, Goodman S, Zagonel V, Capillo D, Botto B, et al. Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 94: 26-32, 2002a.

Esteller M. Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg. *Clin Immunol* 109: 80-88, 2003.

Fazzari MJ, Grealley JM. Epigenomics: beyond CpG islands. *Nature Rev Gen* 5: 446-455, 2004.

Feinberg AP, Vogelstein B. Hypermethylation of *ras* oncogenes in primary human cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111: 47-54, 1983.

Feinberg AP. The epigenetics of cancer etiology. *Semin. Canc. Biol.* (article in press), 2004.

Fenaux P. Inhibitors of DNA methylation: beyond myelodysplastic syndromes. *Nat Clin Prac Oncol* 2 suppl 1: 36-44, 2005.

Forkner CE, Scott TFM. Arsenic as a therapeutic agent in chronic myeloid leukemia. Preliminary report. *JAMA* 97: 3-5, 1931.

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 1827, 1992.

Galm O, Wilop S, Lüders C, Jost E, Gehbauer G, Herman JG, Osieka R. Clinical implications of aberrant DNA methylation patterns in acute myelogenous leukemia. *Ann Hematol* 84: 39-46, 2005.

Galm O, Wilop S, Reichelt J, Jost E, Gehbauer G, Herman J, et al. DNA methylation changes in multiple myeloma. *Leukemia* 18: 1687-92, 2004.

Garcia-Manero G, Daniel J, Smith TL, Kornblau SM, Lee MS, Kantarjian HM, et al. DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in adult acute lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 8: 2217-24, 2002.

Garcia-Manero G, Jeha S, Daniel J, Williamson J, Albitar M, Kantarjian HM, et al. Aberrant DNA methylation in pediatric patients with acute lymphocytic leukemia. *Cancer* 97: 695-702, 2003.

Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* 196: 261-282, 1987.

Gaudet F, Hodgson J, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray J, et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 300: 489-92, 2003.

Giacinti L, Claudio PP, Lopez M, Giordano A. Epigenetic information and estrogen receptor alpha expression in breast cancer. *Oncologist* 11:1-8, 2006.

Gold M. and Hurwitz J. The enzymatic methylation of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid. VI. Further studies on the properties of the deoxyribonucleic acid methylation reaction. *J. Biol. Chem.* 239: 3866-3874, 1964.

Gootenberg JE, Ruscetti FW, Mier JW, Gazdar A, Gallo RC. Human cutaneous T cell lymphoma and leukemia cell lines produce and respond to T cell growth factor. *J Exp Med* 154: 1403–18, 1981.

Gore ME., Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 293:876-880, 2001.

Guilhot F. Sustained durability of responses plus high rates of cytogenetics responses result in long-term benefit for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia (CML-CP) treated with Imatinibe (IM) therapy: update from the IRIS study (absract). *Blood* 104: 10a, 2004.

Hehlmann R, Berger U, Hochhaus A. Chronic myeloid leukemia: a model for oncology. *Ann Hematol* 84: 487-497, 2005.

Herman J, Baylin S. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med Oncol* 349: 2042–54, 2003.

Herman JG, Civin CI, Issa JP, Collector MI, Sharkis SJ, Baylin SB. Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res* 57: 837-841, 1997.

Herman JG, Civin CI, Issa JP, Collector MI, Sharkis SJ, Baylin SB. Distinct patterns of inactivation of p15INK4b and p16INK4a characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res* 57: 837-841, 1997.

Hochhaus A. Cytogenetic and molecular mechanisms of resistance to Imatinib. *Sem in Hematol* 40: 69-79, 2003.

Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, Mannari R, Thomas D, Faderi S, Bayar E, Lyons J, Rosenfeld CS, Cortes J, Kantarjian HM. Phase I study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza- 2-deoxycytidine (Decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* 103:1635-1640, 2004.

Issa JP, Gharibyan V, Corte J, Jelinek J, Kantarjian HM. Phase II study of low dose decitabine in patients with chronic myelogenous leukemia resistant to Imatinib mesylate. *J Clin Oncol* 23: 3948-3956, 2005.

Issa JP, Kantarjian H, Mohan A, O'Brien S, Cortes J, Pierce S, Talpaz M. Methylation of the ABL1 promoter in chronic myelogenous leukemia: lack of prognostic significance. *Blood* 93: 2075-2080, 1999.

Issa JP, Zehnbaauer BA, Civin CI, Collector MI, Sharkis SJ, Davidson NE, Kaufmann SH, Baylin SB. The estrogen receptor CpG island is methylated in most hematopoietic neoplasms. *Cancer Res* 56: 973-977, 1996.

Johan MF, Bowen DT, Frew ME, Goodeve AC, Reilly JT. Aberrant methylation of the negative regulators RASSF1A, SHP-1 and SOCS-1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 129: 60-65, 2005.

Jones P, Baylin S. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3: 415-28, 2002.

Jones P, Laird P. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21: 163-7, 1999.

Jüttermann R, Li E, Jaenisch R. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *PNAS* 91: 11797-11801, 1994.

Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Niederwieser D, Resta D, Capdeville R, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* 346:645-652, 2002.

Kantarjian H. M, Talpaz M. Definition of the accelerated phase of chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol* 6(1), 180-182, 1998.

Kantarjian HJ, Deisseroth A, Kurzrock R, Estrov Z, Talpaz M. Chronic Myelogenous Leukemia: A concise update. *Blood* 82(3): 691-703, 1993.

Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes J, Giles FJ, Faderi S, Issa JP, Garcia-Manero G, Rios MB, Shan J, Andreef M, Keating M, Talpaz M. Results of decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 98: 522-528, 2003.

Kantarjian HM, O'Brien SM, Keating M, Beran M, Estey E, Giralto S, Kornblau S, Rios MB, de Vos D, Talpaz M. Results of decitabine therapy in the accelerated and blastic phases of chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 11: 1617-1620, 1997.

Kantarjian HM, Smith TL, O'Brien S, Beran M, Pierce S, Talpaz M. The Leukemia Service. Prolonged survival in chronic myelogenous leukemia after cytogenetic response to interferon-alfa therapy. *Ann Intern Med* 122: 254-261, 1995.

Kawano S, Miller CW, Gombart AF, Bartram CR, Matsuo Y, Asou H, Sakashita A, Said J, Tatsumi E, Koeffler HP. Loss of p73 gene expression in leukemias/lymphomas due to hypermethylation. *Blood* 94: 1113-1120, 1999.

Kelliher MA, Maclaughlin J, Witte ON, Rosenberg N. Induction of a chronic myelogenous-like leukemia syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6646-6653, 1990.

Kim GD, Ni J, Kelesoglu N, Roberts RJ, Pradhan S. Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *EMBO J.* 2:4183-4195, 2002.

Kusy S, Cividin M, Sorel N, Brizard F, Guilhot F, Brizard A, Larsen C, Roche J. P14^{ARF}, p15^{INK4b} and p16^{INK4a} methylation status in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 101: 374-375, 2003.

La Rosee P, Johnson K, Corbin AS, Stoffregen EP, Moseson EM, Willis S, Mauro MM, Melo JV, Deininger MW, Druker BJ. In vitro efficacy of combined treatment depends on the underlying mechanism of resistance in imatinib-resistant Bcr-Abl-positive cell lines. *Blood* 104: 808a, 2004.

Laird PW, Jackson-Grusby L, Fazeli A, Dickinson SL, Jung WE, Li E, Weinberg RA, Jaenisch R. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell* 81: 197, 1995.

Laird PW, Jaenisch R. The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu Rev Genet* 30: 441, 1996.

Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H and Kurzrock R. The BCR gene and Philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res* 61(6): 234-2355, 2001.

Lenz G, Hutter G, Hiddemann W, Dreyling M. Promoter methylation and expression of DNA repair genes hMLH1 and MGMT in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 83: 628-633, 2004.

Leone G, Teofili L, Voso MT, et al. DNA methylation and demethylating drugs in myelodysplastic syndromes and secondary leukemias. *Haematologica* 87: 1324-1341, 2002.

Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, Laird PW, Jones PA. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol* 22: 480-491, 2002.

Litz CE, Vos JA, Copenhaver CM. Aberrant methylation of the major breakpoint cluster region in chronic myeloid leukemia. *Blood* 88: 2241-2249, 1996.

Liu TC, Lin SF, Chang JG, Yang MY, Hung SY, Chang CS. Epigenetic alteration of the *SOCS1* gene in chronic myeloid leukemia. *Brit J Haematol* 123: 654-661, 2003.

Malinen T, Palotie A, Pakkala S, Peltonen L, Ruutu T, Jansson S. Acceleration of chronic myeloid leukemia correlates with calcitonin gene hypermethylation. *Blood* 77: 2435-40, 1991.

Mateos M, García-Sanz R, López-Pérez R, Moro M, Ocio E, J Hernández, et al. Methylation is an inactivating mechanism of the p16 gene in multiple myeloma associated with high plasma cell proliferation and short survival. *British Journal of Haematology* 118: 1034-40, 2002.

Mateos MV, Garcia-Sanz R, Lopez-Perez R, Balanzaregui A, Gonzalez MI, Fernandez-Calvo J, Moro MJ, Hernandez J, Caballero MD, Gonzalez M, San Miguel JF. P16/INK4a gene inactivation by hypermethylation is associated with aggressive variants of monoclonal gammopathies. *Hematol J* 2: 146-149, 2001.

Matsushita C, Yang Y, Takeuchi S, Matsushita M, Van Dongen JJ, Szczepanski T, Bartram CR, Seo H, Koefler HP, Taguchi H. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Rep* 12:97-99, 2004.

Melki JR, Vincent PC, Brown RD, Clark SJ. Hypermethylation of E-caderin in leukemia. *Blood* 95: 3208-3213, 2000.

Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 59: 3730-40, 1999.

Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat. Med.* 1: 686, 1995.

Mills KI, Guinn BA, Walsh VA, Burnett AK. Increasing methylation of the *calcitonin* gene during disease progression in sequential samples from CML patients. *Leukemia Res* 20: 771-5, 1996.

Momparler RL. Cancer Epigenetics. *Oncogene* 22: 6479-6483, 2003.

Momparler RL. Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Sem Oncol* 32: 443-451, 2005.

Morrison VVA. Chronic Leukemias. *CA Cancer J Clin* 44: 353-77.2, 1994.

Murai M, Toyota M, Satoh A, Suzuki H, Akino K, Mita H, Sasaki Y, Ishida T, Shen L, Garcia-Manero G, Issa JP, Hinoda Y, Tokino T, Imai K. Aberrant DNA methylation associated with silencing BNIP-3 gene expression in hematopoietic tumors. *Brit J Cancer* 92: 1165-1172, 2005.

Murgo AJ. Innovative approaches to the clinical development of DNA methylation inhibitors as epigenetic remodeling drugs. *Sem Oncol* 32: 458-464, 2005.

Nagy E, Beck Z, Kiss A, Csoma E, Telek B, J.Kónya, et al. Frequent methylation of p16 INK4A and p14 ARF genes implicated in the evolution of chronic myeloid leukaemia from its chronic to accelerated phase. *European Journal of Cancer* 39: 2298–305, 2003.

Namba M, Ohtsuki T, Mori M, Togawa A, Wada H, Sugihara T, et al. Establishment of five human myeloma cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol* 25: 723–9, 1989.

Nelkin BD, Przepiorka D, Burke PJ, Thomas ED, Baylin SB. Abnormal methylation of the calcitonin gene marks progression of chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 77(11):2431, 1991.

Newell-Price J, Clark AJL, King P. DNA methylation and silencing of gene expression. *TEM*. 11 (4): 142-148, 2000.

Ng M, To W, Lo KW, Chan S, Tsang KS, Cheng SH, et al. Frequent death-associated protein kinase promoter hypermethylation in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 7: 1724–9, 2001.

Nguyen TDT, Mohrbacher AF, Tsai YC, Groffen J, Heisterkamp N, Nichols PW, Yu MC, Lübbert M, Jones PA. Quantitative measure of *c-abl* and *p15* methylation in chronic myelogenous leukemia: biological implications. *Blood* 95: 2990-2992, 2000.

Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132: 1497-9, 1960.

Nowicki MO, Pawlowski P, Fischer T, Hess G, Pawlowski T, Skorski T. Chronic Myelogenous Leukemia molecular signature. *Oncogene* 22: 3952-3963, 2003.

Oakley EJ. DNA methylation analysis: a review of current methodologies. *Pharmacol Therapeut* 84: 389-400, 1999.

O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen JL, Rousselot P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman JM, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton AE, Capdeville R, Druker BJ; IRIS Investigators. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 348:994-1004, 2003.

O'dwyer M. Multifaceted approach to the treatment of bcr-abl-positive leukemias. *Oncologist* 7:30-38, 2002.

Okami J, Simeone DM, Logsdon CD. Silencing of the hypoxia-inducible cell death protein BNIP3 in pancreatic cancer. *Cancer Res* 64: 5338-5346, 2004.

Oki Y, Kantarjian HM, Gharibyan V, Jones D, O'Brien S, Verstovsek S, Cortes J, Morris GM, Garcia-Manero G, Issa JP. Phase II study of low-dose decitabine in combination with imatinib mesylate in patients with accelerated or myeloid blastic phase of chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 109: 899-906, 2007.

Ortmann CA, Burchert A, Hölzle K, Nitsche A, Witting B, Neubauer A, Schmidt M. Down-regulation of interferon regulatory factor 4 gene expression in leukemic cells due to hypermethylation of CpG motifs in the promoter region. *Nucleic Acids Res* 33: 6895-6905, 2005.

Pluta A, Nyman U, Joseph B, Robak T, Zhivotovsky B, Smolewski P. The role of p73 in hematological malignancies. *Leukemia* 20: 757-766, 2006.

Quesnel B, Guillermin G, Vereecque R, Wattel E, Preudhomme C, Bauters F, et al. Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood* 91: 2985-90, 1998.

Quintás-Cardama A, Cortes JE. Chronic myeloid leukemia: Diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 81(7): 973-988, 2006.

Ramsahoye BH, Davies CS, Mills KI. DNA methylation: biology and significance. *Blood Rev* 10: 249-261, 1996.

Razin A, Cedar H. Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.74: 2725-2728, 1977.

Razin A, Riggs AD. DNA methylation and gene function. *Science*. 210: 604-610, 1980.

Razin A, Shemer E . Epigenetic control of gene expression. *Results Probl. Cell Differ.* 25, 189-204, 1999.

Razin A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing – a three way connection. *EMBO J.* 17: 4905-4908, 1998.

Reddy J, Shivapurkar N, Takahashi T, Parikh G, Stastny V, Echebiri C, Crumrine K, Zochbauer-Muller S, Drach J, Zheng Y, Feng Z, Kroft SH, McKenna RW, Gazdar AF. Differential methylation of genes that regulate cytokine signaling in lymphoid and hematopoietic tumors. *Oncogene* 24: 732-736, 2005.

Roman-Gomez J, Castillejo JA, Jimenez A, Cervantes F, Boque C, Hermosin L, Leon A, Granena A, Colomer D, Heiniger A, Torres A. Cadherin-13, a mediator of calcium-dependent cell-cell adhesion, is silenced by methylation in chronic myeloid leukemia and correlates with pretreatment risk profile and cytogenetic response to interferon alfa. *J Clin Oncol* 21: 1472-1479, 2003.

Roman-Gomez J, Castillejo JA, Jimenez A, Gonzalez MG, Moreno F, Rodriguez MC, Barrios M, Maldonado J, Torres A. 5'CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21(CIP1/WAF1/SDI1) gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 99: 2291–6, 2002.

Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Castillejo J, Agirre M, Barrios M, Navarro G, Molina FJ, Calasanz MJ, Prosper F, Heiniger A, Torres A. Promoter hypermethylation of cancer-related genes: a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 104: 2492–8, 2004.

Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Cervantes F, Sanchez J, Garate L, Barrios M, Castillejo JA, Navarro G, Colomer D, Prosper F, Heiniger A, Torres A. Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia. *Oncogene* 24: 7213-7223, 2005a.

Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Prosper F, Heiniger A, Torres A. Lack of CpG island methylator phenotype defines a clinical subtype of T-cell acute lymphoblastic leukemia associated with good prognosis. *J Clin Oncol* 23: 7043-7049, 2005b.

Rosenfeld CS. Clinical development of decitabine as a prototype for an epigenetic drug program. *Sem Oncol* 32: 465-472, 2005.

Rossi D, Capello D, Gloghini A, Franceschetti S, Paulli M, Bhatia K, et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes throughout the clinicopathologic spectrum of B-cell neoplasia. *Haematologica* 89: 154–64, 2004.

Rosti G, Testoni N, Martinelli G, Baccarani M. The cytogenetic response as a surrogate marker of survival. *Semin Hematol* 40: 56-61, 2003.

Rowley J.D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining [letter]. *Nature* 243(5405), 290-293, 1973.

Rush LJ, Plass C. Alterations of DNA methylation in hematologic malignancies. *Cancer Letters* 185: 1-12, 2002b.

Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP. Allelic-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor suppressor gene. *Am. J. Hum. Genet.* 48: 880, 1991.

Santini V, Kantarjian H, Issa J. Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Ann Intern Med* 134: 573–86, 2001.

Savage D and Antman K. Imatinib mesylate -a new oral targeted therapy. *N Engl J Med* 346:683-693, 2002.

Savage D. G, Szydlo R. M, Goldman J. M. Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral center over a 16-year period. *Br J Haematol* 96(1), 111-116, 1997.

Savage D. G, Szydlo R. M, Goldman J. M. Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral center over a 16-year period. *Br J Haematol* 96(1), 111-116, 1997.

Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, Goldman JM, Miller CB, Ottmann OG, Schiffer CA, Talpaz M, Guilhot F, Deininger MW, Fischer T, O'Brien SG, Stone RM, Gambacorti-Passerini CB, Russell NH, Reiffers JJ, Shea TC, Chapuis B, Coutre S, Tura S, Morra E, Larson RA, Saven A, Peschel C, Gratwohl A, Mandelli F, Ben-Am M, Gathmann I, Capdeville R, Paquette RL, Druker BJ. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* 9:3530-3539, 2002.

Sawyers CL, Shah NP. Chronic Myeloid Leukemia. In: Hoffman, Benz, Shattil, Furie, Cohen, Silberstein, McGlave. *Hematology – Basic principles and Practice*. 4th edition. Ed Elsevier, 2003. CD-ROM.

Schindler T., Bornmann W., Pellicena P., Miller W.T., Clarkson B., Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 289:1938-1942, 2000.

Seidl S, Ackermann J, Kaufmann H, Keck A, Nösslinger T, Zielinski C, et al. DNA-methylation analysis identifies the E-cadherin gene as a potential marker of disease progression in patients with monoclonal gammopathies. *Cancer* 100: 2598–606, 2004.

Shadduck RK et al. AML induction therapy with outpatient azacitidine. *Blood* 104 (Suppl 1): 499A, 2004.

Shah NP. Loss of response to Imatinib: mechanisms and management. *Hematology* 183-187, 2005.

Shteper PJ, Bem-Yehuda D, Molecular evolution of chronic myeloid leukemia. *Sem. Cancer Biol* 11: 313-322, 2001.

Shteper PJ, Ben-Yehuda D. Molecular evolution of chronic myeloid leukemia. *Cancer Biol* 11:313-322, 2001.

Silva MLM, Zalcborg IR, Ornellas MH, Tabak D, Seuanez H, Santo LE, et al. Establishment of a new human leukemia cell line (CEMO 1) with pre-B cell immunophenotype and the translocation (1;14) (q21;q23). *Leukemia* 10: 575–8, 1996.

Silverman LR, Holland JF, Weinberg RS, Alter BP, Davis RB, Ellison RR, Demakos EP, Cornell CJ Jr, Carey RW, Schiffer C. Effects of treatment with 5-azacytidine on the in vivo and in vitro hematopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 7: 21 (suppl 1), 1993.

Singal R, Ginder GD. DNA methylation – Review article. *Blood* 93 (12): 4059-4070, 1999.

Siu LLP, Cheung Chan JK, Wong KF, Kwong YL. Specific patterns of gene methylation in natural killer cell lymphomas: p73 is consistently involved. *Am J Pathol* 160: 59-66, 2002.

Sorm F, Vesely J. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine against leukemic and hematopoietic tissues in AKR mice. *Neoplasma* 15: 339-343, 1968.

Sun B, Jiang G, Zaydan MAA, La Russa VF, Safah H, Ehrlich M. ABL1 promoter methylation can exist independently of BCR-ABL transcription in chronic myeloid leukemia hematopoietic progenitors. *Cancer Res* 61: 6931-6937, 2001.

Szyf M, Eliasson L, Mann V, Klei G, Razin A. Cellular and viral DNA hypomethylation associated with induction of Epstein-Barr virus lytic cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82: 8090-8094, 1985.

Szyf M. Targeting DNA methylation in cancer. *Aging Res Rev* 2:299-328, 2003.

Takahashi T, Shivapurkar N, Reddy J, Shigematsu H, Miyajima K, Suzuki M, et al. DNA methylation profiles of lymphoid and hematopoietic malignancies. *Clinical Cancer Res* 10: 2928–35, 2004.

Tamm I, Wagner M, Schmelz K. Decitabine activates specific caspases downstream of p73 in myeloid leukemia. *Ann Hematol* 13: 47-53, 2005.

Tauchi T, Ohyashiki K. Molecular mechanisms of resistance of leukemia to imatinib mesylate. *Leukemia Res*. 28S1: S39-S45, 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.

Thijssen SFT, Schuurhuis, GJ, van Oostveen JW and Ossenkoppele GJ. Chronic myeloid leukemia from basics to bedside. *Leukemia* 13(11): 1646-1674, 1999.

Toyota M, Kopecky K, Toyota M, Jair KW, Willman CL, Issa JP. Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97: 2823–9.

Turker MS, Bestor TH. Formation of methylation patterns in the mammalian genome. *Mutation Res* 386: 119-130, 1997.

Uchida T, Kinoshita T, Nagai H, Nakahara Y, Saito H, Hotta T, et al. Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. *Blood* 90: 1403–9, 1997.

van Rhee F, Szydlo RM, Hermans j et al. 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.

Vertino PM, Yen RW, Gao J, Baylin SB. De novo methylation of CpG islands sequences in human fibroblast overexpressing DNA (cytosine-5-) methyltransferase. *Mol Cell Biol* 16: 4555-4565, 1996.

Vidal DO, Paixão VA, Brait M, Souto EX, Caballero OL, Lopes LF, Vettore AL. Aberrant methylation in pediatric myelodysplastic syndrome. *Leukemia Res* 31: 175-181, 2006.

Villar-Garea A, Esteller M. DNA demethylating agents and chromatin-remodelling drugs: which, how and why. *Curr Drug Metab* 4: 11–31, 2003.

von Bubnoff N, Schneller F, Peschel C, Duyster J. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study. *Lancet* 359:487-491, 2002.

Weissbach A. A chronicle of DNA methylation (1948-1975). *EXS* 64:1, 1993.

Wijermans P, Lübbert M, Verhoef G, Bosly A, Ravoet C, Andre M, et al. Low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients. *J Clin Oncol* 18: 956–62, 2000.

Wong IH, Ng MH, Huang DP, Lee JC. Aberrant p15 promoter methylation in adult and childhood acute leukemias of nearly all morphologic subtypes: potential prognostic implications. *Blood* 95: 1942–9, 2000.

Wu JC, Santi DV. On the mechanism and inhibition of DNA cytosine methyltransferases. *Prog Clin Biol Res* 198: 119-129, 1985.

Yang MY, Chang JG, Lin PM, Tang KP, Chen YH, Lin HY, Liu TC, Hsiao HH, Liu YC, Lin SF. Downregulation of circadian clock genes in chronic myeloid leukemia: alternative methylation pattern of hPER3. *Cancer Sci* 97: 1298-1307, 2006.

Yang MY, Liu TC, Chang JG, Lin PM, Lin SF. *JunB* gene expression is inactivated by methylation in chronic myeloid leukemia. *Blood* 101: 3205-3211, 2003.

Yang Y, Takeuchi S, Hofmann WK, Ikezoe T, van Dongen JJM, Szczepanski T, Bartram CR, Yoshino N, Taguchi H, Koefler HP. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Res* 30: 98-102, 2006.

Yoder JÁ, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13: 335, 1997.

Zion M, Ben-Yehuda D, Avraham A, Cohen O, Wetzeler M, Melloul D, Ben-Neriah Y. Progressive *de novo* DNA methylation at the bcr-abl locus in the course of chronic myelogenous leukemia. *PNAS* 91: 10722-10726, 1994.

ANEXO I

O projeto intitulado “Análise do Padrão de metilação de genes envolvidos na patogênese e progressão de leucemias, linfomas e mielomas”, assim como seu termo de consentimento livre e esclarecido foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto Nacional do Câncer (INCa) em 15 de abril de 2005, sob o número 104/4, sendo o presidente do Comitê o Dr. Luis Otávio Olivatto.

ANEXO II

Características do tratamento de cada paciente com LMC incluído no estudo. Todos os pacientes Ph- ao diagnóstico eram BCR-ABL positivos, indicando que a translocação estava presente, porém os métodos convencionais citogenéticos não foram capazes de detectar. RCC, resposta citogenética completa; RCM, resposta citogenética major; RHC, resposta hematológica completa; FC fase crônica; FA, fase acelerada; CB, crise blástica. ND, dado não disponível.

Ao Diagnóstico			IFN- α (n=58)			Imatinibe (n=70)				BMS (n=4)		TMO (n=16)		Óbito (n=17)		Tempo follow-up (meses)	
Fase	Ph	idade (anos)	Fase início	duração (meses)	Motivo da interrupção	Fase início	duração (meses)	melhor resposta	Motivo da interrupção	Fase início	duração (meses)	Fase	Imatinibe	meses após diag	situação atual		
P1	crônica	+	50	FA	1	Progressão	FA	12	RHC	resistência secundária				116	óbito	14	
P2	crônica	+	54	FC inicial	4	Intolerância	FC inicial	18	ND						ND	34	
P3	crônica	-	58	FC inicial	29	Intolerância	FC tardia	60	RCC						ND	86	
P4	crônica	+	42	FC inicial	25	Progressão	FA	61	RCC						remissão	43	
P5	crônica	-	30	FC inicial	2	Intolerância	FA	17	ND	resistência primária				53	óbito	54	
P6	crônica	+	35	FC tardia	10	Falha	FC tardia	7	ND	intolerância	FC tardia	12			ND	54	
P7	crônica	+	58	FC inicial	4	Intolerância	FC inicial	35	RCC						remissão	39	
P8	crônica	+	29	FC inicial	25	Falha	FC tardia	48	ND						recaída	80	
P9	crônica	+	70	FC inicial	9	Falha	FC tardia	24	ND						remissão	47	
P10	crônica	+	47	-	-	-	FC tardia	48	ND	intolerância	FA	9	FC inicial	depois	86	óbito	88
P11	crônica	+	36	FC inicial	29	Falha	FC tardia	40	RCM						remissão	71	
P12	crônica	+	73	FC tardia	2	Intolerância	FA	21	ND	resistência secundária					recaída	55	

P32	crônica	ND	44	FC inicial	5	falha	FC tardia	72	RCC					remissão	120
P33	crônica	+	35	FA	5	intolerância	FA	45	RCC	intolerância	FC tardia	depois		ND	60
P34	crônica	+	44	FC inicial	3	intolerância	FC inicial	30	RCC					ND	33
P35	crônica	+	56	FC inicial	57	falha	FC tardia	20	RCC					remissão	82
P36	crônica	+	54	FC inicial	6	Intolerância	CB	5	ND	resistência primária		24	óbito	26	
P37	crônica	+	21	FC inicial	24	Intolerância	FC tardia	60	RCC					remissão	87
P38	crônica	+	29	FC inicial	6	intolerância	FC inicial	71	RCC	resistência secundária				recaída	80
P39	crônica	ND	41	FC inicial	1	intolerância	FC inicial	52	RCC					remissão	51
P40	crônica	+	50	-	-	-	FA	24	ND	resistência primária		108	óbito	116	
P41	crônica	+	37	FA	41	falha	FA	48	ND	resistência primária				recaída	137
P42	crônica	+	47	FC inicial	1	intolerância	FC inicial	35	RCC					remissão	36
P43	crônica	+	39	FC inicial	4	Intolerância	FC inicial	49	RCC					remissão	50
P44	crônica	+	31	FC inicial	26	Intolerância	FC tardia	39	RCC					remissão	68
P45	crônica	+	24	FC inicial	33	Intolerância	FC tardia	66	RCC					remissão	117
P46	crônica	ND	35	FC inicial	5	falha	FC inicial	41	RCC					remissão	46
P47	crônica	ND	54	FC inicial	37	Intolerância	FC tardia	68	RCC					remissão	116
P48	crônica	+	81	FC inicial	13	Intolerância	FC inicial	19	RCC					remissão	32
P49	crônica	+	42	-	-	-	FC tardia	42	RCC		FC tardia	depois		remissão	109
P50	crônica	+	22	FC inicial	26	progressão	FA	1	ND	resistência primária	FA	antes	38	óbito	38

P51	crônica	ND	61	CB	5	falha	CB	16	ND	resistência primária		93	óbito	24	
P52	crônica	+	59	FC inicial	5	intolerância	FC inicial	16	RCC				remissão	21	
P53	crônica	-	17	FC inicial	43	Intolerância	FC tardia	60	RCC				remissão	111	
P54	crônica	+	42	FC inicial	3	falha	FC inicial	38	RCC				remissão	44	
P55	crônica	+	66	FC inicial	7	intolerância	FC inicial	23	RCM				remissão	31	
P56	crônica	+	30	FC inicial	5	intolerância	FC inicial	36	RCC				remissão	42	
P57	crônica	+	29	FC inicial	3	Intolerância	FC inicial	59	RCC				remissão	65	
P58	crônica	+	43	-	-	-	FC inicial	36	RCC				remissão	39	
P59	crônica	ND	48	FC inicial	31	Intolerância	FA	70	RCC				remissão	116	
P60	crônica	+	50	FC inicial	7	falha	FC inicial	20	ND	resistência primária			recaída	85	
P61	crônica	ND	33	-	-	-	FA	13	ND	resistência primária	FA	depois	56	óbito	64
P62	crônica	ND	57	FC inicial	37	falha	FC tardia	34	RCC				remissão	71	
P63	crônica	+	54	FC tardia	25	falha	FC tardia	54	ND	óbito para TMO		153	óbito	125	
P64	acelerada	+	22	-	-	-	FA	11	ND		FA	antes	remissão	22	
P65	acelerada	+	82	-	-	-	FA	23	RCC				remissão	24	
P66	acelerada	+	28	FA	1	progressão	CB	2	ND	óbito	FA	depois	37	óbito	28
P67	acelerada	+	38	-	-	-	CB	12	ND	intolerância	CB	antes	33	óbito	31
P68	acelerada	+	30	-	-	-	CB	7	RHC	resistência secundária			9	óbito	11
P69	blástica	+	17	-	-	-	2 FC	4	ND	óbito	2 FC	depois	37	óbito	18
P70	blástica	+	67	-	-	-	CB	1	ND	intolerância			5	óbito	5

ANEXO IV

Coloração de géis de poliacrilamida com Nitrato de Prata

Solução de Fixação

180 mL Água bidestilada

20 mL Metanol absoluto

1 mL Ácido Acético Glacial

Solução de Coloração

100 mL Água bidestilada

50 mL Solução de fixação

1 mL Nitrato de Prata (20%)

Solução de Revelação

250 mL Água bidestilada

50 mL NaOH (15%)

0,75 mL Formaldeído

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)