

Fernanda Borba Vieira Reis

**ANÁLISES PROTEÔMICAS NA LEUCEMIA
MIELÓIDE AGUDA (LMA): À PROCURA DE
BIOMARCADORES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2008**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Fernanda Borba Vieira Reis

**ANÁLISES PROTEÔMICAS NA LEUCEMIA
MIELÓIDE AGUDA (LMA): À PROCURA DE
BIOMARCADORES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica)

Orientadora: Eliana Abdelhay

Rio de Janeiro
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

BORBA, Fernanda Vieira Reis

ANÁLISES PROTEÔMICAS NA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA (LMA): À PROCURA DE BIOMARCADORES / Fernanda Borba vieira Reis. Rio de Janeiro, 2008. xix, 75 p.: il.

Orientadora: Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay

Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas – Biofísica – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2008.

1. Proteoma 2. Leucemia mielóide aguda 3. Biomarcadores I. Abdelhay, Eliana Saul Furquim Werneck (Orient.) II. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) III. ANÁLISES PROTEÔMICAS NA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA (LMA): À PROCURA DE BIOMARCADORES

Fernanda Borba Vieira Reis

ANÁLISES PROTEÔMICAS NA LEUCEMIA
MIELÓIDE AGUDA (LMA): À PROCURA DE
BIOMARCADORES

Dissertação de Mestrado aprovada em ____ de _____ de 2008.

Dra. Eliana Abdelhay, INCA

Dr. Turan Peter Urmenyi, UFRJ - Biofísica

Dr. Paulo Mascarello Bisch, UFRJ - Biofísica

Dr. Russolina Benedeta Zingali, UFRJ – Bioquímica Médica

**Aos meus pais,
Damião e Eliane,**

**Ao meu marido, amigo e companheiro, Daniel,
Com todo meu amor dedico este trabalho.**

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a minha orientadora **Eliana Abdelhay**, por representar sempre a luz que eu precisava para esclarecer meus pensamentos, fazendo tudo parecer mais fácil.
- Minha companheira proteômica **Luciana Pizzatti**, por ter me acompanhado desde o início nesta batalha travada no mundo das proteínas, me conduzindo na trilha dos géis bidimensionais.
- Aos meus companheiros do Laboratório de Célula-Tronco, **Renata, Carol, Stephany, Nara, Dani Sales, Dani Pinto, André, Tati, Amanda, Elisângela, Bárbara, Gabi, Júlia e Yasmine** por terem feito o meu dia-a-dia sempre mais divertido.
- A **Tati Pink** pela ajuda com as tabelas e por estar sempre interessada em ouvir a minha contagem de pontos do Vigilantes do peso.
- A **Amandita** por ter sempre um bom conselho e estar sempre disposta a ajudar.
- A **Dani e o André** por me proporcionar boas risadas na maravilhosa hora do almoço.
- A **Stephany** por ter se mostrado mais que uma colega de trabalho, ter sido um ombro amigo ouvindo com paciência minhas reclamações.
- A **Lili**, por me socorrer sempre que eu precisei e ainda me proporcionar dias muito felizes no Fundão. A ciência era sempre um grande barato!!!!
- A minha amiguinha **Ana Paula**, que passou pelo Laboratório e certamente deixou amigos e saudades.

- As minhas companheiras desde a faculdade, **Amandas (loira e morena), Carla e Karen**, por compreender minha ausência neste tempo e me acompanhar no meu crescimento profissional achando sempre tudo lindo.

- Às minhas companheiras de IML, **Luciana, Liana, Eremita, Cristina e Tânia** que estenderam a mão no momento que mais precisei, sendo cruciais para a conclusão deste trabalho.

- À minha amiga fiel **Luci**, por fazer-me sentir segura por ter sempre uma amigona pro que der e vier, e olha que eu precisei muito. Além do apoio e incentivo em todas as coisas que eu me propus a fazer.

- Aos meus pais, **Eliane e Damião**, apesar de não terem tido oportunidade de estudar, sempre me incentivaram a correr atrás e não abandonar os meus sonhos, e principalmente, por terem acreditado na minha capacidade e me fazerem me sentir tão querida. **AMO VOCÊS!!!!**

- Ao meu marido **Daniel**, por me amar com tanto afinco, e sempre me incentivar e me reafirmar todo dia que eu sou capaz, o que não me deixava esquecer. Também pela paciência com a minha impaciência e por estar sempre pronto a ajudar no que fosse preciso.

- Aos pacientes que consentiram a utilização de suas amostras para pesquisa, colaborando para o avanço da mesma.

- A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é uma neoplasia hematológica caracterizada pela proliferação anormal de precursores mielóides, redução da apoptose, parada da diferenciação celular e diminuição da aderência das células ao estroma medular. A classificação FAB estratifica a LMA em oito diferentes subtipos denominados M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7. Cada subtipo apresenta uma característica morfológica diagnóstica e é caracterizado pela alteração de uma linhagem hematopoiética diferente. Existem diversas anormalidades cromossômicas, recorrentes e distribuídas entre os subtipos da LMA, que auxiliam no prognóstico da doença. Além destas, existe um grande grupo sem alterações citogenéticas detectáveis onde se observam diversas alterações moleculares. Várias têm sido as tentativas de se estratificar os subtipos da LMA em categorias prognósticas, porém, em todos os subtipos, existem exceções que tornam a definição do prognóstico e a avaliação do efeito das diferentes terapias extremamente complexo. Torna-se, portanto, de extrema importância a identificação de novos biomarcadores que estejam relacionados com a LMA e seus subtipos, o que é então o objetivo deste trabalho. Foram coletadas 58 amostras de medula óssea das quais foram selecionadas 23 para análise proteômica de onde foi possível definir o perfil proteômico de Células Mononucleares (CMN) de Medula Óssea (MO) na LMA composto de 247 proteínas. Após comparação com o perfil proteômico de CMN de MO de doadores foi possível definir um grupo de 61 proteínas identificadas apenas na LMA. Após comparação com o perfil proteômico da Leucemia mielóide crônica fase blástica foram excluídas 27 proteínas que estariam relacionadas com leucemias mielóides, restando, portanto 34 possíveis biomarcadores relacionados com a LMA. Dentre estes possíveis biomarcadores estão proteínas com função oncogênica como RUNDC1 e a isoforma 2 da proteína 22 WD repeat. Foi possível observar também um grupo de 5 proteínas que ocorreu apenas nos pacientes do subtipo M1, sendo candidatas putativas relacionadas a este subtipo.

ABSTRACT

Acute myelogenous leukemia (AML) is a hematologic neoplasia characterized by abnormal proliferation of myeloid precursors, lack of apoptosis, defective maturation and reduced adherence to stromal cells. French American British's classification stratify AML in eight different subtypes named as M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6 and M7. Each diagnostic subtype presents a specific morphological feature and is characterized by alterations in different hematopoietic lineages. Several recurring chromosomal alterations, that possess a prognostic value, are associated to each AML subtypes. However, there is also a significant group that not shows detectable cytogenetic markers, but several molecular alterations. Because the pathological outcome of AML patients with cytogenetic abnormalities differs considerably we hypothesized that their proteome may also differ specifically in their expression pattern, protein interaction pathways and posttranslational modifications. In the present work we applied comparative proteomic approach to identify new biomarkers related to AML and its subtypes. 58 bone marrow (BM) samples were collected, 23 were selected and analyzed. We settle down the AML protein profile of mononuclear bone marrow cells, containing 247 proteins. The comparative analysis between this profile with healthy donors profile, shows 61 differentially expressed proteins in AML samples. And the comparison with the protein profile of chronic myeloid leukemia blastic phase samples identified 27 proteins that could be related to myeloid leukemias. We also identified 34 proteins that are putative AML biomarkers. Among them RUNDC1 and the isoform 2 of 22WD repeat protein presented oncogenic functions. Other 5 proteins observed only in M1 subtype, could be putative candidates to be biomarkers of this subtype.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Petéquias (pontos violáceos na pele).....	3
Figura 2: Equimoses (manchas roxas na pele)	3
Figura 3: Esquema simplificado da diferenciação das células hematopoiéticas· ...	5
Figura 4: Tipos morfológicos na LMA acompanhados de suas alterações citogenéticas	9
Figura 5: Fluxograma representativo da metodologia da análise <i>in silico</i>	31
Figura 6: Gel Bidimensional (pH 4-7) de análise do extrato protéico total das células mononucleares da medula óssea do paciente 19, corado com Coomassie Blue coloidal e digitalizado no software Image Master 2D Platinum ..	34
Figura 7: Gel Bidimensional (pH 4-7) de análise do extrato protéico total das células mononucleares da medula óssea do paciente 14, corado com Coomassie Blue coloidal e digitalizado no software Image Master 2D Platinum ..	34
Figura 8: Distribuição do número de proteínas agrupadas por função em Células Mononucleares de Medula Óssea de pacientes com LMA	35
Figura 9: Gel Bidimensional (pH 4-7) de análise do extrato protéico das células mononucleares da medula óssea do pool de doadores saudáveis, corado com Coomassie Blue coloidal e digitalizado no software Image Master 2D Platinum...	42
Figura 10: Esquema identificando proteínas únicas da LMA·.....	46
Figura 11: Vias de sinalização de p53 mostrando o possível papel de RUNDC1 como inibidor de p53	49
Figura 12: Vias de sinalização em leucemia mielóide aguda mostrando o possível papel da proteína TDRD como bloqueadora de diferenciação e apoptose	50
Figura 13: Vias de apoptose mostrando a proteína azurocidina e a proteína 14-3-3 zeta como inibidoras da apoptose	51

Figura 14: Via de sinalização de MPK mostrando o possível papel de GMFG inibindo a diferenciação52

Figura 15: Gel bidimensional (pH 4-7) de análise do extrato protéico total das células mononucleares da medula óssea do paciente 55, corado com coomassie Blue coloidal e digitalizado no software Image Master 2D Platinum, demonstrando as proteínas putativas relacionadas com o subtipo M154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativas, para o ano de 2008, de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária	2
Tabela 2: Translocações cromossômicas e genes envolvidos na LMA.	11
Tabela 3: Lesões moleculares na leucemia mielóide aguda associadas com características malignas.	13
Tabela 4: Amostras de pacientes com LMA selecionadas para proteoma.	33
Tabela 5: Proteínas identificadas em células Mononucleares de Medula Óssea de pacientes com LMA.	36
Tabela 6: Proteínas encontradas somente nos pacientes com LMA e não detectáveis em doadores saudáveis.	43
Tabela 7: Análise <i>in silico</i> das proteínas hipotéticas encontradas na LMA e não identificáveis em doadores saudáveis.	45
Tabela 8: Proteínas encontradas somente em doador quando comparadas com o perfil protéico obtido de LMA	45
Tabela 9: Proteínas putativas relacionadas à LMA.	47
Tabela 10: Proteínas putativas relacionadas com o subtipo M1 da LMA.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – graus celsius

1-D – Unidimensional

2-D – Bidimensional

ACN – Acetonitrila

AEBSF - Inibidor de protease 4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride

ATRA – Ácido trans-retinóico

BSA – Albumina do Soro Bovino

CEMO – Centro de Transplante de Medula Óssea

CMN – células mononucleares

CR - Remissão completa

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DTT – Dithiothreitol

EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetracético

EGTA – Ácido Tetracético Etilenoglicol

ELM – do inglês Eukaryotic Linear Motif – motivo linear eucariótico

FAB - do inglês French-American-British – Franco Americano britânico

FLT3-ITD -mutações *in tandem* de FLT3

GE – General Electric

HCl – ácido clorídrico

HUPE - Hospital Universitário Pedro Ernesto

IEF – Isoeletrofocalização

IMIP – Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira

INCA – Instituto Nacional de Câncer

InterPro – do inglês Integrated Prosite – Banco de dados de proteínas integrado

IPG – Gradiente de pH imobilizado

IPI – do inglês International Protein Index – Índice internacional de proteínas

IPPMG - Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira

ITD - duplicações in tandem

JMD - domínio justamembrana

LC/MS – do inglês Liquid chromatography-mass spectrometry – espectrometria de massas associada a cromatografia líquida

LLA – Leucemia Linfóide Aguda

LMA – Leucemia Mielóide Aguda

LMC – Leucemia Mielóide Crônica

mA – miliampere

MALDI –TOF – do inglês Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry – Espectrometria de massa com sistema de ionização e desorção à laser assistida por matriz.

mg – miligrama

MgCl₂ - cloreto de magnésio

mL – mililitro

mM – milimolar

MS - Ministério da Saúde

NaCl – Cloreto de Sódio

NaF – Fluoreto de Sódio

NCBI – do inglês National Center for Biotechnology Information – Centro nacional de informação em biotecnologia

NH_4HCO_3 - bicarbonato de amônio

NP-40 – Nonidet P-40

PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato

pH – potencial hidrogeniônico

Ph1 – Cromossomo Filadelfia

pI – Ponto Isoelétrico

PM – Peso Molecular

PSORT – do inglês Prediction of Protein Subcellular Localization – banco de dados de localização subcelular de proteínas

PTD - duplicações parciais *in tandem*

$\text{RAR}\alpha$ - Receptor do ácido retinóico

RNA – Ácido Ribonucléico

RNA_m – Ácido Ribonucléico mensageiro

RPM – rotações por minuto

RTK - receptor de tirosina quinase

SBF – Soro Bovino Fetal

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SDS - PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio

SMART – do inglês Simple Modular Architecture Research Tool – Banco de dados para pesquisa de domínios de proteínas

TFA – Ácido Trifluoracético

TKD - domínio tirosina quinase

TNF – do inglês tumor necrosis factor - fator de necrose tumoral

TRIS – Tris-hidroxi-metil-aminometano

V – Volt

WHO – do inglês World Health Organization – Organização Mundial de saúde

µg – micrograma

µL – microlitro

µM – micromolar

LISTA DE GENES E PROTEÍNAS

APL – do inglês acute promyelocytic leukaemia – gene encontrado na leucemia promielocítica aguda

ASK1 – do inglês Apoptosis signal-regulating kinase 1 – proteína quinase ativadora de apoptose

BAALC – do inglês brain and acute leukemia, cytoplasmic -

C/EBP α - do inglês CCAAT/enhancer binding protein - proteína de ligação ao *enhancer* CCAAT

CBF – do inglês *core binding factor*

c-Kit - receptor de tirosina quinase

ERG – do inglês estrogen-regulated gene – gene regulador do estrogênio

ETO – Fator de transcrição envolvido na translocação t(8,21)

FLT3 – do inglês fms-related tyrosine kinase 3 – tirosina quinase 3 relacionada com fms

GATA1 – do inglês globin transcription factor1 – fator de transcrição da globina

GM-CSF - do inglês Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor – fator de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos

IL-3 - interleucina 3

JAK2 - tirosina quinase envolvida na transdução de sinal

MafK – do inglês v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog K
– Fator de transcrição encontrado em humanos

M-CSF – do inglês Macrophage colony-stimulating factor – fator estimulador de colônias de macrófagos

MLL – do inglês mixed-lineage leukemia – leucemia de linhagem mista

MYH11 – do inglês myosin heavy chain – cadeia pesada da miosina

NF1 - Neurofibromina

NPM1 – do inglês nucleolar phosphoprotein gene - nucleofosmina

NuMA – do inglês nuclear mitotic apparatus – aparato nuclear mitótico

PLZF – do inglês Promyelocytic leukaemia zinc finger protein – proteína zinc finger associada a leukemia promielocítica

PML – do inglês Promyelocytic leukemia – leucemia promielocítica

PU-1 - gene de proliferação celular

RUNDC1 – do inglês RUN domain-containing protein 1 – proteína oncogênica

STAT – do inglês signal transducer and activators of transcription – transdutor de sinal e ativador da transcrição

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. Câncer	1
2. Leucemias	2
3. Leucemias Agudas	4
3.1. Leucemia Linfóide Aguda	5
3.2. Leucemia Mielóide Aguda	6
3.2.1. Classificação	7
3.2.2. Características Morfológicas	8
3.2.3. Características Citogenéticas	8
3.2.4. Características Moleculares	10
3.2.5. Grupos Prognósticos	14
4. Novas Abordagens Tecnológicas	20
4.1. <i>Microarray</i>	21
4.2. Proteômica	21
4.2.1. Aplicação na LMA	22
OBJETIVOS	24
METODOLOGIA	25
1. Critérios de Inclusão e Exclusão	25
2. Obtenção de Células Mononucleares de Medula Óssea	25
3. Preparo dos Extratos Protéicos Totais	26
4. Quantificação dos Extratos Protéicos	26
5. Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE	27
6. Análise Proteômica	27
6.1. Precipitação de Proteína	27
6.2. Rehidratação	27
6.3. Isoeletrofocalização (1-D)	28
6.4. Separação por peso molecular (2-D)	28
6.5. Análise dos Padrões Proteômicos	29

6.6. Processamento e preparação das amostras para análise por espectrometria de massas	29
6.7. Espectrometria de Massas	30
6.8. Análise e identificação em Bancos de Dados	30
6.8.1. Análise <i>in silico</i> das proteínas	31
RESULTADOS	32
1. Análise do perfil protéico de Células Mononucleares (CMN) de Medula Óssea de pacientes diagnosticados com LMA	32
2. Identificação de biomarcadores protéicos de LMA pela análise comparativa entre o perfil protéico de CMN de Medula Óssea de pacientes e o perfil obtido de CMN de Medula Óssea de doadores saudáveis	41
3. Análise de proteínas relacionadas a cada subtipo leucêmico	53
DISCUSSÃO	55
CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

INTRODUÇÃO

1. Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida. (MS/INCA, 2008)

A gênese do tumor é um processo multifatorial associado ao acúmulo de alterações genéticas em células somáticas. O progresso de uma pré-neoplasia para uma neoplasia e a então invasão e metástase é o resultado de sucessivas etapas de expansão clonal de células somáticas que apresentam vantagens para crescimento como resultado de mutações em genes que controlam a proliferação celular e morte. Estas mutações resultam tanto da ativação de proto-oncogenes, que promovem proliferação celular, quanto na inativação de genes supressores de tumor, que inibem proliferação ou promovem a morte celular. Para se tornar uma célula cancerosa, uma célula normal precisa acumular no mínimo de cinco a seis destas mutações, portanto, a instabilidade genética parece ser uma propriedade de células cancerosas (Caldas, 1998).

Dados publicados pelo Ministério da saúde/Instituto Nacional de Câncer que mostram a Incidência de câncer no Brasil demonstram que a neoplasia maligna mais comum é a de pele do tipo não melanoma seguida pelo câncer de mama feminino. Estima-se para 2008 que o número de novos casos de câncer no Brasil será 466.730.(**Tabela 1**)

É possível observar diante destes dados que as leucemias ocupam o nono lugar em incidência na população brasileira, totalizando 9540 novos casos estimados para 2008, um número considerável que requer grande atenção no sentido de conhecer melhor a doença e empenhar novas tecnologias neste estudo.

Tabela 1: Estimativas, para o ano de 2008, de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária. (MS/INCA)

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa de casos novos		
	Masculino	Feminino	Total
Próstata	49.530	-	49.530
Mama Feminina	-	49.400	49.400
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.810	9.460	27.270
Cólon e Reto	12.490	14.500	26.990
Estômago	14.080	7.720	21.800
Colo do Útero	-	18.680	18.680
Cavidade Oral	10.380	3.780	14.160
Esôfago	7.900	2.650	10.550
Leucemias	5.220	4.320	9.540
Pele Melanoma	2.950	2.970	5.920
Outras Localizações	55.610	62.270	117.880
Subtotal	175.970	175.750	351.720
Pele não Melanoma	55.890	59.120	115.010
Todas as Neoplasias	231.860	234.870	466.730

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

2. Leucemias

As leucemias compreendem uma grande variedade de doenças hematológicas neoplásicas podendo afetar diferentes tipos celulares em estágios distintos de maturação. As mutações causadoras destas neoplasias são as mais variadas possíveis, refletindo cariótipos e imunofenótipos distintos (Bashawri, 2002).

Os principais sintomas da leucemia decorrem do acúmulo dos precursores imaturos na medula óssea, prejudicando ou impedindo a produção das células sanguíneas, tais como: eritrócitos cuja falta causa anemia, a presença de leucócitos imaturos podendo levar a infecções e a diminuição do número de plaquetas causando hemorragias. Depois de instalada, a doença progride rapidamente, exigindo com isso que o tratamento seja iniciado tão logo seja feito o diagnóstico e classificação da leucemia.

As manifestações clínicas da leucemia aguda são secundárias à proliferação excessiva de células blásticas da medula óssea, que infiltram os tecidos do organismo, tais como: amígdalas, linfonodos, pele, baço, rins, sistema nervoso central e outros. A fadiga, palpitação e anemia são sintomas

iniciais e aparecem pela redução da produção dos eritrócitos pela medula óssea e também verifica-se tendência a sangramentos devido a trombocitopenia. Outras manifestações clínicas são dores ósseas e articulares que são causadas pela infiltração das células leucêmicas nos ossos. Também ocorre com frequência dores de cabeça, náuseas, vômitos, visão dupla e desorientação, causadas pelo comprometimento do sistema nervoso central.

A suspeita do diagnóstico é reforçada pelo exame físico, onde o paciente pode apresentar palidez, febre, esplenomegalia e sinais decorrentes da trombocitopenia, tais como epistaxe (sangramento nasal), hemorragias conjuntivais, sangramentos gengivais, petéquias (**Figura 1**) e equimoses (**Figura 2**). Na análise laboratorial, o hemograma se apresentará com alterações, porém o diagnóstico é confirmado apenas após o exame de análise da medula óssea, o mielograma.

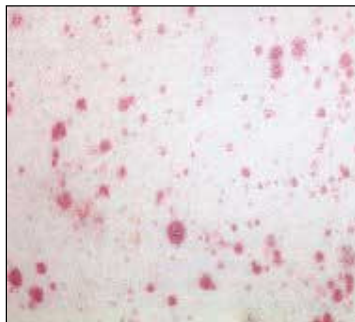


Figura 1: Petéquias (pontos violáceos na pele). (MS/INCA)



Figura 2: Equimoses (manchas roxas na pele). (MS/INCA)

Como geralmente não se conhece a causa exata da leucemia, o tratamento tem o objetivo de destruir as células leucêmicas, para que a medula

óssea possa ser repopulada por células saudáveis. Portanto, em geral se usa a combinação de poliquimioterapia, controle das complicações infecciosas e hemorrágicas, prevenção ou combate da doença no sistema nervoso central e em alguns casos é indicado o transplante de medula óssea. Os principais procedimentos médicos utilizados no tratamento da leucemia são: o mielograma para acompanhamento da resposta ao tratamento, a punção lombar para exame citológico e injeção de quimioterapia, uso de cateter venoso para facilitar a aplicação de medicamentos e coletas de sangue para exame, levando em consideração que o tratamento pode ser bastante longo, além de transfusões enquanto a medula óssea não recupera a hemopoiese. (MS/INCA, 2008).

A classificação das leucemias é um passo muito importante para que seja dado início ao tratamento, e esta definição é totalmente dependente do direcionamento da linhagem e estágio de maturação alterado na hematopoiese. De acordo com o estágio de diferenciação em que a maturação hematopoiética ocorre, um tipo celular imaturo será encontrado em excesso na circulação periférica e dará indicação da classificação da leucemia em questão. Os estágios intermediários até a diferenciação completa das linhagens mielóide e linfóide podem ser observados na **Figura 3**.

3. Leucemias Agudas

As leucemias agudas são síndromes mieloproliferativas, também denominadas leucoses. São neoplasias que acometem a medula óssea e se caracterizam pela proliferação medular desordenada e progressiva, podendo acometer as linhagens mielóide (eritrócitos, granulócitos e plaquetas) ou linfóide. Frequentemente é possível observar os reflexos em alterações no sangue periférico, o que é evidenciado pelo aparecimento de células blásticas nesta circulação. O mielograma revela profusa infiltração destas células leucêmicas e os pacientes acometidos por tais neoplasias evoluem agressivamente para o óbito quando não tratados com rapidez. As leucemias agudas podem ser classificadas em dois tipos que serão baseados na linhagem celular que está alterada: linfóide ou mielóide.

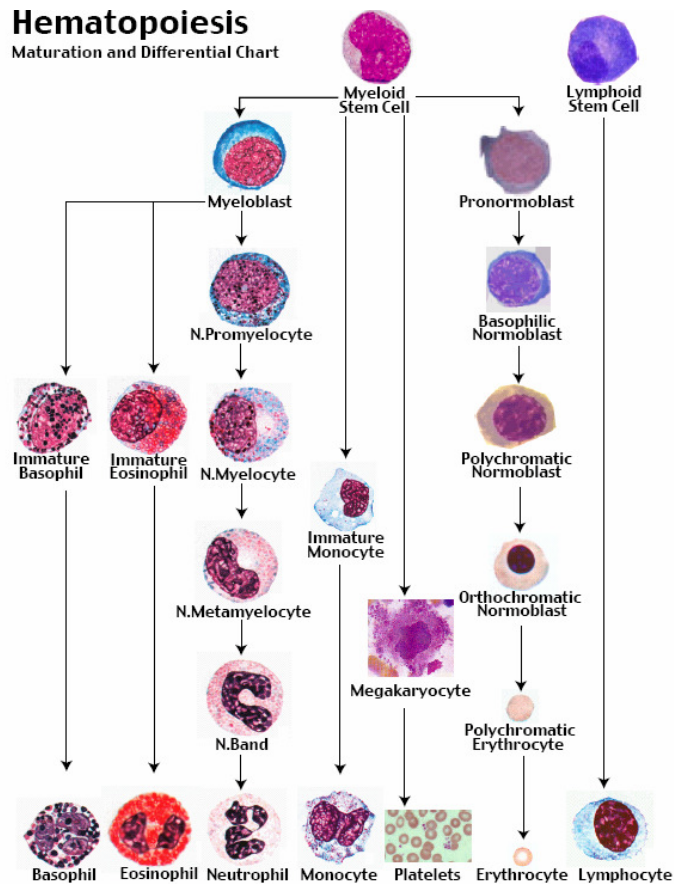


Figura 3: Esquema simplificado da diferenciação das células hematopoiéticas. (WWW.fleming.gr)

3.1. Leucemia linfóide aguda

A leucemia linfóide aguda (LLA) é a malignidade mais comum em crianças, somando mais de 30% de todos os cânceres e 80% das leucemias. Aproximadamente 300 novos casos são diagnosticados a cada ano. Acomete mais freqüentemente o sexo masculino. É caracterizada pela proliferação clonal de precursores linfóides que perderam a capacidade de se diferenciar. A freqüência de anormalidades cromossômicas nesta doença é extremamente alta, 92,3% e entre estas anormalidades podemos encontrar hiperploídias, pseudoploídias e hipoploídias distribuídas entre as LLAs do tipo B e do tipo T. O pico de incidência da LLA fica entre os 2 e 4 anos declinando na adolescência e na juventude. A mortalidade por LLA tem diminuído

drasticamente durante os últimos 25 anos devido a avanços na quimioterapia, particularmente em crianças. (Gilliland & Tallman, 2002)

As LLAs podem ser de dois tipos: tipo B, que é a mais freqüente, originada a partir de precursores de linfócitos B e o tipo T, a partir de precursores de linfócitos T. A classificação mais utilizada é baseada em critérios morfológicos das células blásticas que populam a medula óssea, onde de acordo com os critérios do comitê FAB (French-American-British), três grupos majoritários podem ser distinguidos: A LLA tipo 1 onde é possível observar blastos pequenos, homogêneos e raros nucléolos, a LLA tipo 2 onde é comum encontrar blastos de tamanho variável, heterogêneos e nucléolos bem visíveis e a LLA tipo 3 onde freqüentemente visualiza-se blastos grandes, citoplasma basófilo e vacuolizado, sendo esta última a de pior prognóstico.

Somente a morfologia e a citoquímica não são suficientes para diagnosticar todos os casos, tendo freqüentemente a necessidade de análises citogenéticas e imunofenotipagem para classificar a doença. As anomalias cromossômicas podem determinar um melhor ou pior prognóstico, como por exemplo, a presença da translocação t(9,22) caracterizada pelo Cromossomo Filadélfia (Ph1) atribui um pior prognóstico, enquanto hiperdiploidias atribuem um bom prognóstico. (Bassan et al., 2004)

3.2. Leucemia mielóide aguda

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é a neoplasia hematológica caracterizada pela **proliferação anormal de precursores mielóides**, uma diminuição no nível de apoptose e uma parada de diferenciação destas células. As células alteradas possuem uma vantagem de sobrevivência fazendo com que a medula óssea e o sangue periférico sejam caracterizados por leucocitose com predominância de células imaturas. À medida que estas células imaturas se acumulam na medula óssea, elas substituem as células mielocíticas, megacariocíticas e eritrocíticas normais, levando a uma perda da função da medula óssea e a complicações como sangramento, anemia e infecções. O mecanismo que leva a célula progenitora da linhagem mielóide a perder o controle da proliferação celular, ocasionando a expansão do clone leucêmico,

permanece incerto. No entanto, ativação de proto-oncogenes e mutações em genes supressores tumorais que regulam o ciclo celular parecem estar envolvidos na patogênese das leucemias.

A LMA representa cerca de 15 a 20% das leucemias agudas da infância e 80% de adultos. Na maioria dos casos não há evidência da influência de fatores genéticos, assim como não há diferença de incidência entre etnias, ao contrário da leucemia linfóide aguda (Martins & Falcão, 2000).

3.2.1. Classificação

A heterogeneidade da doença, assim como uma possível diferença de comportamento biológico motivou o estabelecimento de uma classificação. Em 1975, pela primeira vez, o grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) propôs a classificação em seis diferentes subtipos, baseada estritamente em aspectos morfológicos e citoquímicos. Em 1985 esta classificação foi revisada originando a atual classificação FAB, acrescentando novos subtipos. Além disso, foi proposta em 1995 uma classificação que passaria a valorizar dados de recorrência citogenética e da história clínica e/ou aspectos displásicos na medula óssea, tal classificação foi proposta pela organização mundial de saúde sendo denominada classificação WHO (World Health Organization) (Martins & Falcão, 2000).

Segundo a classificação FAB, a Leucemia Mielóide Aguda possui oito subtipos de classificação conhecidos como M0-M7, onde cada um deles apresenta uma característica morfológica diagnóstica, caracterizada pela alteração de uma espécie hematopoiética distinta. Em todos os subtipos de classificação são encontradas anormalidades citogenéticas particulares e as classificações são baseadas na aparência morfológica dos blastos e na maturação das diferentes linhagens celulares na medula óssea. Cada subtipo de LMA possui determinada linhagem em excesso na medula óssea. Por este motivo as distintas classificações da LMA podem exigir tratamentos diferenciados. A observação da **figura 4** mostra esta heterogeneidade.

3.2.2. Características morfológicas

Os tipos morfológicos de LMA são definidos de acordo com o grau de diferenciação e maturação de uma ou mais linhagens, dependendo do momento da hematopoiese em que ocorreu a parada de diferenciação. O subtipo M0 é caracterizado pela indiferenciação das células em excesso na medula óssea. Os subtipos M1 e M2 apresentam em excesso a linhagem granulocítica (neutrófilos). O subtipo M3 é caracterizado por possuir em excesso promielócitos hipergranulares específicos. Os subtipos M4 e M5 apresentam predominantemente as células com diferenciação monocítica sendo que o subtipo M5 pode apresentar somente monócitos e granulócitos em excesso. Já nos subtipos M6 e M7 os tipos celulares predominantes são os eritroblastos e megacarioblastos, respectivamente. Algumas destas classificações ainda se subdividem, como por exemplo, o subtipo M5, que pode ser denominado subtipo M5a e M5b, classificação dada de acordo com a porcentagem de monócitos na medula.

3.2.3. Características Citogenéticas

As diversas anormalidades cromossômicas encontradas nos subtipos da LMA, assim como em LLA, podem ser classificadas quanto ao prognóstico bom ou ruim, e este dado poderá direcionar o tratamento.

A análise citogenética na LMA tem revelado um grande número de anormalidades cromossômicas distribuídas entre os subtipos da LMA, porém entre as que são recorrentes e que ajudam a compor o diagnóstico do subtipo estão as translocações a seguir: (Mrózek et al., 2004; Sahin et al., 2007)

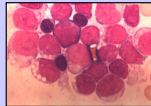
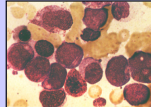
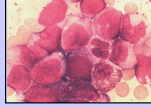
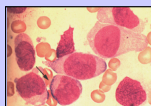
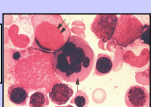
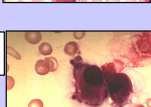
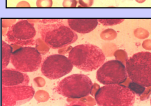
M1 s/ maturação	blastos > 90% na MO	-3,-5,del(5q),-7,del(7q),+8,+11,+13,Ph+,+21	
M2 c/ maturação	90% > blastos > 30% na MO monócitos < 20%	del(2p),t(2;4)(p23;q35),+4,-5,del(5q),t(6;9)(p23;q34),-7,del(7q),t(7;11)(p15;p15),+8,t(8;21)(q22;q22),Ph+,+11,t(11;20)(p15;q11)+21	
M3 pró-mielocítica	blastos promielocíticos na MO	del(7q),+8,t(11;17)(q23;q12),t(15;17)(q22;q21),i(17q),+21	
M4 mielomonocítica aguda	blastos > 30% na MO série monocítica > 20%	t(1;7)(p11;q11),+4,-5,del(5q),t(6;9)(p23;q34)-7,del(7q),+8,del(9q),t(9;11)(p21;q23),t(10;11)(p15;q23),del(11)(q23q24),t(11;17)(q23;q25),t(11;19)(q23;p13),t(12;22)(p13)(q21),inv(16)(p13q22),t(16;16)(p13;q22),t(16;21)(p11.2;q22),del(16)(q22),dic(16;22)(q11;p11)	
M5 monoblástica aguda	série monocítica > 80% na MO	t(1;12)(p36;p12),t(6;11)(q27;q23),+8,t(8;16)(p11;p13),t(9;11)(p21;q23),t(10;11)(p15;q23),ins(10;11)(p11;q23q24),del ou t(11q23),t(11;17)(q23;q25),t(11;19)(q23;p13)	
M6 eritroleucemia	eritroblastos > 50% na MO blastos > 30%	dup(1q),inv(3)(q21;q26),ins(3;3)(q26;q21q26),t(3;3)(q21;q26),-5,-7,del(7p),+8,del(9q),del(20)(q11),i(21q)	
M7 megacarioblástica	megacarioblastos > 30% na MO	t(1;22)(p13;q13),inv ou del 3,+8,del(20q11),+21	

Figura 4: Tipos morfológicos na LMA acompanhados de suas alterações citogenéticas.

- t(8;21)(q22;q22), observada no subtipo M2 e que envolve os genes AML1 e ETO;
- t(15;17)(q22;q21), encontrada no subtipo M3 e M3 variante. Nesta translocação o gene que codifica o receptor alfa do ácido retinóico (RAR) é fusionado ao fator de transcrição chamado PML gerando o produto quimérico PML-RAR. Além do cromossomo 15 outros cromossomos como, por exemplo, o 11 e o 5 podem estar presentes nos subtipos variantes de M3;
- Inversão ou deleção do cromossomo 16 (q22) pode ser encontrada nos subtipos M4, porém na maioria das vezes somente alterações morfológicas são observadas para este subtipo;
- del(11)(q23) ou t(11q23) fortemente associada a leucemias monoblástica e monocítica que compõem o subtipo M5. Estas alterações envolvem o gene

MLL que também participa de outras translocações apresentando um risco intermediário para os pacientes;

- t(8,16)(p11,p13) está associada ao subtipo M5b onde predomina a linhagem monocítica;

- del(12p) e t(6,9)(p23,q34) estão associadas aos subtipos M2 com diferenciação basofílica e ao subtipo M4 respectivamente.

Existem ainda outras anormalidades cromossômicas não descritas acima, como por exemplo, deleções dos cromossomos 5, 7, del 5q, del 7q e ainda as leucemias que apresentam cariótipos complexos, com anormalidades envolvendo mais de uma translocação ou deleção citogenética, que são consideradas de pior prognóstico. Também é importante ressaltar que há uma grande porcentagem de indivíduos que apresentam cariótipo normal, não apresentando nenhuma alteração citogenética detectável por citogenética convencional, sendo um grupo bastante heterogêneo de risco intermediário (Mrózek et al., 2004).

3.2.4. Características moleculares

Em nível molecular as várias alterações cromossômicas sejam translocações, inversões ou deleções, resultam em rearranjo genômico em geral, envolvendo genes codificantes para fatores transcricionais (Rabbits,1994; Look 1997). Estes rearranjos genômicos freqüentemente promovem o aparecimento de um gene quimérico consistindo da porção 5´ de um gene fundido com a 3´ de outro. A proteína quimérica resultante contém domínios estruturais e funcionais das duas proteínas, que foram alteradas e em geral está associada ao desenvolvimento da leucemogênese.

Na LMA, as translocações cromossômicas mais freqüentes têm sido caracterizadas molecularmente, o que é possível observar detalhadamente na **tabela 2** (Biondi & Rambaldi, 1996).

Tabela 2: Translocações cromossômicas e genes envolvidos na LMA.

Alteração Cromossômica	Gene afetado
t(15,17)(q24,q21)	PML(15q21)RAR α (17q21)
t(11,17)(q23,q21)	PLZF(11q23)RAR α (17q21)
t(9,11)(q21,q23)	MLL(11q23)AF9/MLLT3(9p22)
t(11,19)(q23,p21)	MLL(11q23)ENL(19p13)
t(11,17)(q23,q21)	MLL(11q23)AF17(17q21)
t(8,21)(q22,q22)	AML1/CBF α (21q22)ETO/MTG8(8q22)
t(16,21)(p11,q22)	FUS(16p11)
t(6,9)(p23,q34)	DEK(6p23)Can(9q34)
Inv(16)(p13,q22)	Myosin Myh11(16p13)CBF β (16q22)

A patogênese da leucemia mielóide aguda envolve uma série de alterações moleculares que juntas levam a transformação celular. Este processo inclui a regulação da proliferação celular, diferenciação, renovação, sobrevivência, controle dos pontos de checagem do ciclo celular, Reparo do DNA e estabilidade da cromatina (**Tabela 3**) (Licht & Sternberg, 2005). A rotina regulatória normal é interrompida ou comprometida por estes insultos leucemogênicos e a compreensão destas alterações pode guiar novas estratégias terapêuticas. (King & Rowe, 2007).

A proliferação anormal das células leucêmicas é freqüentemente resultado de mutações afetando vias de sinalização proliferativas. Seguindo a descoberta da tirosina quinase BCR-ABL em leucemia mielóide crônica, outras quinases ativadas têm sido implicadas na patogênese da LMA, como por exemplo, a tirosina quinase FLT3 é constitutivamente ativada por duplicações *in tandem* ou por mutações em aproximadamente 30% dos casos. Os mutantes FLT3-ITD de LMA ativam a proliferação e vias de sobrevivência, conferindo a propriedade de auto-renovação em células CD34+ humanas. Além de FLT3

uma outra quinase já foi descrita como participante no processo de leucemogênese, a tirosina quinase c-Kit, tem sua expressão aumentada em 60 a 80% dos pacientes de LMA sendo ativada por mutações (Licht & Sternberg, 2005).

Outro gene envolvido é JAK2 que ao ser ativado por uma mutação pontual V617F induz proliferação através do recrutamento de ativadores transcricionais da família STAT. Esta mutação é encontrada em 5% dos pacientes com síndrome mielodisplásica, sugerindo que a mutação pode ser encontrada em pacientes que evoluem para LMA (Licht & Sternberg, 2005).

Outro mecanismo já descrito seria a transmissão de sinais proliferativos pelo recrutamento de proteínas G da família RAS e mutações de genes que codificam estas proteínas, mimetizando os efeitos de mutações no receptor de tirosina quinase (RTK). N-RAS é mutado e constitutivamente ativado em 10% a 20% da LMA, KRAS em 5% a 15%, enquanto HRAS é raramente mutado. Outra forma de ativação da via de RTK é pela ativação da atividade fosfatase de SHP-2/PTPN11 através de mutações pontuais, sendo estas mutações encontradas em uma pequena proporção de pacientes com LMA *de novo*. A remoção de grupos fosfato de substratos-chave estimula a sinalização através de vias RTK e mutações nesta via tem sido documentadas em aproximadamente 50% dos casos de LMA (Licht & Sternberg, 2005).

Em geral, as vias de RTK na LMA são ativadas com ganho de mutação funcional. A exceção é a perda da expressão da proteína supressora de tumor Neurofibromina (NF1), que inativa RAS pelo estímulo de sua atividade GTPase intrínseca. Crianças com neurofibromatose têm uma perda germinativa de um alelo NF1 e podem desenvolver leucemia mielomonocítica juvenil ou LMA com perda do alelo NF1 normal remanescente. Por outro lado, a perda de NF1 é rara em LMA de novo na infância e LMA no adulto (Licht & Sternberg, 2005).

Tabela 3: Lesões moleculares na leucemia mielóide aguda associadas com características malignas. (Adaptado de Licht & Sternberg, 2005).

<i>Problema</i>	<i>Proliferação Celular Autônoma</i>	<i>Bloqueio da diferenciação</i>	<i>Escape da apoptose</i>	<i>Renovação aumentada</i>	<i>Perda do controle do ciclo celular</i>	<i>Disseminação</i>
Lesão Molecular	Mutações de ativação: Flt-3, Ras, c-kit, c-FMS, JAK2, PTPN11	Fusão de fatores de transcrição	Ativação da via AKT seguida da ativação de RTK	Mutações de β -catenina	disfunção de p53	secreção de TNF por blastos leucemicos
	Mutações de inativação: NF1	receptor do ácido retinóico: PML_RAR α e PLZF-RAR α	Mutações de P53	Ativação da via catenina-wnt por fatores de transcrição fusionados	Perda de Rb	Selectinas, caderinas e integrinas aumentadas
	Upregulação de Trk-A por RUNX1-MTG8	Fator core binding: RUNX1-MTG8, CBF β -myh11, RUNX1-EV11	Disregulação de P53 por proteínas de fusão			Metilação de p15 e p16
		Fusões MLL	Mutação de NPM	Vias de RTK ativadas		
		Fusões e superexpressões de genes HOX	Superexpressão de Bcl2			
	Mutações pontuais de fatores de transcrição: Pu1, CEBP α , RUNX1	Superexpressão de survivina				
	Inibição da expressão de Flt3					

3.2.5. Grupos Prognósticos

Três subgrupos de alterações genéticas vêm sendo definidos nos últimos anos como os de maior frequência em LMA primária do adulto. Os que envolvem rearranjos do gene CBF (*core binding factor*), as leucemias associadas a alterações do gene MLL e as leucemias associadas ao rearranjo PML-RAR α (Heilmeier et al., 2007).

Alterações no gene CBF ocorrem em 15% a 20% das LMAs primárias do adulto e estão geralmente associadas a um prognóstico mais favorável. Estas alterações estão presentes em LMAs com a t(8;21)(q22;q22), a t(16;16)(p13;q22) e a inv(16)(p13;q22). Em cada uma destas alterações uma das cadeias de CBF é afetada. Este gene codifica as subunidades α e β de um fator de transcrição heterodimérico envolvido na regulação da hematopoese. (Mrózek et al., 1997)

A t(8;21)(q22;q22) ocorre na LMA subtipo M2 em 90% dos casos e raramente na LMA-M1 (6%). Nesta translocação a cadeia CBF α 2, denominada AML1 localizada na região 21q22 sofre rearranjo com o gene ETO localizado no cromossomo 8q22. O gene AML1 é expresso em vários tecidos hematopoéticos e principalmente durante a diferenciação mielóide, onde ele se liga a diversos promotores facilitando a ligação de outros fatores de transcrição. Entre os genes regulados por AML1 encontram-se os codificantes de GM-CSF, IL-3, M-CSF, mieloperoxidase e outros envolvidos na diferenciação monocítica (Yergeau et al., 1997; Okuda et al., 1998).

A outra subunidade de CBF a CBF- β está por sua vez envolvida no rearranjo gerado pela t(16;16)(p13;q22) ou pela inv(16)(p13;q22). Nestas alterações cromossômicas CBF β sofre rearranjo com o gene MYH11 localizado no cromossomo 16p13. O gene MYH11 codifica para a cadeia pesada de miosina de músculo liso; o mecanismo pelo qual a fusão deste gene com a subunidade β de CBF gera a transformação maligna não é completamente compreendido. Os estudos mais recentes indicam que a proteína de fusão CBF- β /MYH11 exerce um efeito dominante negativo na interrupção do programa normal de hematopoiese pelo seqüestro da proteína AML1 do *pool* nuclear (Liu et al., 1993).

O segundo grupo de alterações genéticas ocorrendo em LMA envolve rearranjos do gene MLL localizado no cromossomo 11q23. Estas anormalidades são encontradas em 5% a 10% dos pacientes com LMA primária, e são também freqüentemente encontradas em LMAs secundárias após tratamento com inibidores de topoisomerase II (Bernard & Berger, 1995).

O gene MLL é o gene humano homólogo ao gene *trithorax* de *Drosophila* e pertence a uma família gênica cuja função está relacionada com a manutenção de uma determinada atividade gênica. Esta atividade depende do papel que MLL executa no recrutamento de fatores de remodelamento da cromatina. Em relação a hematopoiese o gene MLL parece ter um importante papel na manutenção da expressão de genes Hox relevantes no desenvolvimento e na hematopoiese (Tkachuk et al., 1992).

Translocações envolvendo a região 11q23 já foram encontradas com mais de 25 diferentes sítios cromossômicos como parceiros, sendo os mais comuns em LMA as: t(6;11)(q27;q23), t(9;11)(p22;q23), t(10;11)(p12;q23) e t(11;19)(q23;p13). Estes rearranjos sempre acarretam na quebra da região amino-terminal da proteína MLL com uma região carboxi-terminal do gene parceiro. Estudos com os vários transcritos quiméricos gerados sugerem que a expressão dos genes quiméricos contribui para a leucemogênese, mas tendo em vista a grande diversidade de parceiros de MLL e que estes genes não apresentam similaridade de função supõe-se que o processo leucemogênico ocorra devido a alterações no funcionamento de MLL, levando principalmente aos fenótipos encontrados nos subtipos M4 ou M5 da LMA.

Deleções da região 11q23 também são comuns em LMA primária, mas ocorrem em subtipos distintos como M1 e M2. Além disso, vários casos de LMA primária com +11 ou cariótipo normal apresentam rearranjos somáticos de MLL inclusive duplicação *in tandem*.

O terceiro grupo de alterações genéticas da LMA compreende o grupo de leucemias associadas ao rearranjo PML-RAR α ou t(15;17)(q22;q12). Estes rearranjos envolvem o gene para o receptor do ácido retinóico que parece ser importante na diferenciação mielóide, pois retinóis induzem a granulopoiese. Portanto o bloqueio de seu receptor acarreta na parada de diferenciação das células no estágio de promielócito. Como parceiro nas translocações encontradas na LMA primária o receptor do ácido retinóico α (RAR α) tem

principalmente o gene APL localizado na região 15q22, mas menos freqüentemente o rearranjo ocorre com outros genes como PLZF, NPM, NuMA e STAT5b nas $t(11;17)(q23;q21)$, $t(5;17)(q35;q21)$, $t(11;17)(q13;q21)$ e $dup(17)(q21;q23)$ respectivamente (Larson et al., 1984; Redner et al., 1996).

O gene de fusão PML-RAR α parece codificar uma forma dominante negativa de RAR α inibindo, portanto genes que normalmente são ativados por RAR α . Apesar disso, só a expressão do gene de fusão não é suficiente para induzir a leucemogênese havendo a necessidade de mutações adicionais em FLT3, N-Ras, GATA1, C/EBP α ou PU-1 (Gilliand et al., 2004).

Na realidade este mecanismo parece ser comum a todas as leucemias agudas dos adultos nas quais a necessidade de mutações prévias geralmente em células que não vão prevalecer na população leucêmica parece ocorrer.

Pacientes com LMA e rearranjos envolvendo o gene CBF tem mostrado um prognóstico favorável. Em quase todos os estudos com LMA primária do adulto, pacientes com a $t(8;21)(q22;q22)$, $inv(16)(p13 q22)$ ou $t(16;16)(p13;q22)$ tem apresentado o CR mais elevado (90%) e a maior razão de pacientes livres de doença após 5 anos (50%). A base molecular desta resposta favorável parece ser a sensibilidade dos blastos com este rearranjo à citarabina (Tosi et al., 1998).

Por outro lado, pacientes com anormalidades envolvendo a região 11q23 mostram uma clínica agressiva e um prognóstico ruim. No entanto devido a grande heterogeneidade de rearranjos afetando esta região na LMA primária do adulto a definição dos critérios prognósticos ainda não é conclusiva.

Pacientes com leucemias associadas ao rearranjo de RAR α compreendem um grupo que demonstra como o conhecimento da biologia da doença pode ajudar na definição do prognóstico. Pacientes com LMA-M3 apresentando o gene de fusão PML-RAR α apresentam elevados níveis de remissão ao tratamento com trans-retinol (ATRA). A maioria é totalmente curada quando uma quimioterapia intensiva com antraciclina é co-administrada. Nos rearranjos alternativos que ocorrem neste grupo de leucemias a resposta não é sempre a mesma. Pacientes com $t(5;17)(q35;q21)$ ou $t(11;17)(q13;q21)$ parecem ser sensíveis ao ATRA, já pacientes com a $t(11;17)(q23;q21)$

associada ao rearranjo PLFZ/RAR α não respondem a retinóis (Grimwade et al., 2000).

Apesar da definição pré-existente destes grupos prognósticos, ainda há um grande grupo que não se enquadra em nenhum dos grupos apresentados. Cerca de 40 a 49% dos adultos e 25% das crianças com LMA não apresentam nenhuma alteração cromossômica detectável por citogenética convencional. Estes pacientes com cariótipo normal usualmente são classificados em um grupo prognóstico de risco intermediário devido a sua sobrevivência livre de doença e risco de recaída serem menores que as aberrações consideradas favoráveis como t(8,21)(q22,q22), t(16,16)(p13,q22)/inv(16)(p13,q22) ou t(15,17)(q22,q21), entretanto apresentam melhores condições que os pacientes com citogenética desfavorável como -7, inv(3)(q21,q26)/t(3,3)(q21,q26), translocações envolvendo 11q23 ou cariótipos complexos (Grimwade et al., 2001; Byrd et al., 2002; Slovak et al., 2000)

Pacientes com citogenética normal são uma classe heterogênea em nível molecular, onde este aspecto pode ser influenciado por alterações genéticas que são clinicamente relevantes como marcadores prognósticos.

Apesar de raro, inserções crípticas de vários segmentos pequenos de cromossomos que não alteram a morfologia do cromossomo têm sido descritas em pacientes previamente diagnosticados como cariótipo normal. Nestes casos, comumente, um gene de fusão como PML-RAR α , AML1-ETO ou CBF β -MYH11 é encontrado conferindo um bom prognóstico (Rowe et al., 2000, Mrózek et al., 2001). Por outro lado, mutações gênicas como duplicações in tandem (ITD) no domínio justamembrana (JMD) do gene FLT3, mutações do domínio tirosina quinase de FLT3 (TKD), mutações em nucleofosmina (NPM1), duplicações parciais *in tandem* (PTD) de MLL, expressão aumentada do gene BAALC, mutações no gene CEBPA e expressão aumentada de ERG são freqüentemente encontrados em pacientes com LMA e cariótipo normal e a significância do prognóstico destas mutações ou expressões anormais individuais ou combinadas ainda são uma questão a esclarecer (Mrózek et al., 2007b; Marcucci et al., 2005; Baldus et al., 2007).

Desde 1996 FLT3-ITD tem sido mostrada como uma anormalidade genética prevalente em LMA, sendo especialmente freqüente na t(15,17) e cariótipos normais (Kottaridis et al., 2001). O gene FLT3 codifica um membro

da classe III da família de receptores de tirosina e é normalmente expresso na superfície de células progenitoras hematopoiéticas da medula óssea.

As mutações FLT3-ITD ocorrem nos exons 14 e 15 e variam no comprimento da duplicação de 3 a 400 nucleotídeos. Apesar da heterogeneidade dos transcritos resultantes, eles ocorrem geralmente *in frame*. FLT3-ITD codifica uma proteína anormal que leva a uma dimerização do receptor independente de ligante, autofosforilação e ativação constitutiva. FLT3-ITD tem sido detectada em 28% a 33% dos pacientes com LMA, mas duas outras mutações pontuais em FLT3 também são descritas (Schnittger et al., 2005, Fröhling et al., 2002, Beran et al., 2004, Thiede et al. 2002). A primeira e mais freqüente localiza-se no loop de ativação da tirosina kinase (TKD) e é encontrada em 5% a 14% dos cariótipos normais de pacientes com LMA. Ambas as mutações induzem fosforilação constitutiva e ativação de FLT3 (Kuchenbauer et al., 2005).

Clinicamente, pacientes com cariótipo normal que carregam FLT3-ITD diferem quanto ao tratamento dos que não a apresentam. Um prognóstico pior tanto para remissão quanto para a sobrevivência livre de doença tem sido estabelecido para o grupo de risco intermediário que inclui cariótipo normal. Contrário a FLT3-ITD, a mutação FLT3-TKD não tem sido descrita como um prognóstico adverso entre pacientes com cariótipo normal ou com citogenética de risco intermediário (Fröhling et al., 2002, Thiede et al., 2002).

Mutações de nucleofosmina (NPM1) são as mais freqüentes em pacientes com cariótipo normal, entre 46 e 62% dos casos. A mutação mais comum de NPM1 é uma duplicação de 4pb no exon 12 que causa uma substituição dos últimos 7 aminoácido por 11 outros no C-terminal da nucleofosmina, causando uma localização citoplasmática aberrante. (Falini et al., 2006)

Mutações em NPM1 ocorrem predominantemente em cariótipos normais e pacientes mutados para NPM1 apresentam mutações FLT3-ITD e FLT3-TKD numa freqüência duas vezes maior que pacientes NPM1 não mutados, sugerindo que mutações em NPM1 normalmente levam a aquisição de mutações em FLT3. (Thiede et al., 2006; Palmisano et al., 2007)

A relevância do prognóstico de mutações em NPM1 em pacientes com cariótipo normal ou aqueles classificados na categoria de risco citogenético

intermediário indicaram que estas mutações representam um fator prognóstico independente para ativação de remissão completa na ausência de mutações FLT3-ITD concomitantes (Thiede et al., 2006, Stirewalt et al., 2004)

MLL-PTD foi a primeira mutação que presente em cariótipo normal de pacientes com LMA afeta o prognóstico. Mutações MLL-PTD ocorrem em aproximadamente 8% destes pacientes e a maioria envolve duplicação de regiões genômicas envolvendo dos exons 5 ao 11 e inserções na região duplicada dentro do intron 4 do MLL; na maioria dos casos a região duplicada atravessa dos exons 5 ao 12 (Caliguri et al., 1998, Schnittger et al., 2000, Steudel et al., 2003). A presença de MLL-PTD é concorrente ao silenciamento do alelo selvagem MLL em blastos de LMA. O mecanismo para este processo parece envolver a metilação diferencial de DNA e modificação de histonas o que confere um pior prognóstico aos pacientes com cariótipo normal. A combinação de drogas capazes de reativar a transcrição do alelo selvagem MLL em células MLL-PTD positivas foi associada com aumento da morte celular de blastos leucêmicos (Whitman et al., 2005)

Outra mutação freqüente ocorre no gene CEBP α , um gene que codifica um fator de transcrição com motivo zíper de leucina que tem um papel essencial na granulopoiese. Esta mutação é freqüentemente encontrada na LMA-M1 ou M2 com cariótipo normal. Há duas categorias de mutações CEBP α : mutações no C-terminal que produz proteínas mutantes que prejudicam a atividade de ligação do DNA; e mutações N-terminais que resultam em isoformas truncadas com atividade negativa dominante. Estudos clínicos revelam um prognóstico favorável significativo de mutações CEBP α em pacientes com cariótipo normal.

Apesar da maioria dos cariótipos normais estudados apresentarem uma das alterações citadas acima, um quarto dos pacientes não carregam FLT3-ITD, FLT3-TKD, MLL-PTD, ou mutações em CEBP α ou NPM1. Este grupo é envolvido por alterações de expressão. Muitos genes com expressão anormal têm sido descritos na LMA. O gene ERG, um membro da família ETS de fatores de transcrição, pode se apresentar com expressão aumentada em LMA *de novo* com prognóstico desfavorável (Marcucci et al., 2007). Também podemos observar a expressão aumentada do gene BAALC sendo um fator

prognóstico adverso independente nos pacientes de LMA cariótipo normal (Langer et al., 2008; Baldus et al., 2006).

Vários membros da família polycomb e do grupo hox, tem sido descritos como expressos de forma anormal na LMA. Alguns destes genes podem ter um efeito dramático na hematopoiese normal devido a participação de genes polycomb na regulação epigenética da expressão de genes hox alvo. Recentemente Scholl et al. (2000) e Fröhling et al. (2007) relataram que CDX2 se apresentava com expressão aumentada em 90% dos pacientes LMA e questionam o papel que este aumento da expressão poderia ter no desenvolvimento da LMA. Assim como CDX2 e BMI1, outros genes com expressão aumentada na LMA são capazes de diminuir a expressão de genes HOX (Scholl et al., 2007 e Rice & Licht, 2007). Entretanto, os mecanismos específicos que induzem o aumento da expressão de genes polycomb em LMA assim como evidências de como eles diminuem a expressão de uns e não de outros, ainda necessitam de esclarecimentos. A definição de alvos de reguladores transcricionais e um melhor entendimento do circuito de genes HOX poderia apresentar uma nova geração de alvos genéticos, com potencial terapêutico benéfico para os múltiplos subtipos de LMA (Pajuelo-Gámez et al., 2007).

Várias têm sido as tentativas de se estratificar os vários subtipos de LMA do adulto em categorias prognósticas. Se uma porcentagem dos pacientes pode ser enquadrada nestes escores prognósticos, em todas as classes existem exceções com associações clínicas que tornam difícil a definição do prognóstico e a avaliação do efeito das diferentes terapias. O uso de técnicas de análise em larga escala certamente é uma boa opção para investigar estes fatores.

4. Novas abordagens tecnológicas

Um fator importante que tem retardado o progresso na oncologia clínica é a complexidade da doença, onde cada tipo de tumor consiste de um grande número de subtipos que diferem de acordo com suas alterações genéticas. Cada subtipo molecular pode ser associado com um comportamento clínico e uma resposta ao tratamento distinto.

Nos últimos anos, com o término do seqüenciamento do Genoma Humano, diversas técnicas foram desenvolvidas com o objetivo de analisar de forma ampla e simultânea a expressão gênica de diversos tecidos e tipos celulares (Ota et al., 2003).

Com estas tecnologias diversos estudos de expressão diferencial entre amostras de células normais e doentes foram feitos, e em muitos deles diversos marcadores de expressão tumoral importantes foram encontrados. Neste sentido, técnicas como *Microarray* e de proteômica serão importantes na definição de subtipos de cada tumor para indicar precocemente que pacientes irão se beneficiar de que tratamento.

4.1. *Microarray*

A tecnologia de DNA *microarray* tem sido usada para identificar padrões de expressão de RNAm ou assinaturas moleculares na LMA (Yocum et al., 2006). Esta técnica tem sido uma poderosa ferramenta para caracterizar mecanismos moleculares de muitos cânceres inclusive as leucemias, sendo capaz de mensurar níveis de expressão de centenas de genes simultaneamente (Tsutsumi et al., 2004). As análises por *microarray* têm permitido a identificação de genes que são diferencialmente expressos entre blastos leucêmicos e linhagens hematopoiéticas enquanto identifica genes envolvidos em muitos processos da doença. O seu uso tem confirmado a classificação de subgrupos da leucemia mielóide aguda baseada em critérios morfológicos e citoquímicos, (Andersson et al., 2007; Andersson et al., 2005; Haferlach et al., 2008) além de indicar padrões de expressão gênica que predizem marcadores prognósticos, (Bullinger et al., 2004) identificar os efeitos de regimes de tratamentos específicos na expressão gênica e apontar genes que podem agir como alvo para futuros tratamentos (Guinn et al., 2005).

4.2. Proteômica

A tecnologia do Proteoma tem sido considerada o maior fruto do Projeto Genoma Humano e o conhecimento e a análise detalhada do Proteoma do Câncer representa o salto para a produção de uma nova geração de drogas

muito mais eficazes contra doenças como também mais específicas para cada indivíduo.

O proteoma pode ser definido como o conjunto de proteínas expressas por um genoma e, portanto representa toda a informação genética proteica que está sendo expressa em um determinado momento ou condição patológica. Tendo em vista que o número estimado de transcritos que uma célula pode expressar é de 5.000, e que somente a partir de modificações pós-tradução, podemos ter mais de 100.000 possíveis proteínas, fica evidente a diferença entre a análise do transcriptoma e do proteoma (Hanash et al.,2002). Portanto, a potencialidade e a relevância de abordagens utilizando esta tecnologia ficam bastante evidentes, representando o que realmente está sendo expresso na célula na condição estudada. Com isso, acredita-se que o uso desta técnica para análises comparativas entre células normais e neoplásicas é uma poderosa ferramenta no estudo das leucemias.

4.2.1. Aplicação na LMA

Em relação às diferentes neoplasias, o Proteoma de Leucemias pode ser destacado, uma vez que a obtenção de material de neoplasias hematológicas oferece menores dificuldades e o número de variáveis possíveis de análise é elevado.

Várias têm sido as tentativas de se estratificar os vários subtipos de LMA do adulto em categorias prognósticas. Se uma porcentagem dos pacientes pode ser enquadrada nestes escores prognósticos, em todas as classes existem exceções com associações clínicas que tornam difícil a definição do prognóstico e a avaliação do efeito das diferentes terapias.

Apesar de todo o conhecimento acumulado nos últimos 10 anos sobre as bases moleculares dos processos leucemogênicos da LMA do adulto, somente o conhecimento dos genes e suas funções têm adicionado muito pouco a prática clínica. Isto ocorre em parte pela heterogeneidade da doença que implica em um número elevado de variáveis a serem avaliadas como fatores prognósticos e como alvos terapêuticos. Além disso, sendo a maior parte das alterações genéticas em fatores de transcrição que controlam a diferenciação mielóide, dificuldades existem na elaboração de inibidores que

possam atingir os genes alterados sem interferir com os processos normais da célula.

Torna-se, portanto importante a identificação de novos biomarcadores que estejam alterados em sua expressão nas células leucêmicas como consequência do rearranjo primário e das outras alterações que estas células possuem (Yocum et al., 2006). Estes novos biomarcadores formariam um conjunto de fatores capazes de definir com maior precisão o prognóstico de cada paciente. Além disso, biomarcadores não essenciais à vida da célula poderiam ser utilizados como alvo no desenvolvimento de novas drogas (Unwin & Whetton, 2007; Ohtake, 2007).

Até hoje, os estudos em proteômica da LMA foram em sua maioria realizados com células em cultura (Smith et al., 2002; Rezaul et al., 2005). Estes estudos demonstraram que a metodologia pode ser utilizada com êxito em leucemias, indicando biomarcadores capazes de monitorar a doença em questão. Outros trabalhos têm utilizado o plasma como material biológico (Koomen et al., 2005; Joo et al., 2003), um estudo mais recente analisou o soro de pacientes com LMA e comparou com o soro de indivíduos saudáveis detectando oito proteínas diferencialmente expressas, que podem ser utilizadas potencialmente como método diagnóstico e de monitoramento (Kwak et al., 2004). Balkhi e colaboradores, também desenvolveram um trabalho onde se iniciou a tentativa de estratificar os pacientes de leucemia mielóide aguda por grupos citogenéticos e analisar a interação das proteínas envolvidas (Balkhi et al., 2006).

Portanto seria de extrema importância analisar o perfil proteômicos na LMA, bem como nos seus subtipos distintos que possuíssem as mesmas anormalidades citogenéticas e os subtipos de LMA que ainda não possuem um tratamento específico para que possamos identificar quais proteínas possam caracterizar cada doença. Os resultados forneceria informações para a identificação de marcadores funcionais para a doença e seus diferentes subtipos e indicaria novas proteínas candidatas ao desenvolvimento de outras drogas.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Analisar e identificar por abordagens proteômicas comparativas o perfil protéico da leucemia mielóide aguda identificando possíveis marcadores tumorais funcionais específicos da LMA e de alguns de seus subtipos.

Objetivos Específicos

1-Definir o perfil proteômico de Células mononucleares de medula óssea de pacientes com LMA.

2-Identificar possíveis biomarcadores que se relacionem à doença e alguns de seus subtipos

METODOLOGIA

1. Critérios de inclusão e exclusão

As amostras utilizadas foram obtidas de aspirado de medula óssea de pacientes provenientes de diversas unidades hospitalares do Rio de Janeiro e outros estados do Brasil, dentre elas o próprio INCA, o Hospital da Lagoa, Hospital dos Servidores, Hospital Santa Rita, Hospital Universitário da UFRJ, IPPMG (Instituto de puericultura e pediatria Martagão Gesteira), Onco-Bahia e IMIP de Pernambuco. As amostras utilizadas para este trabalho foram as mesmas amostras colhidas dos pacientes para a realização de exames de rotina de diagnóstico, tais como: citogenética, biologia molecular e imunofenotipagem. Foram incluídas neste estudo as amostras ao diagnóstico e excluídas as amostras pré e pós-transplante.

Portanto os pacientes foram incluídos na pesquisa somente quando, após estes exames, ainda existia material (amostra de medula óssea) excedente disponível. Todos os pacientes foram informados desta possibilidade e assinaram um termo de consentimento.

Como amostras controle, foram utilizadas alíquotas do material colhido de doadores de medula óssea para os transplantes realizados no CEMO. Este material também é enviado rotineiramente para os laboratórios que realizam exames controles.

Do material excedente foram obtidas as células e o plasma para análise dos controles. Estes doadores também foram informados e assinaram o termo de consentimento.

2. Obtenção de Células Mononucleares de Medula Óssea

Para a obtenção das Células Mononucleares de Medula Óssea as amostras dos aspirados medulares foram submetidas a uma centrifugação a 2000 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Sigma). O plasma separado desta centrifugação foi separado e congelado. O pellet de células foi lavado duas vezes com três volumes de solução de Lise de Hemácias (10mM Tris pH8.0, 5mM MgCl₂, 10mM NaCl), submetido a nova centrifugação a 1000 rpm por 2 minutos novamente a

temperatura ambiente tendo seu sobrenadante descartado. O pellet de células foi obtido e foi preparado o extrato protéico total.

3. Preparo dos Extratos Protéicos Totais

O pellet de Células Mononucleares obtido foi lavado duas vezes com PBS 1x por 10 minutos a 1500 rpm. As células foram ressuspensas em tampão de extração de proteínas (50mM de Tris pH 7.5, 5mM EDTA, 10mM EGTA, 50mM NAF, 20mM β -Glicerofosfato, 250mM NaCl, 0.1% de Triton X-100), acrescidas de um mistura de inibidores de proteases (240 μ g/mL AEBSF, 10 μ g/mL Bestatina, 10 μ g/mL Pepstatina, 10 μ g/mL Leupeptina, 18 μ g/mL E-64), na proporção 1:100 de tampão de extração, incubadas durante trinta minutos a 4°C e depois centrifugadas a 15.000 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante foi retirado, novamente centrifugado por 2 minutos a 1500 rpm, sendo o sobrenadante desta última centrifugação, considerado o extrato de proteínas totais. Os extratos foram quantificados e armazenados em alíquotas a -70°C.

4. Quantificação dos Extratos Protéicos

Os extratos protéicos foram quantificados segundo o método de Bradford (Bradford, 1976). Este consiste em uma quantificação espectrofotométrica que se baseia na reação colorimétrica entre uma solução de proteína de concentração conhecida [solução de albumina sérica bovina - BSA (1 μ g/ μ L)] e a solução de Bradford (0,01% Coomassie Brilliant G-250, 4,75 % Etanol P.A. e 8,5 % Ácido Fosfórico P.A.), cuja cor é alterada pela sua reação com as proteínas a serem dosadas.

Para a construção da curva padrão, foram medidas as densidades óticas de várias concentrações de BSA acrescidos do reagente de Bradford. A reação foi completada com água deionizada, sendo o volume final de água mais BSA constante. Cada amostra a ser dosada também teve o volume da sua reação com Bradford completado com água, na mesma proporção da curva.

Os pontos e as absorvâncias correspondentes a cada ponto foram plotados em um gráfico de dispersão, sendo a abscissa correspondente a

absorvância e a ordenada sendo correspondente à concentração de proteína. A equação da reta foi determinada e utilizada para calcular a concentração de proteínas das amostras.

5. Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE

Para a verificação da qualidade dos extratos protéicos e de sua quantificação, 10µg de cada extrato em tampão de amostra (100 mM Tris-HCl, 200mM DTT, 4% SDS, 20% Glicerol, 0,2% Azul de Bromofenol) foram submetidos à eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10%, em tampão de corrida Tris-Glicina (250 mM Tris-base, 192 mM Glicina e 0,1%(w/v) SDS) a 30 mA. Os géis foram corados com Coomassie Blue R-250 (0,1% Coomassie Blue R-250, 30% Etanol e 0,5% Ácido Acético) durante a noite, descorados por 15 minutos em solução descorante (25% Metanol e 5% Ácido Acético) e secos em solução de secagem (30% Metanol e 3% Glicerol) por 15 minutos.

6. Análise Proteômica

O gel bidimensional foi realizado em duas fases: a primeira consiste na separação das proteínas por ponto isoelétrico – isoeletrofocalização (IEF), e a segunda fase consiste na separação dessas proteínas por peso molecular (PM).

6.1. Precipitação de Proteína

Para as análises 2-D, as quantidades de 0,7mg e 1,0mg de cada extrato foram precipitados com o kit 2-D Clean up (GE), conforme especificações do fabricante. Os precipitados foram secos em temperatura ambiente por 5 minutos e imediatamente ressuspensos em 200µL de tampão de rehidratação pH 3-10 (8 M Uréia, 2% w/v NP-400, 0,28% w/v DTT, 2% v/v IPG Buffer (3-10) e 0,002% w/v Azul de Bromofenol 1%).

6.2. Rehidratação

A rehidratação se deu no sistema IPGphor III (GE), sob voltagem de 40 V por 14 horas. Foram utilizadas tiras de gradientes de pH imobilizados (Hanash *et al.*, 2000) de pH 4 a 7 com 11 cm (GE).

6.3. Isoeletrofocalização (1-D)

A IEF foi realizada em tiras de gel de acrilamida com gradiente de pH imobilizado (IPG), permitindo a produção de géis com alto índice de definição do pH.

Após a rehidratação, as tiras foram submetidas a IEF. As amostras focalizadas foram submetidas ao programa com total de 34636 V/h.

6.4. Separação por peso molecular (2-D)

As tiras de pH (IPG) foram submetidas a uma eletroforese em SDS-PAGE. Para isso, elas foram equilibradas, isto é, saturadas com tampão SDS requerido para a segunda dimensão. A solução de equilíbrio continha uréia (aumenta a viscosidade do tampão juntamente com o glicerol, facilitando a transferência das proteínas das tiras IPG para o gel SDS-PAGE), glicerol (idem uréia), redutor (DTT) (agente redutor que quebra as ligações dissulfeto presentes nas proteínas), SDS (agente desnaturante e conferidor de carga negativa às proteínas), iodoacetamida (agente alquilante, impede a reoxidação dos grupos thiol), corante (responsável pelo monitoramento da corrida no gel 2D), além do Tris-HCl (mantém a faixa de pH imobilizado das tiras). A carga elétrica das proteínas na amostra não é considerada na segunda dimensão pela presença do SDS (duodecil sulfato de sódio). Ele é um detergente aniônico que confere carga negativa às proteínas.

As tiras IPG foram equilibradas em duas fases em solução de equilíbrio por 15 minutos (1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 6 M Uréia, 30% Glicerol, 2% w/v SDS, 0,002% Azul de Bromofenol 1% w/v). Na primeira fase foi adicionado DTT (10 mg/mL) à solução de equilíbrio e na segunda fase foi adicionada à solução de equilíbrio iodoacetamida (25 mg/mL). As tiras foram submetidas, posteriormente, a eletroforese em gel SDS-PAGE 8 a 18% (GE). As proteínas separadas na primeira dimensão (por unidade de pH) foram, nesta etapa, separadas por peso molecular.

O sistema utilizado foi o Multiphor II por 1:50 hora e 10 μ L de padrão de peso molecular Bench Mark protein ladder (Invitrogen).

Os géis 2-D foram corados com Coomassie Blue coloidal [2% (w/v) Coomassie G-250] por 72 horas e descorados com água destilada.

6.5. Análise dos Padrões Proteômicos

Após a eletroforese bidimensional, os géis foram digitalizados no scanner Image Scanner (GE), utilizando-se o programa LabScan. Pelo programa Image Master 2-D Platinum (GE), eles foram analisados e visualmente comparados.

6.6. Processamento e preparação das amostras para análise por espectrometria de massas

Os spots foram retirados dos géis com o auxílio de um bisturi, sendo este embebido em metanol 100% entre a retirada de cada um, e colocados em tubos eppendorf siliconizados enumerados de acordo com a imagem do gel impressa. Os eppendorfs foram lavados com 400µL de solução 50% bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 50 mM pH 7,8 e 50% acetonitrila (ACN) 100%, agitados por 10 segundos, sonicados por 5 minutos; a solução foi descartada e mais 2 lavagens foram feitas para que as bandas ficassem descoradas. Para desidratar o gel, 200µL de acetonitrila 100 % foi adicionada em cada tubo eppendorf, ficando incubada por 10 minutos. Após a mudança de aspecto dos géis de transparente para branco, a solução de acetonitrila foi descartada e fragmentos de gel foram secos em no Speed Vac (Thermo Electron) por 10 minutos. As amostras ficaram guardadas no -20°C até a digestão enzimática. A digestão das proteínas foi feita por hidrólise trípica (enzima Seq. Grade Modified Trypsin - Promega). A tripsina (20 µg) foi diluída em 1 mL de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 25 mM pH 7,8, alíquotada em tubos de 100µL e guardada em nitrogênio líquido. Colocou-se em cada tubo, 4µL da solução de diluição da tripsina. Os tubos foram incubados em estufa de 37°C , durante a noite, para a extração de peptídeos.

Novos tubos foram enumerados de acordo com os tubos existentes. Os tubos foram centrifugados, seu conteúdo foi transferido para os tubos novos correspondentes. A extração dos peptídeos foi realizada duas vezes: somente nos eppendorfs com gel, foram aplicados 50µL de solução de extração (50% ACN e 5% TFA), os tubos foram sonicados por 5 minutos e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. O líquido foi novamente transferido para o tubo novo correspondente. As amostras foram concentradas no Speed Vac

(Thermo Electron) até o volume de, aproximadamente 10µL, sendo monitoradas para não secarem. As amostras foram guardadas no -70°C até a sua análise.

6.7. Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas é usada na identificação de proteínas pelos seus peptídeos constituintes. Acoplada a ela está a utilização de bancos de dados para a busca das proteínas. Os espectrômetros de massas constam de quatro partes básicas: um sistema de introdução da amostra para amostras cristalizadas ou líquidas; uma fonte de íon, através da qual, é produzido um feixe de partículas proveniente da amostra; um analisador que separa partículas de acordo com a massa e um detector, no qual os íons separados são recolhidos e caracterizados.

O espectrômetro MALDI-TOF-TOF, possui um analisador por tempo de voo, que se utiliza dos diferentes tempos levados, pelos íons gerados e acelerados, para chegarem a um eletrodo coletor. Os íons mais leves de alta velocidade chegam ao detector antes do que os íons mais pesados de baixa velocidade. O gráfico é um espectro, o qual consiste na relação da massa/carga dos peptídeos com o seu tempo de voo.

Para a análise no espectrômetro de massas MALDI-TOF-TOF 4700 (Applied Biosystems), 0,5 µL de cada amostra foi homogenizada em 0,5 µL de matrix α-ciano recristalizada (10 mg/mL em 50% ACN e 0,1 % TFA). As amostras foram aplicadas na placa do aparelho, juntamente com os calibrantes do kit Sequazyme™ Peptide Mass Standards (AP Biosciences). Os espectros obtidos foram analisados e as proteínas foram identificadas por bancos de dados.

6.8. Análise e identificação em Bancos de Dados

Os resultados de MS/MS foram identificados utilizando o programa MASCOT Daemon e o Banco de Dados Humano IPI (International Protein Index). No programa MASCOT Daemon, parâmetros foram escolhidos, como modificações variáveis - oxidação da metionina, modificações fixas - carbametilação da cisteína, e tolerância de 0,5 Da para MS/MS, considerando para identificação das proteínas um mínimo de 2 peptídeos.

6.8.1. Análise *in silico* das proteínas

As proteínas identificadas tiveram informações como domínios, localização celular, funções, entre outros, inferidas, dos seguintes bancos de dados: Swiss Protein, NCBI, Prosite Scan, InterPro, Motif Scan, PSORT e ELM. A metodologia está demonstrada no fluxograma abaixo (figura 5).

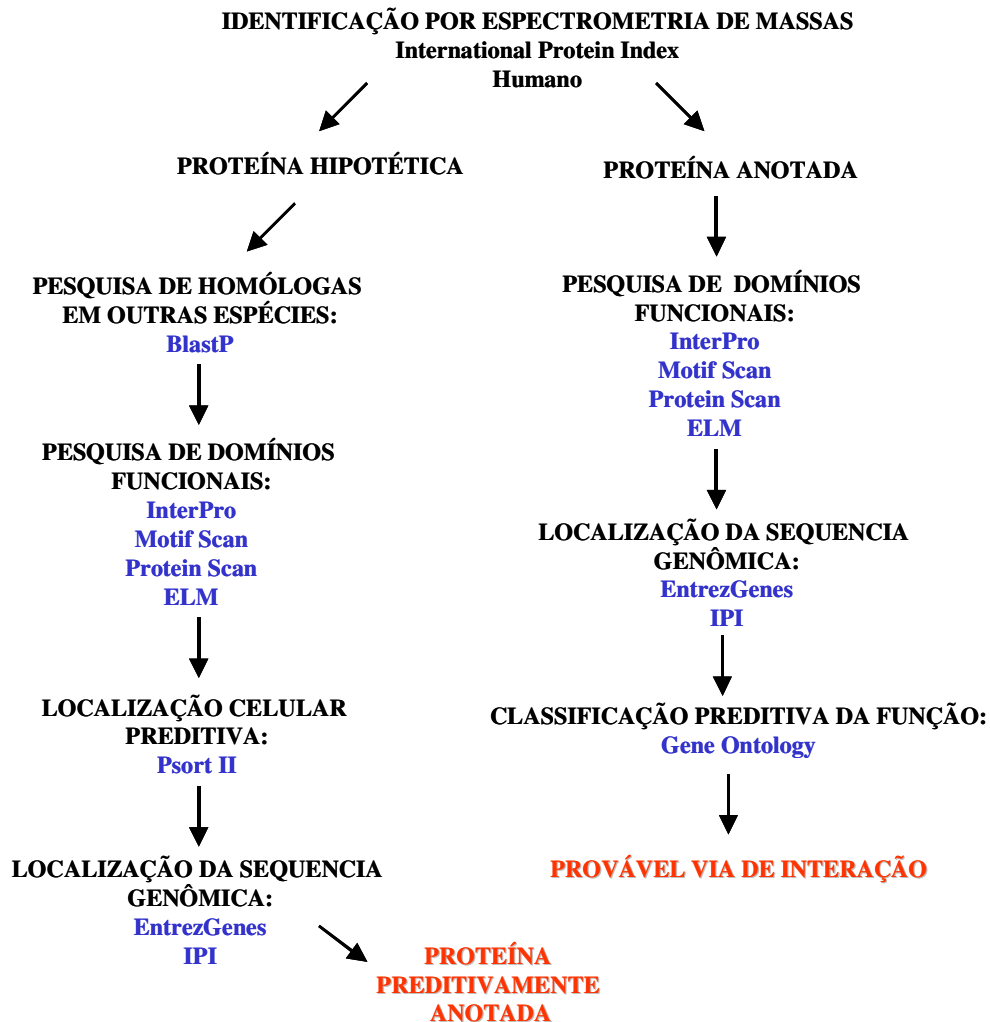


Figura 5: Fluxograma representativo da metodologia da análise *in silico*.

RESULTADOS

1. Análise do perfil protéico de células mononucleares (CMN) de medula óssea de pacientes diagnosticados com LMA

No período de agosto de 2005 a outubro de 2007 foram coletadas 58 amostras viáveis de medula óssea de pacientes com LMA com os mais diversos diagnósticos preliminares, além de amostras de medula óssea de 6 doadores saudáveis. As amostras recebidas são oriundas de diversas unidades hospitalares do Rio de Janeiro e de outros estados do Brasil, como Bahia e Pernambuco. Todas as amostras foram enviadas à Divisão de Laboratórios do CEMO para exames de imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular. Uma alíquota da amostra recebida era então utilizada para a análise proteômica.

De todas as amostras coletadas foram então separadas as células mononucleares e uma alíquota de plasma. Das células mononucleares foi obtido o extrato protéico total. Tanto os extratos quanto os plasmas foram quantificados, analisados quanto à sua integridade por gel SDS-PAGE unidimensional e armazenados à -70°C . As alíquotas de plasma foram reservadas para análise em momento oportuno.

Foram selecionadas 23 amostras para análise proteômica sendo o critério para seleção a quantidade de proteína total acima de 700 μg . As amostras selecionadas estão listadas na **tabela 4**.

Os pacientes cujas amostras foram utilizadas apresentavam os seguintes diagnósticos: Um paciente do subtipo M0, 13 do subtipo M1, apenas um do subtipo M2, três com diagnóstico M3, um paciente diagnosticado como M4, um apresentando subtipo M5 e M6 e duas LMAs secundárias.

Tabela 4: Amostras de pacientes com LMA selecionadas para proteoma.

Código	Data de coleta	PTN total (ug)	Diagnóstico
3	11/08/05	942	LMA M1
10	23/09/05	1008	LMA M3
11	23/09/05	1505	LMA M3
12	04/10/05	2385	LMA M1
14	23/11/05	822	LMA M4
17	28/11/05	1380	LMA M1
19	30/01/06	1650	LMA secundária
23	14/02/06	1300	LMA M1
27	21/03/06	3600	LMA-M3
28	21/03/06	2400	LMA M1
29	07/04/06	3000	LMA M5
32	11/05/06	7600	LMA M6
38	18/08/06	1008	LMA secundária
40	14/02/06	1140	LMA M1
45	16/10/06	2300	LMA M1
49	12/01/07	1020	LMA M0
50	28/02/07	1316	LMA M1
53	16/05/07	900	LMA M2
54	08/05/07	850	LMA M1
55	16/05/07	730	LMA M1
56	16/05/07	1500	LMA M1
57	09/10/07	800	LMA M1
58	24/10/07	840	LMA M1

As amostras selecionadas para proteoma foram purificadas e precipitadas para posterior separação bidimensional, gerando um perfil proteômico da LMA.

Ao analisar os perfis protéicos bidimensionais obtidos em uma mesma janela de análise, o das proteínas expressas na faixa de pH 4 a 7, foi possível observar que existe uma grande semelhança entre todos os pacientes de LMA analisados, independentemente do subtipo da doença. Como pode ser evidenciado nas figuras 6 e 7 que mostram os perfis obtidos de uma LMA secundária (**Figura 6**) e de uma LMA M4 (**Figura 7**).

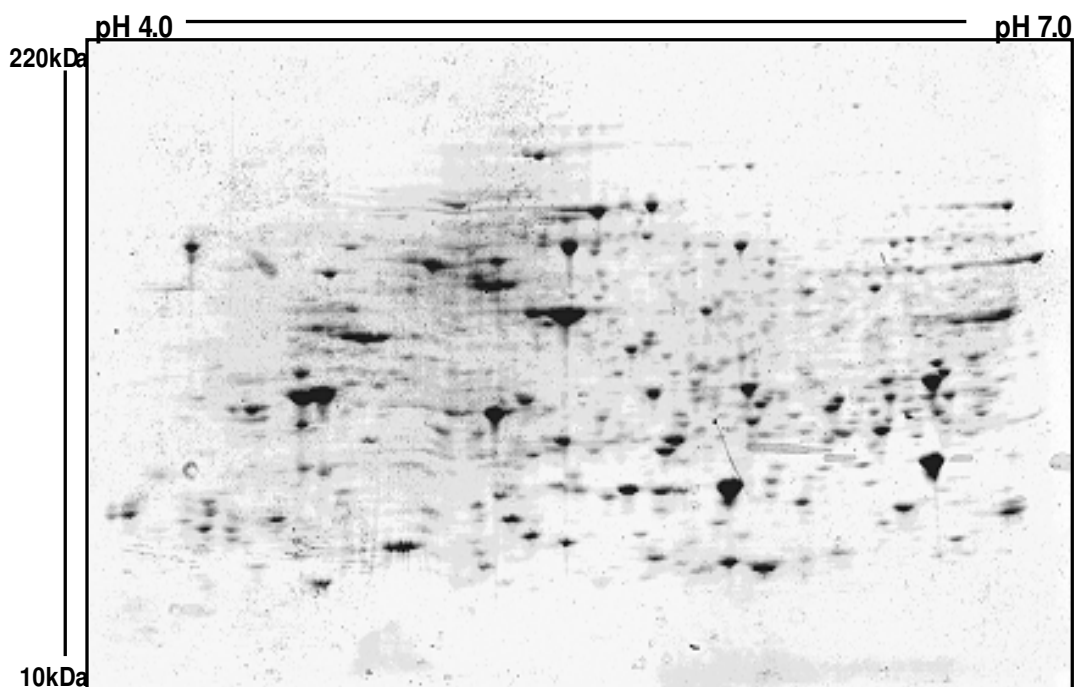


Figura 6: Gel Bidimensional (pH 4-7) de análise do extrato protéico total das células mononucleares da medula óssea do paciente 19, corado com coomassie Blue coloidal e digitalizado no software Image Master 2D Platinum.

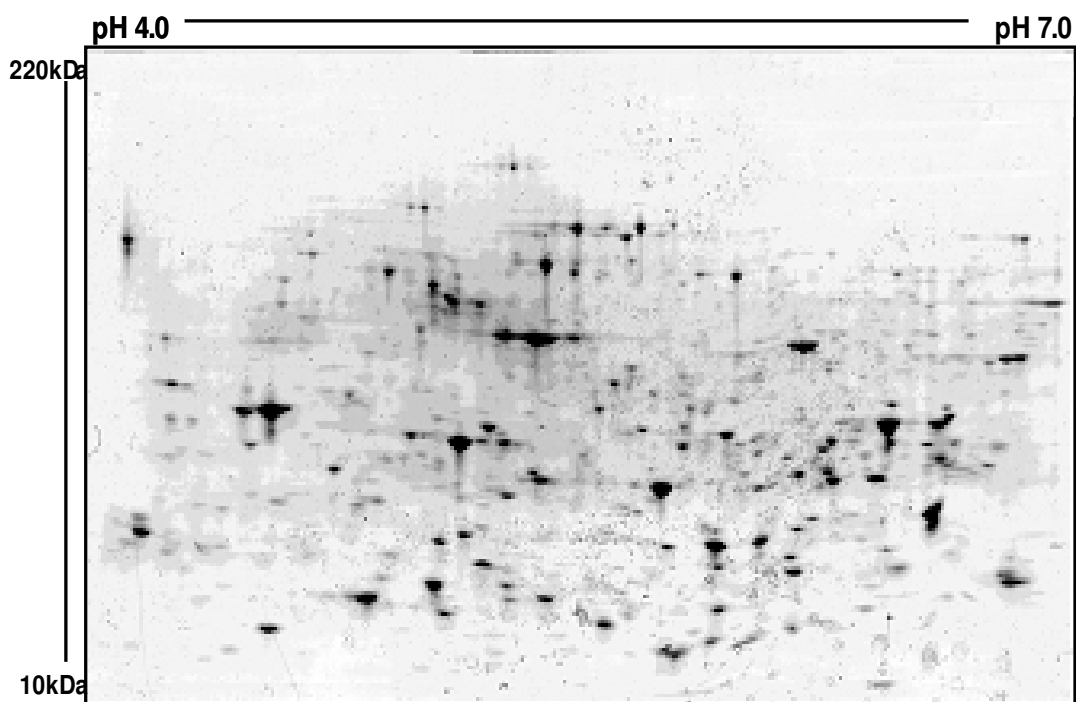


Figura 7: Gel Bidimensional (pH 4-7) de análise do extrato protéico total das células mononucleares da medula óssea do paciente 14, corado com coomassie Blue coloidal e digitalizado no software Image Master 2D Platinum.

Todos os spots visualizados (aproximadamente 200 spots em cada gel) foram retirados dos géis e digeridos por tripsina pelo método InGel Digest para identificação por espectrometria de massas. Os peptídeos foram analisados utilizando o MALDI-TOF-TOF e os espectros gerados foram lançados no programa MASCOT consultando o banco de dados Humano IPI. Com a análise das 23 amostras foi possível obter a identificação confiável de 1823 spots, correspondendo a 247 proteínas diferentes, que podem ser visualizadas na **tabela 5**.

A partir das proteínas identificadas foi feita uma pesquisa em busca da função das proteínas encontradas, o que foi possível devido a consulta de bancos de dados de ontologia de genes e produtos de genes, como por exemplo, o EBI Database IPI human. Ao visualizar a tabela 5 podemos observar proteínas diversas com funções diferentes. A quantificação de proteínas que exercem determinados tipos de função celular foram agrupadas e podem ser vistas na **figura 8**.

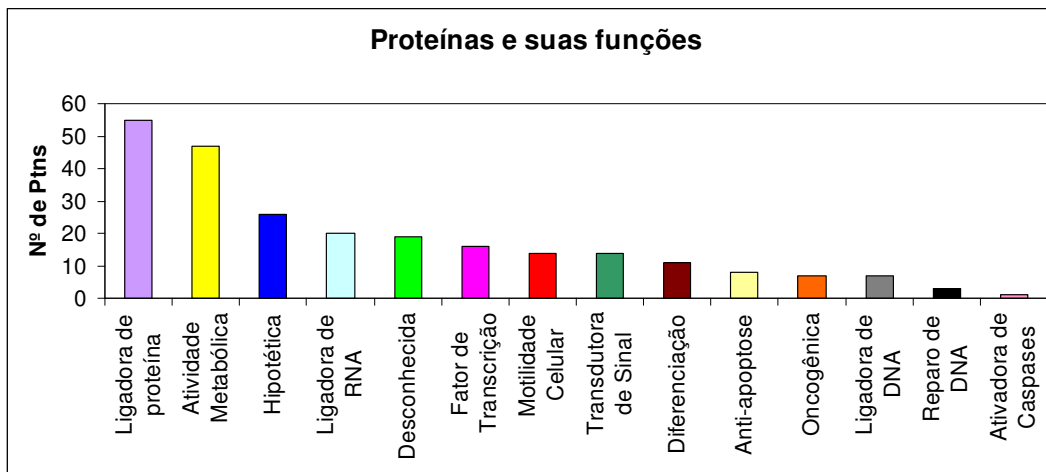


Figura 8: Distribuição do número de proteínas agrupadas por função em Células Mononucleares de Medula Óssea de pacientes com LMA.

Tabela 5: Proteínas identificadas em Células Mononucleares de Medula Óssea de pacientes com LMA

ACESSO	MASSA	SCORE	DESCRIÇÃO	FUNÇÃO
IPI00645470	1477	26	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase	atividade metabólica
IPI00442350	1548	24	TIFA-related protein TIFAB	transdutora de sinal
IPI00644358	1676	24	2 kDa protein	desconhecida
IPI00409748	1864	28	ASRGL1 ASRGL1 protein	atividade metabólica
IPI00796325	1894	27	ECE2 2 kDa protein	atividade metabólica
IPI00396017	2134	25	ACACA Acetyl-CoA carboxylase 1 (Fragment)	atividade metabólica
IPI00791369	2198	24	ANAPC5 2 kDa protein	diferenciação
IPI00791661	2397	25	FLJ32214 protein	protein binding
IPI00383946	2495	24	Tumor susceptibility protein isoform 3	oncogênica
IPI00747509	2589	28	3 kDa protein	desconhecida
IPI00816094	2641	25	NF2 NF2 protein (Fragment)	motilidade celular
IPI00788025	2726	28	LOC652748 similar to mitogen-activated protein kinase kinase 3 isoform C	atividade metabólica
IPI00457302	2948	40	AdAptor-relAteD protein complex 3, sigmaA 1 subunit isoform 2	protein binding
IPI00643822	3579	22	Indolethylamine N-Methyltransferase	Atividade metabólica
IPI00168711	3717	24	MGC24103 protein	hipotética
IPI00296797	3898	25	Hypothetical protein	hipotética
IPI00644577	4151	21	C6orf157 protein	protein binding
IPI00095312	4354	23	4 kDa protein	desconhecida
IPI00003172	4463	21	SOX-29 protein	fator de transcrição
IPI00646580	4519	35	5 kDa protein	Protein binding
IPI00797351	4730	42	PPP1R12A 5 kDa protein	transdutora de sinal
IPI00829819	4900	40	Isoform 2 of Uncharacterized protein	desconhecida
IPI00853479	4903	40	FES 5 kDa protein	diferenciação
IPI00031610	5129	21	PRKCH protein	diferenciação
IPI00031112	5395	20	Hypothetical protein CATX-2	hipotética
IPI00792137	5425	47	SNRPN 5 kDa protein	RNA binding
IPI00643968	5558	25	Solute carrier family 35, member E2	protein binding
IPI00788690	5623	46	Hypothetical short protein	hipotética
IPI00032259	6242	34	MAN2A2 PRO2198	atividade metabólica
IPI00514719	6341	39	Conserved hypothetical protein	hipotética
IPI00798107	6742	40	MLXIP 7 kDa protein	fator de transcrição
IPI00384773	7041	36	Hypothetical drug-resistance-associated protein	hipotética
IPI00792036	7447	43	MLH1 HMLH1 protein	protein binding
IPI00554530	7532	36	HypotHetical protein LOC285989 isoform 2	hipotética
IPI00786959	8155	39	LOC732425 similar to Breakpoint cluster region protein	anti-apoptose
IPI00645279	8224	24	OTTHUMP00000016801	fator de transcrição
IPI00173647	9187	41	SPRR4 Small proline-rich protein 4	motilidade celular
IPI00642012	9858	55	10 kDa protein	Transdutora de sinal
IPI00478284	10126	42	TM9SF2 10 kDa protein	desconhecida
IPI00789961	10250	36	PPHLN1 10 kDa protein	protein binding
IPI00454596	10562	35	Splice Isoform 2 of Putative polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like protein	atividade metabólica
IPI00792954	10801	40	11 kDa protein	desconhecida
IPI00798183	10849	49	TPCN1 11 kDa protein	atividade metabólica
IPI00175403	10980	35	PREDICTED: hypothetical protein XP_211092	hipotética

IPI00058504	11145	37	11 kDa protein	desconhecida
IPI00398395	11568	35	PREDICTED: hypothetical protein XP_373553	hipotética
IPI00003734	11673	34	Putative S100 calcium-binding protein H_NH0456N16.1	hipotética
IPI00410387	11982	41	Endosulfine-alpha variant 4	protein binding
IPI00006988	12096	40	RETN Resistin precursor	transdutora de sinal
IPI00645447	12376	50	12 kDa protein	desconhecida
IPI00396980	12436	35	LOC390876 similar to 60S ribosomal protein L35	RNA binding
IPI00789999	12642	74	DCTN2 13 kDa protein	motilidade celular
IPI00025318	12766	244	SH3BGRL SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	protein binding
IPI00607779	13217	33	Vanin 3, isoform 3	motilidade celular
IPI00027462	13291	77	S100A9 Protein S100-A9	transdutora de sinal
IPI00514370	13950	40	14 kDa protein	atividade metabólica
IPI00017964	14021	146	SNRPD3 Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	protein binding
IPI00401353	14174	32	Hypothetical protein LOC283152	hipotética
IPI00646689	14217	88	TXNL5 Thioredoxin-like protein 5	atividade metabólica
IPI00377102	15040	32	Granulysin isoform 519	diferenciação
IPI00216691	15216	162	PFN1 Profilin-1	motilidade celular
IPI00738128	15865	47	LOC647082 similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	RNA binding
IPI00456440	15887	33	PREDICTED: hypothetical protein XP_498862	hipotética
IPI00411983	16008	52	BLOC1S2 Isoform 1 of Biogenesis of lysosome-related organelles complex-1 subunit 2	protein binding
IPI00847774	16009	47	RPL18A Ribosomal protein L18a-like protein	protein binding
IPI00457045	16166	31	Tumor protein D52-like 1, isoform 3	oncogênica
IPI00218733	16340	130	SOD1 16 kDa protein	atividade metabólica
IPI00428714	16350	33	LP4947	DNA binding
IPI00745927	16354	36	LOC401442 hypothetical protein	hipotética
IPI00654566	16424	36	PTCH1 PTCH protein +12b	oncogênica
IPI00385870	16536	32	Hypothetical protein FLJ33773	hipotética
IPI00028723	16562	34	Splice Isoform 2 of Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1-like	oncogênica
IPI00028414	16961	49	GMF-GAMMA MGC126867	diferenciação
IPI00375687	16980	34	MRPL47 mitochondrial ribosomal protein L47 isoform b	RNA binding
IPI00019038	16982	121	LYZ Lysozyme C precursor	atividade metabólica
IPI00003949	17184	47	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	Reparo de DNA
IPI00219306	17210	43	Mago nashi protein homolog	protein binding
IPI00514666	17282	40	SETDB1 17 kDa protein	DNA binding
IPI00479997	17292	194	STMN1 Stathmin	transdutora de sinal
IPI00012048	17309	98	NME1 Nucleoside diphosphate kinase A	atividade metabólica
IPI00026260	17401	73	NME2;NME1 Nucleoside diphosphate kinase B	atividade metabólica
IPI00646362	17420	37	RABEPK Rab9 effector protein with kelch motifs	atividade metabólica
IPI00167963	18191	35	Hypothetical protein FLJ35576	hipotética
IPI00419585	18229	360	PPIA;PPIAL3;LOC654188 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	atividade metabólica
IPI00478390	18280	30	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoform 4	anti-apoptose
IPI00012011	18719	210	CFL1 Cofilin-1	transdutora de sinal
IPI00643187	19301	39	Novel protein	desconhecida
IPI00298547	20050	73	PARK7 Protein DJ-1	transdutora de sinal
IPI00018600	20155	36	OPA3 Optic atrophy 3 protein	transdutora de sinal
IPI00032879	20220	31	Adenylate kinase isoenzyme 6	atividade metabólica
IPI00376005	20442	92	EIF5A Isoform 2 of Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	fator de transcrição

IPI00102821	21023	116	MGC29506 hypothetical protein LOC51237	hipotética
IPI00395432	21587	44	Isoform 3 of VAV-like protein	transdutora de sinal
IPI00792599	21834	56	ATP6V1G2 HLA-B associated transcript 1	RNA binding
IPI00478011	21947	36	22 kDa protein	desconhecida
IPI00335132	22223	43	22 kDa protein	desconhecida
IPI00293975	22369	44	GPX1 glutathione peroxidase 1 isoform 1	atividade metabólica
IPI00011315	22490	37	FLJ00096 protein	desconhecida
IPI00025512	22826	156	HSPB1 Heat shock protein beta-1	anti-apoptose
IPI00024993	22826	188	ECHS1 Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor	atividade metabólica
IPI00003817	23031	72	ARHGDIB Rho GDP-dissociation inhibitor 2	transdutora de sinal
IPI00003815	23250	65	ARHGDIA Rho GDP-dissociation inhibitor 1	transdutora de sinal
IPI00219757	23569	121	GSTP1 Glutathione S-transferase P	atividade metabólica
IPI00383751	24338	69	CALRETICULIN=CALCIUM binding protein (Fragment)	protein binding
IPI00296913	24597	52	ADP-sugar pyrophosphatase	atividade metabólica
IPI00793322	24758	70	DUT 24 kDa protein	atividade metabólica
IPI00328892	24955	40	LOC388282 Hypothetical protein	hipotética
IPI00220301	25002	51	Peroxiredoxin 6	atividade metabólica
IPI00419258	25049	53	HMGB1 High mobility group protein B1	fator de transcrição
IPI00018352	25151	94	UCHL1 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	diferenciação
IPI00232898	25251	44	RAB41 RAB41, member RAS homolog family	oncogênica
IPI00643438	25763	41	Retinoid X receptor, beta	fator de transcrição
IPI00794755	25868	50	SLC9A3R1 26 kDa protein	protein binding
IPI00291922	26565	70	Proteasome subunit alpha type 5	diferenciação
IPI00215901	26689	146	AK2 Isoform 1 of Adenylate kinase isoenzyme 2, mitochondrial	protein binding
IPI00022246	27325	45	AZU1 Azurocidin precursor	anti-apoptose
IPI00642042	27386	104	Hypothetical protein DKFZp686J1372	hipotética
IPI00451401	27451	147	TPI1 Isoform 2 of Triosephosphate isomerase	atividade metabólica
IPI00328840	27541	46	THOC4 THO complex subunit 4	RNA binding
IPI00029997	27815	107	PGLS 6-phosphogluconolactonase	atividade metabólica
IPI00021263	27899	132	YWHAZ 14-3-3 protein zeta/delta	Fator de transcrição
IPI00024919	28017	64	RDX3 Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial precursor	atividade metabólica
IPI00027409	28245	35	PRTN3 Myeloblastin precursor	protein binding
IPI00386854	28451	285	HNRPA2B1 HNRPA2B1 protein	RNA binding
IPI00010779	28619	48	TPM4 Isoform 1 of Tropomyosin alpha-4 chain	motilidade celular
IPI00007339	28655	32	HMG20B PP7706	fator de transcrição
IPI00470442	28757	40	Early B-cell factor 2	DNA binding
IPI00030154	28876	37	PSME1 Proteasome activator complex subunit 1	diferenciação
IPI00007423	28941	50	ANP32B Isoform 1 of Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	protein binding
IPI00453476	29003	55	hCG_2015269 similar to Phosphoglycerate mutase 1 (Phosphoglycerate mutase isozyme B) (PGAM-B) (BPG-dependent PGAM 1) isoform 1	atividade metabólica
IPI00024911	29032	151	Endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor	atividade metabólica
IPI00178083	29346	112	TPM3 29 kDa protein	motilidade celular
IPI00374686	29372	45	29 kDa protein	desconhecida
IPI00654567	29500	41	Lipj Protein	Atividade metabólica
IPI00220740	29617	145	NPM1 Isoform 2 of Nucleophosmin	transdutora de sinal
IPI00418823	29796	33	Similar to Lactate dehydrogenase-C1	atividade metabólica
IPI00017334	29843	141	PHB Prohibitin	fator de transcrição
IPI00000760	29911	231	DDAH2 NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	anti-apoptose
IPI00221366	30295	38	SLC2A4RG Isoform 2 of SLC2A4 regulator	fator de transcrição

IPI00018134	31114	37	Hypothetical protein FLJ10357	hipotética
IPI00796307	31357	31	LOC254559 hypothetical protein	hipotética
IPI00167233	31559	46	LOC146177 CDNA FLJ40941 fis, clone UTERU2008426	RNA binding
IPI00418240	31575	46	NEBL LIM-nebulette	protein binding
IPI00026185	31616	46	Splice Isoform 1 of F-actin capping protein beta subunit	protein binding
IPI00014230	31742	48	C1QBP Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial precursor	protein binding
IPI00478539	32532	141	LOC645691 similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	RNA binding
IPI00448796	33307	46	TTC25 Isoform 2 of Tetratricopeptide repeat protein 25	protein binding
IPI00555788	33598	40	GDPD1 Isoform 3 of Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain-containing protein 1	atividade metabólica
IPI00042578	34341	80	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 isoform a; nuclear ribonucleoprot	RNA binding
IPI00640296	34354	51	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	RNA binding
IPI00477527	35541	40	SLC25A44 Solute carrier family 25 member 44	protein binding
IPI00013860	35705	86	HIBADH 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial precursor	atividade metabólica
IPI00853508	35706	42	FAM62C 35 kDa protein	desconhecida
IPI00219018	36201	99	GAPDH Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	atividade metabólica
IPI00171173	36541	41	Sperm 1 POU-domain transcription factor	fator de transcrição
IPI00419932	36749	42	RAB12	Tansdutora de sinal
IPI00220271	36761	38	Alcohol dehydrogenase	protein binding
IPI00793605	36851	148	CALR 37 kDa protein	DNA binding
IPI00647239	37057	52	C10orf47 Isoform 2 of Uncharacterized protein C10orf47	desconhecida
IPI00028888	38581	43	HNRPD Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	RNA binding
IPI00848090	38760	91	CAPG gelsolin-like capping protein	protein binding
IPI00027341	38779	49	CAPG Macrophage-capping protein	protein binding
IPI00215965	38936	168	HNRPA1 Isoform A1-B of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	RNA binding
IPI00003527	39130	93	SLC9A3R1 Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50	protein binding
IPI00465439	39851	35	ALDOA Fructose-bisphosphate aldolase A	diferenciação
IPI00332091	39872	40	RPP40 Ribonuclease P 40kDa subunit	protein binding
IPI00332091	39872	40	RPP40 Ribonuclease P 40kDa subunit	protein binding
IPI00295363	40081	36	OTC Ornithine carbamoyltransferase, mitochondrial precursor	atividade metabólica
IPI00003704	40688	41	RBM4 Isoform 1 of RNA-binding protein 4	RNA binding
IPI00004657	40777	58	MICA;HLA-A;HLA-A29.1;LOC730410;HLA-B;HLA-C HLA class I histocompatibility antigen, B-7 alpha chain precursor	protein binding
IPI00296441	41024	110	ADA Adenosine deaminase	atividade metabólica
IPI00478172	41567	41	40 kDa protein	Transdutora de sinal
IPI00021439	42052	248	ACTB Actin, cytoplasmic 1	motilidade celular
IPI00003269	42318	157	DKFZp686D0972 hypothetical protein LOC345651	hipotética
IPI00027444	42829	410	SERPINB1 Leukocyte elastase inhibitor	protein binding
IPI00055753	44203	30	Methionyl-tRNA formyltransferase, mitochondrial precursor	atividade metabólica
IPI00220503	44906	37	DCTN2 dyactin 2	motilidade celular
IPI00169383	44985	104	PGK1 Phosphoglycerate kinase 1	atividade metabólica
IPI00011229	45037	185	CTSD Cathepsin D precursor	atividade metabólica
IPI00003881	45985	182	HNRPF Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	RNA binding
IPI00303882	47189	68	M6PRBP1 Isoform B of Mannose-6-phosphate receptor-binding protein 1	protein binding
IPI00303423	47476	39	METTL8 Methyltransferase type 12 domain containing protein	atividade metabólica
IPI00465248	47481	155	ENO1 Isoform alpha-enolase of Alpha-enolase	fator de transcrição

IPI00216171	47581	84	ENO2 Gamma-enolase	atividade metabólica
IPI00412670	49435	46	C2orf56 hypothetical protein LOC55471 isoform 1	hipotética
IPI00018398	49458	35	PSMC3 26S protease regulatory subunit 6A	protein binding
IPI00013881	49484	137	HNRPH1 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	RNA binding
IPI00644431	49611	56	DDX39 ATP-dependent RNA helicase DDX39	RNA binding
IPI00166247	49612	30	Splice Isoform 1 of Zinc finger protein 620	fator de transcrição
IPI00011654	50095	72	Tubulin beta-2 chain	motilidade celular
IPI00011735	51035	37	Interferon-related developmental regulator 1	diferenciação
IPI00020632	51184	37	ASS1 Argininosuccinate synthase	atividade metabólica
IPI00432577	52025	38	ZNF227 Zinc finger protein 14 (Fragment)	DNA binding
IPI00418471	53676	200	VIM Vimentin	motilidade celular
IPI00385859	55204	33	Hypothetical protein FLJ10866	hipotética
IPI00657680	55328	125	PDIA3 55 kDa protein	protein binding
IPI00178315	56502	40	ADCK4 Isoform 2 of Uncharacterized aarF domain-containing protein kinase 4	fator de transcrição
IPI00298497	56577	64	FGB Fibrinogen beta chain precursor	protein binding
IPI00025252	57146	479	PDIA3 Protein disulfide-isomerase A3 precursor	protein binding
IPI00010796	57480	329	Protein disulfide-isomerase precursor	protein binding
IPI00009505	58369	40	SNTB2 Isoform 1 of Beta-2-syntrophin	motilidade celular
IPI00657770	59119	39	ACF Isoform 6 of APOBEC1 complementation factor	protein binding
IPI00071180	59183	78	UBQLN1 Isoform 2 of Ubiquilin-1	Reparo de DNA
IPI00007074	59448	34	YARS Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	transdutora de sinal
IPI00440493	59828	53	ATP5A1 ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	atividade metabólica
IPI00465436	59947	34	CAT Catalase	atividade metabólica
IPI00472102	61346	190	HSPD1 61 kDa protein	protein binding
IPI00013894	63227	44	STIP1 Stress-induced-phosphoprotein 1	fator de transcrição
IPI00024502	63869	55	UBQLN4 Ubiquilin-4	Reparo de DNA
IPI00152875	64319	44	ZNF384 Isoform 1 of Zinc finger protein 384	DNA binding
IPI00300242	64443	38	Isoform 2 of Uncharacterized protein	desconhecida
IPI00009755	65175	35	METTL3 Isoform 1 of N6-adenosine-methyltransferase 70 kDa subunit	atividade metabólica
IPI00444262	65979	333	NCL CDNA FLJ45706 fis, clone FEBRA2028457, highly similar to Nucleolin	RNA binding
IPI00375441	67690	80	FUBP1 Isoform 1 of Far upstream element-binding protein 1	protein binding
IPI00554756	68122	43	BLK Hypothetical protein (Fragment)	hipotética
IPI00550587	68211	51	CEP290 68 kDa protein	fator de transcrição
IPI00480076	68299	31	RUNDC1 protein	oncogênica
IPI00018140	69788	40	SYNCRIP Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	RNA binding
IPI00645606	70346	47	AH1 Isoform 3 of Jouberin	diferenciação
IPI00816204	70737	50	KIAA1683 KIAA1683 protein	protein binding
IPI00477225	70904	38	T-plastin	protein binding
IPI00003865	71082	102	HSPA8 Isoform 1 of Heat shock cognate 71 kDa protein	protein binding
IPI00783641	72077	40	TXNRD1 thioredoxin reductase 1 isoform 3	atividade metabólica
IPI00003362	72492	150	HSPA5 HSPA5 protein	protein binding
IPI00007765	73920	179	HSPA9 Stress-70 protein, mitochondrial precursor	anti-apoptose
IPI00413614	74834	34	SYMPK Isoform 2 of Symplekin	protein binding
IPI00002459	75571	101	ANXA6 annexin VI isoform 2	protein binding

IPI00010740	76216	40	SFPQ Isoform Long of Splicing factor, proline- and glutamine-rich	RNA binding
IPI00641047	78712	98	GSN Gelsolin	protein binding
IPI00007244	84784	127	MPO Isoform H17 of Myeloperoxidase precursor	anti-apoptose
IPI00420071	86680	54	MAP6 microtubule-associated protein 6 isoform 1	motilidade celular
IPI00022774	89819	53	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	ativar caspases
IPI00472386	93805	41	93 kDa protein	atividade metabólica
IPI00302693	94485	45	ZNF226 Zinc finger protein 226	DNA binding
IPI00382979	95610	36	Splice Isoform 2 of WD-repeat protein 22	oncogênica
IPI00186290	96246	59	EEF2 Elongation factor 2	protein binding
IPI00140420	102618	136	TDRD11	fator de transcrição
IPI00435211	102993	42	CNKSR2 Isoform 3 of Connector enhancer of kinase suppressor of ras 2	transdutora de sinal
IPI00646886	107941	43	MOV10 Mov10, Moloney leukemia virus 10, homolog	protein binding
IPI00748184	117126	38	PIP5K3 CDNA FLJ45870 fis, clone OCBBF3005330, highly similar to FYVE finger- containing phosphoinositide kinase (Fragment)	protein binding
IPI00479743	122882	54	ANKRD26-like family C member 1A	protein binding
IPI00739539	122946	43	LOC728378 POTE-2 alpha-actin	protein binding
IPI00030099	152828	36	ADCY9 Adenylate cyclase type 9	atividade metabólica
IPI00024467	175235	47	UGCGL2 UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 2 precursor	atividade metabólica
IPI00657881	179196	43	LOC339766 177 kDa protein	protein binding
IPI00019502	227646	125	MYH9 Myosin-9	motilidade celular
IPI00302592	282581	206	Filamin A, alpha	protein binding

2. Identificação de biomarcadores protéicos de LMA pela análise comparativa entre o perfil protéico de CMN de Medula Óssea de pacientes e o perfil obtido de CMN de Medula Óssea de doadores saudáveis

De modo a identificar as proteínas que estão relacionadas ao estado patológico da LMA nós analisamos o perfil proteômico de células mononucleares de medula óssea de indivíduos saudáveis doadores para transplante de medula óssea e comparamos os dois perfis.

O perfil proteômico de doadores saudáveis foi feito a partir de um pool de 6 doadores normais (**figura 9**). Na análise bidimensional observamos a mesma janela de análise dos pacientes com LMA, de pH 4 a 7.

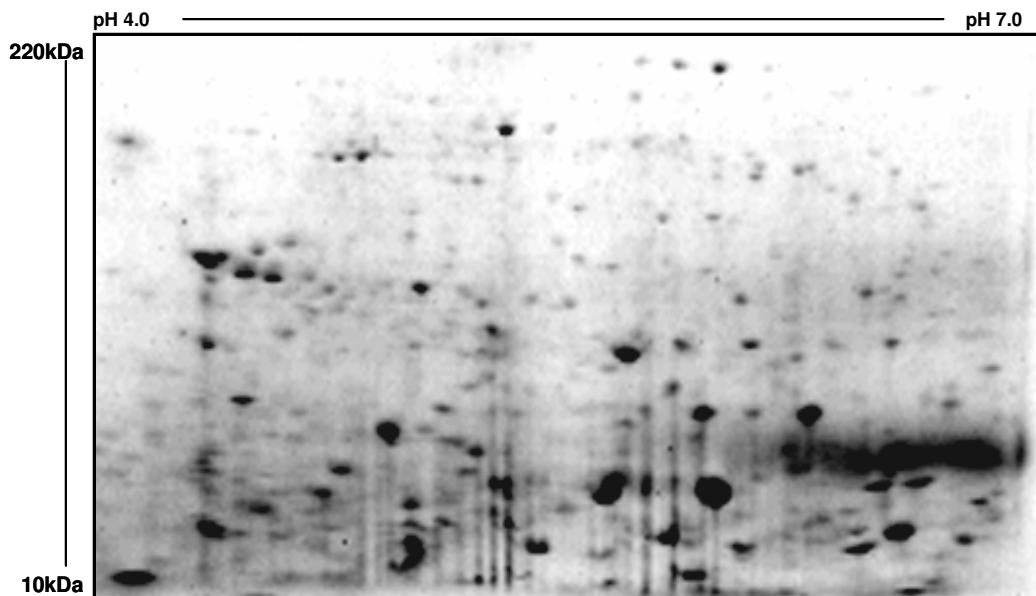


Figura 9: Gel Bidimensional (pH 4-7) de análise do extrato protéico das células mononucleares da medula óssea do pool de doadores saudáveis, corado com Coomassie Blue coloidal e digitalizado no software Image Master 2D Platinum.

Assim como nos géis 2D das amostras de pacientes, todos os spots visualizados foram retirados e digeridos por tripsina pelo método InGel Digest para identificação por espectrometria de massas, utilizando o MALDI-TOF-TOF e consultando o banco de dados IPI human database. Foram identificadas 189 proteínas visualizadas em doadores saudáveis sendo 115 idênticas as já descritas em Pizzatti et al. (2006) e 74 novas.

Com estes dados, o perfil protéico de CMN de Medula Óssea de pacientes com LMA foi comparado ao perfil protéico de CMN de doadores saudáveis. Foram identificadas 61 proteínas que estão presentes no perfil protéico de LMA e ausentes nos doadores saudáveis listadas na **tabela 6**.

É importante ressaltar que estas proteínas correspondem a diferenças qualitativas encontradas, mas que diferenças quantitativas foram freqüentes e deverão ser posteriormente avaliadas.

Tabela 6: Proteínas encontradas somente nos pacientes com LMA e não detectáveis em doadores saudáveis

DESCRIÇÃO	ACESSO
RUNDC1 protein	IPI00480076
Lipj Protein	IPI00643822
Putative S100 calcium-binding protein H_NH0456N16.1	IPI00003734
5 kDa protein	IPI00646580
Indolethylamine N-Methyltransferase	IPI00654567
ASRGL1 ASRGL1 protein	IPI00409748
STMN1 Stathmin	IPI00479997
40 kDa protein	IPI00478172
Splice Isoform 2 of WD-repeat protein 22	IPI00382979
hCG_2015269 similar to Phosphoglycerate mutase 1 (Phosphoglycerate mutase isozyme B) (PGAM-B) (BPG-dependent PGAM 1) isoform 1	IPI00453476
SOD1 16 kDa protein	IPI00218733
NPM1 Isoform 2 of Nucleophosmin	IPI00220740
MPO Isoform H17 of Myeloperoxidase precursor	IPI00007244
PDIA3 55 kDa protein	IPI00657680
TDRD11	IPI00140420
YWHAZ 14-3-3 protein zeta/delta	IPI00021263
Granulysin isoform 519	IPI00377102
Hypothetical protein FLJ35576	IPI00167963
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	IPI00003949
Isoform 3 of VAV-like protein	IPI00395432
OTC Ornithine carbamoyltransferase, mitochondrial precursor	IPI00295363
RAB41 RAB41, member RAS homolog family	IPI00232898
SPRR4 Small proline-rich protein 4	IPI00173647
OPA3 Optic atrophy 3 protein	IPI00018600
MAN2A2 PRO2198	IPI00032259
LOC728378 POTE-2 alpha-actin	IPI00739539
Hypothetical protein LOC283152	IPI00401353
Hypothetical protein CATX-2	IPI00031112
OTTHUMP00000016801	IPI00645279
RAB12	IPI00419932
Sperm 1 POU-domain transcription factor	IPI00171173
SOX-29 protein	IPI00003172
PRKCH protein	IPI00031610
Mago nashi protein homolog	IPI00219306
Tumor protein D52-like 1, isoform 3	IPI00457045
Splice Isoform 2 of Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1-like	IPI00028723
SYMPK Isoform 2 of Symplekin	IPI00413614
FES 5 kDa protein	IPI00853479
PPP1R12A 5 kDa protein	IPI00797351
MLXIP 7 kDa protein	IPI00798107
MLH1 HMLH1 protein	IPI00792036
NEBL LIM-nebulette	IPI00418240
LOC732425 similar to Breakpoint cluster region protein	IPI00786959
Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoform 4	IPI00478390
AHI1 Isoform 3 of Joubertin	IPI00645606
YARS Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	IPI00007074

S100A9 Protein S100-A9	IPI00027462
GSN Gelsolin	IPI00641047
AZU1 Azurocidin precursor	IPI00022246
UBQLN4 Ubiquilin-4	IPI00024502
ANKRD26-like family C member 1A	IPI00479743
STIP1 Stress-induced-phosphoprotein 1	IPI00013894
PHB Prohibitin	IPI00017334
CAPG gelsolin-like capping protein	IPI00848090
HMG20B PP7706	IPI00007339
MAP6 microtubule-associated protein 6 isoform 1	IPI00420071
GMF-GAMMA MGC126867	IPI00028414
UBQLN1 Isoform 2 of Ubiquilin-1	IPI00071180
CAT Catalase	IPI00465436
MOV10 Mov10, Moloney leukemia virus 10, homolog	IPI00646886
RETN Resistin precursor	IPI00006988

Podemos observar nesta lista a presença de algumas proteínas conhecidamente alteradas nos processos leucemogênicos, como por exemplo, a Nucleofosmina e a Statmina conhecida também como oncoproteína 18. É importante ressaltar também a presença de três proteínas com função oncogênica que aparecem apenas na LMA e não são identificadas em doadores: a RUNDC1 que pode inibir p53 comprometendo o *check point* do ciclo celular levando a uma atividade oncogênica, a isoforma 2 da proteína 22 *WD repeat* que é também uma proteína envolvida com o ponto de checagem celular, além da isoforma 3 da proteína tumoral D52 envolvida na sinalização da proliferação celular e apoptose (Llanos et al., 2006; Boutros et al., 2004).

Das proteínas identificadas apenas em LMA pudemos observar 3 proteínas hipotéticas, para as quais se pode inferir uma suposta função após uma análise *in silico* consultando os seguintes sites: EBI Database IPI Human, PSORT II Server, InterProscan, MotifScan, Oncomine Databases. A partir desta análise é possível gerar uma série de informações como, localização celular e genômica e presença de determinados domínios, podendo servir como dado preliminar no auxílio da definição da função da proteína e o possível envolvimento das mesmas em processos neoplásicos (**Tabela 7**). Um bom exemplo seria a determinação da localização genômica, onde a definição do cromossomo onde a proteína se encontra pode levar a percepção se a mesma está ou não localizada numa região de alteração cromossômica recorrente na doença estudada. Por exemplo, a proteína hipotética LOC283152 que está

localizada no cromossomo 11. Este cromossomo apresenta alterações conhecidas na LMA, ligadas ao gene MLL na região 11q23, que podem conferir um prognóstico pior aos pacientes que a apresentam (Bernard & Berger, 1995).

Tabela 7: Análise *in silico* das proteínas hipotéticas encontradas na LMA e não identificáveis em doadores saudáveis.

ACESSO	DESCRIÇÃO	LOCALIZAÇÃO CELULAR	LOCALIZAÇÃO GENÔMICA	DOMÍNIO
IPI00167963	Hypothetical protein FLJ35576	nuclear	16	aldoketo redutase
IPI00401353	Hypothetical protein LOC283152	nuclear	11	citocina de 4 hélices
IPI00031112	Hypothetical protein CATX-2	citoplasmática	2	ziper de leucina

Foi possível detectar também proteínas que foram encontradas somente no perfil protéico de doadores saudáveis e estavam ausentes no perfil protéico da LMA. Acredita-se que estas proteínas dispostas na **tabela 8**, foram perdidas na doença.

Tabela 8: Proteínas encontradas somente em doador quando comparadas com o perfil protéico obtido de LMA.

ACESSO	DESCRIÇÃO
IPI00027462	Calgranulin B
IPI0038295	Beta-globin gene from a thalassemia patient, complete cds
IPI00183968	Tropomyosin alpha 3 chain

Portanto temos como candidatas a biomarcadores da doença um número elevado de proteínas tanto com expressão aumentada (61), quanto com expressão diminuída (3).

Tendo em vista que este número é muito elevado e que provavelmente várias destas proteínas estão relacionadas ao processo leucêmico e não a

LMA propriamente dita nós verificamos a presença destas proteínas em CMN de Medula Óssea de pacientes com LMC em crise blástica.

Tanto a LMA quanto a LMC (Leucemia mielóide crônica) são neoplasias hematológicas que atingem a mesma linhagem celular, a linhagem mielóide. Com isso acreditamos que a comparação do perfil protéico da LMA com o perfil protéico da LMC em crise blástica que é uma fase agudizada da LMC seria bastante relevante. Para tal foram utilizados dados obtidos em nosso Laboratório (Dados não publicados). A partir desta análise restaram 34 proteínas comuns a todos os pacientes com LMA, ausentes em doadores e na LMC crise blástica sendo estas proteínas candidatas a estarem relacionadas à doença LMA (**Tabela 9**). Neste grupo foram encontradas proteínas com as mais diversas funções, dentre elas, proteínas hipotéticas, proteínas que inibem a apoptose, proteínas com função oncogênica, transdutoras de sinal e fatores de transcrição. Algumas destas proteínas são fortes candidatas a biomarcadores e deverão ser validadas em uma coorte de pacientes com LMA.

Um resumo esquemático da distribuição das interseções encontradas entre as proteínas analisadas na LMA, LMC crise blástica e doadores saudáveis pode ser visualizado na **figura 10**.

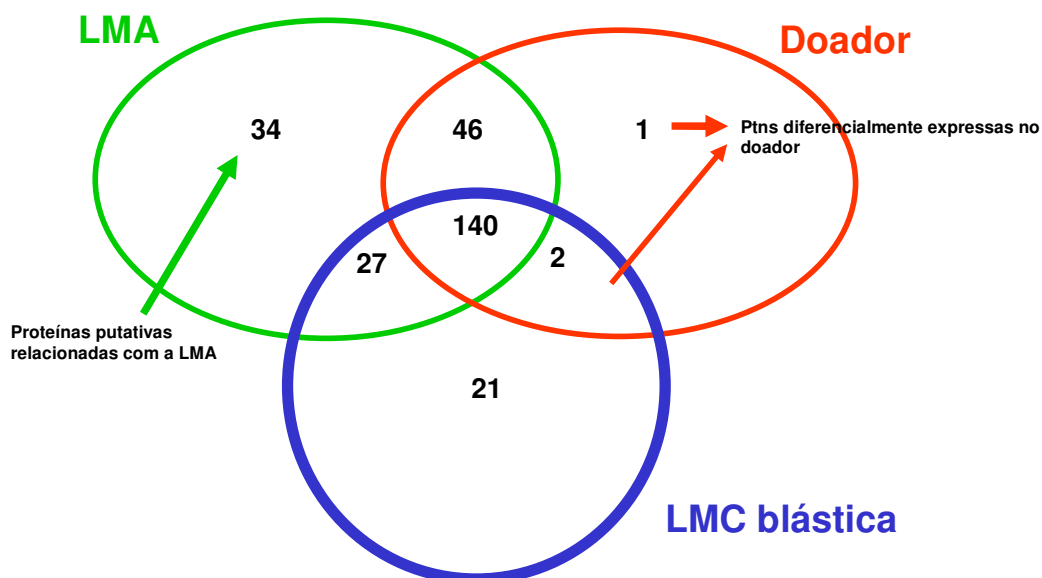


Figura 10: Esquema identificando proteínas únicas da LMA

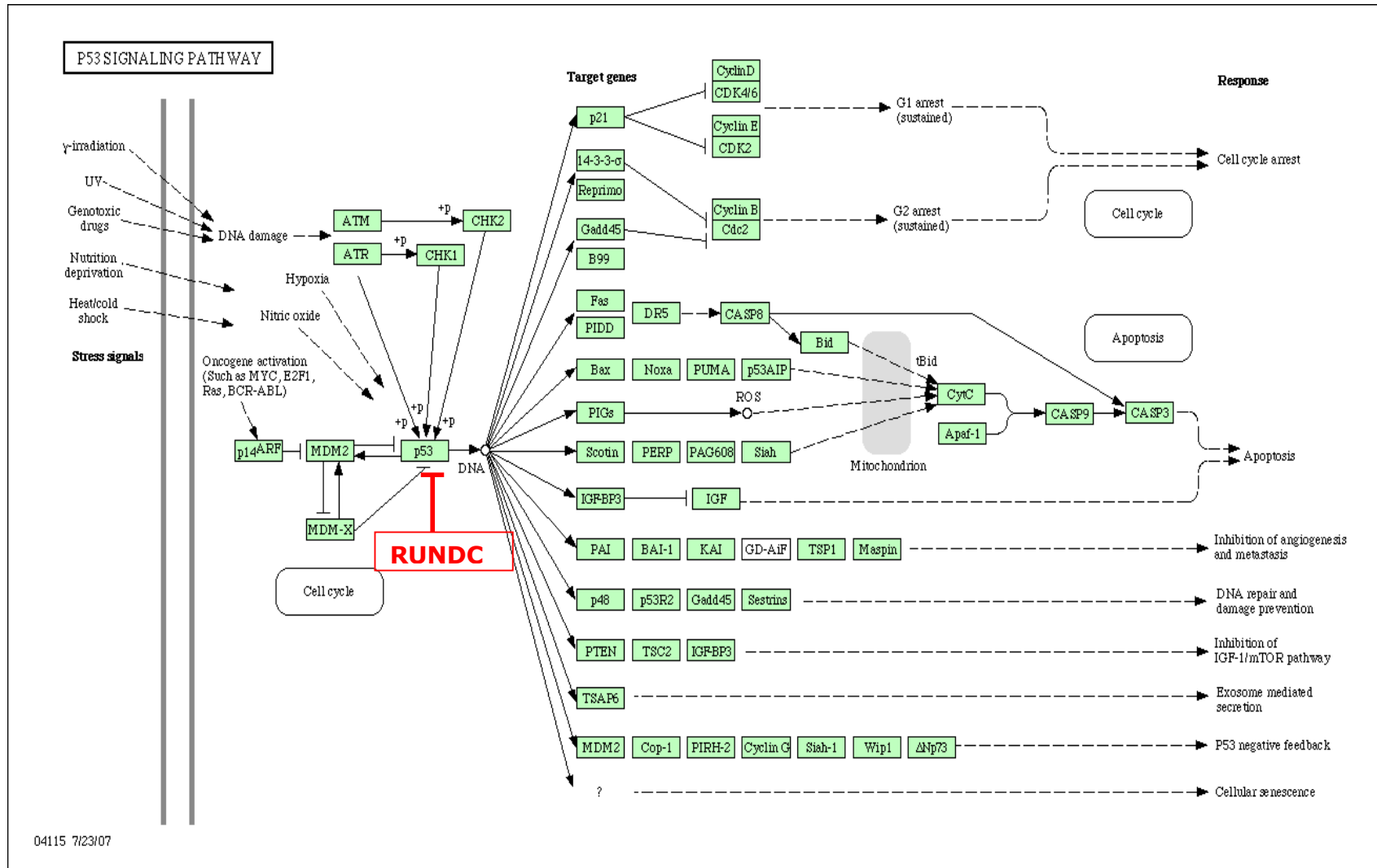
Tabela 9: Proteínas putativas relacionadas com a LMA.

DESCRIÇÃO	ACESSO	FUNÇÃO
RUNDC1 protein	IPI00480076	oncogênica
Lipj Protein	IPI00643822	Atividade metabólica
Indolethylamine N-Methyltransferase	IPI00654567	Atividade metabólica
40 kDa protein	IPI00478172	desconhecida
Splice Isoform 2 of WD-repeat protein 22	IPI00382979	oncogênica
TDRD11	IPI00140420	fator de transcrição
YWHAZ 14-3-3 protein zeta/delta	IPI00021263	fator de transcrição
Granulysin isoform 519	IPI00377102	diferenciação
Isoform 3 of VAV-like protein	IPI00395432	transdutora de sinal
OTC Ornithine carbamoyltransferase, mitochondrial precursor	IPI00295363	Atividade metabólica
RAB41 RAB41, member RAS homolog family	IPI00232898	oncogênica
OPA3 Optic atrophy 3 protein	IPI00018600	transdutora de sinal
Hypothetical protein CATX-2	IPI00031112	hipotética
RAB12	IPI00419932	Transdutora de sinal
Sperm 1 POU-domain transcription factor	IPI00171173	fator de transcrição
SOX-29 protein	IPI00003172	fator de transcrição
PRKCH protein	IPI00031610	diferenciação
Mago nashi protein homolog	IPI00219306	protein binding
Tumor protein D52-like 1, isoform 3	IPI00457045	oncogênica
Splice Isoform 2 of Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1-like	IPI00028723	oncogênica
SYMPK Isoform 2 of Symplekin	IPI00413614	protein binding
PPP1R12A 5 kDa protein	IPI00797351	transdutora de sinal
MLXIP 7 kDa protein	IPI00798107	fator de transcrição
MLH1 HMLH1 protein	IPI00792036	protein binding
NEBL LIM-nebulette	IPI00418240	protein binding
Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoform 4	IPI00478390	anti-apoptose
AH11 Isoform 3 of Joubertin	IPI00645606	diferenciação
YARS Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	IPI00007074	transdutora de sinal
S100A9 Protein S100-A9	IPI00027462	transdutora de sinal
AZU1 Azurocidin precursor	IPI00022246	anti-apoptose
ANKRD26-like family C member 1A	IPI00479743	protein binding
CAPG gelsolin-like capping protein	IPI00848090	protein binding
MAP6 microtubule-associated protein 6 isoform 1	IPI00420071	motilidade celular
GMF-GAMMA MGC126867	IPI00028414	diferenciação

Dentre as proteínas putativas relacionadas com a LMA, estão ressaltadas algumas proteínas que representam potenciais biomarcadores. Com base em dados da literatura e a utilização do banco de dados do KEGG PATHWAY foi possível inserir estas proteínas nas vias envolvidas nos processos leucemogênicos da LMA. Através desta análise é possível criar hipóteses da localização destas proteínas nas vias envolvidas. Uma delas é a

proteína RUNDC1 recentemente descrita na literatura como inibidora de p53 e conseqüentemente como participante da regulação dos pontos de checagem do ciclo celular e da apoptose (Llanos et al., 2006), tal proteína está com expressão aumentada em LMA (**Figura 11**). Uma outra proteína importante é o fator de transcrição TDRD11, o qual já foi observado um aumento da expressão em câncer de cólon. A literatura menciona uma atividade de cofator de transcrição desta proteína onde ela agiria através do recrutamento de modificadores da cromatina e ativação de promotores de STAT6 levando a um bloqueio da apoptose e também ativação de CEBP desencadeando um bloqueio de diferenciação (Välineva et al., 2005) (**Figura 12**). Além da proteína azurocidina, outra proteína com função anti-apoptótica aparece com expressão aumentada na LMA, a proteína 14-3-3 zeta. A azurocidina se apresenta como uma IAP (inibidora de apoptose) através da via das caspases e a 14-3-3 zeta através da sinalização positiva de Bcl2 garantindo a sobrevivência da célula afetada (Matta et al., 2007) (**Figura 13**). Já a proteína GMFG é uma proteína especificamente da linhagem hematopoiética que parece ter um papel na mediação da pluripotencialidade destas células, pois a mesma se apresenta como inibidora de ERK bloqueando a via de diferenciação celular (Shi et al., 2006) (**Figura 14**).

Figura 11: Vias de sinalização de p53 mostrando o possível papel de RUNDC1 como inibidor de p53



04115 7/23/07

Figura 12: Vias de sinalização em leucemia mielóide aguda mostrando o possível papel da proteína TDRD como bloqueadora de diferenciação e apoptose

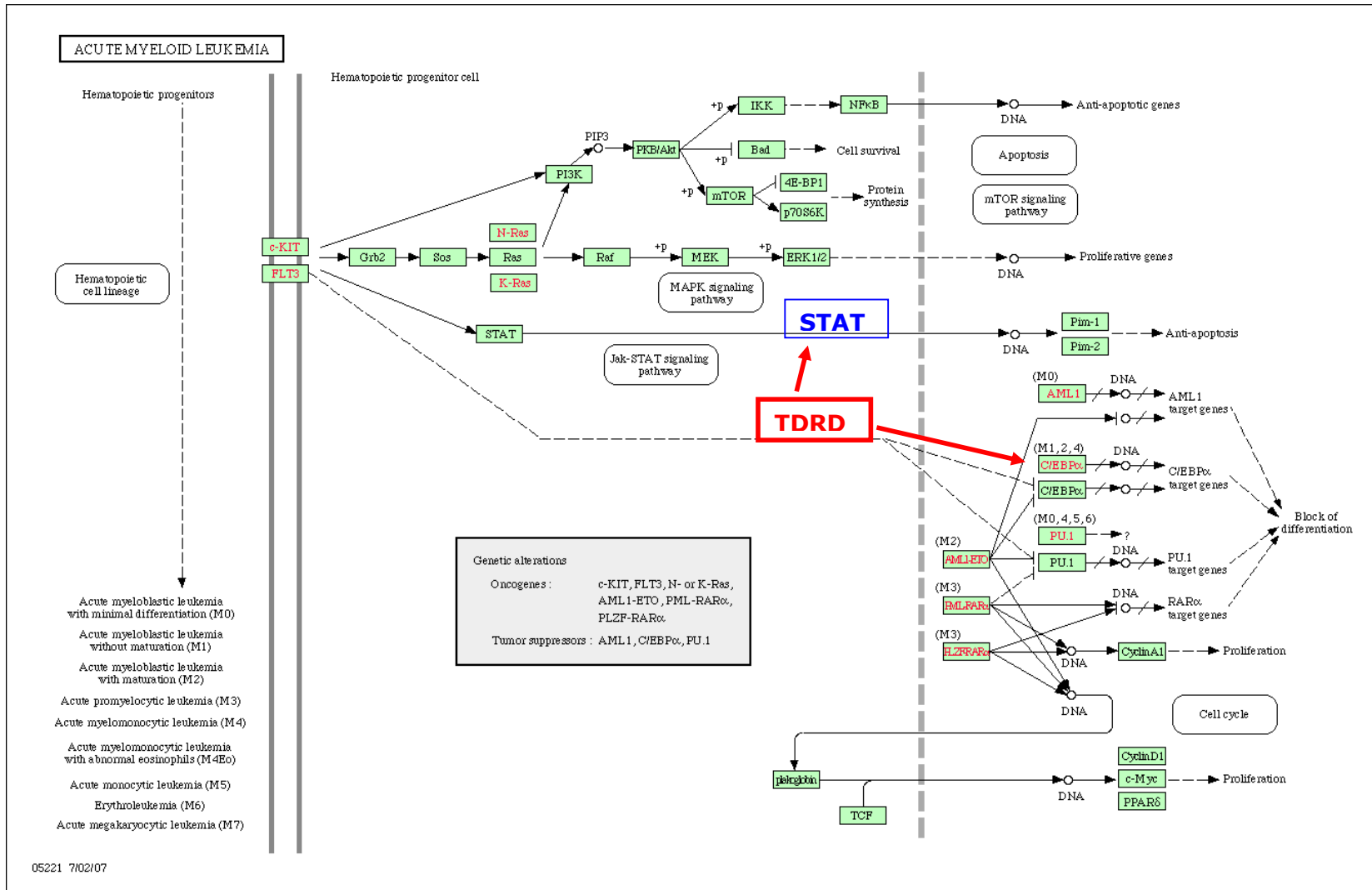


Figura 13: Vias de apoptose mostrando a proteína azurocidina e a proteína 14-3-3 zeta como inibidoras da apoptose.

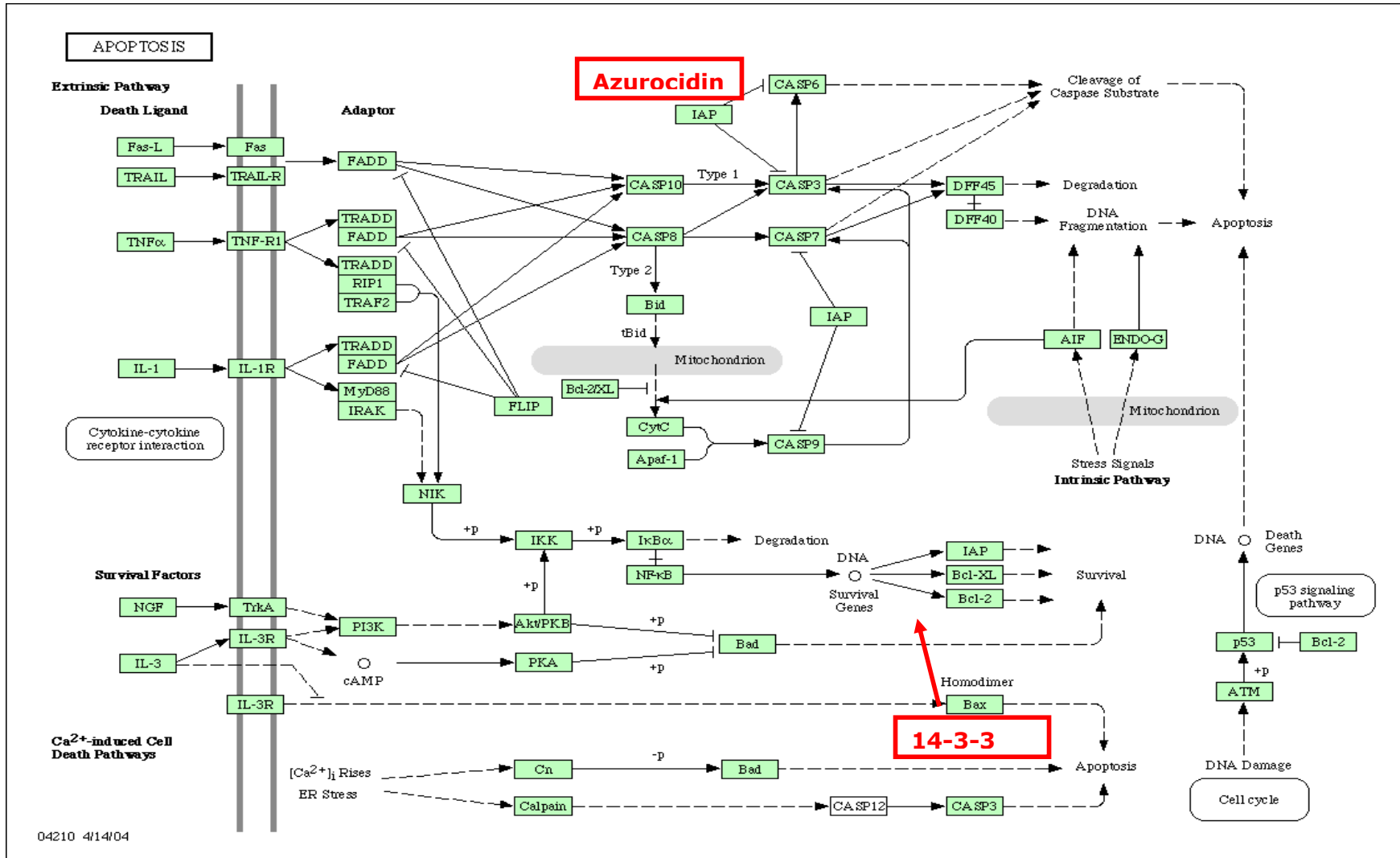
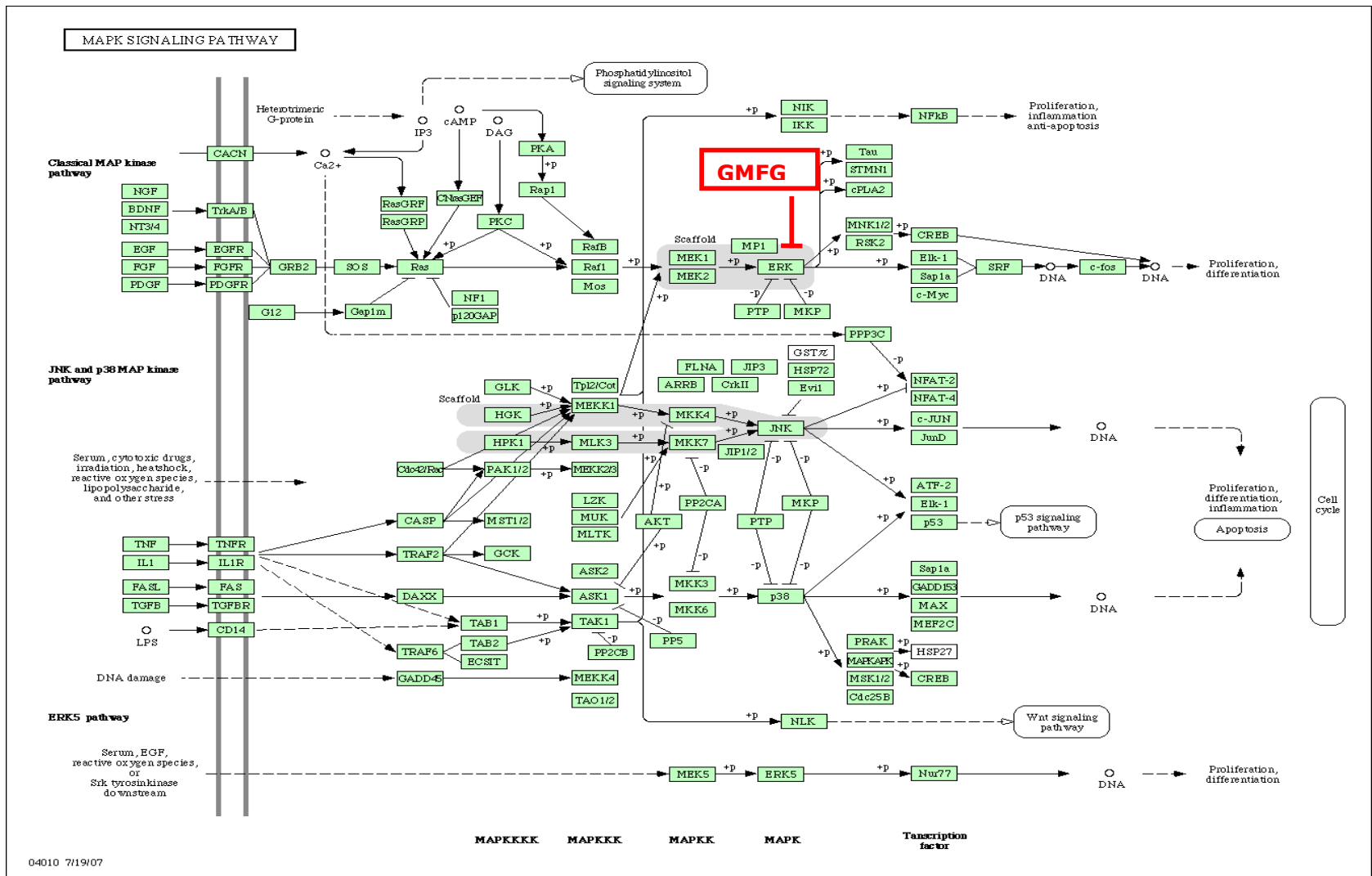


Figura14: Via de sinalização de MPK mostrando o possível papel de GMFG inibindo a diferenciação



3. Análise de proteínas relacionadas ao subtipo M1

Apesar dos perfis protéicos dos diferentes pacientes serem bastante semelhantes, diferenças quantitativas e qualitativas podem ser identificadas entre os subtipos da doença. No entanto como o número de amostras foi ainda muito pequeno somente foi possível identificar proteínas específicas de um subtipo, o subtipo M1 que representou aproximadamente 56% de nossa amostra.

Foi possível observar um grupo de 5 proteínas que estavam expressas em todos os pacientes com o subtipo M1 ocorrendo apenas nos pacientes deste subtipo, sendo portanto proteínas putativas relacionadas à este subtipo da doença (**Tabela 10**).

Tabela 10: Proteínas putativas relacionadas com o subtipo M1 da LMA.

CÓDIGO	DESCRIÇÃO	ACESSO	FUNÇÃO
1	TDRD11	IPI00140420	fator de transcrição
2	YWHAZ 14-3-3 protein zeta/delta	IPI00021263	fator de transcrição
3	AZU1 Azurocidin precursor	IPI00022246	anti-apoptose
4	ANKRD26-like family C member 1A	IPI00479743	protein binding
5	GMF-GAMMA MGC126867	IPI00028414	diferenciação

As proteínas relacionadas com o subtipo M1 foram observadas em todas as amostras deste subtipo e eram ausentes nas amostras dos demais subtipos. A localização delas em um gel bidimensional de um dos pacientes com este subtipo pode ser visualizada na **figura 15**.

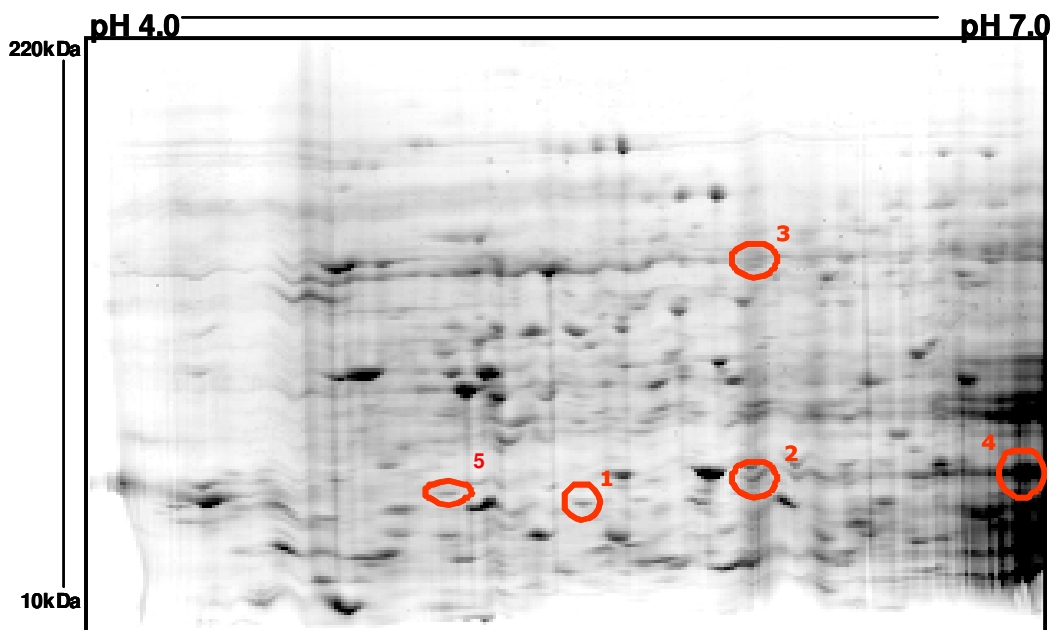


Figura 15: Gel Bidimensional (pH 4-7) de análise do extrato protéico total das células mononucleares da medula óssea do paciente 55, corado com coomassie Blue coloidal e digitalizado no software Image Master 2D Platinum, demonstrando as proteínas putativas relacionadas com o subtipo M1. Os números indicam os códigos mencionados na **tabela 10**.

Para a confirmação destas proteínas candidatas é necessário que a presença destas seja confirmada em outras amostras. Para a determinação de proteínas relacionadas com os diversos subtipos da LMA seria necessário um aumento do número de pacientes dos diversos subtipos para análise, sendo importante a continuação destes estudos.

DISCUSSÃO

A Leucemia mielóide aguda é uma neoplasia hematológica agressiva caracterizada pelo acúmulo de precursores mielóides na medula óssea. Com as modalidades de tratamento que tem sido desenvolvidas, a sobrevivência livre de doença tem aumentado consideravelmente. Com o auxílio de diagnósticos citogenéticos e moleculares para guiar um tratamento individualizado o sucesso na remissão da doença tem aumentado, no entanto a sobrevida de pacientes adultos com LMA não ultrapassa 30% (Sjøholt et al., 2006). Descobertas vêm sendo feitas sobre as alterações submicroscópicas em pacientes com LMA na tentativa de definir o prognóstico, já se descreve a presença de assinaturas moleculares de subgrupos prognósticos, porém para a definição de aspectos individuais com maior precisão que permitam direcionar o tratamento ainda é preciso estudos mais aprofundados. Desta forma a identificação de novos biomarcadores de diagnóstico e prognóstico que ajudem a melhorar a sobrevida seria de extremo valor (Mrózek et al, 2007a).

Neste sentido, entender as malignidades hematológicas em nível de proteína é importante para o desenvolvimento de tratamentos específicos que podem ser baseados na patogênese molecular, variação genética e modo de ação das drogas (Rees-Unwin et al., 2004). A tecnologia proteômica vem emergindo como uma ferramenta bastante útil na identificação de biomarcadores da doença além de definição e caracterização dos processos fisiológicos e patológicos. Muitas mudanças celulares na expressão proteica em resposta a um estímulo externo ou a uma mutação podem ser apenas caracterizadas no nível do proteoma. O sangue, um fluido abundante em proteínas, representa um meio rico para a pesquisa proteômica (Unwin & Whetton, 2007).

A grande variabilidade encontrada na LMA dificulta o enquadramento de todos os indivíduos em grupos prognósticos já definidos. Hoje a literatura dispõe de informações importantes sobre grupos prognósticos marcados por alterações citogenéticas freqüentes, além de alterações moleculares que também influenciam no prognóstico do paciente (Oveland et al., 2006). Contudo, o grande conhecimento que tem se acumulado nos últimos tempos se

concentra em indivíduos que apresentam alterações recorrentes, deixando ainda boa parte dos pacientes em condições prognósticas indefinidas. É importante ressaltar ainda que uma parcela considerável dos pacientes com LMA, cerca de 45%, não apresentam alterações citogenéticas detectáveis, o que torna difícil a definição do prognóstico e diagnóstico. Sendo assim, a aplicação da tecnologia proteômica como ferramenta para o apontamento de novos biomarcadores que se somem ao conhecimento já acumulado poderia representar uma nova abordagem na tentativa de direcionar o tratamento destes pacientes e assim aumentar sua sobrevida.

O uso desta tecnologia aplicada ao estudo da leucemia mielóide crônica, já apresenta resultados importantes na varredura de marcadores da doença. Nosso grupo ao longo de sua experiência já observou proteínas diferencialmente expressas na LMC quando comparada com doadores normais, além de estudar proteínas marcadoras das fases da doença (Pizzatti et al., 2006). O grande diferencial quando se trata de LMC é que a doença é bastante homogênea, apresentando basicamente três fases bem definidas: crônica, acelerada e blástica, onde 95% dos indivíduos apresentam a alteração cromossômica marcadora da LMC, o Cromossomo Filadélfia. Os indivíduos de cada fase apresentam similaridades clínicas e moleculares entre si, gerando a possibilidade do estudo da doença através de *pool* de pacientes permitindo a caracterização do perfil molecular de cada fase (Sessions et al., 2007). Entretanto, quando se trata de leucemia mielóide aguda a grande heterogeneidade da doença dificulta o agrupamento dos pacientes não permitindo o uso desta estratégia, sendo necessária a análise de amostras individuais (Balkhi et al., 2006). Dentro da LMA é possível observar diversidades morfológicas, citogenéticas, moleculares e imunofenotípicas e todas estas diferenças se refletem em respostas distintas ao tratamento, até mesmo dentro de um único subtipo. Desta forma a análise de proteínas diferencialmente expressas entre grupos de alterações citogenéticas seria uma perspectiva interessante. Entretanto, a necessidade de análise de amostras individuais faz com que a escassez de material e a prioridade para exames de rotina sejam fatores que limitam a obtenção de amostras adequadas para análise proteômica.

Em nosso trabalho pudemos vivenciar as dificuldades de se estudar uma doença altamente heterogênea como a LMA. A primeira delas foi a obtenção de amostras com celularidade adequada para a obtenção de um extrato protéico com concentração suficiente para utilização da tecnologia proteômica na análise de amostras individuais. A alíquota de material cedida muitas vezes não apresentava celularidade suficiente para fornecer a quantidade mínima necessária de proteína para a técnica utilizada. Ainda assim foi possível a formação de um banco de 58 amostras de onde foram então selecionadas 23, que possuíam quantidade de proteína superior a 700µg, para a análise proteômica. As 35 amostras não selecionadas a princípio, também serão de extrema importância para a continuação deste trabalho porque representarão um universo diversificado para a validação dos possíveis biomarcadores apontados nesta análise preliminar através de técnicas que precisem de quantidades menores de proteína. Além disso, novas amostras continuam a ser coletadas para futuras análises.

Apesar de toda dificuldade na obtenção de amostras de medula óssea para separação de células mononucleares em quantidade suficiente, foi possível obter 23 amostras de LMA para análise proteômica. A partir da separação bidimensional e identificação por espectrometria de massas de todas as proteínas detectadas em todas as 23 amostras analisadas identificamos 247 proteínas que compõem o perfil proteômico de células mononucleares de medula óssea de pacientes com LMA. Neste perfil observamos proteínas com as mais diversas funções, representando um amplo espectro de atividades realizadas por estas células. Dentre elas, encontramos proteínas que participam do metabolismo basal da célula, proteínas que se ligam a outras proteínas e também proteínas oncogênicas, fatores de transcrição e proteínas anti-apoptóticas. Em nosso grupo de análise uma grande parte das amostras pertencia ao subtipo M1, restando poucos representantes dos demais subtipos. Não resta dúvidas que a ampliação da amostragem seria importante para o aumento da representação de proteínas dos demais subtipos, dando uma maior abrangência ao perfil proteômico. Além disso, a utilização da metodologia de separação de proteínas por gel bidimensional apresenta limitações na identificação de diferenças de expressão

mais sutis, sendo então a proposta da utilização de técnicas com maior sensibilidade uma perspectiva interessante. A aplicação de metodologias mais sofisticadas, como a cromatografia líquida de alto desempenho associada à espectrometria de massas (LC/MS), representaria um ganho considerável para a sensibilidade na análise dos peptídeos colaborando para o aumento da amplitude do perfil proteômico de células mononucleares de medula óssea de pacientes com LMA. A sensibilidade e precisão de métodos como esse permitiriam o uso de uma quantidade menor de proteína ampliando a adequação das amostras biológicas e permitindo a visualização de um número maior de proteínas levando a percepção de diferenças mais amplas entre as amostras analisadas (Vandenbogaert et al., 2008; Lee & Kerns, 1999).

Sendo o principal objetivo deste trabalho a identificação de biomarcadores que se relacionassem a LMA e alguns de seus subtipos, partimos para comparação do perfil protéico de células mononucleares de medula óssea de pacientes com LMA e o mesmo material de doadores saudáveis. A partir destas análises foi possível identificar um grupo de 61 proteínas encontradas na LMA e não detectáveis em doadores saudáveis. Este grupo de proteínas ainda representaria um conjunto bastante complexo e a definição do que está relacionado com a LMA ou com leucemias em geral ainda não seria possível. Para tentar definir neste universo, proteínas que estariam relacionadas com a LMA e não com leucemias mielóides em geral seguimos para uma comparação com proteínas identificadas na crise blástica da LMC. O trabalho desenvolvido por nosso laboratório nesta linha de pesquisa a algum tempo nos permite dispor do perfil protéico da LMC nas três fases, inclusive na fase blástica. Desta forma, a comparação com este perfil nos possibilitaria a exclusão de proteínas comuns à leucemias mielóides. A escolha da fase blástica se dá porque a mesma representa uma fase agudizada da doença, e que em alguns momentos pode até mesmo se confundir com a LMA. Com esta abordagem foi possível chegar a um grupo de 34 possíveis biomarcadores da LMA independente do subtipo, que estariam ausentes na LMC fase blástica e ausentes em doadores saudáveis.

Vale ressaltar que em nossas análises, dentre as proteínas que foram relacionadas com a LMA, estão proteínas oncogênicas e proteínas anti-apoptóticas até então não implicadas no processo de leucemogênese. Uma

delas é a proteína RUNDC1 recentemente descrita na literatura como inibidora de p53 e conseqüentemente como participante da regulação dos pontos de checagem do ciclo celular e da apoptose (Llanos et al., 2006), tal proteína está com expressão aumentada em LMA e representa um potencial biomarcador da doença. Outra proteína oncogênica observada foi a isoforma 3 da proteína tumoral D-52 que é um membro da família de proteínas tumorais D-52 envolvidas na proliferação celular e sinalização de cálcio, que estimula a apoptose induzida por ASK1 (Boutros et al., 2004), que também apresentou expressão diferenciada na LMA . Ainda pudemos observar a isoforma 3 da proteína de suscetibilidade tumoral que apresenta um papel importante na diferenciação e proliferação celular e age como regulador negativo da diferenciação celular (Young et al., 2007), que poderia estar representando um fator crucial na manutenção do fenótipo indiferenciado das células blásticas. Encontramos também uma proteína que tem como alvo as células neutrofílicas e participa da diferenciação das mesmas, a proteína azurocidina que recentemente foi descrita como inibidora de caspases e conseqüentemente com função anti-apoptótica (Olofsson et al., 1999; Sköld et al., 2002), que poderia estar se somando a outras proteínas na inibição da apoptose celular.

A dificuldade de desenvolver pesquisas utilizando células mononucleares de medula óssea de pacientes com uma doença tão heterogênea como a LMA se reflete na quantidade limitada de publicações nesta área. Os estudos até então desenvolvidos são na sua maioria efetuados com células em cultura (Smith et al., 2002; Rezaul et al., 2005), que apesar de serem adquiridas a partir de células leucêmicas imortalizadas em cultura que apresentam um compromisso com o fenótipo inicial do qual se partiu a proliferação celular subsequente, certamente apresentam alterações adicionais adquiridas durante os diversos repiques para manutenção das células. Desta forma, experimentos com células em cultura poderiam dar um indício da expressão das proteínas em condições leucêmicas, mas não refletiriam a realidade fiel da biologia da célula analisada a fresco.

Em outros trabalhos já realizados, o material biológico escolhido para análise foi o plasma (Koomen et al., 2005; Joo et al., 2003). Um exemplo de estudo recente que utilizou soro de pacientes de LMA e comparou com soro de indivíduos saudáveis foi capaz de detectar oito proteínas diferencialmente

expressas, que podem ser utilizadas potencialmente como método diagnóstico e de monitoramento (Kwak et al., 2004). A utilização do soro do paciente para a análise também é uma proposta interessante, entretanto as perguntas que seriam passíveis de resposta nesta abordagem envolveriam proteínas solúveis no plasma sanguíneo e não seria capaz de sanar dúvidas quanto ao funcionamento celular e de proteínas restritas ao interior celular.

Balkhi e colaboradores recentemente desenvolveram um trabalho utilizando células mononucleares de medula óssea onde foi possível identificar proteínas relacionadas com grupos prognósticos recorrentes já conhecidos e analisar a interação de proteínas diferencialmente expressas (Balkhi et al., 2006). Neste único trabalho apresentado na literatura utilizando células mononucleares de medula óssea de paciente foram descritas algumas proteínas diferencialmente expressas nos grupos citogenéticos analisados, já conhecidamente implicadas em processos leucemogênicos. Dentre as proteínas apresentadas está MAfK que foi identificada como alvo específico da inv (16), esta proteína promove a diferenciação eritróide em células eritroleucêmicas e age como regulador de genes eritróides específicos. (Igarashi et al., 1995). Foi possível observar também a expressão diferencial de uma IAP (proteína inibidora de apoptose), a survivina, em pacientes com a t(8,21). Esta proteína já é conhecidamente um potencial alvo terapêutico em câncer, já se sabe que a sua expressão aumentada leva a desregulação da dinâmica tanto da actina quanto da tubulina (Gurbuxani et al., 2005).

Um outro objetivo de nosso trabalho era identificar possíveis biomarcadores relacionados a alguns dos subtipos da LMA (M0 a M7). Entretanto ao analisar o universo de amostras selecionadas para proteoma, grande parte pertencia ao subtipo M1. A quantidade de amostras dos demais subtipos era muito pequena para permitir uma análise de proteínas que pudessem resultar na comparação dos diversos subtipos. Com isso, restringimos a análise de proteínas relacionadas com o subtipo M1, cujo subtipo esteve consideravelmente representado em nossa amostragem. A frequência observada deste subtipo é de aproximadamente 20% das leucemias mielóides agudas (Harris et al., 1999). A alta representatividade do subtipo FAB M1, 56% de nossa amostra, também chamada de leucemia mieloblástica sem maturação não é surpreendente se observarmos as características das

células blásticas que se apresentam em excesso na medula óssea dos indivíduos acometidos pela LMA deste subtipo, podendo alcançar a taxa de mais de 90% de blastos na medula óssea. A ausência de maturação dos blastos leucêmicos e a alta capacidade proliferativa destas células explicam a alta celularidade das amostras provenientes dos indivíduos deste subtipo e a conseqüente grande quantidade de proteína obtida destas amostras, o que é indispensável para a análise proteômica. A análise de proteínas relacionadas ao subtipo M1 permitiu a identificação de 5 possíveis biomarcadores deste subtipo. A maior parte das proteínas eram fatores de transcrição, não deixando de observar a presença de uma proteína anti-apoptótica, uma proteína com função de se ligar a outras proteínas e uma descrita a princípio com função de diferenciação.

Dentre as proteínas candidatas a estarem relacionadas ao subtipo FAB M1 está o fator de transcrição TDRD11 onde já foi observado um aumento da expressão em câncer de cólon. A literatura menciona uma atividade de cofator de transcrição desta proteína onde ela agiria através do recrutamento de modificadores da cromatina e ativação de promotores de STAT6 (Välineva et al., 2005). Além da proteína azurocidina, outra proteína com função anti-apoptótica aparece com expressão aumentada neste subtipo da LMA, a proteína 14-3-3 zeta. Já se descreve que o aumento da expressão desta proteína poderia ter um importante papel na progressão e desenvolvimento do tumor de boca (Matta et al., 2007). Já a proteína GMFG é uma proteína especificamente da linhagem hematopoiética que parece ter um papel na mediação da pluripotencialidade destas células além de sua expressão acompanhar linhagens de células-tronco hematopoiéticas humanas (Shi et al., 2006).

O mapeamento de proteínas envolvidas com a LMA e seus subtipos são de extrema importância para auxiliar no direcionamento de terapias moleculares subtipo-específicas. As proteínas cuja expressão é significativamente alterada entre estes grupos poderiam explorar o potencial terapêutico e seu envolvimento na desregulação ou hiperatividade na sinalização de cascatas intracelulares (Petricoin et al., 2005). Neste sentido o desenvolvimento de nosso trabalho, utilizando células mononucleares de medula óssea de pacientes com LMA e doadores normais permite demonstrar

a evolução do conhecimento que tem acontecido na aplicação da proteômica no estudo da LMA. Para desenvolvimento dos experimentos foram utilizadas 700 µg de proteína, no entanto, ao longo da pesquisa foi possível aperfeiçoar a metodologia utilizada. A melhoria no desempenho da extração e solubilização das proteínas, além de ajustes nos programas de separação bidimensional permitiu o uso de quantidades menores, 300 µg de proteína, o que facilita a ampliação de amostras passíveis de utilização por esta técnica.

Na tentativa de refinar ainda mais as proteínas putativas relacionadas à LMA, nosso grupo continuará perseguindo o objetivo de aperfeiçoar cada vez mais nossa metodologia e ampliar as possibilidades e janelas de análise. Nosso estudo é de extrema importância, pois representa o passo inicial para o estabelecimento de possíveis biomarcadores prognósticos e diagnósticos que auxiliem no tratamento da LMA, além de permitir o estabelecimento de um banco de amostras de LMA que será útil para experimentos de validação dos possíveis biomarcadores apontados neste trabalho.

Nosso trabalho representa uma análise preliminar de diferenças qualitativas avaliadas na LMA quando comparadas com doadores saudáveis e LMC fase blástica e certamente diferenças quantitativas se somam para contribuir para o processo leucemogênico. A validação das proteínas aqui apontadas como possíveis biomarcadores da LMA e do subtipo M1 requer ainda muito trabalho e será o nosso próximo passo, onde será necessária a confirmação das mesmas em uma coorte maior. Apesar da amostragem ainda pequena, tivemos a oportunidade de formar um banco de amostras que será bastante útil para esta validação utilizando outras técnicas de biologia molecular que requerem uma quantidade menor de proteína, como western blot. Além da validação das proteínas candidatas, o aumento da amostragem será essencial para a futura análise de todos os subtipos da LMA e ampliação de sua representatividade no perfil proteômico da LMA e posteriormente a separação de proteínas relacionadas a grupos citogenéticos, um objetivo que nós continuaremos perseguindo.

CONCLUSÕES

- Neste trabalho foram coletadas 58 amostras de medula óssea das quais foram selecionadas 23 amostras para análise proteômica de onde foi possível definir o perfil proteômico de Células Mononucleares de Medula Óssea de pacientes com LMA.
- O perfil proteico de Células Mononucleares de Medula Óssea de pacientes diagnosticados com LMA na janela analisada através da tecnologia proteômica aplicada, é composto de 247 proteínas com as mais diversas funções celulares, além do metabolismo basal, proteínas oncogênicas, fatores de transcrição e proteínas anti-apoptóticas.
- A partir da comparação do perfil proteômico da LMA com o perfil proteômico de Células Mononucleares de Medula Óssea de doadores saudáveis voluntários ao transplante foi possível definir um grupo de 61 proteínas identificadas apenas na LMA e ausentes em doadores saudáveis. Dentre elas estão proteínas conhecidamente alteradas na LMA, como a Nucleofosmina, e novas proteínas implicadas na doença, como a RUNDC1.
- Após comparação com o perfil proteômico de Células Mononucleares de Medula Óssea de pacientes com LMC na fase blástica foi possível excluir 27 proteínas que estavam relacionadas com leucemias mielóides e não com a LMA especificamente, restando 34 proteínas putativas relacionadas com a LMA, representando possíveis biomarcadores.
- Das 34 proteínas candidatas a biomarcadores da LMA foi possível definir 5 que apresentam relação com o subtipo FAB M1, que estavam presentes em todas as amostras de subtipo e ausentes nos demais subtipos.
- Para a validação dos possíveis biomarcadores RUNDC1, WD *repeat*, Proteína tumoral D52, e azurocidina é necessária a confirmação destas proteínas em uma amostragem maior através de outras técnicas de biologia molecular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSSON A, EDÉN P, LINDGREN D, NILSSON J, LASSEN C, HELDRUP J, FONTES M, BORG A, MITELMAN F, JOHANSSON B, HÖGLUND M, FIORETOS T, Gene expression profiling of leukemic cell lines reveals conserved molecular signatures among subtypes with specific genetic aberrations, *Leukemia* **19(6)**:1042-1050 (2005).
2. ANDERSSON A, RITZ C, LINDGREN D, EDÉN P, LASSEN C, HELDRUP J, OLOFSSON T, RÅDE J, FONTES M, PORWIT-MACDONALD A, BEHRENDTZ M, HÖGLUND M, JOHANSSON B, FIORETOS T, Microarray-based classification of a consecutive series of 121 childhood acute leukemias: prediction of leukemic and genetic subtype as well as of minimal residual disease status, *Leukemia* **21(6)**:1198-1203 (2007).
3. BALDUS CD, MRÓZEK K, MARCUCCI G, BLOOMFIELD CD, Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review, *British Journal of Haematology* **137(5)**:387-400 (2007).
4. BALDUS CD, THIEDE C, SOUCEK S, BLOOMFIELD CD, THIEL E, EHNINGER G, BAALC expression and FLT3 internal tandem duplication mutations in acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: prognostic implication, *Journal of Clinical Oncology* **24(5)**:790-797 (2006).
5. BALKHI MY, TRIVEDI AK, GELETU M, CHRISTOPEIT M, BOHLANDER SK, BEHRE HM, BEHRE G, Proteomics of acute myeloid leukaemia: Cytogenetic risk groups differ specifically in their proteome, interactome and post-translational protein modifications, *Oncogene* **25(53)**:7041-7058 (2006).
6. BASHAWRI LA, Bone marrow examination. Indications and diagnostic value, *Saudi Medical Journal* **23(2)**:191-196 (2002).
7. BASSAN R, GATTA G, TONDINI C, WILLEMZE R, Adult acute lymphoblastic leukaemia, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **50**: 223-261 (2004).
8. BERAN M, LUTHRA R, KANTARJIAN H, ESTEY E, FLT3 mutation and response to intensive chemotherapy in young adult and elderly patients with normal karyotype, *Leukemia Research* **28(6)**:547-50 (2004).

9. BERNARD OA, BERGER R, Molecular basis of 11q23 rearrangements in hematopoietic malignant proliferations, *Genes chromosomes Cancer* **13**:75-85 (1995).
10. BIONDI A, RAMBALDI R, Molecular Diagnosis and monitoring of acute myeloid leukemia, *Leukemia Research*, 20: 801-807 (1996).
11. BOUTROS R, FANAYAN S, SHEHATA M, BYRNE JA, The tumor protein D52 family: many pieces, many puzzles, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **325(4)**:1115-1121 (2004).
12. BRADFORD MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* **72**:248-254 (1976).
13. BULLINGER L, DÖHNER K, BAIR E, FRÖHLING S, SCHLENK RF, TIBSHIRANI R, DÖHNER H, POLLACK JR, Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia, *The New England Journal of Medicine* **350(16)**:1605-1616 (2004).
14. BYRD JC, MRÓZEK K, DODGE RK, CARROLL AJ, EDWARDS CG, ARTHUR DC, PETTENATI MJ, PATIL SR, RAO KW, WATSON MS, KODURU PR, MOORE JO, STONE RM, MAYER RJ, FELDMAN EJ, DAVEY FR, SCHIFFER CA, LARSON RA, BLOOMFIELD CD, Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461), *Blood* **100(13)**:4325-4336 (2002).
15. CALDAS C, Molecular assessment of câncer, *Brazilian Molecular Journal*, **316**: 1360-1363 (1998).
16. CALIGIURI MA, STROUT MP, LAWRENCE D, ARTHUR DC, BAER MR, YU F, KNUUTILA S, MRÓZEK K, OBERKIRCHER AR, MARCUCCI G, DE LA CHAPELLE A, ELONEN E, BLOCK AW, RAO PN, HERZIG GP, POWELL BL, RUUTU T, SCHIFFER CA, BLOOMFIELD CD, Rearrangement of ALL1 (MLL) in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics, *Cancer Research* **58(1)**:55-59 (1998).
17. CENTRO DE PESQUISA ALEXANDER FLEMING. (2008). Hematopoiese. Disponível em: <http://www.fleming.gr/>. Acesso em 14 abr 2008.

18. FALINI B, BOLLI N, SHAN J, MARTELLI MP, LISO A, PUCCIARINI A, BIGERNA B, PASQUALUCCI L, MANNUCCI R, ROSATI R, GORELLO P, DIVERIO D, ROTI G, TIACCI E, CAZZANIGA G, BIONDI A, SCHNITTGER S, HAFERLACH T, HIDDEMANN W, MARTELLI MF, GU W, MECUCCI C, NICOLETTI I, Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML, *Blood* **107(11)**:4514-4523 (2006).
19. FRÖHLING S, SCHLENK RF, BREITRUCK J, BENNER A, KREITMEIER S, TOBIS K, DÖHNER H, DÖHNER K, Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm, *Blood* **100(13)**:4372-4380 (2002).
20. FRÖHLING S, SCHOLL C, BANSAL D, HUNTLY BJ, HOX gene regulation in acute myeloid leukemia: CDX marks the spot?, *Cell Cycle* **6(18)**:2241-2245 (2007).
21. GILLILAND DG, JORDAN CT, FELIX CA, The molecular basis of leukemia, *American Society of Hematology*: 80- 97 (2004).
22. GILLILAND DG, TALLMAN MS, Focus on acute leukemias, *Cancer cell*, **1**: 417-420 (2002).
23. GRIMWADE D, BIONDI A, MOZZICONACCI MJ, HAGEMEIJER A, BERGER R, NEAT M, HOWE K, DASTUGUE N, JANSEN J, RADFORD-WEISS I, LO COCO F, LESSARD M, HERNANDEZ JM, DELABESSE E, HEAD D, LISO V, SAINTY D, FLANDRIN G, SOLOMON E, BIRG F, LAFAGE-POCHITALOFF M, Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. Groupe Français de Cytogénétique Hématologique, Groupe de Français d'Hématologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies", *Blood* **96(4)**:1297-1308 (2000).
24. GRIMWADE D, WALKER H, HARRISON G, OLIVER F, CHATTERS S, HARRISON CJ, WHEATLEY K, BURNETT AK, GOLDSTONE AH, The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial, *Blood* **98(5)**:1312-1320 (2001).

25. GUINN B, GILKES A, WOODWARD E, WESTWOOD N, MUFTI G, LINCH D, BURNETT A, MILLS K, Microarray analysis of tumour antigen expression in presentation acute myeloid leukaemia, *Biochemical and Biophysical Research Communication* **333**: 703-713 (2005).

26. GURBUXANI S, XU Y, KEERTHIVASAN G, WICKREMA A, CRISPINO JD, Differential requirements for survivin in hematopoietic cell development, *Proceedings of the National Academy of sciences of the USA* **102(32)**:11480-11485 (2005).

27. HAFERLACH T, BACHER U, KERN W, SCHNITTGER S, HAFERLACH C, The diagnosis of BCR/ABL-negative chronic myeloproliferative diseases (CMPD): a comprehensive approach based on morphology, cytogenetics, and molecular markers, *Annals of Hematology* **87(1)**:1-10 (2008).

28. HANASH SM, Biomedical applications of two-dimensional electrophoresis using immobilized pH gradients: current status, *Electrophoresis* **21(6)**:1202-1209 (2000).

29. HANASH SM, GURPIDE-MADOZ J, MISEK DE, Identification of novel targets for cancer therapy using expression proteomics, *Leukemia* **16**: 478-485 (2002).

30. HARRIS NL, JAFFE ES, DIEBOLD J, FLANDRIN G, MULLER-HERMELINK HK, VARDIMAN J, LISTER TA, BLOOMFIELD CD, World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997, *Journal of Clinical Oncology* **17(12)**:3835-3849 (1999).

31. HEILMEIER B, BUSKE C, SPIEKERMANN K, BOHLANDER S, FEURING-BUSKE M, HIDDEMANN W, BRAESS J, Diagnostics, classification and prognostic criteria of acute myeloid leukemia, *Medizinische Klinik (Munich, Germany)*: 1983) **102(4)**:296-308 (2007).

32. IGARASHI K, ITOH K, HAYASHI N, NISHIZAWA M, YAMAMOTO M, Conditional expression of the ubiquitous transcription factor MafK induces erythroleukemia cell differentiation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* **92(16)**:7445-7449 (1995).

33. JOO WA, KANG MJ, SON WK, LEE HJ, LEE DY, LEE E, KIM CW, Monitoring protein expression by proteomics: human plasma exposed to benzene, *Proteomics* **3(12)**:2402-2411 (2003).

34. KING ME, ROWE JM, Recent developments in acute myelogenous leukemia therapy, *The oncologist*, **12**: 14-21 (2007).
35. KOOMEN JM, LI D, XIAO LC, LIU TC, COOMBES KR, ABBRUZZESE J, KOBAYASHI R, Direct tandem mass spectrometry reveals limitations in protein profiling experiments for plasma biomarker discovery, *Journal of Proteome Research* **4(3)**:972-981 (2005).
36. KOTTARIDIS PD, GALE RE, FREW ME, HARRISON G, LANGABEER SE, BELTON AA, WALKER H, WHEATLEY K, BOWEN DT, BURNETT AK, GOLDSTONE AH, LINCH DC, The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials, *Blood* **98(6)**:1752-1759 (2001).
37. KUCHENBAUER F, KERN W, SCHOCH C, KOHLMANN A, HIDDEMANN W, HAFERLACH T, SCHNITTGER S, Detailed analysis of FLT3 expression levels in acute myeloid leukemia, *Haematologica* **90(12)**:1617-1625 (2005).
38. KWAK JY, MA TZ, YOO MJ, CHOI BH, KIM HG, KIM SR, YIM CY, KWAK YG, The comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for acute myeloid leukemia, *Experimental Hematology* **32(9)**:836-842 (2004).
39. LANGER C, RADMACHER MD, RUPPERT AS, WHITMAN SP, PASCHKA P, MROZEK K, BALDUS CD, VUKOSAVLJEVIC T, LIU CG, ROSS ME, POWELL BL, DE LA CHAPELLE A, KOLITZ JE, LARSON RA, MARCUCCI G, BLOOMFIELD CD, High BAALC expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome and a distinct gene-expression signature in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B (CALGB) study, *Blood* (2008). Publicação eletrônica 31 Mar 2008.
40. LARSON RA, KONDO K, VARDIMAN JW, BUTLER AE, GOLOMB HM, ROWLEY JD, Evidence for a 15;17 translocation in every patient with acute promyelocytic leukemia, *The American Journal of Medicine* **76**:827-841 (1984).
41. LEE MS, KERNS EH, LC/MS applications in drug development, *Mass Spectrometry Reviews* **18(3-4)**:187-279.(1999).
42. LICHT JD, STERNBERG DW, The molecular pathology of acute myeloid leukemia, *American society of hematology*, **5**: 137-142 (2005).

43. LIU P, TARLE SA, HARJA A, CLAXTON DF, MARLTON P, FREEDMAN M, SICILIANO MJ, COLLINS FS, Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia, *Science* **261**:1041-1044 (1993).
44. LLANOS S, EFEYAN A, MONSECH J, DOMINGUEZ O, SERRANO M A, High-throughput loss-of-function screening identifies novel p53 regulators, *Cell Cycle* **5(16)**:1880-1885 (2006).
45. LOOK AT, Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias, *science*, **278(5340)**:1059-64 (1997).
46. MARCUCCI G, MAHARRY K, WHITMAN SP, VUKOSAVLJEVIC T, PASCHKA P, LANGER C, MRÓZEK K, BALDUS CD, CARROLL AJ, POWELL BL, KOLITZ JE, LARSON RA, BLOOMFIELD CD, High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study, *Journal of Clinical Oncology* **25(22)**:3337-3343 (2007).
47. MARCUCCI G, MRÓZEK K, BLOOMFIELD CD, Molecular heterogeneity and prognostic biomarkers in adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics, *Current Opinion in Hematology* **12(1)**:68-75 (2005).
48. MARTINS SLR, FALCÃO RP, A importância da imunofenotipagem na leucemia mielóide aguda, *Revista da Associação Médica Brasileira*, **46**: 1-11 (2000).
49. MATTA A, BAHADUR S, DUGGAL R, GUPTA SD, RALHAN R, Over-expression of 14-3-3zeta is an early event in oral cancer, *BMC Cancer* **7**:169 (2007).
50. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – MS/INCA. (2008). Incidência de câncer no Brasil - Estimativa 2008. Disponível em: www.inca.gov.br. Acesso em 16 mar 2008.
51. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – MS/INCA. (2008). Tipos de câncer: Leucemias. www.inca.gov.br. Acesso em 16 mar 2008.
52. MRÓZEK K, DÖHNER H, BLOOMFIELD CD, Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances, *Current Opinion in Hematology* **14(2)**:106-14 (2007a).

53. MRÓZEK K, HEEREMA NA, BLOOMFIELD CD, Cytogenetics in acute leukemia, *Blood Reviews*, **18**: 115-136 (2004).
54. MRÓZEK K, HEINONEN K, DE LA CHAPELLE A, BLOOMFIELD CD, Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Seminars in Oncology*, **24**: 17-31(1997).
55. MRÓZEK K, MARCUCCI G, PASCHKA P, WHITMAN SP, BLOOMFIELD CD, Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification?, *Blood* **109(2)**:431-448 (2007b).
56. MRÓZEK K, PRIOR TW, EDWARDS C, MARCUCCI G, CARROLL AJ, SNYDER PJ, KODURU PR, THEIL KS, PETTENATI MJ, ARCHER KJ, CALIGIURI MA, VARDIMAN JW, KOLITZ JE, LARSON RA, BLOOMFIELD CD, Comparison of cytogenetic and molecular genetic detection of t(8;21) and inv(16) in a prospective series of adults with de novo acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study, *Journal of Clinical Oncology* **19(9)**:2482-2492 (2001).
57. OHTAKE S, Acute myeloid leukemia, *Gan To Kagaku Ryoho. Cancer & Chemoterapy* **34(13)**:2175-2179 (2007).
58. OKUDA T, CAI Z, YANG S, LENNY N, LYU CJ, VAN DEURSEN JM, HARADA H, DOWNING JR, Expression of a Knocked-In AML1-ETO Leukemia Gene Inhibits the Establishment of Normal Definitive Hematopoiesis and Directly Generates Dysplastic Hematopoietic Progenitors, *Blood*, **91**: 3134-3143 (1998).
59. OLOFSSON, A.M. , VESTBERG, M. , HERWALD, H. , RYGAARD, J. , DAVID, G. , ARFORS, K.E. , LINDE, V. , FLODGAARD, H. , DEDIO, J. , MÜLLER-ESTERL, W, Heparin-binding protein targeted to mitochondrial compartments protects endothelial cells from apoptosis, *Journal do Clinical Investigation* **104 (7)**:885-894 (1999).
60. OTA J, YAMASHITA Y, OKAWA K, KISANUKI H, FUJIWARA S, ISHIKAWA M, CHOI YL, UENO S, OHKI R, KOINUMA K, WADA T, COMPTON D, KADOYA T, MANO H, Proteomics analysis of hematopoietic stem cell-like fractions in leukemic disorders, *Oncogene* **22**: 5720-5728 (2003).

61. OVELAND E, FLADMARK KE, WERGELAND L, GJERTSEN BT, HOVLAND R, Proteomics approaches to elucidate oncogenic tyrosine kinase signaling in myeloid malignancies, *Current Pharmaceutical Biotechnology* **7(3)**:185-198 (2006).
62. PAJUELO-GÁMEZ JC, CERVERA J, GARCÍA-CASADO Z, MENA-DURÁN AV, VALENCIA A, BARRAGÁN E, SUCH E, BOLUFER P, SANZ MA, MLL amplification in acute myeloid leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **174(2)**:127-131 (2007).
63. PALMISANO M, GRAFONE T, OTTAVIANI E, TESTONI N, BACCARANI M, MARTINELLI G, NPM1 mutations are more stable than FLT3 mutations during the course of disease in patients with acute myeloid leukemia, *Haematologica* **92(9)**:1268-1269 (2007).
64. PETRICOIN EF 3RD, BICHSEL VE, CALVERT VS, ESPINA V, WINTERS M, YOUNG L, BELLUCO C, TROCK BJ, LIPPMAN M, FISHMAN DA, SGROI DC, MUNSON PJ, ESSERMAN LJ, LIOTTA LA, Mapping molecular networks using proteomics: a vision for patient-tailored combination therapy, *Journal of clinical oncology* **23(15)**:3614-3621 (2005).
65. PIZZATTI L, SÁ LA, DE SOUZA JM, BISCH PM, ABDELHAY E, Altered protein profile in chronic myeloid leukemia chronic phase identified by a comparative proteomic study, *Biochimica et biophysica acta*, **1764(5)**:929-942 (2006).
66. RABBITS TH, Chromosomal translocations in human cancer, *Nature*, **372(6502)**:143-149 (1994).
67. REDNER RL, RUSH EA, FAAS S, RUDERT WA, COREY SJ, The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion, *Blood* **87**:882-886 (1996).
68. REES-UNWIN KS, MORGAN GJ, DAVIES FE, Proteomics and the haematologist, *Clinical and Laboratory Haematology* **26(2)**:77-86 (2004).
69. REZAUL K, WU L, MAYYA V, HWANG SI, HAN D, A systematic characterization of mitochondrial proteome from human T leukemia cells, *Molecular & Cellular Proteomics* **4(2)**:169-181 (2004).
70. RICE KL, LICHT JD, HOX deregulation in acute myeloid leukemia, *The Journal of Clinical Investigation* **117(4)**:865-868 (2007).

71. ROWE D, COTTERILL SJ, ROSS FM, BUNYAN DJ, VICKERS SJ, BRYON J, MCMULLAN DJ, GRIFFITHS MJ, REILLY JT, VANDENBERGHE EA, WILSON G, WATMORE AE, BOWN NP, Cytogenetically cryptic AML1-ETO and CBF beta-MYH11 gene rearrangements: incidence in 412 cases of acute myeloid leukaemia, *Brasilian Journal Haematology* **111(4)**:1051-1056 (2000).
72. SAHIN FI, KIZILKILIC E, BULAKBASI T, YILMAZ Z, BOGA C, OZALP O, KARAKUS S, OZDOGU H, Cytogenetic findings and clinical outcomes of adult acute myeloid leukaemia patients, *Clinical and Experimental Medicine* **7(3)**:102-107 (2007).
73. SCHNITTGER S, KINKELIN U, SCHOCH C, HEINECKE A, HAASE D, HAFERLACH T, BÜCHNER T, WÖRMANN B, HIDDEMANN W, GRIESINGER F, Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML, *Leukemia* **14(5)**:796-804 (2000).
74. SCHNITTGER S, SCHOCH C, KERN W, MECUCCI C, TSCHULIK C, MARTELLI MF, HAFERLACH T, HIDDEMANN W, FALINI B, Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype, *Blood* **106(12)**:3733-3739 (2005).
75. SCHOLL C, BANSAL D, DÖHNER K, EIWEN K, HUNTLY BJ, LEE BH, RÜCKER FG, SCHLENK RF, BULLINGER L, DÖHNER H, GILLILAND DG, FRÖHLING S, The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed in most cases of acute myeloid leukemia and promotes leukemogenesis, *The Journal of Clinical Investigation* **117(4)**:1037-1048 (2007).
76. SESSIONS J, Chronic myeloid leukemia in 2007, *American Journal of Health-System Pharmacy*, **64**:4-9 (2007).
77. SHI Y, CHEN L, LIOTTA LA, WAN HH, RODGERS GP, Glia maturation factor gamma (GMFG): a cytokine-responsive protein during hematopoietic lineage development and its functional genomics analysis, *Genomics Proteomics Bioinformatics* **4(3)**:145-155 (2006).
78. SJØHOLT G, BEDRINGAAS SL, DØSKELAND AP, GJERTSEN BT, Proteomic strategies for individualizing therapy of acute myeloid leukemia (AML), *Current Pharmaceutical Biotechnology* **7(3)**:159-170 (2006).

79. SKÖLD S, ZEBERG L, GULLBERG U, OLOFSSON T, Functional dissociation between proforms and mature forms of proteinase 3, azurocidin, and granzyme B in regulation of granulopoiesis, *Experimental Hematology* **30(7)**:689-696 (2002).
80. SLOVAK ML, KOPECKY KJ, CASSILETH PA, HARRINGTON DH, THEIL KS, MOHAMED A, PAIETTA E, WILLMAN CL, HEAD DR, ROWE JM, FORMAN SJ, APPELBAUM FR, Karyotypic analysis predicts outcome of pre-remission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study, *Blood* **96(13)**:4075-4083 (2000).
81. SMITH DL, EVANS CA, PIERCE A, GASKELL SJ, WHETTON AD, Changes in the proteome associated with the action of Bcr-Abl tyrosine kinase are not related to transcriptional regulation, *Molecular & Cellular Proteomics* **1(11)**:876-884 (2002).
82. STEUDEL C, WERMKE M, SCHAICH M, SCHÄKEL U, ILLMER T, EHNINGER G, THIEDE C, Comparative analysis of MLL partial tandem duplication and FLT3 internal tandem duplication mutations in 956 adult patients with acute myeloid leukemia, *Genes Chromosomes Cancer* **37(3)**:237-251 (2003).
83. STIREWALT DL, MESHINCHI S, KUSSICK SJ, SHEETS KM, POGOSOVA-AGADJANYAN E, WILLMAN CL, RADICH JP, Novel FLT3 point mutations within exon 14 found in patients with acute myeloid leukaemia, *Brasilian Journal of Haematology* **124(4)**:481-484 (2004).
84. THIEDE C, KOCH S, CREUTZIG E, STEUDEL C, ILLMER T, SCHAICH M, EHNINGER G, Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML), *Blood* **107(10)**:4011-4020 (2006).
85. THIEDE C, STEUDEL C, MOHR B, SCHAICH M, SCHÄKEL U, PLATZBECKER U, WERMKE M, BORNHÄUSER M, RITTER M, NEUBAUER A, EHNINGER G, ILLMER T, Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis, *Blood* **99(12)**:4326-4335 (2002).
86. TKACHUK DC, KOHLER S, CLEARY ML, Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias, *Cell* **71**:691-700 (1992).

87. TOSI P, VISANI G, OTTAVIANI E, TESTONI N, PELLACANI A, TURA S, Inv(16) acute myeloid leukemia cells show an increased sensitivity to cytosine arabinoside in vitro, *European Journal of Haematology* **60(3)**:161-165 (1998).
88. TSUTSUMI C, UEDA M, MIYAZAKI Y, YAMASHITA Y, CHOI YL, OTA J, KANEDA R, KOINUMA K, FUJIWARA S, KISANUKI H, ISHIKAWA M, OZAWA K, TOMONAGA M, MANO H, DNA microarray analysis of dysplastic morphology associated with acute myeloid leukemia, *Experimental Hematology* **32**: 828-835 (2004).
89. UNWIN RD, WHETTON AD, How will haematologists use proteomics ?, *Blood Review* **21(6)**:315-26 (2007).
90. VÄLINEVA T, YANG J, PALOVUORI R, SILVENNOINEN O, The transcriptional co-activator protein p100 recruits histone acetyltransferase activity to STAT6 and mediates interaction between the CREB-binding protein and STAT6, *The Journal of Biological Chemistry* **280(15)**:14989-14996 (2005).
91. VANDENBOGAERT M, LI-THIAO-TÉ S, KALTENBACH HM, ZHANG R, AITTOKALLIO T, SCHWIKOWSKI B, Alignment of LC-MS images, with applications to biomarker discovery and protein identification, *Proteomics* **8(4)**:650-672 (2008).
92. WHITMAN SP, LIU S, VUKOSAVLJEVIC T, RUSH LJ, YU L, LIU C, KLISOVIC MI, MAHARRY K, GUIMOND M, STROUT MP, BECKNELL B, DORRANCE A, KLISOVIC RB, PLASS C, BLOOMFIELD CD, MARCUCCI G, CALIGIURI MA, The MLL partial tandem duplication: evidence for recessive gain-of-function in acute myeloid leukemia identifies a novel patient subgroup for molecular-targeted therapy, *Blood* **106(1)**:345-352 (2005).
93. YERGEAU DA, HETHERINGTON CJ, WANG Q, ZHANG P, SHARPE AH, BINDER M, MARIN-PADILLA M, TENEN DG, Embryonic lethality and impairment of hematopoiesis in mice heterozygous for an AML1-ETO fusion gene, *Nature Genetics*, **15**: 303-306 (1997).
94. YOCUM AK, BUSCH CM, FELIX CA, BLAIR IA, Proteomics-Based Strategy to Identify biomarkers and pharmacological targets in leukemias with t(4;11) translocations, *Journal of proteome research*, **5**: 2743-2753 (2006).

95. YOUNG TW, MEI FC, ROSEN DG, YANG G, LI N, LIU J, CHENG X, Up-regulation of tumor susceptibility gene 101 protein in ovarian carcinomas revealed by proteomics analyses, *Molecular & Cellular Proteomics* **6(2)**:294-304 (2007).

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](#)