

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
*Instituto de Bioquímica Médica*

Guilherme Augusto Piedade de Oliveira

Orientador: Prof. Jerson Lima da Silva  
Co-orientador: Mônica Santos de Freitas  
Ivone Betriz Otazu



**Aspectos Clínicos e Termodinâmicos da Leucemia Mielóide  
Crônica (LMC)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Bioquímica  
Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) como um  
dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Rio de Janeiro

2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Guilherme Augusto Piedade de Oliveira

Aspectos Clínicos e Termodinâmicos da Leucemia Mielóide Crônica (LMC)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Jerson Lima da Silva

Co-orientador: Mônica Santos de Freitas

Ivone Betriz Otazu

Rio de Janeiro

2009

O trabalho experimental desta tese foi realizado no Laboratório de Termodinâmica de Proteínas e Estruturas Virais Gregorio Weber, do Instituto de Bioquímica Médica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação do Prof. Jerson Lima da Silva e co-orientação da Dra. Mônica Santos de Freitas e Dra. Ivone Beatriz Otazu com recursos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Milênio para Biologia Estrutural em Biomedicina e Biotecnologia (Programa Milênio - CNPq) e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

***Guilherme Augusto Piedade de Oliveira***

***Aspectos Clínicos e Termodinâmicos da Leucemia Mielóide Crônica  
(LMC)***

Tese submetida ao corpo docente do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários a obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Data de aprovação: \_\_/\_\_/\_\_

**Orientador:**

---

- *Dr. Jerson Lima da Silva*

Doutor em 1987, pela Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
Prof. Titular do Instituto de Bioquímica Médica/ UFRJ.

**Revisor interno / Suplente Interno:**

---

- *Dr. Marcius da Silva Almeida*

Doutor em 2001 pela Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica/ UFRJ.

**Membros Titulares da Banca:**

---

- *Dr<sup>a</sup>. Maria Lucia Bianconi*

Doutora em 1990 pela Universidade de São Paulo,  
Prof<sup>a</sup>. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica/ UFRJ.

---

- *Dr<sup>a</sup>. Cláudia Vitória de Moura Gallo*

Doutora em 1993 pela Université Paris VII – Jussieu,  
Prof<sup>a</sup>. Adjunto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro/ UERJ.

---

- *Dr. Julio Alberto Mignaco*

Doutor em 1995 pela Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica/ UFRJ.

**Suplente Externo:**

---

- *Dr<sup>a</sup>. Yraima Moura Lopes de Cordeiro*

Doutora em 2005 pela Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
Prof<sup>a</sup>. Adjunto do Departamento de Fármacos/ UFRJ.

*A minha família*  
*A os meus pais:*

*André Luis Augusto de Oliveira*  
*Cleuza Piedade de Oliveira*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, André Luis Augusto de Oliveira e Cleuza Piedade de Oliveira, por me darem total apoio em todos os momentos de minha vida. Sem dúvida nenhuma, essas duas figuras ilustres representam os meus alicerces nesta vida. Nunca passei por uma situação de conflito, tristeza, dúvida ou medo sozinho. Sempre tive comigo as palavras dóceis e o incondicional apoio deles. Todos os dias agradeço por ter nascido filho de André Luis Augusto de Oliveira e Cleuza Piedade de Oliveira, e com eles ter tido a honra de aprender o significado do respeito, do caráter, da disciplina e da perseverança.

As forças superiores que me deram saúde e força para concluir esse trabalho de dissertação. Obrigado por me fornecerem a inteligência, a frieza e a calma de pensar diante das dúvidas ou das situações aparentemente sem saída. Tenho plena certeza que a cada dia terei mais força para prosseguir com minha jornada. Esse trabalho é só o começo.

Aos meus avós (*in memoriam*), Domingos Luis Piedade e Venina Francisca Piedade, por terem participado de minha infância e terem feito dela uma das melhores fases de minha vida. Como eu sinto falta do barrão do vô no final da tarde e as pipocas doce do Carlitos, sem contar com a comida da vó, que ninguém fazia igual. A falta que vocês me fazem é algo incalculável, mas obrigado por deixarem na memória de minha mãe e na minha a majestade que foram em vida.

A minha mestre, Ivone Beatriz Otazu, que eu posso chamá-la de segunda mãe. Ivone simplesmente me ensinou a ser um pesquisador de qualidade, me ensinou a lidar com as pessoas frágeis e também com as difíceis. Me mostrou que a vida na ciência é muitas vezes difícil, mas que nunca devemos deixar de correr atrás de nossos objetivos. Ela é uma pessoa que marcou minha vida científica e que eu sempre quero ter por perto. Mesmo com Ivone morando muito longe de mim agora, ainda sinto quase sempre seus ensinamentos de segunda mãe, soando suavemente em meus ouvidos. Estou muito feliz em saber agora, que reencontrarei minha querida orientadora em uma nova visão de mundo.

Ao meu mestre, Jerson Lima da Silva, por confiar em minha capacidade de realizar um trabalho científico e por estar sempre disposto a uma nova caminhada científica. Assim como Ivone, Jerson é no mundo da ciência como meu segundo pai. Mesmo com seu tempo muito disputado, nunca faltou em me dar apoio e incentivo. Pessoa tranquila, de convivência agradável somente com as suas atitudes diárias me ensinou algo que levarei por toda minha vida: a convivência pacífica com seus semelhantes é uma das chaves para o sucesso. Agradeço e muito pelos conselhos de amigo e por me permitir uma nova experiência de vida fora do país.

A minha mestre Mônica Santos de Freitas, que sem dúvida alguma foi de fundamental importância para abrir meus horizontes científicos. Muito do que aprendi ao longo de minha formação, eu devo a ela. Eu nunca conheci uma pessoa tão devota em ajudar aos seus semelhantes. Certamente essa sua virtude, você conseguiu transferir para mim, hoje eu me sinto super satisfeito em ajudar os demais. Sou muito sortudo em ter caído nas mãos de Moniquinha, pessoa de uma educação nobre e de uma inteligência única, que desde o começo me mostrou o caminho correto e me enriqueceu com seus conselhos e ensinamentos.

A professora Débora Foguel, que sempre me atendeu com um sorriso nos lábios e sempre se prontificou em ajudar.

Aos professores André e Andrea por todo o carinho e respeito ao longo de todos esses anos.

Aos meus tios e primas Celso, Rúbia, Regina, Cícero Nathália e Nastaja, que de muito recordo minha fase de infância e que sempre quando lembro me enchem os olhos de lágrimas por pensar que aquela época não mais voltará. Tio Celso sempre me machucando com aquelas brincadeiras loucas, tio Cícero sempre sério mas que quase sempre caíamos na gargalhada, tia Regina com seu jeito único de alegrar os outros e minha priminha Nathália, que mais convivi, sempre lembro de nós fazendo travessuras na piscina de Águas da Prata.

Aos meus amigos mais que irmãos Carlos e Chica (Leonardo). Esses caras são daquele tipo de pessoa que você não seleciona assunto. Você pode falar tudo, contar tudo. Estão sempre presentes para uma diversão ou para um papo cabeça. Estou mais que certo que essas duas amizades eu vou levar para sempre comigo. Eles são os irmãos que eu não tive.



Ao meu amigão Fabianno, que cresceu comigo dentro do laboratório e que recentemente ganhou uma filhota linda.

A minha amiga Cristiane Latgé, que em tão pouco tempo passou de uma simples colega de laboratório para um amiga do coração, pela qual nunca quero perder. Mulher de olhar penetrante, temperamento difícil, muito carinhosa e sempre disposta a ajudar as pessoas. Não sei mais viver sem sua amizade.

A minha amiga Nathy, que eu sempre tive uma amizade super afetuosa. Sempre me ajudava durante as aulas e no laboratório. Amizade pura de sentimento verdadeiro, Nathy certamente é a amiga que todas as pessoas procuram. Não sei mais viver sem seu carinho, suas palavras doces e sua alegria de viver e aproveitar a vida com a moral e o caráter que só você possui.

Ao meu amigão Theo, que também em pouco tempo se transformou em uma das pessoas mais queridas no laboratório. Seus sábios conselhos e seu espírito doido de aproveitar a vida aproximou bastante nossa amizade. Rapaz de grande educação e inteligência, certamente quero levar essa amizade para sempre.

A minha querida Fernanda, que apesar de recente, já me fez sentir algo único, jamais vivido anteriormente. Percebi com ela, que nessa vida, somos capazes de encontrar a grande felicidade e que só depende de nós mesmos para preservá-la. Depois de conhecê-la, tenho certeza de que todo ser humano é capaz de encontrar a pessoa amada, a pessoa que completa seus pensamentos, e que as aparentes diferenças, podem representar a simples complementariedade perfeita. Eu te amo!

A todos do laboratório LTPV, LAPA e ao CNRMN pelas ajudas e discussões concedidas.

## RESUMO

Oliveira, Guilherme Augusto Piedade. **Aspectos Clínicos e Termodinâmicos da Leucemia Mielóide Crônica (LMC)**. Tese (Mestrado em Ciências) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma neoplasia que ocorre em células tronco hematopoiéticas da medula óssea. As células alteradas possuem um cromossomo adicional, conhecido como cromossomo Philadelphia (Ph), que é o resultado de uma translocação recíproca entre os genes *bcr*, presente no cromossomo 22, e o proto-oncogene *c-abl*, presente no cromossomo 9. Como resultado desta translocação t(9;22), é observada a presença de um novo gene quimérico denominado *bcr-abl*, que codificará a proteína Bcr-abl, essencial para a patogênese da LMC. O principal tratamento para a LMC consiste na terapia com Mesilato de Imatinibe (MI), inibidor competitivo capaz de barrar o fenótipo maligno da LMC pelo controle da atividade cinase da quimera Bcr-abl. A resistência ao MI é muito encontrado em pacientes pós-tratamento devido a aquisição de mutações em resíduos localizados no sítio de ligação do inibidor. Em busca de novos fármacos capazes de bloquear os efeitos deletérios causados pela LMC e mutações emergentes, um maior entendimento acerca do domínio cinase SH1 e regiões regulatórias SH2 e SH3 deve ser atingido a nível termodinâmico. Em vista disso, esse trabalho tem como principais objetivos o estabelecimento de um protocolo de purificação das construções SH3-SH2-SH1 assim como SH2-SH1 e SH1 em *E.coli* para posterior caracterização termodinâmica. Além disso buscamos compreender um pouco melhor a resposta do MI em pacientes pediátricos por monitoramento molecular, citogenético e iFISH. Os esforços na obtenção de um protocolo de purificação das construções descritas renderam o estabelecimento de um novo protocolo de expressão em *E.coli* e purificação com o uso do detergente dodecil sulfato de sódio. As construções foram purificadas em grande quantidade e em elevado grau de pureza. Duas delas (SH3-SH2-SH1 e SH2-SH1) foram purificadas em seu estado ativo (fosforiladas) e o domínio SH1 em sua conformação inativa (desfosforilada). Todas as construções apresentaram atividade biológica frente a um substrato específico. A caracterização termodinâmica, por sua vez, revelou que a unidade regulatória por completo (SH3-SH2-SH1) é mais estável quando comparada com as outras construções em ensaios de espectroscopia de fluorescência monitorando a sonda triptofano, e em ensaios por dicroísmo circular. O monitoramento molecular dos pacientes pediátricos em uso constante de MI demonstrou uma boa resposta clínica e hematológica frente ao tratamento. A terapia com MI apesar de direcionado a população adulta, se mostrou eficaz na população pediátrica, sendo, portanto uma ótima opção como primeira linha de tratamento.

## ABSTRACT

Oliveira, Guilherme Augusto Piedade. **Thermodynamic and Clinical Aspects from Chronic Myeloid Leukemia (CML)**. Tese (Mestrado em Ciências) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a neoplastic disease that occurs in hematopoietic stem cells in bone marrow compartment. These cells have an additional chromosome known as Philadelphia chromosome (Ph), result of a translocation between the bcr gene, present in chromosome 22, and c-abl oncogene, present in chromosome 9. As result of this translocation t(9,22), its observed the presence of a new chimeric gene bcr-abl that will encode a Bcr-abl protein, essential for the pathogenic of CML. The front line therapy for CML is the Imatinib Mesylate Therapy, a competitive inhibitor that blocks the maligne phenotype of CML, by controlling the kinase activity of this protein. Imatinib resistance can occur in post-treatment patients due to acquisition of mutations in residues localized in the catalytic pocket. Looking for new drugs that are able to block the effects of CML and new mutations, a better understanding must be assessed for the SH1 kinase domain and SH2 and SH3 regulatory units at thermodynamic level. For this propose, this work has as main objectives the establishment of a new purification protocol for SH3-SH2-SH1, SH2-SH1 and SH1 domains in *E. coli* for thermodynamic characterization. Furthermore, we also tried to understand better the response of Imatinib in pediatric patients by molecular, citogenetic and iFISH assays. A new expression in *E. coli* system and purification with sodium dodecyl sulfate protocol were obtained. All constructs were obtained in high yield and purity. SH3-SH2-SH1 and SH2-SH1 proteins were obtained in the active conformation (phosphorylated) and SH1 protein in inactive conformation (dephosphorylated). All proteins had biologic activity for a specific substrate. Thermodynamic characterization showed that SH3-SH2-SH1 protein was more stable when compared with the SH2-SH1 or SH1 proteins in spectroscopic assays monitoring the tryptophan and circular dichroism assays. Molecular monitoring of pediatric patients in constant use of Imatinibe Mesylate showed a good clinic and hematologic response during the therapy. In spite of treatment with Imatinibe Mesylate be able just for adults in Brazil, the use with children showed good responses, so it could also be a front-line therapy for the pediatric population.

## ABREVIATURAS

A	- absorvância
abl	- abelson
ACN	- acetonitrila
ADN	- ácido deoxiribonucleico
ADNc	- ácido deoxiribonucleico complementar
ARN	- ácido ribonucleico
ARNm	- ácido ribonucléico mensageiro
ARNr	- ácido ribonucléico ribossomal
ATM	- ataxia telangiectasia mutated
ATP	- trifosfato de adenosina
bcr	- “break cluster region”
dATP	- desoxi-adenosina trifosfato
dCTP	- desoxi-citosina trifosfato
DEPC	- dietilpirocarbonato
dGTP	- deoxi-guanosina trifosfato
dNTP	- deoxinucleotídeo trifosfato
dTTP	- deoxi-timidina trifosfato
D.O.	- densidade ótica
DTT	- ditioneitol
GAP	- GTPase activating protein
GAPDH	- gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GEF	- guanyl nucleotide exchange factor
GDP	- Difosfato de ganosina
GTP	- Trifosfato de ganosina
IAA	- Iodoacetamina
IPTG	- isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
LMC	- Leucemia mielóide crônica
NLS	- sinais de localização nuclear
PBS	- tampão fosfato de sódio
PCR	- reação em cadeia da polimerase
Ph	- Philadelphia
PMSF	- phenylmethanesulphonylfluoride
RT-PCR	- reação em cadeia da polimerase após Transcrição Reversa

SDS	- "sodium dodecyl sulfate"
SDS-PAGE	- "sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis"
SH	- "Src homolgy"
TAE	- Tampão tris-ácido acético-EDTA
Taq	- <i>Themophilus acquaticus</i> DNA polimerase
TFA	- Ácido trifluoracético
XPB	- <i>Xeroderma pigmentosum</i> b protein

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema geral da hematopoiese .....	3
FIGURA 2. Esquema ilustrando o desenvolvimento da LMC .....	11
FIGURA 3. Formação do cromossomo Philadelphia .....	12
FIGURA 4. Figura esquemática do gene bcr .....	14
FIGURA 5. Figura esquemática ilustrando o mecanismo de regulação negativa do Bcr .....	17
FIGURA 6. Figura esquemática da proteína p160 <sup>BCR</sup> .....	18
FIGURA 7. Figura esquemática das duas isoformas da proteína p145 <sup>ABL</sup> .....	20
FIGURA 8. Figura esquemática do gene c-abl .....	21
FIGURA 9. Figura esquemática da proteína p145 <sup>ABL</sup> .....	22
FIGURA 10. Figura esquemática das proteínas p190 <sup>Bcr-Abl</sup> , p210 <sup>Bcr-Abl</sup> e p230 <sup>Bcr-Abl</sup> .....	26
FIGURA 11. Estrutura de proteínas cinases na conformação ativa e inativa.....	29
FIGURA 12. Sítios de fosforilação no Abl .....	34
FIGURA 13. Regulação da cinase Abl pela molécula de miristoil .....	38
FIGURA 14. Interações SH2-SH1 na forma inativa da cinase Abl .....	40
FIGURA 15. Modelo de ativação da cinase Bcr-abl .....	42
FIGURA 16. Modelo de atuação do STI-571 .....	45
FIGURA 17. Esquema do RT-PCR Multiplex .....	54
FIGURA 18. Esquema do RT-PCR Nested .....	58
FIGURA 19. Desenho dos competidores pNC210 <sup>Bcr-abl</sup> e pNC190 <sup>Bcr-abl</sup> .....	60
FIGURA 20. Produtos amplificados por RT-PCR competitivo .....	62
FIGURA 21. Estratégia de clonagem das construções em estudo .....	66
FIGURA 22. Diagrama esquemático do ensaio cinase .....	73
FIGURA 23. Géis da amplificação das regiões de interesse e clonagem .....	91
FIGURA 24. Verificação das sequências clonadas .....	93
FIGURA 25. Varredura de condições de expressão e processamento das construções de interesse .....	95
FIGURA 26. Protocolo de purificação das construções em estudo .....	96
FIGURA 27. Análise das proteínas por gel filtração .....	97
FIGURA 28. Dosagem de SDS .....	98
FIGURA 29. Espectrometria de massa das proteínas em estudo .....	99
FIGURA 30. Western-blot das proteínas em estudo .....	100
FIGURA 31. Análises da co-expressão da p210-SH321 com a fosfatase YopH .....	101
FIGURA 32. Atividade cinase por um substrato específico .....	102
FIGURA 33. Espectros de triptofano das proteínas em estudo .....	103
FIGURA 34. Espectros de triptofanos após tratamento com uréia .....	104
FIGURA 35. Análises por Dicroísmo circular .....	106
FIGURA 36. Curvas de centro de massa espectral com agentes desnaturantes .....	107
FIGURA 37. Curva de desnaturação térmica .....	109
FIGURA 38. Curva de ligação a bis-ANS .....	110

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Características bcr e c-abl .....	23
TABELA 2. Pontos de quebra incomuns no bcr e c-abl .....	26
TABELA 3. Características Bcr-abl .....	27
TABELA 4. Sítios de fosforilação mapeados no Abl .....	34
TABELA 5. Síntese de ADNc .....	51
TABELA 6. Iniciadores e condições experimentais de RT-PCR qualitativo e competitivo Bcr-abl .....	55
TABELA 7. Reagentes para RT-PCR bcr-abl .....	56

## ÍNDICE

1	Introdução .....	1
1.1	Biologia das Leucemias .....	1
1.2	Considerações gerais sobre a Hematopoiese.....	1
1.3	Considerações gerais sobre a diversidade biológica das Leucemias.....	4
1.3.1	Neoplasias linfóides.....	4
1.3.2	Neoplasias Mielóides .....	5
1.3.3	Neoplasias da linhagem dos monócitos e macrófagos.....	6
1.3.4	Neoplasias de mastócitos .....	7
1.4	Aspectos Clínicos e Epidemiológicos da LMC .....	8
1.5	Aspectos Celulares da Leucemia Mielóide Crônica .....	9
1.6	Aspectos Moleculares da Leucemia Mielóide Crônica.....	11
1.6.1	O Gene bcr.....	13
1.6.2	O gene c-abl.....	19
1.6.3	O gene quimérico bcr-abl.....	23
1.7	Estrutura e catálise do domínio catalítico (SH1) da cinase Abl.....	27
1.8	Mecanismos de Regulação do Abl e do Bcr-abl .....	29
1.8.1	Primeiro evento – Autofosforilação do Abl.....	31
1.8.2	Segundo evento – Desacoplamento do domínio SH3.....	35
1.8.3	Terceiro evento – Desacoplamento da molécula de ácido mirístico..	35
1.8.4	Quarto evento - Desacoplamento do domínio SH2 e ligação de fosfopeptídeos.....	38
1.8.5	Mecanismos de regulação perdidos no Bcr-abl.....	40
1.9	Opções de tratamento para a LMC.....	42
2	Objetivos .....	46
2.1	Objetivos gerais.....	46
2.2	Objetivos específicos.....	46
3	Materiais e Métodos.....	47
3.1	Aquisição de amostras .....	47
3.2	Isolamento de células mononucleares da medula óssea.....	47
3.3	Contagem de células.....	48
3.4	Isolamento de ARN.....	48
3.4.1	Método de Isolamento de ARN com Trizol.....	48
3.4.2	Método de Isolamento de ARN com Tiocianato de Guanidina.....	49
3.5	Quantificação do ARN por espectrofotometria.....	50
3.6	Avaliação da Integridade do ARN.....	50
3.7	Síntese do ADNc pela Transcriptase Reversa.....	50
3.8	Amplificação do ADNc para os transcritos bcr-abl por meio do RT-PCR.....	52
3.8.1	RT-PCR Multiplex.....	53
3.8.2	RT-PCR Nested.....	57
3.8.3	RT-PCR Competitivo.....	58
3.8.3.1	RT-PCR p210 <sup>Bcr-abl</sup> e p190 <sup>Bcr-abl</sup> .....	58
3.8.3.2	RT-PCR para transcritos abl.....	61
3.9	Criação de células competentes para choque térmico e transformação.....	63
3.10	Clonagem em E. coli .....	64
3.11	Obtenção de plasmídeos por minipreparações.....	66



3.12 Sequenciamento de ADN.....	67
3.13 Processamento das células e purificação das proteínas.....	68
3.14 Gel Filtração das amostras purificadas.....	70
3.15 Dosagem de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS).....	70
3.16 Espectometria de massa.....	71
3.17 Atividade cinase.....	72
3.18 Western-blot.....	73
3.19 Análises espectroscópicas.....	74
3.19.1 Espectro de triptofano.....	74
3.19.2 Desnaturação química.....	75
3.19.3 Espectros de bis-ANS.....	77
3.19.4 Dicroísmo Circular.....	77
4 Resultados.....	78
4.1 Monitoramento de pacientes pediátricos em tratamento com Mesilato de Imatinibe.....	78
4.2 Expressão e purificação da unidade regulatória da proteína Bcr-abl.....	91
4.3 Início da caracterização termodinâmica das construções p210-SH321, p210- $\Delta$ SH3 e p210- $\Delta$ SH3/SH2.....	102
5 Discussão.....	111
6 Conclusão.....	124
Referências.....	126
Anexo .....	145
Curriculum Vitae .....	146

## **1 Introdução**

### **1.1 Biologia das Leucemias**

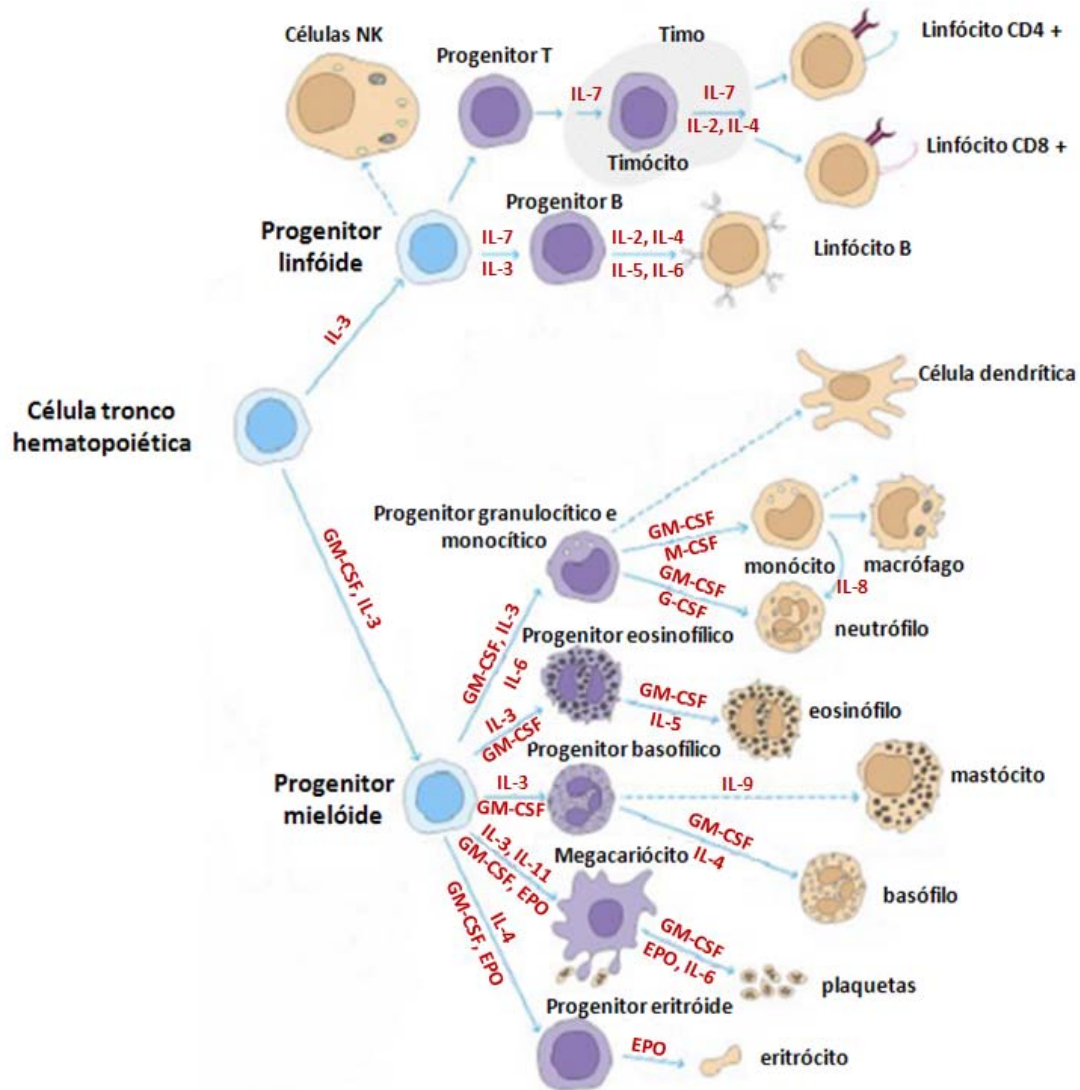
A Leucemia pode ser definida como a proliferação ou expansão incontrolada de células hematopoiéticas que não retêm a capacidade de diferenciar-se normalmente em células maduras do sangue. As leucemias são doenças extremamente heterogêneas. No entanto, uma abordagem biológica da natureza dos processos leucêmicos permite delinear características comuns a todas elas: origem e expansão clonal, desregulação de funções celulares básicas como diferenciação, proliferação e morte celular, decorrente da presença de alterações genéticas específicas e evolução em múltiplas etapas, mediante acumulação progressiva de alterações e aquisição de vantagem proliferativa ou sobrevivência diferencial em relação às células normais. Em sua grande maioria, as leucemias ocorrem pela transformação de um progenitor com comprometimento para linhagem linfóide ou mielóide. Como consequência, as leucemias são primariamente classificadas em mielóides e linfóides, de acordo com o determinado pela morfologia celular e pelo tipo de marcadores celulares encontrados (FOON e TODD, 1986). Em termos gerais, as neoplasias do sistema hematopoiético (leucemias e linfomas) parecem originar-se em três níveis na sequência de diferenciação das linhagens: células-tronco hematopoiéticas, progenitores pluripotentes e células periféricas.

### **1.2 Considerações gerais sobre a Hematopoiese**

Um modelo para compreender a origem e progressão das leucemias se baseia em relacionar os mecanismos leucemogênicos específicos com alterações dos mecanismos

homeostáticos normais que regulam a produção e diferenciação de células do sangue. A hematopoiese é o processo pelo qual são formadas e amadurecidas as células e os elementos figurados do sangue. A integridade do sistema hematopoiético é mantida por uma população de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes e auto-renováveis, que possuem a capacidade de originar todos os elementos do sangue: eritrócitos, granulócitos, monócitos, linfócitos e plaquetas (**Figura 1**). Este é um processo complexo, hierárquico e extremamente ordenado, que envolve tanto a autorenovação das células-tronco hematopoiéticas quanto a diferenciação, expansão e morte da prole destas células.

A progressão ao longo da cascata de diferenciação decorre do desenvolvimento de um programa de expressão gênica estritamente controlada e orquestrada por um conjunto de fatores de transcrição (**Figura 1**). Este programa se desenvolve de forma autônoma e pode ser estimulado por sinais resultantes das interações celulares entre as células-tronco hematopoiéticas e células do estroma, assim como da expressão de moléculas solúveis (citocinas) ou de superfície (receptores e moléculas de adesão).



**Figura 1. Esquema geral da hematopoiese.** O esquema ilustra o processo de hematopoiese. Todos os elementos do sangue se originam a partir de uma célula-tronco pluripotencial na medula óssea. As diferentes linhagens amadurecem na medula óssea, com exceção do linfócito T, que o faz no timo. As diferentes moléculas envolvidas com o processo de diferenciação das células estão representadas em vermelho. Os progenitores intermediários foram omitidos.

### **1.3 Considerações gerais sobre a diversidade biológica das Leucemias**

As doenças neoplásicas hematopoiéticas podem comprometer linhagens linfóides ou mielóides, os macrófagos e seus precursores ou os mastócitos. As doenças que comprometem as diversas linhagens diferem não apenas quanto ao seu quadro citomorfológico, mas também quanto ao aspecto clínico, incluindo evolução e resposta ao tratamento.

#### 1.3.1 Neoplasias Linfóides

Compreendem doenças que apresentam características clínicas e morfológicas bastante variáveis. Originam-se de linfócitos das linhagens T, B ou NK que podem estar em diferentes estágios de maturação. Assim, as leucemias agudas originam-se dos precursores linfóides primitivos, enquanto as leucemias linfóides crônicas e o mieloma múltiplo derivam de linfócitos mais diferenciados. Ademais, as neoplasias podem, no seu início, ser localizadas, como ocorre nos linfomas, que comprometem predominantemente os linfonodos. Alternativamente a infiltração neoplásica pode ser generalizada, desde o seu início, como acontece nas leucemias onde existe a infiltração da medula óssea e de outros órgãos. Do ponto de vista histórico, as neoplasias linfóides originadas da medula óssea são denominadas leucemias, enquanto as originadas de qualquer outro órgão linfóide são identificadas como linfomas.

O linfoma de Hodgkin é definido pela presença das células malignas de Reed-Sternberg e células de Hodgkin, em um substrato celular apropriado, e comprometem, em 80% dos casos, os linfonodos cervicais. Por outro lado, os linfomas não-hodgkin são um grupo heterogêneo de doenças clonais das linhagens T, B ou NK que podem

originar-se em qualquer órgão do sistema linfóide (linfonodos, timo, baço, pele ou tecido linfóide associado ao sistema digestivo) ou então ter uma origem extralinfóide, como pulmão, cérebro, tireóide ou gônadas.

Nas leucemias linfóides agudas, a proliferação e o acúmulo de linfoblastos na medula óssea determinam a supressão da hematopoiese normal, que resulta em anemia, neutropenia e plaquetopenia. Além disso, a infiltração extramedular resulta em esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia e no comprometimento de meninges e gônadas. Na leucemia linfocítica crônica, (LLC) a principal característica é o acúmulo de linfócitos B CD5 + na medula óssea, sangue periférico e órgãos linfóides.

As neoplasias de células plasmocitárias representam a proliferação clonal de plasmócitos e plasmoblastos e são, geralmente, acompanhadas de proteinemia monoclonal. O mieloma múltiplo compromete predominantemente, a medula óssea de forma generalizada, sendo pouco comum que se dissemine, invadindo o sangue periférico e outros órgãos. Ao contrário, a leucemia plasmocítica infiltra desde o seu início a medula óssea e o sangue periférico.

### 1.3.2 Neoplasias Mielóides

As doenças mieloproliferativas clonais resultam de uma mutação de uma célula progenitora pluripotencial que mantém a capacidade, embora de maneira imperfeita, de diferenciação e maturação para cada uma das linhagens mielóides. Por outro lado, o clone neoplásico suprime a multiplicação e a diferenciação das linhagens normais, levando habitualmente a anemia, neutropenia e plaquetopenia, que são reversíveis. As síndromes mielodisplásicas compartilham uma propensão a citopenias, medula hiperplástica e alterações displásicas. Nas leucemias mielóides agudas, os blastos

leucêmicos podem ter características morfológicas e imunofenotípicas das células eritóides, monocíticas megacariocíticas, de mieloblastos ou promielócitos. As leucemias crônicas da linhagem mielóide, incluem a leucemia mielóide crônica clássica Ph+, tema de estudo desta dissertação, a leucemia neutrofilica crônica, a leucemia eosinofílica crônica, a leucemia mielomonocítica juvenil e a leucemia mielomonocítica crônica. A mielofibrose idiopática constitui também uma proliferação neoplásica da linhagem mielóide que apresenta fibrose de medula óssea acompanhada de esplenomegalia. Na policitemia vera e na trombocitemia essencial, a proliferação neoplásica resulta na formação de células com características morfológicas e funcionais muito próximas das normais, porém em número excessivo. Uma característica das doenças mieloproliferativas é a possibilidade de evolução de uma doença para outra e a presença de quadros hematológicos mistos.

### 1.3.3 Neoplasias da linhagem dos monócitos e macrófagos

As doenças histiocíticas clonais incluem a histiocitose de células de langerhans e a histiocitose maligna. A histiocitose de células de langerhans pode ser localizada na pele, ossos, ou em qualquer outro órgão, ou ser generalizada. A histiocitose maligna é usualmente generalizada, comprometendo a medula óssea, linfonodos, fígado e baço, podendo ser confundida com linfomas.

### 1.3.4 Neoplasias de mastócitos

As mastocitoses são doenças raras caracterizadas pela infiltração anormal de mastócitos na pele, medula óssea, sangue, linfonodos, fígado, baço e trato gastrointestinal. A apresentação clínica varia de uma doença indolente (mastocitose indolente), passando pelas mastocitoses associadas a doenças hematológicas, e chegando a formas agressivas como a leucemia de mastócitos e mastocitose agressiva. Abaixo estão resumidas as neoplasias hematopoéticas (**Quadro 1**) descritas brevemente nesta dissertação.

<b>Quadro 1</b> <b>Sumário das Neoplasias Hematológicas</b>	
<b>Linfóides</b>	Leucemia linfóide aguda: adultos e crianças Leucemias linfóides crônicas e doenças relacionadas Linfomas não-hodgkin Linfoma de Hodgkin Neoplasias plasmocitárias
<b>Mielóides</b>	Leucemia mielóide aguda: adultos e crianças Leucemias mielóide crônica Policitemia Vera Trombocitemia essencial Mielofibrose com metaplasia mielóide Síndromes mielodisplásicas
<b>Histiocitoses clonais</b>	Histiocitose de células de Langerhans localizada sistêmica Histiocitose maligna
<b>Doenças de mastócitos</b>	



#### **1.4 Aspectos Clínicos e Epidemiológicos da Leucemia Mielóide Crônica**

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma doença clonal e maligna de células-tronco hematopoiéticas transformadas, que proliferam na medula óssea em compartimentos granulocíticos e megacariocíticos. O resultado dessa doença mieloproliferativa é a expansão clonal de uma célula primordial com capacidade transformante, que confere à sua progênie uma maior vantagem proliferativa diante dos outros elementos hematopoiéticos. A hiperplasia mielóide na medula óssea exclui gradualmente as células normais do microambiente medular o que leva a um aumento significativo desses tipos celulares no sangue periférico (GOLDMAN e MELO, 2003).

Estima-se que a incidência anual da LMC seja de 1:100.000 na população mundial adulta e 1:1.000.000 em crianças de até 10 anos (GOLDMAN, 1995) sendo a idade média para a apresentação da doença em torno de 53 anos. Os sintomas típicos consistem em: fadiga, anorexia, perda de peso, esplenomegalia e hepatomegalia. A mais comum anormalidade física detectada é a esplenomegalia que afeta 50% dos pacientes com LMC. Entre os principais achados clínicos no sangue periférico pode-se citar a elevada contagem de células brancas (acima de  $25000/\text{mm}^3$ ), elevada contagem de plaquetas entre 30 e 50% dos casos e basofilia. Na medula óssea pode-se detectar hiperplasticidade, redução no conteúdo adiposo, aumento na razão de células mielóides/eritrócitos, números aumentados de megacariócitos e blastos, juntamente com promielócitos correspondendo a menos de 10% do total de células (SAWYERS, 1999).

A LMC é uma doença bifásica com uma fase crônica inicial que progride para aguda, também conhecida como blástica (REN, 2005). A fase crônica da doença tem duração média de 3 a 4 anos. Ela é caracterizada por um quadro de trombocitose, presença menor do que 10% de blastos, 20% de blastos mais promielócitos e 20% de

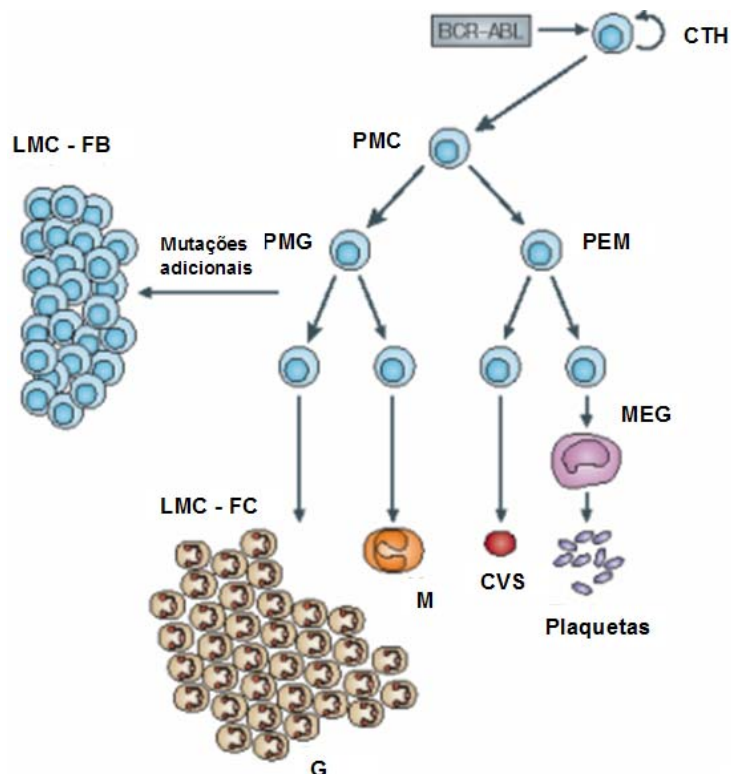
basófilos no sangue periférico e medula óssea além de nenhum envolvimento extramedular com exceção do fígado e do baço (BRANFORD e cols., 2003). Entre a fase crônica e blástica, segue uma fase de transição conhecida como acelerada de duração média de 4 a 6 meses. Esta é caracterizada pela presença entre 10 a 30% de blastos no sangue periférico ou medula óssea, 20% ou mais de blastos, mais promielócitos no sangue periférico ou medula óssea, trombocitopenia menor que  $100 \times 10^9/L$ , esplenomegalia progressiva e aquisição de anormalidades cromossômicas adicionais (BRANFORD e cols., 2003). A fase aguda da doença tem duração curta entre 3 a 6 meses seguido de óbito. Nessa fase pode ser observado o bloqueio da diferenciação celular, o que resulta na presença de mais de 30% de células imaturas (blastos), no sangue periférico e medula óssea (REN, 2005). Essas células adquirem um aumento na capacidade proliferativa e de sobrevivência assim como resistência a apoptose. A presença de novas anormalidades cromossômicas e infiltrados extramedulares são marcantes nos estágios mais tardios da doença (CALABRETTA e PERROTI, 2004).

### **1.5 Aspectos Celulares da Leucemia Mielóide Crônica**

A LMC é resultado do comprometimento de células da cascata mielóide que expressam o marcador cromossomal bcr-abl. Tanto as células hematopoiéticas imaturas como aquelas em estágios finais de diferenciação mielóide expressam tal marcador (**Figura 2**) e a cada ciclo de mielopoiese elas são renovadas na circulação, dificultando o combate à neoplasia.

A progressão da LMC para a fase blástica é amplamente discutida, porém pouco se sabe dos mecanismos envolvidos em sua aquisição. A caracterização dos fenótipos

celulares nas duas fases da doença pode trazer uma compreensão significativa, ao nível molecular e celular, dos mecanismos envolvidos na aquisição do potencial transformante. Uma das hipóteses discutidas descreve a fase crônica da LMC, como um evento “pré-leucêmico”, que promove uma vantagem proliferativa às células-tronco e progenitores, mas que carece na habilidade de favorecer o processo de auto-renovação em potencial. Tal fato leva os progenitores mielóides da fase crônica a não possuírem o potencial oncogênico por completo. Dentro desse contexto, a crise blástica da LMC ocorre quando uma célula-tronco hematopoiética “pré-leucêmica” ou uma população derivada desta emerge com um novo fenótipo de célula-tronco e adquire a capacidade de auto-renovação (JAMIESON e cols., 2004). No estágio pré-leucêmico as células-tronco e progenitores acabam por adquirir mutações, novas anormalidades cromossômicas e outros eventos epigenéticos que levam a alterações em vias de transdução de sinais e, conseqüentemente, a progressão da doença. Algumas constatações corroboram essa hipótese. Uma delas é a ativação da via da  $\beta$ -catenina em progenitores mielóides comprometidos com a linhagem granulocítica e macrofágica, de pacientes em crise blástica. Esses pacientes sofrem aumento na atividade de auto-renovação e bloqueia a cascata de diferenciação, o que leva ao acúmulo de células imaturas na medula óssea que por sua vez povoam o sangue periférico (**Figura 2**) (JAMIESON e cols., 2004). Além disso, diversos oncogenes, que são ativados em decorrência de alterações cromossômicas, são também capazes de conferir propriedades de células-tronco a progenitores hematopoiéticos, favorecendo assim a progressão da doença (HUNTLY e cols., 2004).

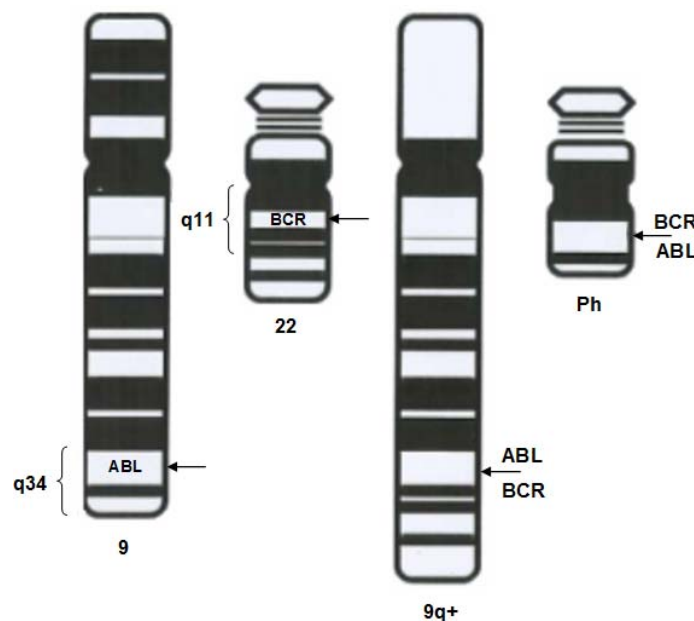


**Figura 2. Esquema ilustrando o desenvolvimento da LMC.** As Células-Tronco Hematopoéticas (CTH) iniciam na via de diferenciação mielóide dando origem aos Progenitores Mielóides Comuns (PMC). Essas células dão origem aos Progenitores de Granulócitos e Macrófagos (PMG) e aos Progenitores Megacariocíticos e Eritrocíticos (PEM). Os progenitores de granulócitos e macrófagos se diferenciam e dão origem as células em estágio final de diferenciação: os granulócitos (G), que sofrem expansão clonal em decorrência do marcador bcr-abl (fase crônica – LMC-FC), e os macrófagos (M). No decorrer da doença ocorre a progressão para a fase blástica (LMC-FB) com o acúmulo de células imaturas. Outras linhagens representadas: Células Vermelhas do sangue (CVS) e Megacariócitos (MEG). Adaptado de REN, (2005).

### 1.6 Aspectos Moleculares da Leucemia Mielóide Crônica

A LMC é o resultado de uma translocação recíproca no ADN, sem perda cromossomal, entre os braços longos do cromossomo 9 e 22, conhecida como t(9;22) (q34;q11). Essa justaposição ocorre, especificamente, entre o proto-oncogene c-abl (Abelson), localizado no cromossomo 9 e o gene bcr (“breakpoint cluster region”),

localizado no cromossomo 22. O resultado dessa alteração é a formação de um derivado cromossômico, denominado cromossomo Philadelphia (Ph), o qual é citogeneticamente visível como um cromossomo 22 encurtado (**Figura 3**). O cromossomo Ph foi descrito como a primeira anormalidade cromossômica associada a uma neoplasia (NOWELL e HUNGERFORD, 1960) e é a marca citogenética para a detecção da LMC. A translocação t(9;22) é uma fusão entre as extremidades 5' do gene bcr e 3' do gene c-abl que dão origem a um gene híbrido denominado bcr-abl, que é transcrito e traduzido em uma químera protéica, Bcr-abl. Abaixo são ilustrados os cromossomos 9 e 22 e os derivados cromossômicos formados em decorrência da translocação t(9;22) (q34;q11).



**Figura 3. Formação do cromossomo Philadelphia.** A figura mostra os cromossomos 9 e 22 normais e seus derivados cromossômicos após sofrerem justaposição entre os genes bcr e c-abl. O derivado 9q+ recebe um segmento correspondente ao gene bcr, criando o gene abl-bcr, que não codifica proteínas e não está envolvido no desenvolvimento da LMC e o derivado Ph, que recebe um segmento do gene c-abl, gerando o gene quimérico bcr-abl, que codifica proteínas diretamente relacionadas ao desenvolvimento da LMC. As setas indicam os pontos de quebra. Adaptado da tese de Doutorado de Ivone Beatriz Otazú.

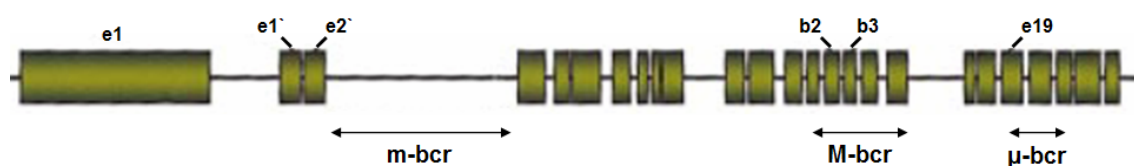
### 1.6.1 O Gene bcr

O gene bcr inteiro possui 130 kb e contém 23 éxons. O primeiro íntron que separa os éxons 1 e 2 possui 68 kb (HEISTERKAMP e cols., 1988) e inclui dois éxons alternativos, resultados de edição. Dois possíveis transcritos de 4,5 e 7 kb são formados e traduzidos em proteínas de 130 kDa (p130<sup>BCR</sup>) e 160 kDa (p160<sup>BCR</sup>), respectivamente, sendo a p160<sup>BCR</sup> predominante. Entretanto, Outras isoformas para a proteína Bcr já foram descritas (LI e cols., 1989). A fase de leitura corresponde a 3818 nucleotídeos e codifica uma proteína de 1271 aminoácidos (p160<sup>BCR</sup>) (LAURENT e cols., 2001). Três regiões susceptíveis a pontos de quebra foram caracterizadas no gene bcr (**Figura 4**) e ficaram conhecidas como m-bcr (menor-bcr ou “Minor breakcluster region”), M-bcr (maior-bcr ou “Major breakcluster region”) e  $\mu$ -bcr (micro-bcr ou “micro breakcluster region”) (PANE e cols., 2002).

É interessante que, diversos pseudogenes (bcr2, bcr3 e bcr4) relacionados ao bcr foram descritos no cromossomo 22 por hibridização in situ. Esses pseudogenes não codificam proteínas e possuem sequências na extremidade 3' idênticas as sequências do gene bcr funcional (bcr1). A extremidade 5', por sua vez é altamente variável entre eles (CROCE e cols., 1987). Existe também outro gene relacionado ao bcr, localizado no cromossomo 17p13.3. Esse gene, conhecido como abr, codifica uma proteína de 98 kDa e possui 68% de homologia com o gene bcr (HEISTERKAMP e cols., 1989).

A região promotora do gene bcr tem papel crucial no controle do estado leucêmico, visto que o gene híbrido bcr-abl é regulado pelo promotor do bcr. Regiões localizadas 5' ao gene bcr, já sequenciadas, apontam para um promotor complexo e com diversos sítios de transativação protéica. Desta forma, tem sido sugerido que tal promotor seja um dos responsáveis pela produção dos transcritos bcr-abl aberrantes e

que essa contribuição seja importante na manutenção da LMC (ZHU e cols., 1990). O gene *bcr* é expresso em todas as células (gene constitutivo), entretanto, em tecidos de embriões de galinha, camundongos e humanos, os níveis de ARNm são maiores no cérebro e em células hematopoiéticas (COLLINS e cols., 1987). A proteína codificada pelo gene *bcr* é expressa nos estágios iniciais da diferenciação mielóide e seus níveis são significativamente reduzidos ao longo de sua maturação em leucócitos polimorfonucleares (WETZLER e cols., 1993). As proteínas  $p130^{BCR}$  e  $p160^{BCR}$  podem ser localizadas no núcleo e no citoplasma das células, entretanto em alguns tipos celulares, a isoforma  $p130^{BCR}$  predomina no núcleo, ligada a heterocromatina, enquanto que a isoforma  $p160^{BCR}$  apresenta-se majoritariamente no citoplasma celular (LAURENT e cols., 2000).



**Figura 4. Figura esquemática do gene *bcr*.** Gene *bcr* dividido em éxons e introns assim como nas três regiões susceptíveis a pontos de quebra e os dois éxons alternativos resultados de edição. Os retângulos representam o posicionamento dos 23 éxons que compõem o gene e os espaços entre eles correspondem às regiões intrônicas. As regiões *e1'* e *e2'* representam os éxons resultantes da edição alternativa do gene e as setas delimitam os intervalos das três principais regiões de quebra. Os éxons *e1*, *b2*, *b3* e *e19* sofrem quebra dentro do *m-*, *M-* e *μ-bcr*, respectivamente. Adaptado de DEININGER e cols., 2000.

A funcionalidade da proteína  $p160^{BCR}$  está diretamente relacionada com o direcionamento de sinalizações de outras proteínas (DEININGER e cols., 2000). A associação da proteína a cromatina e em regiões pericromossomais durante a mitose, sugere uma possível função na regulação do ciclo celular. A  $p160^{BCR}$  juntamente com a

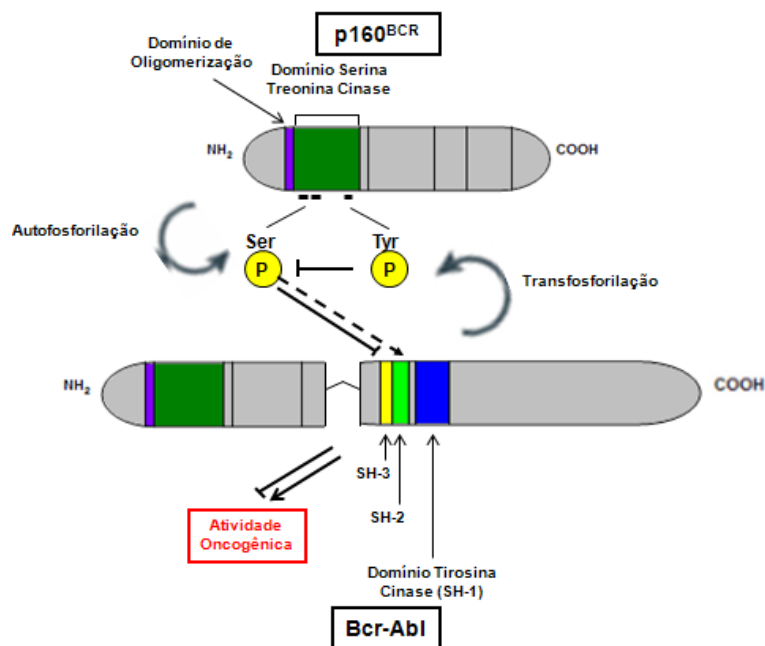
proteína “Xeroderma pigmentosum group B protein” (XPB) participam na função reparadora do ADN no início da transcrição. Outras associações com proteínas do tipo 14-3-3 na sinalização intracelular confirmam esta função reguladora no ciclo da célula (DEININGER e cols., 2000).

Diferentes domínios funcionais podem ser identificados na proteína p160<sup>BCR</sup>. A região codificada pelo primeiro éxon apresenta um domínio de oligomerização, um domínio com atividade serina/treonina cinase e regiões de ligação a “Src homology domain 2” (SH2). A região central possui domínios com sequências homólogas a vários “guanyl nucleotide exchange factor” (GEFs), os quais são ativadores de proteínas G. A região carboxi-terminal da proteína apresenta um domínio GAP (“GTPase activating protein”) com atividade de GTPase relacionado a proteína RAS com função ativadora da cascata de sinalização Rac-GAP (DICKMANN e cols., 1995) (**Figura 6**). Os domínios correspondentes ao primeiro éxon apresentam crucial importância na patogênese da LMC, uma vez que permanecem em todos os produtos protéicos derivados da fusão quimérica bcr-abl em leucemias crônicas e agudas.

O domínio de oligomerização compreende a primeira parte da região amino-terminal que é formada por diversos resíduos hidrofóbicos. Sabe-se que a presença desse domínio é de crucial importância para a ativação da proteína Bcr-abl. Dentro desse contexto, possíveis intervenções terapêuticas poderiam ser criadas utilizando-se dessa região para a inibição do caráter oncogênico do Bcr-abl (ZHAO e cols., 2002). Mutações dentro do domínio de oligomerização atenuam a atividade oncogênica do Bcr-abl e abolem a interação da proteína Bcr com a Bcr-abl (MC WHIRTER e cols., 1993). Sabe-se também que a deleção desse domínio resulta em uma diminuição da capacidade de ligação do Bcr-abl a F-actina, sendo um dos fatores que explicam a localização citoplasmática do Bcr-abl (MC WHIRTER e cols., 1993).



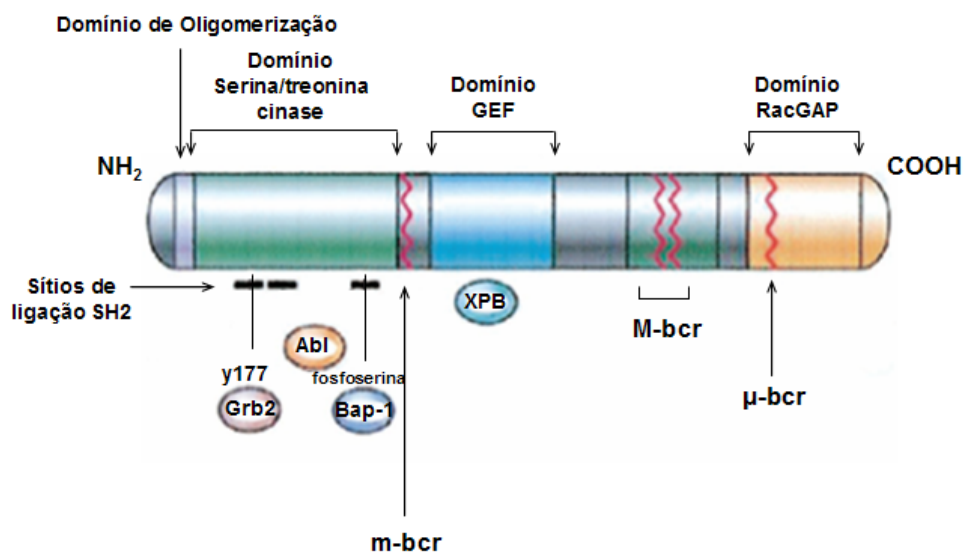
Vários domínios de ligação a região regulatória SH2 da proteína Bcr já foram caracterizados (LAURENT e cols., 2001). Esses domínios são altamente conservados e participam na montagem de complexos de transdução de sinais. Eles permitem que a região reguladora SH2 da proteína Abl se ligue a proteína Bcr por meio de mecanismos não dependentes de fosfotirosinas e sim fosfoserinas e fosfotreoninas, auxiliando na transformação oncogênica do Bcr-abl (PENDERGAST e cols., 1991). Outra região de ligação a SH2, dependente de fosfotirosinas, interage a proteína adaptadora Grb2 com o Bcr, sendo essencial para a via de transdução de sinal Ras (PENDERGAST e cols., 1993). A proteína Bcr além de possuir uma região de oligomerização em sua porção amino-terminal, carrega um domínio serina/treonina cinase (MARU e WITTE, 1991). Esse domínio é capaz de autofosforilar serinas e treoninas, que passam a constituir sítios de ancoragem para domínios SH2, como o presente na quimera Bcr-abl. Acredita-se que resíduos de tirosinas da proteína Bcr transfosforilados pelo Bcr-abl tenham a capacidade de reduzir a atividade serina/treonina cinase no Bcr (LU e cols., 1993). Tal mecanismo leva a uma menor atividade de autofosforilação por parte do domínio serina/treonina cinase do Bcr, concomitantemente uma menor taxa de ligação do domínio SH2 do Bcr-abl e com isso menor atividade oncogênica. Dentro desse contexto, a proteína Bcr é também conhecida como um regulador negativo da onco-proteína Bcr-abl (**Figura 5**) (ARLINGHAUS, 2002).



**Figura 5. Figura esquemática ilustrando o mecanismo de regulação negativa do Bcr.** A proteína  $p160^{BCR}$  autofosforila serinas nas regiões de ligação a SH2, (representado pelas pequenas barras pretas horizontais dentro do domínio serina/treonina cinase), levando a ligação no domínio SH2 da  $p210^{Bcr-abl}$  (← - ►) e conseqüentemente regulando a atividade oncogênica. A proteína  $p210^{Bcr-abl}$ , por sua vez, transfosforila tirosinas na  $p160^{BCR}$ , mecanismo que diminui sua autofosforilação, representado pelas setas (⊣). Esse processo leva a uma menor ligação do  $p160^{BCR}$  ao domínio SH2 na  $p210^{Bcr-abl}$  restabelecendo a atividade oncogênica da quimera.

A região central e carboxi-terminal da proteína interage com proteínas G. As proteínas G são essenciais nas sinalizações intracelulares, organização do citoesqueleto, crescimento celular e desenvolvimento normal por meio do intercâmbio de ligação do difosfato de guanosina (GDP) (estado inativo) por trifosfato de guanosina (GTP) (estado ativo) regulado por GAP e GEFs, respectivamente. Estudos recentes buscaram demonstrar novas proteínas que pudessem interagir com esses domínios. Usando sistema de duplo-híbrido em leveduras, foi identificada a XPB, uma proteína de reparo de ADN, como candidato capaz de se ligar a essa região. A co-expressão da XPB com uma das isoformas mais comuns da proteína Bcr-abl, faz com que a XPB seja

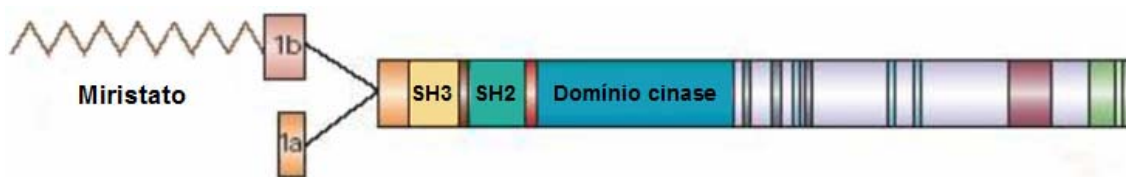
fosforilada por Bcr-abl e, a partir desse ponto, se tornar incapaz de corrigir possíveis erros no ADN (TAKEDA e cols., 1999). Acredita-se que na presença da proteína Bcr-abl, a interação normal entre XPB e a proteína Bcr sofram interferência, levando a um defeito no reparo do ADN e, subsequente instabilidade genômica em células portadoras da quimera Bcr-abl. Esse mecanismo pode ser uma das explicações para a evolução clonal da doença, de uma fase “benigna” controlada (crônica) para a crise blástica fatal.



**Figura 6. Figura esquemática da proteína p160<sup>BCR</sup>.** O esquema ilustra os principais domínios da proteína Bcr. As linhas vermelhas representam os pontos de quebra m-bcr, M-bcr e μ-bcr responsáveis pela formação das diferentes isoformas da proteína Bcr-abl. Algumas proteínas que se ligam ao p160<sup>BCR</sup> (Grb2, Abl, Bap-1 e XPB) estão representadas juntamente com seus sítios de ancoragem. Adaptado de KURZROCK e cols., 2003.

### 1.6.2 O gene c-abl

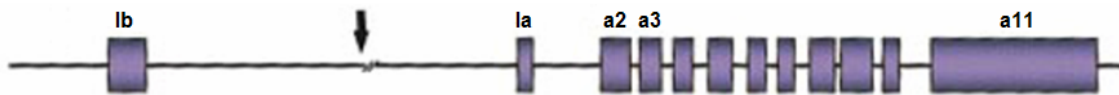
O proto-oncogene celular c-abl é um homólogo humano do oncogene viral v-abl que causa a Leucemia Murina de Abelson (ABELSON e RABSTEIN, 1970). Acredita-se que em algum estágio da evolução, o vírus da leucemia murina de Abelson (Ab-MuLV) tenha se inserido no genoma do c-abl de mamíferos. O c-abl é um gene altamente conservado presente não só em vertebrados, mas também em *Drosophila* (HOFFMAN e cols., 1983). O gene c-abl humano tem tamanho aproximado de 225 kb e seus dois primeiros éxons são conhecidos como 1b e 1a, seguido dos éxons 2 ao 11. Uma região intrônica longa (200 kb) separa o éxon 1b do éxon 1a (BERNARDS e cols., 1987). O gene apresenta dois possíveis transcritos de 6 e 7 kb, formados por edição alternativa dos éxons 1b e 1a que são codificados em duas isoformas distintas de 145 kDa (p145<sup>ABL</sup>) (SHTIVELMAN e cols., 1986) e com atividade tirosina cinase (LUGO e cols., 1990). A variante 1b do c-abl é miristoilada na região amino-terminal, enquanto a variante 1a apresenta 19 aminoácidos a menos que a 1b e não possui sítios para adição de miristoil (HANTSCHHEL e SUPERTI-FURGA, 2004) (**Figura 7**). A condição necessária para que ocorra a miristoilação é a presença de um resíduo de glicina na segunda posição da proteína. Sequências consenso para a miristoilação apresentam uma serina na sexta posição e uma lisina na sétima (FARAZI e cols., 2001).



**Figura 7. Figura esquemática das duas isoformas da proteína p145<sup>ABL</sup>.** Os éxons 1b e 1a sofrem edição alternativa (“splicing”) e resultam em duas variantes da proteína p145<sup>ABL</sup>. A diferença entre elas corresponde a 19 resíduos e uma miristoilação na variante 1b. Adaptado de HANTSCHEL e SUPERTI-FURGA, 2004.

A fase de leitura corresponde a 3389 nucleotídeos e codifica uma proteína de 1130 aminoácidos (SHTIVELMAN e cols., 1986). O gene c-abl apresenta uma região de ponto de quebra localizada na primeira porção intrônica que compreende cerca de 200 kb (**Figura 8**). Dentro dessa enorme região, as quebras ocorrem em “clusters” em 3 regiões distintas que compreendem intervalos de  $30 \pm 5$ ,  $100 \pm 13$  e  $135 \pm 8$  kb (JIANG e cols., 1990).

A proteína p145<sup>ABL</sup> pode ser encontrada em diversos compartimentos subcelulares entre eles núcleo, citoplasma, mitocôndria e retículo endoplasmático. Nesses compartimentos, a p145<sup>ABL</sup> interage com uma grande variedade de proteínas celulares que incluem adaptadores celulares, cinases, fosfatases, reguladores do ciclo celular, fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto (WETZLER e cols., 1993). Acreditava-se que a modificação por meio da miristoilação na variante 1b do c-abl era a responsável em direcionar e ancorar a proteína em membranas, discriminando assim as formas nuclear e citoplasmática da proteína. Entretanto, evidências recentes mostraram que a miristoilação não é suficiente para a associação com membranas e que outros mecanismos como acetilações e palmitoilações seriam necessários para uma ancoragem estável em membranas (HANTSCHEL e SUPERTI-FURGA, 2004).

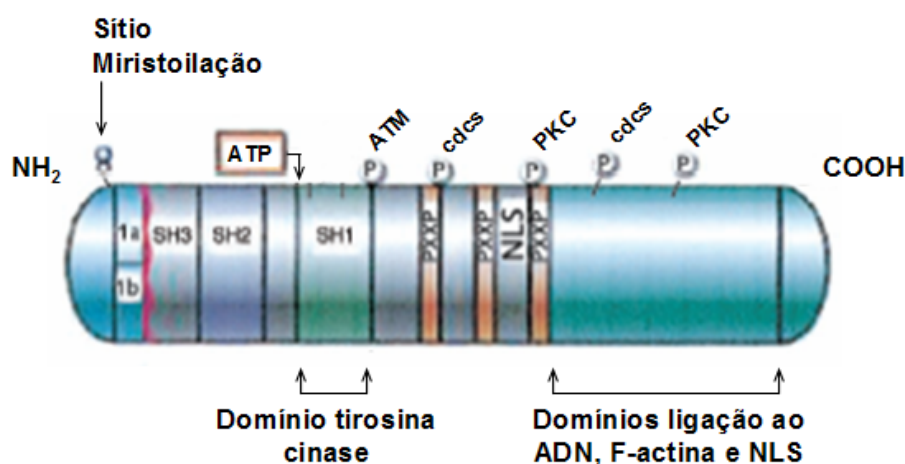


**Figura 8. Figura esquemática do gene c-abl.** Os retângulos representam o posicionamento dos 11 éxons que compõem o gene e os espaços entre eles correspondem às regiões intrônicas. As regiões 1b e 1a representam os éxons que sofrem a edição alternativa do gene e a seta mostra a primeira região intrônica que é o principal ponto de quebra do gene. Adaptado de DEININGER e cols., 2000.

A funcionalidade da proteína p145<sup>ABL</sup> está relacionada a muitos processos celulares que incluem regulação da sobrevivência, crescimento celular, estresse oxidativo, resposta a danos no ADN (genotoxicidade), dinâmica de mobilização do citoesqueleto por meio da F-actina e migração celular.

Diversos domínios funcionais já foram descritos na proteína Abl como os domínios SH3, SH2, domínio catalítico com atividade tirosina cinase (SH1), domínio de ligação ao ADN, sequências ricas em prolina (PxxP) e domínio de ligação a F-actina (**Figura 9**). O domínio SH3 caracteriza-se por uma atividade regulatória negativa na transformação maligna. Observou-se que mutações nesse domínio alteram a conformação da proteína e bloqueia a união de ligantes com sequências ricas em prolina dessa região, o que leva a ativação do potencial de transformação do Abl (MAYER e BALTIMORE, 1994). Na região central da proteína existem sequências ricas em prolina que são capazes de interagir com domínios SH3 de outras proteínas. Entre essas sequências estão presentes os sinais de localização nuclear (NLS), que direcionam a proteína para o núcleo (VAN ETTEN e cols., 1989). O domínio tirosina cinase do Abl promove a transferência de um grupo terminal de fosforil do trifosfato de adenosina (ATP) para um resíduo de tirosina de um substrato aceptor. A perda no controle da

atividade tirosina cinase é um fator chave para o incremento do potencial oncogênico da quimera Bcr-abl. A maior parte da proteína Abl citoplasmática está associada a filamentos de actina (VAN ETTEN e cols., 1994). Já foi visto que a atividade tirosina cinase do Abl é inibida por meio de filamentos de actina (WOODRING e cols., 2001 e HANTSCHHEL e cols., 2005). A proteína Abl possui também a capacidade de se ligar ao ADN (HÉLÈNE e cols., 1997) e acredita-se que ela possua um papel no reparo do ADN, uma vez que a proteína é capaz de interagir com outras proteínas que participam desse processo como a ATM (“ataxia telangiectasia mutated”). As principais características dos genes bcr e c-abl descritas acima estão sumarizadas na Tabela 1.



**Figura 9. Figura esquemática da proteína p145<sup>ABL</sup>.** O esquema ilustra os principais domínios presentes na proteína Abl. A linha vermelha representa o ponto de quebra mais comum na formação da quimera Bcr-abl. Diversas proteínas representadas na figura são fosforiladas e interagem com Abl ativando inúmeras vias de transdução de sinais. Adaptado de KURZROCK e cols., 2003.

Tabela 1. Características bcr e c-abl

	<b>bcr</b>	<b>c-abl</b>
Localização	22q11	9q34
Tamanho gene	130 Kb	>230 Kb
Número éxons	23 éxons	11 éxons
Tamanho transcritos	4,5 kb e 7 kb	6 kb e 7 kb
Expressão	Constitutiva	Constitutiva
ORF	3818 nucleots.	3389 nucleots.
Aminoácidos	1271 resíduos	1130 resíduos
Nome proteína	p160 <sup>BCR</sup>	p145 <sup>ABL</sup>
Tamanho proteína	160 KDa	145 KDa
Genes relacionados	bcr2, bcr3, bcr4 (22q11) e abr (17p13.3)	-
Domínios protéicos	Domínio de oligomerização Domínio Serina/treonina cinase Regiões de ligação a SH2 Domínio de homologia a GEFs Domínio de homologia a GAP	Domínio SH3 Domínio SH2 Domínio SH1 (cinase) Regiões ricas em Pro (PxxP) Sinal de Localização Nuclear (NLS) Domínio Ligação Actina Domínio Ligação ADN
Funções	Direcionamento de sinalizações Associação com heterocromatina Regulação do ciclo celular Reparo do ADN	Sobrevivência celular Crescimento celular Estresse Oxidativo Respostas a danos no ADN Mobilização citoesqueleto Migração celular

### 1.6.3 O gene quimérico bcr-abl

A justaposição formada entre os genes bcr e abl resulta na formação do gene quimérico bcr-abl, que por sua vez irá ser transcrito e traduzido em diferentes isoformas protéicas, dependendo de onde ocorreram as quebras nos genes envolvidos. Os pontos de quebra no bcr estão agrupados em três regiões já descritas como m-bcr, M-bcr e  $\mu$ -bcr. A região do M-bcr é detectada em mais de 95% dos casos de LMC e compreende uma região cromossomal de 5,8 kb, composta pelos éxons 12 a 16 do bcr, inicialmente descritos como b1-b5 (HEISTERKAMP e cols., 1985). As quebras mais comuns dessa região unem o bcr, até o éxon 13 ou 14, (b2 ou b3), com o c-abl a partir do éxon a2, até o final do gene. Essas fusões geram transcritos conhecidos como b2-a2 ou b3-a2 de 8,5 kb que codificam uma proteína de 210 kDa chamada p210<sup>Bcr-Abl</sup> (**Figura 10**). Duas



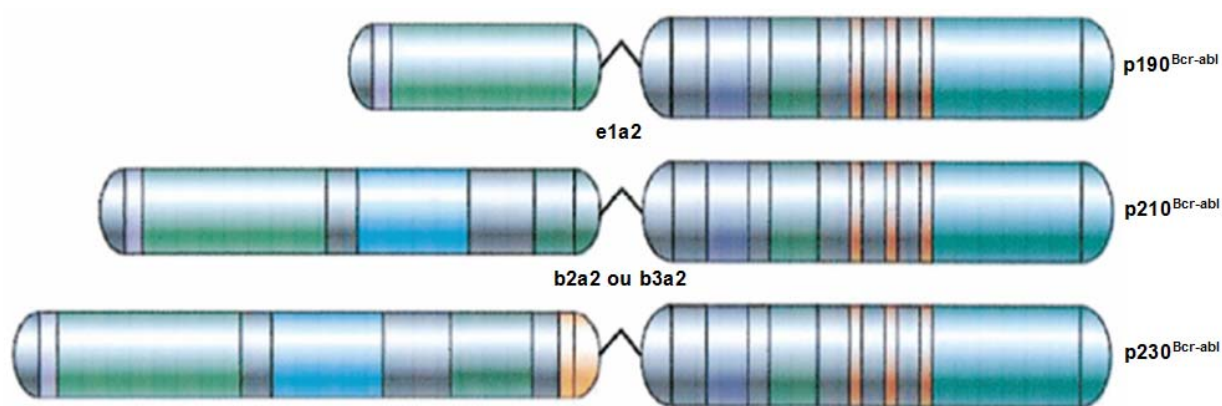
variantes (b2-a2 e b3-a2) dessa proteína podem ser geradas em decorrência da quebra no bcr ser mais centromérica ou mais telomérica ao éxon 14 (b3). Dessa forma a proteína p210<sup>Bcr-Abl</sup> pode ou não conter os 25 aminoácidos que correspondem a sequência codificada pelo éxon 14 (b3) (KURZROCK e cols., 1987). Diversos pacientes diagnosticados como LMC apresentam a expressão concomitante dos transcritos b2-a2 e b3-a2 (MELO, 1996).

Em 70-80% dos casos de Leucemia Linfóide Aguda (LLA), Philadelphia positivo, (GLEISSNER e cols., 2002) e em raros casos de Leucemia Mielóide Crônica (MELO e cols., 1994), a quebra no bcr ocorre em uma região intrônica que compreende uma sequência de 55 kb (m-bcr) entre os éxons e2' e e2. A quebra mais comum nessa região une o éxon e1 do bcr, com o c-abl a partir do éxon a2, até o final do gene. Essa fusão gera o transcrito conhecido como e1-a2 de 7,4 kb que é traduzido em uma proteína de 185 kDa conhecida como p190<sup>Bcr-Abl</sup> (CLARK e cols., 1987) também chamada de p185<sup>Bcr-Abl</sup> por alguns investigadores (**Figura 10**).

A última região susceptível a pontos de quebras foi localizado na porção 3' terminal do gene bcr na região intrônica entre os éxons 19 e 20 ( $\mu$ -bcr) (SAGLIO e cols., 1990). A quebra mais comum nessa região une o éxon e19 do bcr, com o c-abl a partir do éxon e2, até o final do gene. Essa fusão gera o transcrito e19-a2 de 10 kb que é traduzido em uma proteína de 230 kDa conhecida como p230<sup>Bcr-Abl</sup> (**Figura 10**). Pacientes portadores desse transcrito apresentam uma forma distinta de doença mieloproliferativa, menos agressiva, conhecida como Leucemia Mielóide Crônica Neutrofílica (LMC-N) (PANE e cols., 1996b).

A expressão de cada transcrito bcr-abl produzida pelos diferentes pontos de quebra no gene bcr, assim como a expressão simultânea de mais de um transcrito e as variações nos níveis de expressão destes clones, mostram uma correlação com os

fenótipos hematológicos e clínicos de diferentes leucemias Philadelphia positivo (Ph+) (DEININGER e cols., 2000). As leucemias Ph+ que expressam proteínas como p190<sup>Bcr-Abl</sup>, p210<sup>Bcr-Abl</sup> e p230<sup>Bcr-Abl</sup> foram associadas com fenótipos mielóides, geralmente comprometendo a expansão, o grau de diferenciação e a maturação de progenitores granulocíticos. Como exemplo, LMC expressando proteínas p230<sup>Bcr-Abl</sup> comprometem com menor intensidade o processo normal de diferenciação granulocítica em comparação a expressão de p210<sup>Bcr-Abl</sup>. Do mesmo modo, diferenças fenotípicas na clínica foram observadas entre p190<sup>Bcr-Abl</sup>, p210<sup>Bcr-Abl</sup> e p230<sup>Bcr-Abl</sup> sendo menos agressiva a doença quando a maioria dos éxons do bcr é mantida no transcrito quimérico (QUACKENBUSH e cols., 2000). Outros pontos de quebra ocorrem em não mais de 1-2% dos casos de leucemias bcr-abl positivas associados a LMC e LLA e incluem as isoformas b3-a3 (LAURENT e cols., 2001), e6-a2 (HOCHHAUS e cols., 1996), e2a1 (LAURENT e cols., 2001), e1-a3 (SOEKARMAN e cols., 1990), e8-a2 (BRANFORD e cols., 2000), e13a2 (KAWASAKI e cols., 1988), e13-a3 (OTAZU e cols., 2002) entre outras (**Tabela 2**). As principais características das diferentes isoformas formadas pela associação dos genes bcr e c-abl estão sumarizadas na Tabela 3.



**Figura 10. Figura esquemática das proteínas p190<sup>Bcr-Abl</sup>, p210<sup>Bcr-Abl</sup> e p230<sup>Bcr-Abl</sup>.** O esquema representa o resultado da fusão entre o gene bcr e c-abl de acordo com os pontos de quebra mais comuns no bcr (m-bcr, M-bcr e  $\mu$ -bcr), respectivamente. O conteúdo de éxons do bcr que formam essas quimeras aumenta na proporção que a quebra ocorre mais 3' terminal ao gene enquanto o conteúdo de éxons do gene c-abl se mantém constante nas três isoformas. Adaptado de KURZROCK e cols., 2003.

**Tabela 2. Pontos de quebra incomuns no bcr e c-abl**

	Quebras		Referências	Transcrito	Proteína	KDa
	bcr	c-abl				
bcr	-	-				160
c-abl	-	-				145
* e1a2	m-bcr	Íntron 1	53			185
* b3a2	M-bcr	Éxon 14	49			210
* b2a2	M-bcr	Éxon 13	49			210
* e19a2	$\mu$ -bcr	Íntron 1	55			230
b3a3	?	?	14			?
e6a2	Íntron 6	Íntron 1	56			195
e2a1	?	?	14			?
e1a3	m-bcr	Íntron 2	57			180
e8a2	?	?	58			197,5
e13a2	M-bcr	Íntron 1	59			210
e13a3	M-bcr	Íntron 2	60			203

\* Correspondem a 99% das Leucemias

**Tabela 3. Características Bcr-abl**

	<b>p190<sup>BCR-ABL</sup></b>	<b>p210<sup>BCR-ABL</sup></b>	<b>p230<sup>BCR-ABL</sup></b>
<b>Quebra bcr</b>	<b>m-bcr (55 Kb)</b>	<b>M-bcr (5,8 Kb)</b>	<b>μ-bcr</b>
<b>Quebra c-abl</b>	<b>íntron 1</b>	<b>íntron 1</b>	<b>íntron 1</b>
<b>Nome transcritos</b>	<b>e1a2</b>	<b>b3a2 / b2a2</b>	<b>e19a2</b>
<b>Tamanho transcritos</b>	<b>7,4 Kb</b>	<b>8,5 Kb</b>	<b>10 Kb</b>
<b>Nome proteína</b>	<b>p190<sup>Bcr-Abl</sup></b>	<b>p210<sup>Bcr-Abl</sup></b>	<b>p230<sup>Bcr-Abl</sup></b>
<b>Tamanho proteína</b>	<b>185 KDa</b>	<b>210 KDa</b>	<b>230 KDa</b>
<b>Doença</b>	<b>LMC, LLA</b>	<b>LMC, LLA</b>	<b>LMC-N</b>

### **1.7 Estrutura e catálise do domínio catalítico (SH1) da cinase Abl**

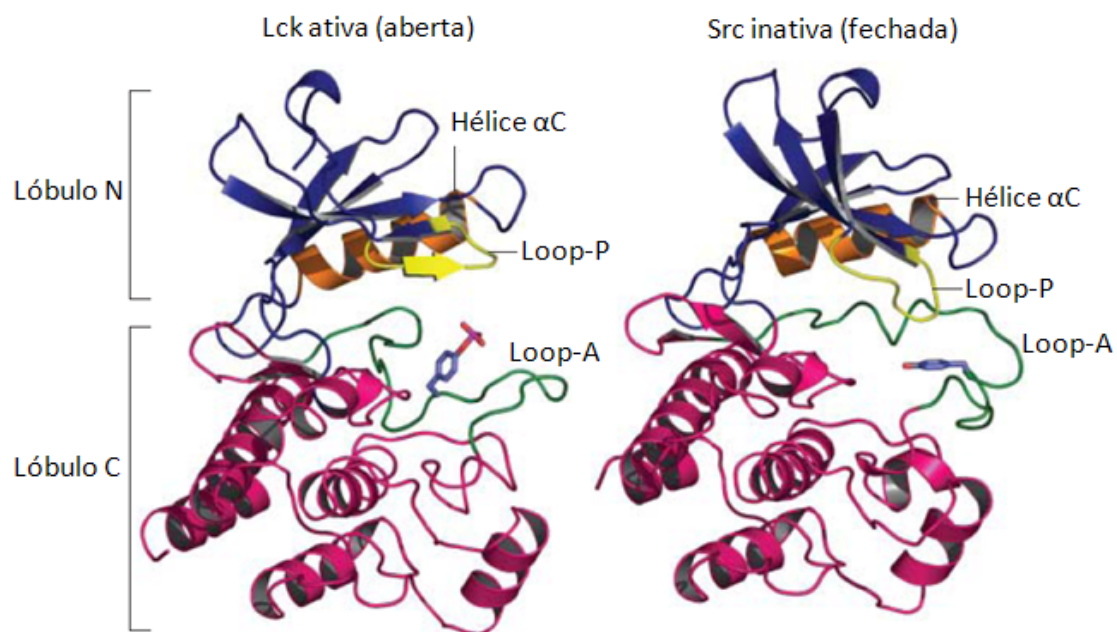
A compreensão dos mecanismos moleculares implicados na patogênese da Leucemia Mielóide Crônica, por parte da expressão da proteína Bcr-abl, cuja atividade tirosina cinase se encontra desregulada na célula, desperta o interesse para o entendimento de como essa proteína fosforila seus substratos a nível estrutural. É sabido que o genoma humano codifica 518 cinases, constituindo 2% de todos os genes (COWAN-JACOB, 2006). Todas essas cinases apresentam o domínio catalítico (SH1) altamente conservado, com aproximadamente 300 resíduos e são capazes de transferir o fosfato  $\gamma$  de uma molécula de ATP para grupos hidroxila de resíduos de serina, treonina e tirosina de peptídeos substratos.

O domínio SH1 das cinases é bilobular. Ele é dividido em dois subdomínios ou lóbulos conhecidos por lóbulo-N ou pequeno e lóbulo-C ou maior. O lóbulo-N é formado por 5 folhas- $\beta$  orientadas de maneira antiparalela e uma  $\alpha$ -hélice proeminente conhecida como hélice  $\alpha$ C. Por outro lado, o lóbulo-C é constituído basicamente por  $\alpha$ -hélices (HANTSCHHEL e SUPERTI-FURGA, 2004) (**Figura 11**). A fenda de ligação do ATP fica situada em um bolsão hidrofóbico entre os lóbulos. A conformação adotada pelo domínio SH1 das cinases em sua forma ativa e inativa apresenta diferenças em

algumas regiões extremamente flexíveis e conservadas. Um dos loops conservados, conhecido como Loop-P (loop de ligação ao fosfato), fica localizado entre a folha  $\beta 1$  e  $\beta 2$  do lóbulo-N e forma a cobertura do sítio ativo da cinase, contribuindo para coordenar o fosfato  $\gamma$  da molécula de ATP ligada (HANTSCHHEL e SUPERTI-FURGA, 2004). O grupo adenina da molécula de ATP, por sua vez, realiza duas ligações de hidrogênio com átomos da cadeia de peptídeos que conectam os lóbulos N e C (NAGAR e cols., 2002). O grupo amino extra cíclico do ATP compartilha uma ligação de hidrogênio com o oxigênio da carbonila do resíduo E316 e o nitrogênio 1 do anel da purina compartilha a outra ligação de hidrogênio com o nitrogênio amida do resíduo M318 (NAGAR e cols., 2002). O loop-P quando na conformação inativa, adota uma estrutura compacta. Outras regiões como a hélice  $\alpha C$  e os lóbulos N e C, sofrem alterações na orientação quando as cinases transitam entre a conformação ativa e inativa.

Uma das regiões mais conservadas de proteínas cinases compreende o loop de ativação (loop-A). Essa região é altamente flexível e tem tamanho aproximado de 20 a 30 resíduos. Na forma ativa, o loop-A adota uma conformação estendida. Dois importantes aspectos ocorrem para a manutenção da conformação estendida dessa região. Na primeira delas, o resíduo D381, que compõe o motivo DFG (Asp-Phe-Gly) localizado na base N-terminal do loop-A, é posicionado de forma a interagir diretamente com um íon de magnésio que coordena os grupos fosfatos do ATP (NAGAR e cols., 2002). O segundo aspecto, por sua vez, compreende a fosforilação do resíduo de tirosina do loop-A (ex: Y412 na proteína Abl) que mantém o resto do loop-A posicionado para fora do centro catalítico, formando assim uma plataforma de ligação ao substrato (NAGAR e cols., 2002). Por outro lado, na conformação inativa, o motivo DFG do loop-A está rotacionado drasticamente quando comparado a conformação ativa, e dessa maneira a F382 fica voltada para dentro do sítio de ligação do ATP e não mais o

resíduo D381. O resto do loop-A adota uma conformação que mimetiza um substrato ligado a enzima, dessa forma bloqueando o sítio ativo da mesma.



**Figura 11. Estrutura de proteínas cinases na conformação ativa e inativa.** A figura representa as principais alterações que ocorrem no domínio SH1 de cinases quando elas transitam entre a conformação ativa e inativa. A esquerda a cinase Lck (YAMAGUCHI e HENDRICKSON, 1996) em sua conformação aberta e a direita a cinase Src (XU e cols., 1997) em sua conformação fechada. Lóbulo N em azul, lóbulo C em magenta, hélice  $\alpha$ C em laranja, loop-P em amarelo, loop-A em verde e tirosina do loop-A representada na forma de bastão, fosforilada a esquerda e desfosforilada a direita. Adaptado de HANTSCHHEL e SUPERTIFURGA, 2004.

### 1.8 Mecanismos de Regulação do Abl e do Bcr-abl

Muitos avanços relacionados aos mecanismos envolvidos na regulação de tirosinas cinases puderam ser esclarecidos nos últimos anos. A elucidação estrutural dos domínios que compõem a unidade catalítica SH3 (GOSSER e cols., 1995), SH2 (OVERDUIN e cols., 1992) e SH1 (NAGAR e cols., 2002) por meio das técnicas de

espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cristalografia por Raios-X permitiu uma melhor compreensão desses mecanismos. A atividade tirosina cinase da proteína Abl, modelo de estudo, é estritamente regulada na célula. Esse controle é alcançado por meio da capacidade de auto-inibição da proteína (PLUK e cols., 2002) que envolve complexas interações intramoleculares entre a unidade catalítica da tirosina cinase (SH1), os domínios regulatórios SH2 e SH3 (SMITH e cols., 2003 e NAGAR e cols., 2003) e outros segmentos como o próprio grupo miristoil, o conector SH3/SH2 e o conector SH2/SH1 (HANTSCHER e cols., 2003). O complexo mecanismo de regulação desta cinase está diretamente relacionado com a manutenção de seu estado inativo, sendo, portanto um controle para o correto funcionamento das vias de sinalização no interior da célula. A perda desses mecanismos de regulação, fenômeno que ocorre durante o estado leucêmico, em vista da oligomerização da proteína Bcr-abl (MCWHIRTER e cols., 1993 e SMITH e cols., 2003), leva ao descontrole da atividade tirosina cinase e a ativação de importantes vias de sinalização na célula. A fosforilação descontrolada, pelo Bcr-abl, de substratos envolvidos em vias tais quais MAP cinases, Jak-Stat, PI3-cinase e Myc cinase (DEININGER e cols., 2000 e STEELMAN e cols., 2004) levam a ativação constitutiva da sinalização mitogênica. Por sua vez, a fosforilação de diversos outros substratos, como a proteína Crk1, envolvida na regulação da motilidade celular e na adesão celular mediada por integrinas (SATTLER cols., 1996), assim como a fosforilação da proteína pró-apoptótica Bad, levam a outros mecanismos implicados na transformação oncogênica entre eles: adesão alterada ao estroma medular e matriz extracelular e a redução do processo de apoptose. Em suma, o desenvolvimento do fenótipo maligno da Leucemia Mielóide Crônica é baseado na intensa ativação mitogênica, adesão alterada ao estroma e matriz extracelular e inibição da apoptose. Recentemente, um novo mecanismo envolvido no potencial transformante

da proteína Bcr-abl vem sendo discutido e se baseia na degradação de proteínas inibitórias da proteína Abl por meio da ativação do complexo protéico do proteassoma (DAI e cols., 1998).

Os principais mecanismos estruturais envolvidos na regulação do Abl já foram elucidados, em contra partida, a sinalização inicial para que a cinase Abl, inativa dentro da célula, seja ativada e exerça uma determinada função fisiológica ainda não é compreendida. Uma das hipóteses sugere que após um estímulo externo, possíveis inibidores, tais como Pag/Msp23 (WEN e cols., 1997) ancorados na unidade catalítica se dissociem da mesma, permitindo a cascata de eventos que levarão a ativação completa da cinase. Os eventos posteriores a dissociação de possíveis inibidores da cinase, compreendem a autofosforilação de duas tirosinas específicas (Y412 no loop de ativação e Y245 no conector SH2-SH1), o desacoplamento do domínio regulatório SH3, o desacoplamento da molécula de ácido mirístico do domínio SH1, o desacoplamento do domínio regulatório SH2 e a consequente ligação de pequenos fosfopeptídeos em motivos específicos do domínio SH2 antes ocluídos pelo domínio SH1. Todos esses eventos estão muito bem caracterizados a nível estrutural e possivelmente ocorrem de forma cronológica e por meio de um mecanismo de causa e efeito.

#### 1.8.1 Primeiro evento - Autofosforilação do Abl

O primeiro mecanismo investigado e relacionado com o aumento da atividade catalítica da proteína Abl é a fosforilação de resíduos de tirosina dentro da unidade catalítica (SH3-SH2-SH1). É sabido que a proteína Abl na célula se mantém em sua conformação inativa, não apresentando quaisquer fosforilações (FRANZ e cols., 1989). Entretanto quando os mecanismos de autoinibição são rompidos por meio de mutações,

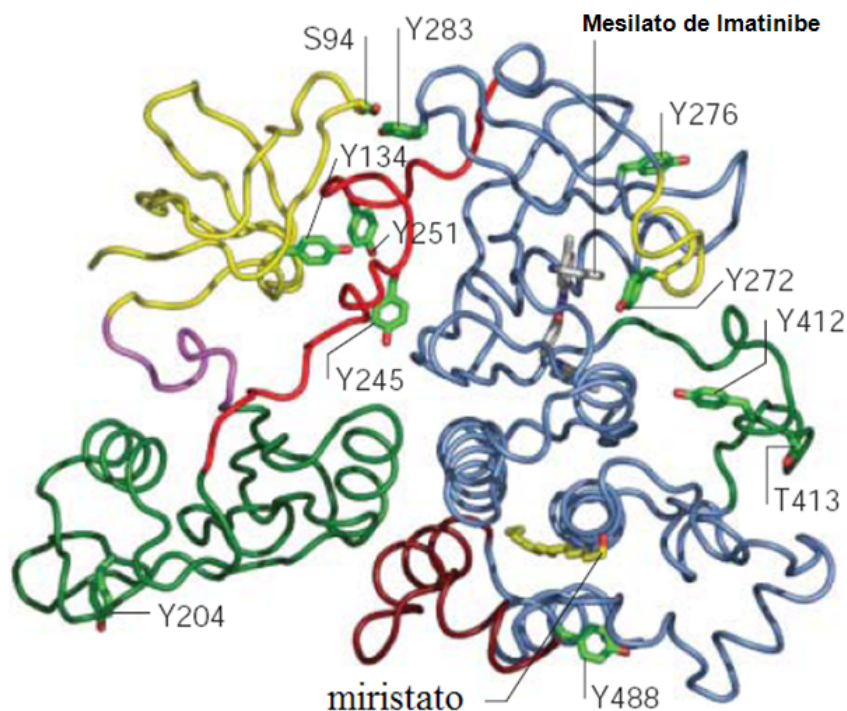


essas formas ativas da proteína passam a apresentar diversos resíduos de tirosina fosforilados. (FRANZ e cols., 1989; JACKSON e BALTIMORE, 1989). Dentro desse contexto, torna-se evidente uma forte correlação entre o processo de fosforilação da cinase e sua ativação. Diversos trabalhos buscaram a descoberta de novos sítios alvos de fosforilação dentro da proteína Abl, com o objetivo de mapear os resíduos essenciais para a ativação da cinase (REYNOLDS e cols., 1982; STEEN e cols., 2003; SALOMON e cols., 2003). O primeiro relato de sítios de fosforilação foi identificado em dois peptídeos trípticos obtidos do Vírus da Leucemia Murina de Abelson (MuLV) (REYNOLDS e cols., 1982). Trabalhos mais recentes foram capazes de mapear diversos outros sítios alvos de fosforilação dentro da unidade catalítica da proteína Bcr-abl (STEEN e cols., 2003; SALOMON e cols., 2003) (**Figura 12 e Tabela 5**) e em outras regiões da proteína Bcr (HE e cols., 2002). Análises de mutagênese identificaram que os resíduos Y412, localizado no loop de ativação e Y245, que fica na região de ligação entre o domínio SH2 e o SH1, quando fosforilados, são cruciais para a ativação da proteína Abl. A substituição da Y245 por fenilalanina inibe a ativação do Abl induzida por fosforilação em 50%, enquanto que a proteína portando o duplo mutante Y245F e Y412F é minimamente ativada por meio de autofosforilação (BRASHER e cols., 2000). Tais evidências revelam que a fosforilação dessas tirosinas são de crucial importância para a ativação da cinase e que elas ocorrem de maneira sequencial.

Após a identificação de diversos sítios alvos de fosforilação e o mapeamento dos resíduos de maior importância para a ativação da cinase, outro ponto de crucial importância passou a ser questionado: Por quais mecanismos ocorre a autofosforilação da proteína Abl? Dentro desse questionamento foi possível identificar que a proteína poderia ser fosforilada por meio de estímulos de fatores de transcrição, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que leva a ativação de grupos de cinases

como as pertencentes a família Src, que por sua vez são capazes de fosforilar a cinase Abl (PLATTNER e cols., 1999). Outro mecanismo proposto atualmente é a capacidade da proteína Abl por si mesma, se autofosforilar. Experimentos realizados *in vitro*, identificaram que a atividade cinase, frente a um substrato específico da Abl, é dose dependente (BRASHER e cols., 2000). Tal constatação sugere fortemente que a autofosforilação da cinase Abl ocorra por meio de um mecanismo intermolecular.

Análises estruturais facilitaram ainda mais a compreensão e a importância da fosforilação para a ativação da proteína Abl. Acredita-se que a fosforilação do resíduo de Y412 no loop de ativação da Abl e de diversas outras cinases, seja de crucial importância para estabilizar a conformação ativa da mesma e dessa forma permitindo a ligação do substrato e a consequente catálise (HANTSCHHEL e SUPERTI-FURGA, 2004) (**Figura 12**).



**Figura 12. Sítios de fosforilação no Abl.** Resíduos que são fosforilados na forma ativa da proteína Abl. Os resíduos foram mapeados na estrutura regulada do Abl (código do pdb: 1OPK). Os sítios de fosforilação estão representados por bastões verdes, o domínio SH3, em traçado amarelo, o conector SH3-SH2 em roxo, o domínio SH2 em verde, o conector SH2-SH1 em vermelho e o domínio SH1 em azul. Loop-P e loop de ativação estão representados em amarelo e verde, respectivamente. Adaptado de HANTSCHHEL e SUPERTI-FURGA, 2004.

Tabela 4. Sítios de fosforilação mapeados no Abl (Adaptado de Ref. 38)

Resíduo fosforilado	Ref. 78	Ref. 79	Localização	Sequência
S94	n.d.	n.d.	domínio SH3 (Loop RT)	DFVApSGDNT
Y134	s.	n.d.	domínio SH3 (superfície de ligação a ligante)	VPSNpYITPV
Y204	s.	s.	domínio SH2 (face sul)	DGKLpYVSSE
Y245	s.	s.	Linker SH2-SH1	KPTVpYGVSP
Y251	s.	n.d.	Linker SH2-SH1	VSPNpYDKWE
Y272	s.	s.	domínio SH1 (loop-P / contato com STI-571)	GGGQpYGVVY
Y276	s.	s.	domínio SH1 (lóbulo N)	YGEVpYEGVW
Y283	s.	s.	domínio SH1 (lóbulo N / interface SH3)	VWKKpYSLTV
Y412	s.	s.	Loop de ativação	TGDTpYTAHA
T413	n.d.	s.	Loop de ativação	GDTYpTAHAG
Y488	n.d.	s.	domínio SH1 (lóbulo C / face sul)	PEKVpYELMR

p(S/T/Y) designa os resíduos fosforilados, n.d. – não determinado e s. – sítio de fosforilação identificado.

### 1.8.2 Segundo evento – Desacoplamento do domínio SH3

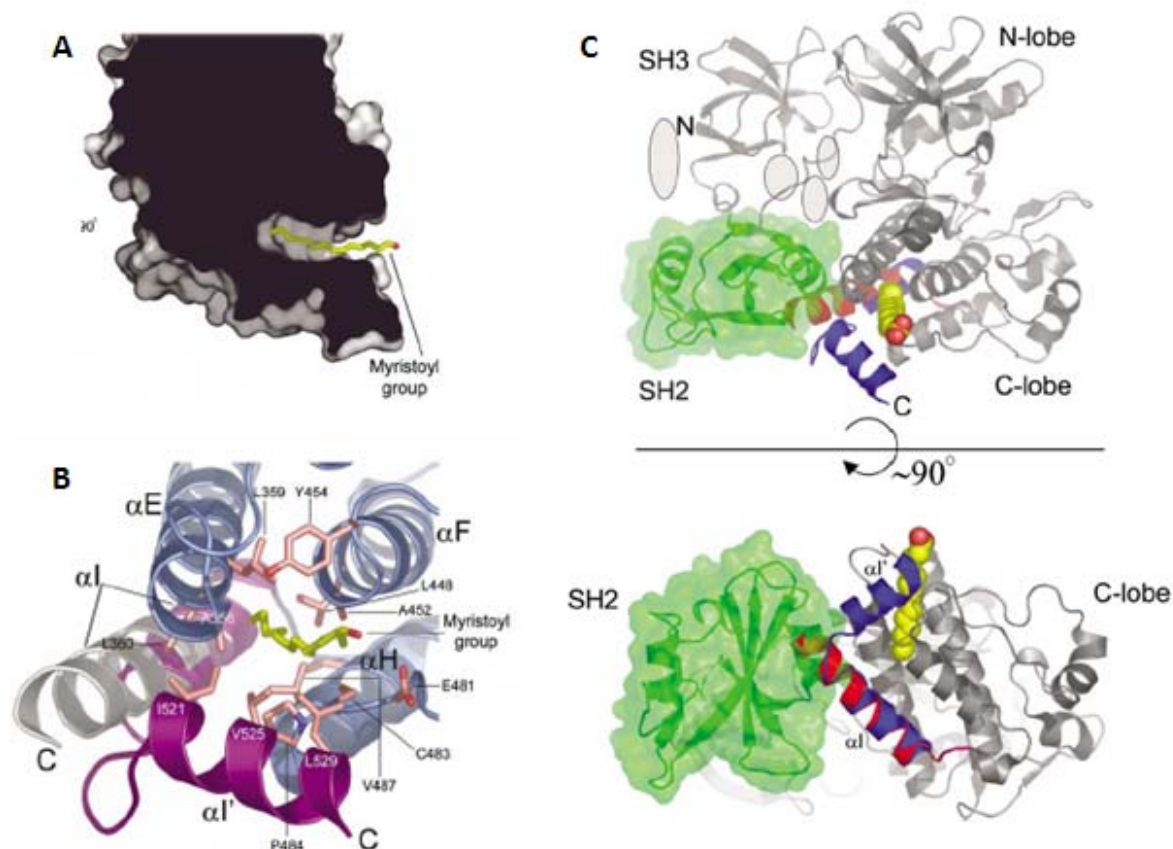
O segundo evento de ativação da complexa cascata de regulação da cinase Abl compreende o desacoplamento do domínio regulatório SH3. As primeiras evidências de que essa região estaria envolvida na regulação da proteína Abl surgiram com os estudos de mutagênese (JACKSON e BALTIMORE, 1989) e depleção de regiões N-terminal (FRANZ e cols., 1989) da cinase. Essas proteínas truncadas possuem o potencial oncogênico. Trabalhos posteriores evidenciaram que o domínio SH3 se mantém ligado a uma prolina no linker SH2-SH1 (P242) e que uma mutação nesse resíduo ou em resíduos do SH3 que fazem parte da região de ligação são capazes de desregular a atividade da cinase *in vivo* e *in vitro* (BARILÁ e SUPERTI-FURGA, 1998). Como já discutido anteriormente a fosforilação da Y412 no Abl leva a um aumento da atividade cinase da proteína e a uma rápida fosforilação no resíduo Y245. A fosforilação da Y245 desacopla o domínio SH3 ligado a P242 e conseqüentemente aumenta ainda mais a atividade cinase.

### 1.8.3 Terceiro evento - Desacoplamento da molécula de ácido mirístico

A miristoilação é uma modificação co-traducional comum que ocorre por meio da ligação covalente de uma molécula de miristato, ácido graxo saturado de 14 carbonos, a regiões consensos de proteínas. A reação é catalisada pela N-miristoil transferase que após reconhecer regiões consensos na proteína, transfere o miristato, provindo do miristoil-CoA para o grupo amino da glicina N-terminal. Essa enzima atua co-traducionalmente, após a remoção do resíduo de metionina iniciador. O único resíduo necessário para que ocorra a miristoilação é a presença da glicina na segunda

posição (HANTSCHHEL e SUPERTI-FURGA, 2004), entretanto outras regiões consensos ótimas para tal modificação já foram identificadas (FARAZI e cols., 2001). A miristoilação estava diretamente relacionada com o processo de ancoramento de proteínas em membranas (HANTSCHHEL e SUPERTI-FURGA, 2004). Porém, evidências recentes mostram que essa modificação não é suficiente para exercer tal processo, sendo necessárias modificações adicionais como palmitoilações para uma ancoragem estável (RESH, 1999). No caso específico da proteína Abl, a miristoilação está envolvida com um dos mecanismos de regulação da atividade da cinase. A molécula de miristato se liga a uma fenda hidrofóbica localizada no lóbulo C do domínio SH1. Essa ligação provoca uma distorção na última  $\alpha$ -hélice do domínio SH1, a hélice  $\alpha I$ . A hélice  $\alpha I$  impede a ligação do domínio SH2 ao domínio SH1. A ligação do miristato quebra a hélice  $\alpha I$  em uma nova hélice  $\alpha I'$ , que se mantém posicionada como uma tampa para o sítio de ligação a molécula de miristato e conseqüentemente permite a ancoragem do domínio SH2 ao domínio SH1 (**Figura 13**). Dessa maneira, a ligação do miristato parece ser essencial para a manutenção da conformação auto-inibida da unidade catalítica, uma vez que estudos avaliando a participação dessa molécula na ativação do Abl mostraram que sua retirada aumenta constitutivamente a atividade da cinase (NAGAR e cols., 2003; HANTSCHHEL e cols., 2003). Entretanto, estudos contraditórios a esse mecanismo avaliaram a isoforma 1a da proteína Abl, que não é miristoilada. Tanto a isoforma 1a como a isoforma miristoilada 1b foram capazes de recuperar os efeitos deletérios causados pelo silenciamento do gene Abl em modelo murino (HARDIN e cols., 1996), evidenciando que a miristoilação não apresenta uma função crucial para a atividade celular do Abl apesar de participar da ativação da mesma.

Como mencionado anteriormente, a miristoilação é realizada por meio da ligação covalente de uma molécula de miristato ao resíduo de glicina na segunda posição. Na cinase Abl, a miristoilação é realizada no resíduo G2, localizado na região N-terminal ao domínio SH3, também conhecida como o Cap N-terminal. Essa região do Cap compreende cerca de 80 resíduos e recentemente foi também identificada como uma região que participa da regulação da cinase Abl, uma vez que sua deleção aumenta os níveis de fosfotirosinas totais na célula, aumenta a autofosforilação e a atividade cinase “in vitro” (HANTSCHEL e cols., 2003). Apesar da participação do Cap na regulação da cinase Abl, muito se questionou sobre o mecanismo pelo qual essa região regula a proteína. Até hoje é questionável se o Cap funciona apenas como uma região N-terminal que apresenta a molécula de miristato ao domínio SH1, ou se resíduos específicos que compõem o Cap são capazes de interagir com os domínios SH3, SH2 e SH1 e promover a manutenção da forma auto-inibida. A partir desse questionamento, estudos buscaram evidenciar possíveis sítios de interação entre o Cap e os domínios regulatórios (PLUK e cols., 2002; HANTSCHEL e cols., 2003). A mutação de determinados resíduos do Cap, como a K70, juntamente com mutação no resíduo G2, que impede a miristoilação, causam um aumento ainda maior da atividade cinase quando comparado apenas a mutação do resíduo G2 (HANTSCHEL e cols., 2003). Evidências como essa sugerem fortemente que a funcionalidade da região do Cap não se estende a apenas apresentar a molécula de miristato. O mapeamento completo da região do Cap definiu que apenas 15 a 20 resíduos são importantes para a regulação da atividade da cinase Abl, sendo a região central desnecessária para tal mecanismo de regulação.



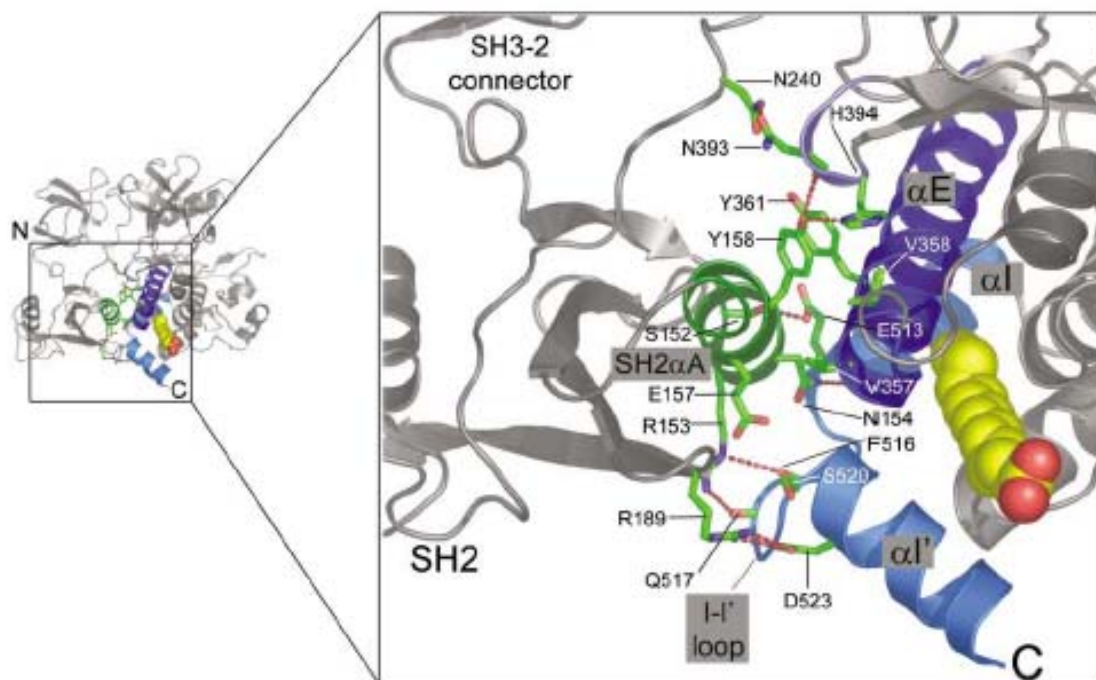
**Figura 13. Regulação da cinase Abl pela molécula de miristoil.** (A) corte de um mapa de superfície evidenciando a fenda hidrofóbica na qual a molécula de miristoil está inserida. (B) detalhes da distorção que ocorre na hélice  $\alpha I$  (cinza) e a formação da nova hélice  $\alpha I'$  (roxo) na região C-terminal do domínio SH1 após ancoramento do grupamento de miristoil (amarelo). Outras hélices- $\alpha$  do domínio SH1 ( $\alpha E$ ,  $\alpha F$  e  $\alpha H$ ) estão representadas em azul. (C) Visualizações da hélice  $\alpha I$  em vermelho mostrando a cinase desligada do miristoil e conseqüentemente impossibilitando o ancoramento do domínio SH2. Após a ligação do miristoil (hélice  $\alpha I'$  em azul) é possível o ancoramento do domínio SH2 a resíduos do domínio SH1. Adaptado de NAGAR e cols., 2003.

#### 1.8.4 Quarto evento - Desacoplamento do domínio SH2 e ligação de fosfopeptídeos

Como mencionado anteriormente, o domínio SH2 é uma região de grande importância na regulação da unidade catalítica da proteína Abl. Esse domínio é capaz de interagir na forma auto-inibida da cinase, com diversos resíduos do domínio SH1 por meio de ligações de hidrogênio. Tal interação só é possível uma vez que a ligação do

miristato ao lóbulo C do SH1 provoca a distorção da hélice  $\alpha I$ , permitindo assim a aproximação do domínio SH2 aos resíduos do domínio catalítico. O resíduo S152, localizado na região N-terminal da hélice  $\alpha SH2A$  faz uma ligação de hidrogênio com a E513 do domínio SH1. O resíduo R153, que faz parte do motivo que interage com resíduos de fosfotirosina de peptídeos substratos, faz duas ligações de hidrogênio com os grupos carbonila dos resíduos F516 e Q517, localizados no loop I-I' gerado pela quebra da hélice  $\alpha I$ . O resíduo N154 faz uma ligação de hidrogênio com o grupo carbonila do E513. Uma série de interações é formada entre a Y158 do domínio SH2, o anel aromático da Y361, da hélice  $\alpha E$  do domínio SH1 e os resíduos N393, do domínio SH1 e N290 do linker SH2-SH1 (**Figura 14**). Como já mencionado anteriormente, a saída do miristato desfaz todas essas interações e afasta o domínio SH2 para longe do SH1. O desacoplamento do domínio SH2 acaba por expor um motivo (FLVR), antes ocluído pelo domínio SH1, que compreende um sítio de ligação a fosfotirosinas. Diversas investigações mostram que a exposição desse motivo e a consequente ligação de fosfopeptídeos substratos são também capazes de aumentar a atividade cinase da proteína Abl, sendo, portanto mais um mecanismo de regulação da enzima (HANTSCHHEL e cols., 2003).





**Figura 14. Interações SH2-SH1 na forma inativa da cinase Abl.** A figura representa as diversas ligações de hidrogênio (pontilhados em vermelho) que ocorrem entre os resíduos do SH2 e SH1 do Abl na forma ligada a molécula de miristoil (amarelo). Hélice SH2 $\alpha$ A em verde, hélice  $\alpha$ E em azul escuro e hélice  $\alpha$ I-I' em azul claro. Os resíduos que participam das ligações de hidrogênio estão representados na forma de bastões. Essas interações são perdidas no momento em que a molécula de miristoil é desligada da cinase. Adaptado de NAGAR e cols., 2003.

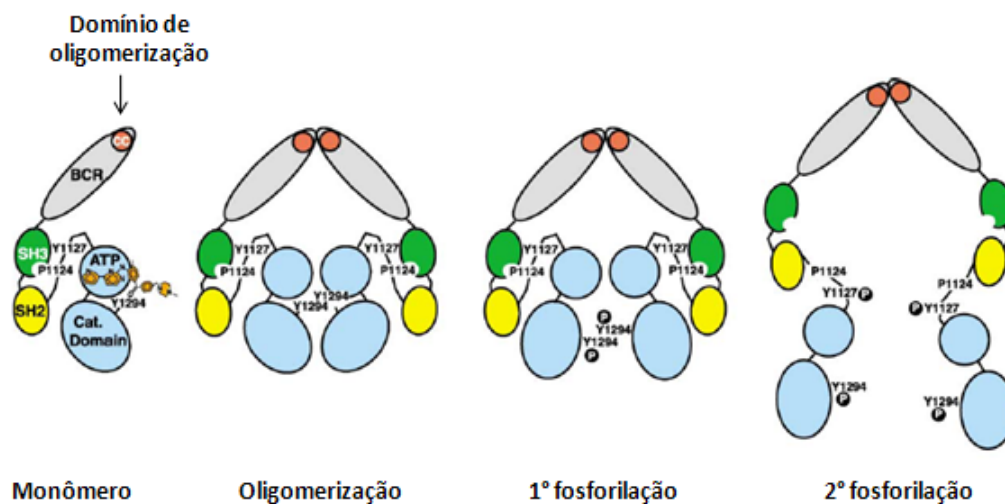
### 1.8.5 Mecanismos de regulação perdidos no Bcr-abl

A proteína Abl, como já discutido, é regulada pelo grupamento miristoil, e os domínios SH3 e SH2 juntamente com fosforilações. Esses diversos mecanismos de regulação mostram que diversas rotas de ativação da proteína “in vivo” podem ocorrer até que ela se encontre totalmente ativada. Dentro do contexto dos mecanismos que envolvem a regulação da proteína Abl, muitos estudos vem buscando um melhor entendimento de como esses mecanismos são perdidos em células leucêmicas que expressam a proteína quimérica Bcr-abl. Como já discutido anteriormente, a

translocação entre o gene bcr e o gene c-abl produz um gene quimérico bcr-abl regulado pelo promotor do gene bcr. O primeiro possível mecanismo envolvido com a perda da regulação na atividade tirosina cinase da proteína Bcr-abl, pode ser explicado a nível genômico, onde o gene c-abl passa a ser controlado pelo promotor do gene bcr e não mais pelo seu promotor específico. Essa alteração pode levar a diferentes níveis de expressão gênica da quimera e conseqüentemente a perda da regulação a nível protéico. Estudos enfatizando a caracterização do promotor do gene bcr podem evidenciar importantes regiões de regulação gênica do gene bcr normal e a partir daí inferir um possível mecanismo de regulação da quimera bcr-abl que reflita na perda do controle na atividade da cinase (ZHU e cols., 1990). Outro ponto de intensa discussão a nível gênico é a depleção do primeiro éxon do gene c-abl durante o mecanismo de translocação com o gene bcr (SMITH e cols., 2003). A saída do primeiro éxon corresponde exatamente a região do Cap N-terminal na proteína quimérica Bcr-abl. A perda do Cap na quimera protéica implica na ausência de um dos mecanismos de regulação discutidos anteriormente, ou seja, a proteína Bcr-abl não apresenta o grupamento miristoil ancorado no domínio SH1, em vista da ausência do Cap, e dessa forma o domínio SH2 está sempre em sua conformação aberta. A perda desse mecanismo de regulação pode estar diretamente relacionada com a atividade cinase descontrolada da quimera.

Outro importante ponto de discussão acerca do descontrole da atividade cinase da quimera Bcr-abl está relacionado com o ganho de importantes domínios da proteína Bcr. Dentro desse contexto, ganha destaque o domínio de oligomerização da proteína Bcr. A deleção do domínio de oligomerização da proteína Bcr-abl diminui a atividade cinase da mesma e seu poder de transformação oncogênica (MCWHIRTER e cols., 1993). Por meio de mutagênese do domínio de oligomerização foi possível evidenciar

que o principal mecanismo de ativação da função cinase corresponde a oligomerização das proteínas Bcr-abl (SMITH e cols., 2003). A partir dessas descobertas, foi possível sugerir um modelo simples de oligomerização das proteínas Bcr-abl e sua participação no incremento e manutenção da desregulação da atividade cinase (**Figura 15**).



**Figura 15. Modelo de ativação da cinase Bcr-abl.** Na forma monomérica, a proteína Bcr-abl se encontra em seu estado inativo e desfosforilada. Após oligomerização por meio do domínio de oligomerização do Bcr, ocorre uma autofosforilação primária na Y412 seguido da Y245. Essas fosforilações levam a cascata de eventos discutidos anteriormente e a consequente ativação da cinase Bcr-abl. Em cinza proteína Bcr, em verde o domínio SH3, em amarelo o domínio SH2 e em azul o domínio SH1. Adaptado de SMITH e cols., 2003.

### 1.9 Opções de tratamento para a LMC

O tratamento para a LMC evoluiu lentamente de início, mas no decorrer dos últimos 20 anos, novos medicamentos surgiram como opções de tratamento. Diversos citoreduativos como Busulfan e hidroxyuréia surgiram como alternativas ao combate paliativo a neoplasia. Até recentemente, acreditava-se que o melhor tratamento para interromper o estado leucêmico era o uso exclusivo de  $\alpha$ -interferon, capaz de ativar

células “natural killers”, ou conjugado a cytarabina (GUILHOT e cols., 1997). O único tratamento considerado curativo para a LMC é o transplante de medula óssea alogeneico (TMO) HLA-compatível. Apesar de ser considerado o único tratamento capaz de erradicar a leucemia, o TMO possui apreciável taxa de mortalidade e morbidade. Próximo do ano de 1990, muito desse quadro mudou com o advento do Mesilato de Imatinibe.

Sabendo-se que a atividade cinase desregulada do Bcr-abl apresenta papel crucial na patogênese da LMC, Druker, e colaboradores, se engajaram no propósito de encontrar uma pequena molécula capaz de inibir a atividade tirosina cinase do Bcr-abl (DRUKER, 2002). Esse esforço rendeu a descoberta de uma fenilaminopirimidina, nomeada inicialmente por CGP 57148B (também conhecida como Mesilato de Imatinibe ou STI-571, e comercializado como Glivec), a qual é capaz de ocupar o sítio de ligação do ATP no bolso catalítico da cinase, impedindo o acesso do mesmo (**Figura 16**) e, conseqüentemente, a fosforilação de quaisquer substratos. Ensaios pré-clínicos mostraram que a molécula era altamente eficaz no bloqueio da atividade cinase do Abl, no receptor do fator de células-tronco c-Kit e no receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas PDGF-R, entretanto era pouco eficaz para outras cinases (BUCHDUNGER e cols., 2000).

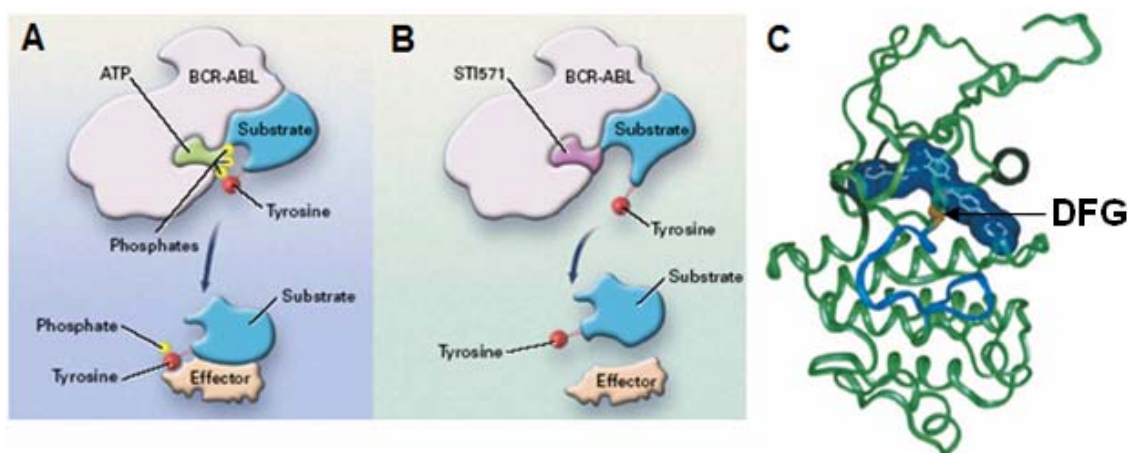
Resultados encorajadores levaram Druker a realizar em 1998, ensaios clínicos com 83 pacientes portadores de LMC em fase crônica (DRUKER e cols., 2001a) e 58 em crise blástica (DRUKER e cols., 2001b). Os resultados desses ensaios mostraram que a molécula, agora renomeada como STI-571 (“signal transduction inhibitor”) foi capaz de reverter rapidamente as anormalidades clínicas e hematológicas da fase crônica da LMC e reduzir os níveis de células Ph<sup>+</sup> na medula óssea. O perfil tóxico da molécula foi considerado suave para o grau de potência alcançado pela droga. A droga

em pouco tempo ganhou o status de melhor agente terapêutico no combate a LMC. O sucesso alcançado pelo STI-571 no combate a fase crônica da LMC, foi também alcançado em fases mais tardias da doença. O medicamento se mostrou eficaz no tratamento de pacientes na fase acelerada (TALPAZ e cols., 2002) e blástica (SAWYERS e cols., 2002) da LMC, levando a respostas citogenéticas e hematológicas duráveis.

A estrutura cristalográfica do domínio SH1 juntamente com o Glivec evidenciou que essa molécula recém descoberta só era capaz de se ligar na conformação inativa da cinase Abl (NAGAR e cols., 2002). A elucidação dessa estrutura levantou o questionamento de como células leucêmicas Bcr-abl positivas poderiam ser inibidas pelo Glivec, tendo em vista que a proteína Bcr-abl nessas células se encontra constantemente fosforiladas na sua conformação ativa e como o Glivec seria capaz de se ligar a tal estrutura. Uma das hipóteses aceitas é a de que a fosforilação do loop de ativação na cinase Abl seria um mecanismo dinâmico. A ação de fosfatases celulares manteria o complexo Bcr-abl transientemente desfosforilado, permitindo assim uma possível ligação do inibidor e inativação da cinase (NAGAR e cols., 2002). Outra hipótese aceita seria a de que o inibidor seria capaz de sequestrar moléculas protéicas do Bcr-abl recém sintetizadas impossibilitando sua posterior fosforilação (NAGAR e cols., 2002).

Apesar de o tratamento ter se mostrado eficaz em todas as fases da doença, em muitos casos a terapia com o inibidor apresenta baixa responsividade dentro de um intervalo de tempo pós-terapia. A ausência de resposta na fase aguda da doença é tipicamente devido a emergência de mutações na proteína Bcr-abl que a fazem não ser responsivas ao inibidor. Alguns investigadores acreditam que o processo de aquisição de mutações seja seletivo, onde as mutações já fazem parte do genoma das quimeras em

células primitivas (LESTIENNE e cols., 2002). Já foi visto que o inibidor é insensível as células-tronco hematopoiéticas Ph<sup>+</sup> “in vitro” (GRAHAM e cols., 2002), fato que reforça a hipótese de que a aquisição de mutações ao longo do tratamento seja um processo seletivo. Nos últimos anos, novos inibidores, mais potentes e que conseguem responder as mutações conferidas pelo STI-571, foram desenvolvidos entre eles o AMN107 (WEISBERG e cols., 2005) e o BMS-354825 (SHAH e cols., 2004; TOKARSKI e cols., 2006). Novas classes de inibidores, capazes de atuar por meio de mecanismos alostéricos e não mais no alvo de ligação ao ATP, vem sendo desenvolvidos e acredita-se que essa estratégia possa resultar em grandes avanços no tratamento das leucemias (ADRIAN e cols., 2006).



**Figura 16. Modelo de atuação do STI-571.** A droga conhecida atualmente pelo nome de Glivec® é um inibidor competitivo pelo sítio de ligação da molécula trifosfato de adenosina (ATP). Em (A) o ATP se ancora no Bcr-abl e transfere um de seus fosfatos a proteínas alvos. Em (B) a situação na presença do inibidor, inviabilizando o acesso do ATP. Em (C) a estrutura cristalizada do domínio catalítico cinase (SH1) obtido quando complexado ao Glivec. Em azul claro o “loop” de ativação, em dourado o motivo DFG e em verde escuro a hélice  $\alpha$ C e o conector entre os lóbulos do domínio SH1. Adaptado de NAGAR e cols., 2002.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivos Gerais

- Melhor compreensão dos diferentes métodos de diagnóstico molecular, citogenético e citológico e monitoramento molecular na Leucemia Mielóide Crônica (LMC) assim como avaliação termodinâmica e estrutural dos domínios regulatórios SH3 e SH2 e catalítico SH1 envolvidos na patogênese da LMC.

### 2.2 Objetivos específicos

- Monitoramento de dois pacientes pediátricos portadores de LMC em tratamento com Mesilato de Imatinibe a fim de compreender melhor a dinâmica de aquisição da doença residual mínima e responsividade a droga na população infantil.

- Expressão e purificação da unidade regulatória SH3-SH2-SH1, SH2-SH1 e SH1 da proteína Bcr-abl em sistema heterólogo (*E.coli*) a fim de facilitar estudos estruturais e biofísicos com tais domínios.

- Caracterização termodinâmica das construções supracitadas a fim de compreender a participação dos domínios regulatórios SH3 e SH2 frente ao domínio SH1 e suas estabilidades dentro da unidade regulatória SH3-SH2-SH1.

### **3 Materiais e Métodos**

#### **3.1 Aquisição de amostras**

A população em estudo foi composta por amostras de medula óssea e sangue periférico de 2 pacientes com suspeitas de LMC; um dos pacientes faz parte do Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) e o outro é paciente do Instituto de Pediatria e Puericultura Martagão Gesteira (IPPMG). Foram utilizados também bolsas de “buffy coat” (concentrado de leucócitos) de 5 doadores do Banco de Sangue do HUCFF. Todas as amostras foram obtidas após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido dos responsáveis e o projeto pode ser realizado após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPPMG (anexo).

#### **3.2 Isolamento de células mononucleares da medula óssea ou sangue periférico**

Foram utilizados entre 5 e 10 mL de sangue periférico ou medula óssea para cada estudo. As amostras foram diluídas na proporção de 1:1 com PBS e submetidas a gradiente de densidade com Hesperan®. Para cada 6 mL de amostra utilizou-se 1 mL de Hesperan. Após precipitação dos eritrócitos, o sobrenadante das células brancas foi retirado, misturado com PBS na proporção 1:1 e lavado por meio de centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm a 4 °C. Após centrifugação, o sedimento celular foi solubilizado em 1 mL de PBS e submetido a contagem em câmara de Neubauer.



### **3.3 Contagem de Células**

A contagem de células viáveis foi realizada com uma suspensão celular diluída na proporção de 1:10 em Trypan blue 0,4%. Foi utilizado também Líquido de Turk para a contagem das células com exclusão de hemácias. De acordo com a quantidade de células obtidas, procedimentos alternativos foram utilizados para o isolamento de ARN, segundo estimativas do número de células previamente isoladas. Amostras contendo  $10^7$  células ou mais foram congeladas em Trizol® (1 mL de Trizol para cada  $10^7$  células). Amostras contendo entre  $2 \times 10^6$  e  $5 \times 10^6$  células foram congeladas com Tiocianato de Guanidina (0,5 mL de guanidina para cada  $2 \times 10^6$  células).

### **3.4 Isolamento de ARN**

Para o procedimento de extração de ARN, todos os cuidados necessários foram tomados, a fim de evitar possíveis degradações do material isolado: Foi utilizado água estéril previamente tratada com Dietil pirocarbonato (DEPC) e as bancadas, vidraria e micropipetas foram limpas com RNase away (Invitrogene n° cat- 10328011).

#### 3.4.1 Método de Isolamento de ARN com Trizol

O protocolo de extração de ARN a partir do Trizol (Invitrogene n° cat - 15596026) foi seguido de acordo com o recomendado. Brevemente, os lisados foram retirados do congelamento e mantidos em temperatura ambiente durante 5 minutos, adicionando-se em seguida 0,2 mL de clorofórmio para cada mL de trizol previamente colocado. Os volumes finais foram agitados vigorosamente por 2 minutos e

posteriormente centrifugados a 4 °C, 12500 rpm por 15 minutos. Um controle negativo da reação foi realizado colocando-se água tratada previamente com DEPC no lugar da suspensão celular. Após centrifugação e formação do gradiente, o sobrenadante foi retirado com micropipeta. O ARN foi precipitado por meio da adição de 0,5 mL de isopropanol, sendo esse volume proporcional a cada 1 mL de Trizol utilizado inicialmente. Passados 10 minutos a temperatura ambiente, o ARN foi sedimentado por centrifugação 12500 rpm, 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado em etanol 75% e, posteriormente, diluído em 20 µL de água estéril previamente tratada com DEPC.

#### 3.4.2 Método de isolamento de ARN com Tiocianato de Guanidina (CHOMCZYNSKI e cols., 1987)

Os lisados foram descongelados a temperatura ambiente. De acordo com a proporção de guanidina inicial, foram adicionados 50 µL de acetato de sódio 2 M pH 4 e 300 µL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (12:1:1), misturando-se gentilmente as soluções. Posteriormente, os tubos foram resfriados a 4 °C por 15 minutos e centrifugados a 12500 rpm durante 15 minutos. Após centrifugação, pode ser observada a formação de duas fases. O sobrenadante foi retirado com micropipeta. O ARN foi precipitado com a adição de 0,5 mL de isopropanol. Os tubos foram mantidos a -20 °C por 90 minutos ou a -80 °C por 10 minutos, sendo o ARN posteriormente, centrifugado a 12500 rpm por 15 minutos a 4 °C. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o ARN lavado com etanol 70%. O material foi seco em estufa 37 °C e diluído em 20 µL de água estéril previamente tratada com DEPC.

### **3.5 Quantificação do ARN por espectrofotometria**

O ARN foi diluído em água MilliQ na proporção de 1:300 e as absorbâncias (abs) foram lidas nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A quantificação de ARN foi realizada por meio da seguinte equação:  $\text{abs } 260 \text{ nm} \times 40 \times \text{fator de diluição}$ . A quantificação de contaminantes protéicos na amostra isolada foi calculada pela equação:  $\text{abs } 280 \text{ nm} \times 50 \times \text{fator de diluição}$ . O razão de pureza ( $\text{abs } 260 \text{ nm} / \text{abs } 280 \text{ nm}$ ) é considerado um indicador da qualidade do isolamento. Consideraram-se aceitáveis valores de razão de pureza  $A_{260/280}$  entre 1,6 a 2. As concentrações foram calculadas na unidade de  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . O espectrofotômetro utilizado foi um Beckman Coulter DU 800.

### **3.6 Avaliação da integridade do ARN**

Géis de agarose 0,8% em tampão TAE foram realizados para avaliar a integridade do ARN por meio de corridas eletroforéticas. As amostras foram aplicadas no gel misturando-se 1  $\mu\text{L}$  da solução de ARN com 2  $\mu\text{L}$  de solução de aplicação de ARN. Foram consideradas aceitáveis amostras que apresentaram um padrão de bandas característico de ARN, onde se é possível detectar 2 bandas discretas, correspondentes ao ARNr 28S e 18S de aproximadamente 5 kb e 2 kb.

### **3.7 Síntese do ADNc pela transcriptase reversa**

De acordo com a quantidade de ARN obtida no isolamento, foram utilizadas entre 1 e 2  $\mu\text{g}$  de ARN para um volume final de 20  $\mu\text{L}$  de ADNc ou 3 e 4  $\mu\text{g}$  de ARN para um volume final de 40  $\mu\text{L}$  de ADNc. As amostras de ARN foram diluídas em água

tratada com DEPC para volumes de 10,2  $\mu\text{L}$  ou 20,4  $\mu\text{L}$ , respectivamente. Essas soluções foram aquecidas a 65 °C durante 10 minutos de forma a eliminar estruturas secundárias e após esse tempo, os tubos foram imediatamente colocados em gelo. Adiante (**Tabela 5**) é possível identificar os volumes dos reagentes necessários para a síntese do ADNc.

**Tabela 5. Síntese do ADNc**

Reagentes	Vol. Final de ADNc	
	20 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$
Solução 25 mM DNTPs *	0,8 $\mu\text{L}$	1,6 $\mu\text{L}$
Tampão de reação 5x	2 $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$
Iniciadores randômicos (50 pmol/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
RNAse inibitor (5000 U/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
Transcriptase reversa (200 U/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$

\* Esta solução de deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) contém proporções iguais de dATP, dTTP, dCTP e dGTP

Após mistura dos reagentes para síntese do ADNc, estes foram adicionados a respectiva solução de ARN previamente mantida em gelo de forma a completar o volume de 20  $\mu\text{L}$  ou 40  $\mu\text{L}$  dependendo da quantidade de ARN obtida na extração. As misturas finais foram mantidas por 10 minutos a temperatura ambiente para iniciar a reação enzimática e incubadas logo em seguida a 42 °C por 50 minutos. Finalmente, os tubos foram aquecidos a 70 °C durante 5 minutos para a finalização da reação por inativação enzimática. Nessa etapa de síntese do ADNc, também foram realizados controles negativos. Os controles consistiam na utilização da totalidade dos reagentes

sem o ARN (cRT) e com o controle negativo da extração do ARN (cARN). Foram feitos também controles positivos que consistiam da síntese de ADNc a partir do ARN das linhagens leucêmicas K562, SUP-B15 e de doadores.

### **3.8 Amplificação do ADNc para os transcritos bcr-abl por meio do RT-PCR**

Foram utilizados diferentes protocolos de RT-PCR para o estudo dos pacientes. Primeiramente, foi amplificado um gene constitutivamente expresso GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase), senso: 5'-ATCACCATCTCCAGGAGCG-3' e antisenso: 5'-CCTGCTCACCACCTTCTTG-3', de forma a verificar a integridade da síntese do ADNc. Para isso, cada tubo continha 2 µL de ADNc da amostra, somado a 20 µL dos reagentes para GAPDH (Tampão 10x, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs e iniciadores) e 0,5 µL de Taq polimerase (5 U/µL). Após amplificação o produto era visualizado em corridas eletroforéticas com gel de agarose 1,4% corados com brometo de etídeo na concentração de 1 µg/µL. Verificado a eficiência do ADNc, foi iniciado um RT-PCR qualitativo chamado Multiplex, de baixa sensibilidade, de forma a diagnosticar os tipos de transcritos leucêmicos expressos na população em estudo. Caso o resultado do Multiplex mostrasse negatividade, um protocolo de RT-PCR Nested, mais sensível, que consiste em duas etapas de amplificação, era realizado. Outra análise realizada na população consistia na quantificação dos transcritos leucêmicos e para isso foi utilizado o protocolo de RT-PCR competitivo, que se baseia no protocolo de Nested, porém com os competidores pNC210<sup>Bcr-Abl</sup> e pNC190<sup>Bcr-Abl</sup>.

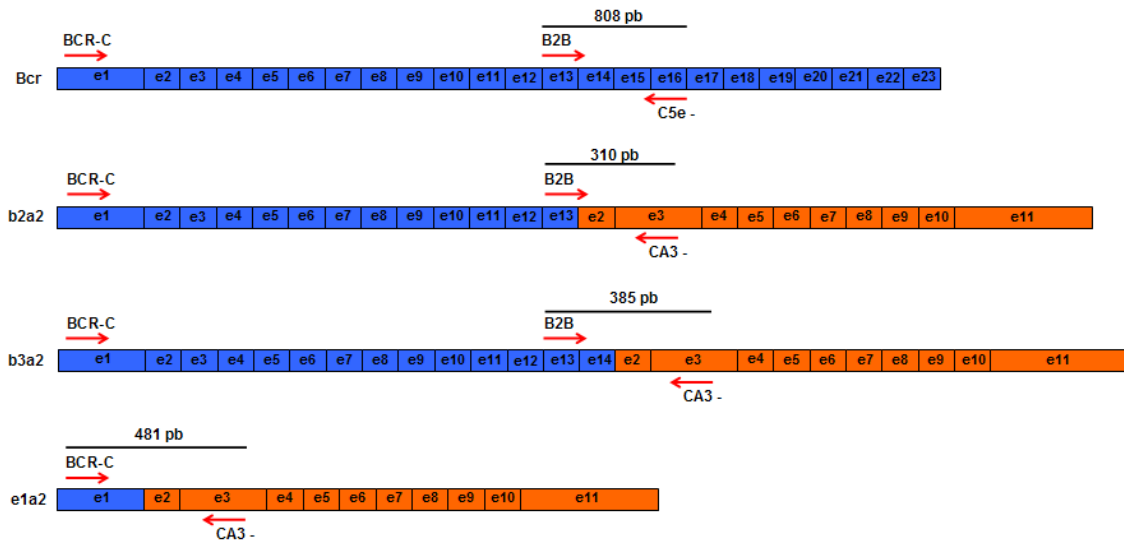
### 3.8.1 RT-PCR Multiplex

A presença dos diferentes transcritos bcr-abl (b3a2, b2a2 ou e1a2) foi testada mediante RT-PCR Multiplex (OTAZU e cols., 2000), que apresenta uma sensibilidade de detecção de 1 célula tumoral em  $10^3$  células analisadas. Nessa mesma reação, tem-se a possibilidade de amplificar um controle interno da síntese do ADNc. Para a realização desse protocolo são utilizados quatro iniciadores em uma mesma reação de amplificação.

Quando os iniciadores B2B e CA3- (**Tabela 6**) foram utilizados, amplificou-se uma sequência compreendida entre o éxon 13 do gene bcr e o éxon 3 do gene c-abl com tamanhos de 385 e 310 pb, correspondentes aos transcritos b3a2 e b2a2, respectivamente. Quando pacientes apresentam co-expressão dos transcritos b3a2 e b2a2, esse protocolo é capaz de amplificar ambas as isoformas. Com os iniciadores BCR-C e CA3- (**Tabela 6**), amplificou-se uma sequência compreendida entre o éxon 1 do gene bcr e o éxon 3 do gene c-abl, com tamanho de 481 pb correspondente ao transcrito e1a2. Como controle interno da síntese do ADNc, foram utilizados os iniciadores B2B e C5e- (**Tabela 6**) que amplificam uma sequência compreendida entre os éxons 13 e 16 do gene bcr (**Figura 17**). A presença desse produto (808 pb), juntamente com o produto do GAPDH (666 pb) nos permitiu descartar resultados falsos negativos para o bcr-abl.

Em cada tubo, excetuando-se os utilizados para controles negativos, foram misturados 2  $\mu$ L de ADNc com 21  $\mu$ L dos reagentes para Multiplex, (**Tabela 7**). Em seguida, 0,5  $\mu$ L de Taq Polimerase (5 U/ $\mu$ L) foram adicionados ao tubo. Os tubos foram submetidos aos ciclos descritos na Tabela 8 e seus produtos foram visualizados em géis

de agarose 1,4% corados com brometo de etídeo (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) após corridas eletroforéticas em tampão TAE.



**Figura 17. Esquema do RT-PCR Multiplex.** O esquema representa o gene *bcr* e os transcritos leucêmicos *b2a2*, *b3a2* e *e1a2*. As setas vermelhas indicam os iniciadores utilizados para amplificar cada um dos transcritos assim como o controle interno da síntese de ADNc. O tamanho do produto amplificado é representado pelas barras pretas. Gene *bcr* em azul e gene *abl* em laranja.

**Tabela 6.** Iniciadores e condições experimentais de RT-PCR qualitativo e competitivo Bcr-abl

Tipo de RT-PCR	Iniciadores	Sequências 5' - 3'	Ciclagem
Multiplex	BCR-C	ACC GCA TGT TCC GGG ACA AAA G	1 ciclo de 99° (10''), 96° (1'), 61° (3'), 72° (2'), 99° (5''), 97° (20''), 60° (30''), 61° (25''), 78° (10''), 73° (50''), 31 ciclos de 96° (1'), 61° (3'), 72° (2'), 1 ciclo de extensão final de 73° (10').
	B2B	ACA GAA TTC CGC TGA CCA TCA ATA AG	
	C5e -	ATA GGA TCC TTT GCA ACC GGG TCT GAA	
	CA3 -	TGT TGA CTG GCG TGA TGT AGT TGC TTG G	
Nested 1° etapa (qualitativo e competitivo)	BCR1 +	GAA CTC GCA ACA GTC CTT CGA C	1 ciclo de 99° (5''), 96° (1'), 70°(25''), 73°(1'), 31 ciclos de 96°(1'), 70° (25''), 73° (1'), 1 ciclo de extensão final de 73° (10').
	NB1 +	GAG CGT GCA GAG TGG AGG GAG AAC A	
	Abl3 -	GGT ACC AGG AGT GTT TCT CCA GAC TG	
Nested 2° etapa (qualitativo e competitivo)	E1N +	AGA TCT GGC CCA ACG ATG ACG A	1 ciclo de 99° (5''), 97° (1'), 65° (3'), 72° (2'), 99° (5''), 97° (30''), 63° (30''), 65° (40''), 78° (10''), 73° (50''), 31 ciclos de 96° (1'), 65° (3'), 72° (2'), 1 ciclo de extensão final de 73° (10').
	B2A	TTC AGA AGC TTC TCC CTG ACA T	
	CA3 -	TGT TGA CTG GCG TGA TGT AGT TGC TTG G	
Amplificação Abl (competitivo)	A2N	CCC AAC CTT TTC GTT GCA CTG T	1 ciclo de 99° (10''), 96°(1'), 65° (3'), 72° (2'), 99° (10''), 97° (30''), 63° (30''), 65° (25''), 78° (10''), 73° (50''), 31 ciclos de 96° (1'), 65° (3'), 72° (2'), 1 ciclo de extensão final de 73° (10').
	A4 -	CGG CTC TCG GAG GAG ACG ATGA	



Tabela 7. Reagentes para RT-PCR bcr-abl

	<i>MULTIPLEX</i>	<i>NESTED P210 1° etapa</i>	<i>NESTED P210 2° etapa</i>	<i>NESTED P190 1° etapa</i>	<i>NESTED P190 2° etapa</i>	<i>ABL</i>
Tampão 10x	120 µL	125 µL	100 µL	125 µL	125 µL	125 µL
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	45 µL	62,5 µL	35 µL	45 µL	35 µL	44 µL
DNTPs 25 mM	9,6 µL	10 µL	8 µL	10 µL	8 µL	10 µL
Iniciador 1	5,6 µL <b>CA3</b>	5,2 µL <b>NB1+</b>	4,6 µL <b>CA3</b>	4,5 µL <b>BCR1+</b>	4,6 µL <b>CA3</b>	4,5 µL <b>A4</b>
Iniciador 2	5,3 µL <b>c5e</b>	5,4 µL <b>aBL3</b>	3,6 µL <b>B2A</b>	5,4 µL <b>aBL3</b>	3,6 µL <b>E1N+</b>	4,5 µL <b>A2N</b>
Iniciador 3	5 µL <b>B2B</b>	–	–	–	–	–
Iniciador 4	4,4 µL <b>BCR-C</b>	–	–	–	–	–
Água Miliq	805 µL	792 µL	849 µL	810 µL	849 µL	812 µL

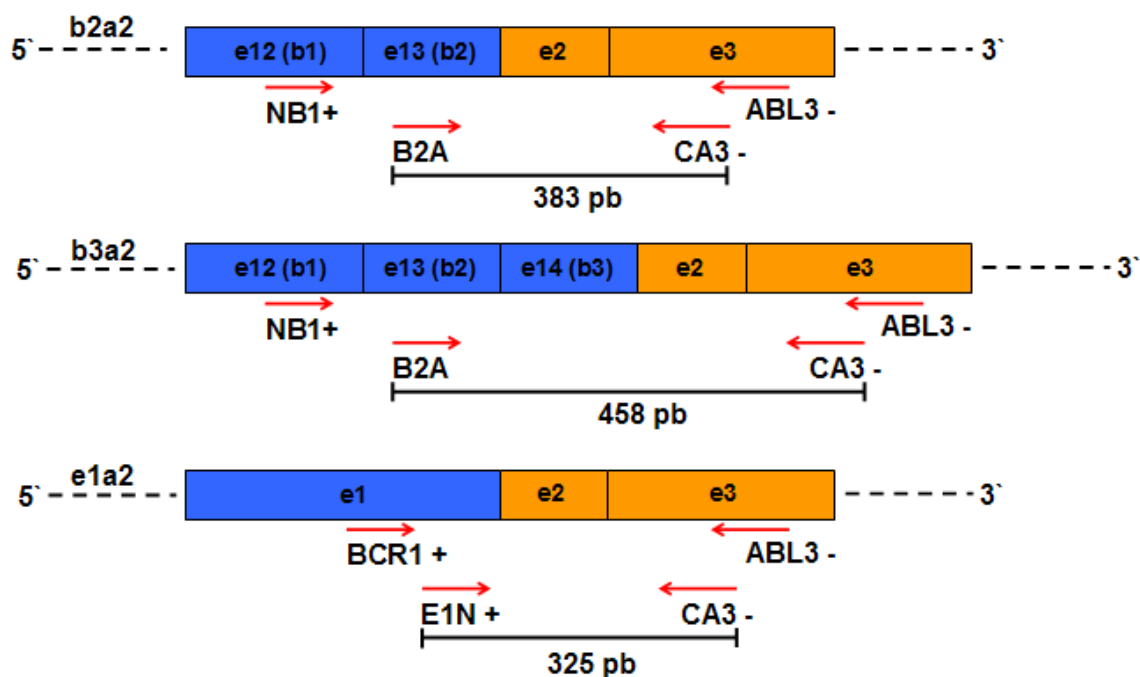
### 3.8.2 RT-PC Nested

Quando o RT-PCR Multiplex apresentava resultado negativo, o ADNc do paciente era submetido a um protocolo de RT-PCR mais sensível, capaz de detectar 1 célula tumoral em  $10^6$  células analisadas. Esse protocolo consiste de duas etapas sucessivas de amplificação (OTAZU e cols., 1999). A primeira etapa é realizada com iniciadores mais distantes (externos) ao ponto de fusão do bcr-abl e a segunda etapa com um par de iniciadores mais próximos (internos) ao ponto de fusão.

Na primeira etapa para amplificar os ADNc dos transcritos b3a2, b2a2 foram utilizados os iniciadores mais externos NB1+ e ABL3- (**Tabela 6**), que amplificam uma sequência compreendida entre o éxon 12 do gene bcr e o éxon 3 do gene c-abl (**Figura 18**). Para isso, foram misturados em cada tubo, 5  $\mu$ L de ADNc da amostra, 20  $\mu$ L dos reagentes para Nested 1<sup>o</sup> etapa (**Tabela 7**) e 0,5  $\mu$ L de Taq Polimerase (5 U/ $\mu$ L). Após amplificação, uma segunda etapa de amplificação é realizada como os iniciadores mais internos B2A e CA3- (**Tabela 6**), que amplificam uma sequência compreendida entre o éxon 13 do gene bcr e o éxon 3 do gene c-abl (**Figura 18**). Para isso, cada tubo da segunda etapa continha, 1  $\mu$ L do produto amplificado da primeira etapa somado a 19  $\mu$ L dos reagentes para Nested 2<sup>o</sup> etapa (**Tabela 7**) e 0,5  $\mu$ L de Taq Polimerase (5 U/ $\mu$ L).

Da mesma forma, para a amplificação do ADNc do transcrito e1a2, foram usados os iniciadores BCR1+ e ABL3- (**Tabela 6**) na primeira etapa de reação, que amplifica uma sequência compreendida entre o éxon 1 do gene bcr e o éxon 3 do gene c-abl. A segunda etapa foi realizada com os iniciadores E1N+ e CA3- (**Tabela 6**) mais internos. Esses permitiram a amplificação de uma sequência mais interna ao éxon 1 do gene bcr e o éxon 3 do gene c-abl (**Figura 18**). Os produtos da segunda etapa de amplificação tanto para os transcritos b2a2, b3a2 e e1a2 eram visualizados após corridas

eletroforéticas em Tampão TAE e gel de agarose 1,4% corados com brometo de etídeo. Os produtos da segunda etapa apresentam tamanhos de 383, 458 e 325 pb, respectivamente.



**Figura 18. Esquema do RT-PCR Nested.** O esquema representa os pontos de quebra dos transcritos b2a2, b3a2 e e1a2. As setas vermelhas correspondem às posições dos iniciadores utilizados na 1ª e 2ª etapa do protocolo de Nested para cada um dos transcritos e o tamanho dos fragmentos são representados pelas barras pretas. Gene bcr em azul e gene c-abl em laranja.

### 3.8.3 RT-PCR competitivo

#### 3.8.3.1 RT-PCR p210<sup>Bcr-abl</sup> e p190<sup>Bcr-abl</sup>

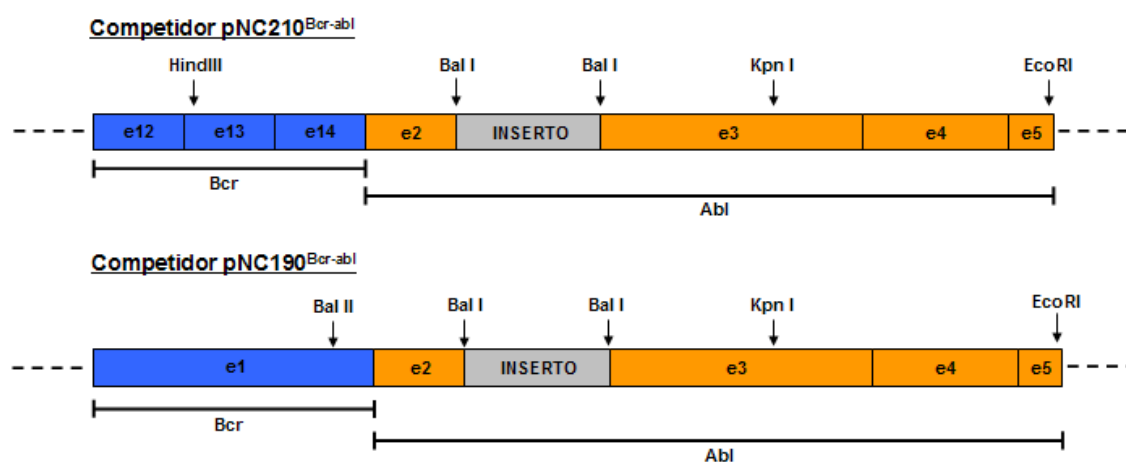
O RT-PCR competitivo foi realizado com o objetivo de estimar a carga tumoral da população de estudo. Esse RT-PCR foi realizado mediante duas etapas de amplificação. Os competidores dos ADNc b3a2 e e1a2 foram construídos a partir do

ADNc de cada transcrito, nos quais, foi inserido um fragmento de 101 pb entre a região 3' do éxon 2 e a região 5' do éxon 3 do gene c-abl (OTAZU e cols., 2002; CROSS e cols., 1993). Cada competidor foi inserido em um plasmídeo, sendo nomeados pNC210<sup>Bcr-abl</sup> e pNC190<sup>Bcr-Abl</sup> para b3a2 e e1a2, respectivamente (**Figura 19**). Posteriormente, os plasmídeos foram linearizados e quantificados, obtendo-se uma concentração de  $10^9$  moléculas de competidor para cada 2,5  $\mu$ L de solução contendo 1 mM Tris pH 7,5 e 0,1 mM EDTA. Diluições em série foram realizadas, obtendo-se concentrações entre  $10^7$  e  $10^1$  moléculas para cada 2,5  $\mu$ L de competidor. As concentrações estoque de ambos os plasmídeos foram mantidas em  $-70$  °C e as diluições foram usadas para os ensaios competitivos. O protocolo e os iniciadores utilizados foram os mesmos utilizados no RT-PCR Nested (**Tabela 7 e Figura 20**).

Para quantificação dos transcritos b3a2 e b2a2 utilizou-se o competidor pNC210<sup>Bcr-abl</sup> e para quantificação do transcrito e1a2 o competidor pNC190<sup>Bcr-Abl</sup>. Três tubos de reação de RT-PCR com diferentes diluições do competidor (por exemplo,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ) foram preparados para cada paciente quando a presença do transcrito bcr-abl tenha sido detectada previamente por Multiplex. Do mesmo modo, diluições entre  $10^3$  e  $10^1$  moléculas foram utilizadas quando a detecção foi feita por RT-PCR Nested.

Na primeira etapa do RT-PCR, o competidor foi co-amplificado com a amostra do paciente, misturando-se 2,5  $\mu$ L do ADNc da amostra, com 2,5  $\mu$ L do competidor, juntamente com 20  $\mu$ L dos reagentes para Nested 1° etapa (**Tabela 7**) e 0,5  $\mu$ L de Taq Polimerase (5 U/ $\mu$ L). O produto da primeira amplificação foi novamente amplificado na segunda etapa. Nessa etapa, 2  $\mu$ L do produto da primeira amplificação foram diluídos em 400  $\mu$ L de água. Em seguida, 1  $\mu$ L dessa diluição foi acrescido a 19  $\mu$ L dos reagentes para Nested 2° etapa (**Tabela 7**) juntamente com 0,5  $\mu$ L de Taq Polimerase (5 U/ $\mu$ L).

Os produtos da segunda etapa foram visualizados em corridas eletroforéticas em tampão TAE com géis de agarose 1,4% corados com brometo de etídeo (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). O produto correspondente ao competidor pNC210<sup>Bcr-abl</sup> apresentou uma banda de 559 pb, enquanto que os produtos das amostras amplificadas apresentaram tamanhos de 458 pb para b3a2 e 383 pb para b2a2. Quando o competidor pNC190<sup>Bcr-abl</sup> foi utilizado, a banda correspondente apresentou 426 pb e o produto amplificado para e1a2 foi de 325 pb (Figura 20). A estimativa da quantificação dos transcritos foi realizada quando ambas as bandas (competidor e amostra) apresentaram-se com igual intensidade quando submetidas a análise em transluminador.

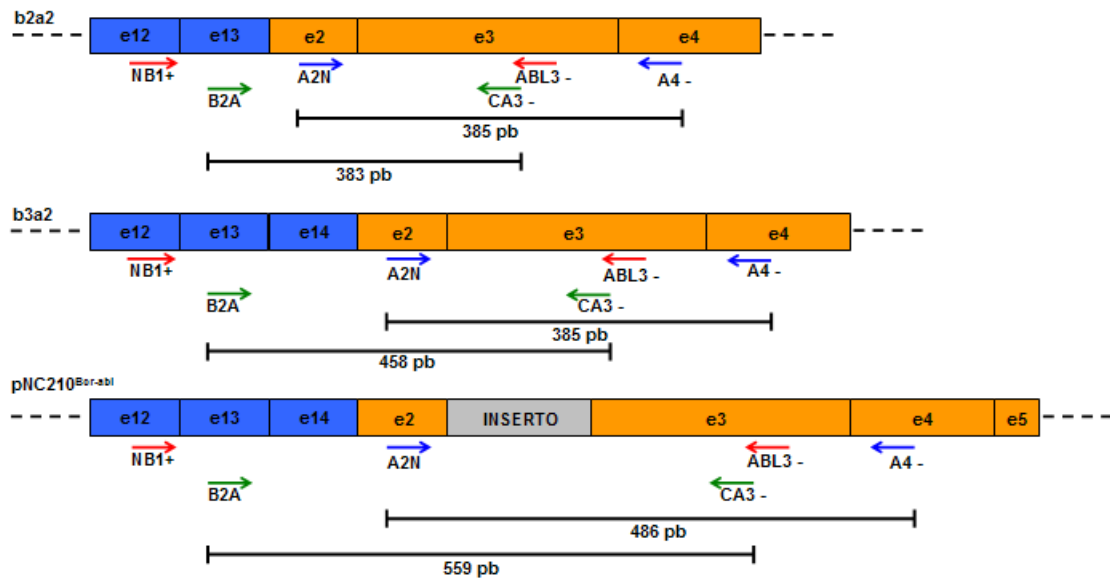


**Figura 19. Desenho dos competidores pNC210<sup>Bcr-abl</sup> e pNC190<sup>Bcr-abl</sup>.** O esquema ilustra a estratégia utilizada na montagem dos competidores utilizados no RT-PCR competitivo. As setas verticais indicam os diferentes sítios de clivagem por enzimas de restrição utilizadas para as construções. Ambos os competidores apresentam uma inserção no éxon e2 do gene c-abl de um fragmento de 101 pb.

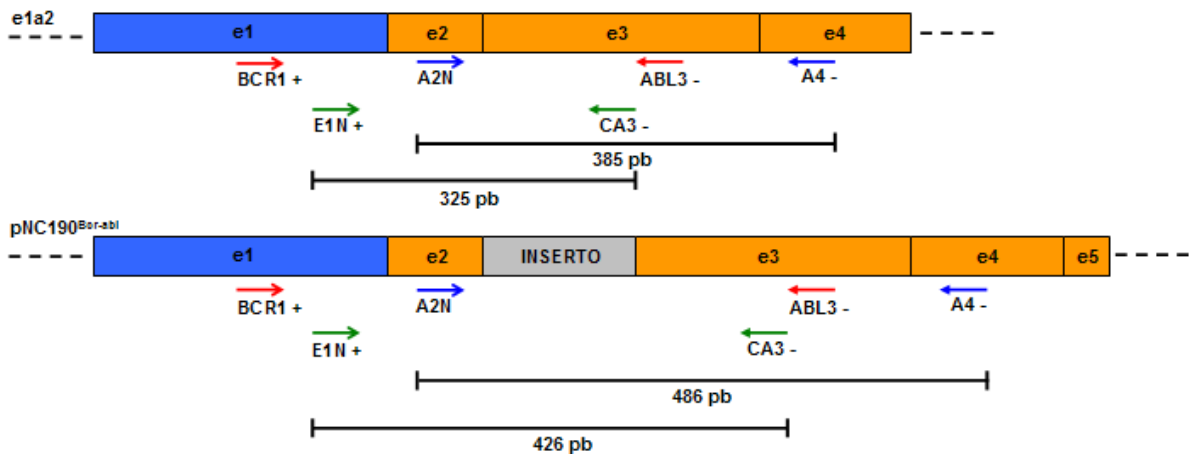
### 3.8.3.2 RT-PCR para transcritos abl

A quantificação de transcritos c-abl por RT-PCR competitivo permite estabelecer um controle interno da quantificação dos transcritos bcr-abl. Paralelamente, foi possível estimar a carga tumoral dos pacientes utilizando a razão BCR-ABL/ABL. Com os iniciadores A2N e A4 – (**Tabela 6**), que amplificam uma região compreendida entre os éxons 2 e 3 do gene c-abl, o competidor apresentou um tamanho de 486 pb enquanto o ADNc do transcrito c-abl normal apresentou tamanho de 385 pb (**Figura 20**). Em cada tubo, com exceção dos controles negativos foram misturados 2,5 µL do competidor e 2,5 µL do ADNc em 21 µL dos reagentes para Abl (**Tabela 7**) e 0,5 µL de Taq Polimerase (5 U/µL). Os produtos foram visualizados em corridas eletroforéticas como descrito anteriormente.

A



B



**Figura 20. Produtos amplificados por RT-PCR competitivo.** Em (A) e (B) são ilustrados, respectivamente, os diferentes rearranjos p210<sup>Bcr-abl</sup> e p190<sup>Bcr-abl</sup> juntamente com o competidor pNC210<sup>Bcr-abl</sup> e pNC190<sup>Bcr-abl</sup> e os iniciadores utilizados no RT-PCR competitivo. As caixas indicam os éxons e as setas indicam os iniciadores utilizados no protocolo de RT-PCR competitivo para p190 e p210. As cores das setas indicam os jogos de iniciadores correspondentes a primeira etapa (vermelho), segunda etapa (verde) e c-abl (azul). O tamanho dos produtos amplificados tanto para os competidores, como para os transcritos bcr-abl e abl estão representados pelas barras pretas. Gene bcr em azul e gene c-abl em laranja.

### **3.9 Criação de células competentes para choque térmico e transformação**

O protocolo utilizado para criação de células competentes para choque térmico consistiu no crescimento das cepas de interesse com os respectivos antibióticos, caso necessário, em 25 mL de meio LB durante 16 horas a 37 °C. Transcorrido o tempo, quatro novas culturas de 25 mL em meio LB foram realizadas, adicionando-se 0,5 mL da cultura original. Essas novas culturas foram mantidas em crescimento a 37 °C e suas densidades óticas (D.O.) foram monitoradas até alcançarem 0,4 - 0,6. Após o tempo, as culturas foram centrifugadas em tubos de 50 mL a 7000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Após retirada do sobrenadante, o precipitado de células foi solubilizado em 10 mL da solução de 60 mM de Cloreto de Cálcio e 20 mM de acetato de Sódio pH 6,5 e mantidos em gelo por 30 minutos. Transcorrido o tempo, o material foi novamente centrifugado. O precipitado formado foi novamente solubilizado em 3,2 mL do mesmo tampão anterior somado a 0,8 mL de glicerol 100%. Aliquotas de 70 µL foram feitas para posterior transformação e mantidas em -80 °C por tempo indeterminado.

Para transformação, alíquotas de 70 µL da cepa de interesse competente para choque térmico foram retiradas do -80 °C e mantidas em gelo. 5 µL do vetor de interesse foi misturado aos 70 µL da célula competente e mantido por 30 minutos no gelo. Transcorrido o tempo, as amostras foram mantidas por 1 minuto em temperatura entre 37 e 42 °C e imediatamente transferidas para o gelo por 5 minutos. Após esse tempo, todo o volume era plaqueado em placas contendo LB semi-sólido com o antibiótico correspondente e mantido em estufa a 37 °C por 16 horas. Para a produção da proteína p210-SH321 em sua conformação inativa (desfosforilada), 5 µL do plasmídeo pCDF.Duet com a sequência codificadora da fosfatase YopH de *Yersinia* (SEELIGER e cols., 2005), gentilmente cedido pelo grupo do Dr. John Kuriyan da

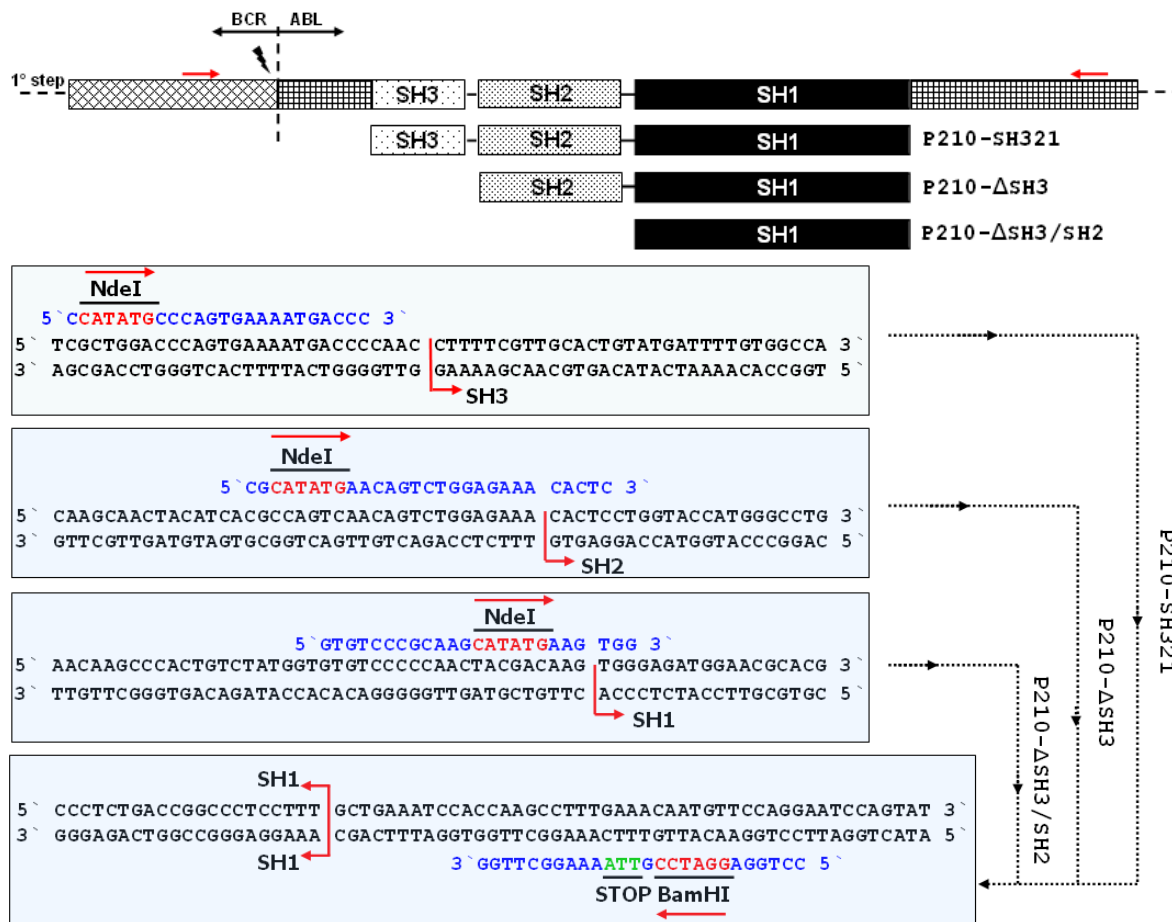


Universidade da Califórnia, foi co-transfectado com 5  $\mu$ L do plasmídeo pET29a contendo a sequência codificadora da unidade regulatória SH3-SH2-SH1. O protocolo de transformação foi mantido o mesmo descrito acima.

### **3.10 Clonagem em *E. coli***

O domínio tirosina cinase do c-abl (SH1) foi clonado em bactérias *Escherichia coli* sozinho (p210- $\Delta$ SH3/S2) ou juntamente com as regiões regulatórias SH2 (construção p210- $\Delta$ SH3) ou SH2 e SH3 (construção p210-SH321). Para isso, iniciadores específicos para cada região foram criados com sequências reconhecidas por endonucleases de restrição que não cortam em nenhum ponto dessas regiões (**Figura 21**). O protocolo de PCR utilizado para amplificação dessas regiões específicas consistiu de Nested, onde na primeira etapa foram utilizados os iniciadores Bcrabl-2607-F (5'-ACGTCTTCCTGTTCCACCGACC-3') e Bcrabl-4788-R (5'-GCTCTCTCCCTGGCCCTTGG-3'). Na segunda etapa, os iniciadores utilizados estão representados na Figura 21. Na primeira reação, 2  $\mu$ L de ADNc do paciente foram misturados com 20  $\mu$ L dos reagentes (1,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 0,15 mM dNTPs) com os iniciadores específicos e 0,5  $\mu$ L de Taq de alta fidelidade (Platinun - Invitrogen). O produto de PCR foi submetido à purificação e utilizado como molde para a segunda reação com os iniciadores específicos para cada construção. Foram utilizados 2  $\mu$ L do produto purificado da primeira etapa somado a 20  $\mu$ L dos reagentes (2 mM MgCl<sub>2</sub> e 0,15 mM dNTPs) com os iniciadores específicos e 0,5  $\mu$ L Taq de alta fidelidade (Platinun - Invitrogen). Ao final do protocolo de Nested, o material foi novamente purificado. O sistema de vetores pET foi utilizado para posterior clonagem. Inicialmente, as construções p210-SH321, p210- $\Delta$ SH3 p210- $\Delta$ SH2/S2 foram inseridas

no vetor pGEM-T por meio de ligação com T4 ADN ligase a 16 °C. Cada um dos vetores pGEM-T contendo as construções foram clivados com as enzimas NdeI e BamHI por um período de 12 horas a 37 °C a fim de liberar os fragmentos correspondentes. As sequências liberadas foram purificadas, inseridas no vetor pET29a que confere resistência ao antibiótico kanamicina (25 µg/mL) e transformadas em células DH5α competentes por choque térmico. Os clones resistentes foram verificados por PCR usando iniciadores específicos e os que continham as construções de interesse foram congelados em glicerol 15% e utilizados para a obtenção de plasmídeos purificados contendo as construções por meio de minipreparações. Os plasmídeos pET29a.p210-SH321, pET29a.p210-ΔSH3 e pET29a.p210-ΔSH3/SH2 foram novamente transformados em células de expressão Rosetta (DE3) que apresentam plasmídeos para alguns ARNs transportadores, capacitando-as no reconhecimento de códons raros para o genoma bacteriano. As proteínas foram produzidas em meio seletivo contendo os antibióticos kanamicina e cloranfenicol (34 µg/mL).



**Figura 21. Estratégia de clonagem das construções em estudo.** O esquema mostra a estratégia de clonagem das construções p210-SH321, p210-ΔSH3 e p210ΔSH3/SH2. Os iniciadores receberam sítios para as enzimas de restrição NdeI e BamHI. Os iniciadores foram estrategicamente criados fora das regiões codificadoras de cada um dos domínios de interesse a fim de facilitar o correto enovelamento protéico durante a tradução. As regiões entre domínios foram mantidas como na sequência original.

### 3.11 Obtenção de plasmídeos por minipreparações

A obtenção de plasmídeos por meio das minipreparações foi realizada por meio do Kit (Wizard Plus SV Minipreps – Promega – A1460). Inicialmente, precipitados bacterianos provenientes de 5 mL de cultura em fase estacionária foram solubilizados em 250 µL de 50 mM Tris-Cl pH 7,5; 10 mM EDTA e 100 µg/mL de RNase A. Após solubilização, as células foram lisadas com 250 µL de 200 mM NaOH e 1% SDS. Em

seguida, foram adicionados 350 µL de 4,09 M de hidrocloreto de guanidina, 0,759 M de acetato de potássio e 2,12 M de ácido acético glacial para neutralização do pH. Após formação de precipitados esbranquiçados, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para colunas fornecidas pelo kit e novamente centrifugadas a 14000 rpm por 1 minuto. Após lavagem das colunas com 162,8 mM de acetato de potássio, 22,6 mM de Tris-Cl pH 7,5 e 0,109 mM de EDTA somado a etanol 95%, os plasmídeos foram eluídos em água milliQ e analisados por géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo.

### **3.12 Sequenciamento de ADN**

As amostras clonadas tiveram suas seqüências confirmadas por meio de sequenciamento. Para tal, os plasmídeos obtidos foram utilizados como molde para reações de PCR com os mesmos iniciadores utilizados na Figura 21. Após amplificação das seqüências por PCR, o material foi purificado (QIAquick PCR purification Kit – Qiagen - 28104) e quantificado em Nanodrop. Os produtos de PCR foram sequenciados utilizando o MegaBACE 1000, um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a tecnologia GE Healthcare. As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye terminator kit (com Thermo Sequenase II DNA polimerase – US81090). As seqüências foram analisadas pelo software Chromas 3.12 e alinhadas pelo programa de alinhamento da invitrogene Vector NTI Advance 9.1.

### **3.13 Processamento das células e purificação das proteínas**

Após clonagem, amplificação dos plasmídeos por minipreparações e confirmação por sequenciamento, as construções foram expressas na cepa de *Escherichia coli* Rosetta (DE3). Diversos testes foram realizados a fim de determinar a condição na qual as construções se mantivessem na parte solúvel e em sua forma nativa e não formassem corpúsculos de inclusão. Foram testados diferentes densidades óticas (D.O.) de indução com IPTG ou lactose, diferentes concentrações de IPTG ou lactose, diferentes temperaturas de crescimento e indução, diferentes tempos de indução e diferentes protocolos de processamento das células por meio do uso de diferentes tipos de detergentes, lisozima, inibidores de proteases, agentes desnaturantes e glicerol. Em uma das condições testadas boa parte da proteína foi recuperada para a fração solúvel. Esse protocolo foi repetido diversas vezes e o mesmo padrão foi observado.

O protocolo foi estabelecido de acordo com as seguintes etapas: 5  $\mu$ L do plasmídeo contendo a construção de interesse (p210-SH321, p210- $\Delta$ SH3 ou p210- $\Delta$ SH3/SH2) foi transformado isoladamente ou juntamente com 5  $\mu$ L do plasmídeo contendo a fosfatase YopH em 70  $\mu$ L de células Rosetta (DE3) competentes para choque térmico, ou BL21 (DE3) no caso de co-expressão com a fosfatase. Após transformação o volume total foi plaqueado em placas contendo meio LB com kanamicina e cloranfenicol para a cepa Rosetta (DE3) ou kanamicina e streptomomicina (50  $\mu$ g/mL) para a cepa BL21 (DE3) e mantidos em crescimento por 16 hrs a 37 °C. Após o tempo de crescimento, colônias da placa foram transferidas para 25 mL de LB líquido contendo os mesmos antibióticos e crescido por mais 16 hrs a 37 °C. Após esse procedimento, os 25mL de meio contendo as bactérias transformadas na fase estacionária, foram transferidos para 800 mL de LB com os respectivos antibióticos. O

crescimento foi feito a 37 °C até a D.O. aproximada de 0,8. A indução foi realizada com 1 mM de IPTG ou 20 mM de lactose por 2 horas na mesma temperatura. Após o transcorrer desse tempo, os 800 mL foram centrifugados a 7000 rpm, por 10 minutos a 4 °C em quatro tubos distintos e estéreis, de forma a obter precipitados bacterianos provindos de 200 mL de cultura. Cada precipitado de 200 mL de cultura foi misturado com 15 mL de tampão de lise (20 mM de tampão fosfato, pH 8,0 contendo 1 mg/mL de lisozima, 1 mM PMSF, 5 mM de  $\beta$ -mercapoetanol e 5% de glicerol). Após solubilização das células, as mesmas foram sonicadas em 4 ciclos de 20 segundos e centrifugadas a 7000 rpm. Sucessivas novas lavagens foram realizadas ao precipitado formado a partir dessa primeira lavagem com tampão de lise (corpúsculos de inclusão), com 15 mL de Tampão fosfato pH 8,0 contendo 0,05% do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS). Dependendo da construção expressa o número de lavagens sucessivas variava sendo: 2 lavagens para a construção p210-SH321 com ou sem a fosfatase YopH, 5 lavagens para a construção p210- $\Delta$ SH3 e 3 lavagens para a construção p210- $\Delta$ SH3/SH2. Entre cada lavagem as amostras eram novamente submetidas a centrifugação a 7000 rpm, por 10 minutos a 4 °C. Após cada etapa de centrifugação os sobrenadantes das mesmas foram coletados para posterior análise eletroforética em gel de SDS-PAGE. As frações puras foram submetidas imediatamente a gel filtração na coluna GPC 300 para confirmação de pureza e posteriormente foram dialisadas para retirada do detergente SDS. Essa estratégia permitiu que grande parte da proteína de interesse retida na fração insolúvel (corpúsculos de inclusão) fosse para a parte solúvel em sua conformação nativa e com elevado grau de pureza.

### **3.14 Gel Filtração das amostras purificadas**

Após purificação das proteínas, corridas analíticas por gel filtração em GPC 300 foram realizadas em sistema Akta (Pharmacia). A coluna foi equilibrada com o tampão 20 mM fosfato de sódio pH 8,0. O fluxo utilizado foi de 0,5 mL/minuto. Eluição das amostras foi monitorada pela absorvância em 280 nm.

### **3.15 Dosagem de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)**

Após as amostras purificadas serem dialisadas contra 4 litros de 20 mM tampão fosfato de sódio pH 8,0, elas foram submetidas a dosagem de SDS residual por meio de um protocolo colorimétrico (RUSCONI e cols., 2001). Resumidamente, o protocolo utilizado baseia-se na utilização do corante Stain-all (Sigma), capaz de se ligar a moléculas de SDS, e alterar sua coloração de fúcsia para amarelo a medida que o detergente é adicionado. A quantidade de SDS, normalmente utilizada em análises bioquímicas é facilmente detectada por esse protocolo, a partir de uma varredura em espectrofotômetro entre 400 a 750 nm. O pico de absorção característico do corante stain-all ocorre em 510 nm, sendo que com a adição de SDS, esse pico diminui e um novo pico aparece em 453 nm juntamente com um ombro em 438 nm. A absorvância em 438 nm aumenta linearmente com a adição de SDS, sendo portanto utilizada para a curva de calibração assim como para as medidas das amostras. Para mensurar a quantidade de SDS residual nas amostras purificadas, uma solução estoque (1,8 mM) de Stain-all foi preparada solubilizando 1 mg de Stain-all em 1 mL de isopropanol:água 50:50 (v/v) e armazenada ao abrigo da luz a 4 °C. Dessa solução estoque, foi preparada uma solução intermediária (90 µM) misturando-se 1 mL da solução estoque com 1 mL

de formamida e 18 mL de água milliQ. Essa solução intermediária foi novamente diluída para uma concentração final de 56,25  $\mu\text{M}$ , concentração utilizada para a curva de calibração assim como para a medida das amostras. A curva de calibração foi realizada adicionando concentrações crescentes de SDS a 1 mL da solução de Stain-all (56,25  $\mu\text{M}$ ). Os pontos estabelecidos de SDS para a curva de calibração foram de 0, 0,8, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18  $\mu\text{M}$  de SDS. Para esses valores foi preparada uma solução de SDS a 2 mM, de forma a utilizar apenas volumes entre 0,5-1  $\mu\text{L}$ , sendo portanto desprezível o volume final de SDS adicionado ao stain-all. Após realizada a regressão linear, e estabelecimento da equação da reta, foram realizadas as medidas com as proteínas purificadas adicionando-se 1  $\mu\text{L}$  da proteína a 1 mL de stain-all (56,25  $\mu\text{M}$ ). Pela equação da reta e as medidas de D.O. a 438 nm foi possível mensurar a quantidade residual de SDS em cada amostra.

### **3.16 Espectometria de massa**

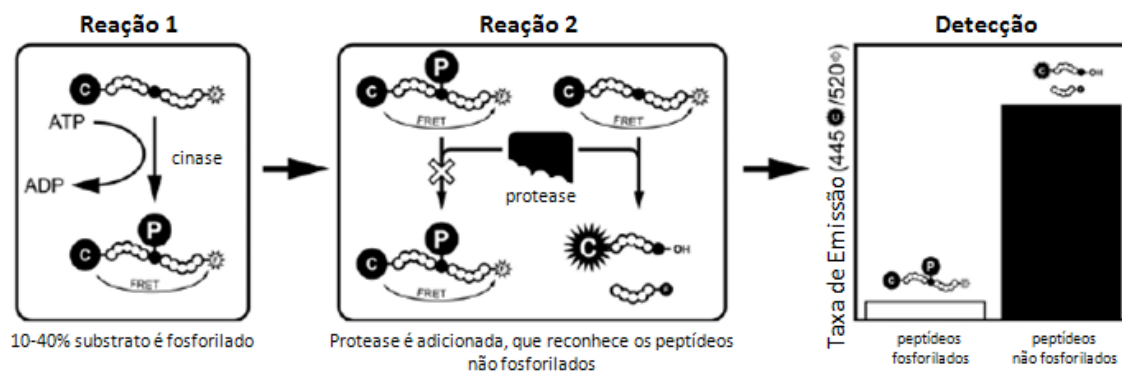
As construções após purificação, foram cortadas dos geis de SDS-PAGE e processadas para análises de espectrometria de massa. Inicialmente, as bandas foram cortadas e descoradas com solução de Acetonitrila (ACN) 50% em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM. Uma vez descoradas, as pontes dissulfeto eram reduzidas com DTT 10 mM em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  por 1 hora a 56 °C. Posteriormente, cisteínas livres eram alquiladas com iodoacetamina (IAA) 55 mM em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  por 45 minutos ao abrigo da luz. Após alquilação o gel era desidratado com ACN 100% e tripsinizado (0,01  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) por um período de 24 horas a 37 °C. Após tripsinização a extração dos peptídeos era realizada utilizando-se vortex com ACN 50% e TFA 5% e finalmente as amostras eram



explotadas em placas para análise no espectômetro de massa tipo ion trap HCTultra ETD (Bruker Daltonics) com fonte de electrospray.

### **3.17 Atividade cinase**

As amostras puras foram submetidas a ensaio para mensurar a atividade cinase “in vitro”. Para isso foi utilizado o kit Z’ Lyte kinase assay kit – Tyr 2 peptide (Cat. N°. PV3191 – Invitrogene). Esse kit aplica o fenômeno de FRET (transferência de energia ressonante por fluorescência). Resumidamente, esse fenômeno ocorre quando o espectro de emissão de um determinado fluoróforo, conhecido como doador, se sobrepoe ao espectro de absorção de uma outra molécula, conhecida como acceptor. Quando o par doador-acceptor estão próximos espacialmente é possível que ocorra a transferência de energia no estado excitado do doador para o acceptor. O peptídeo ótimo para a cinase Abl está marcado em suas extremidades com fluoresceína (acceptor) e coumaraina (doador). Com essa técnica é possível captar, por exemplo, a diferença de sensibilidade de peptídeos fosforilados e não fosforilados quando submetidos a quebra proteolítica. Na primeira reação, a cinase transfere um dos fosfatos  $\gamma$  para o peptídeo. Na segunda reação, uma protease sítio-específica reconhece e cliva os peptídeos não fosforilados, enquanto que os peptídeos fosforilados não sofrem clivagem pela protease, mantendo portanto o par doador-acceptor no estado FRET. Por meio do cálculo da taxa de emissão entre a coumaraina e a fluoresceína é possível estimar a porcentagem de fosforilação da reação. A Figura 22 ilustra o princípio da técnica.



**Figura 22. Diagrama esquemático do ensaio de atividade cinase.** A reação 1 compreende a reação onde a cinase é colocada em contato com o peptídeo substrato e o ATP, a reação 2 corresponde a adição da protease sensível a fosforilação dos peptídeos e a detecção é feita monitorando as taxas de emissão da coumarina (445 nm) e fluoresceína (520 nm).

### 3.18 Western-blot

Análises de auto-fosforilação por Western-blot foram realizadas nas proteínas logo após purificação com anticorpo primário monoclonal anti-fosfo-tirosina (Santa Cruz PY99). As amostras protéicas foram carregadas em géis de SDS-PAGE e corridas com amperagem constante em 30 mA por 90 minutos. Após corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (Thermo Scientific - #88518) com o sistema de transferência X-Cell II Blot Module (E19051 - Invitrogene). Após montagem do sistema e ativação da membrana de PVDF com metanol 100% por 1 minuto, a transferência foi feita com o sistema imerso em água pelo lado externo e tampão de transferência do lado interno (25 mM Tris-Cl pH 8,3; 192 mM glicina) por 90 minutos a 180 mA e 25 V. Após transferência, a membrana foi mantida em bloqueio por 2 horas sob agitação no tampão TBS (10 mM Tris-Cl pH 8,0 e 150 mM NaCl) contendo 0,1% Tween 20 e 2% de leite em pó desnatado. Passado o tempo, o tampão de bloqueio foi descartado e a membrana foi incubada por um período de 16 horas sob

agitação com o anticorpo primário (Santa Cruz PY99) anti-fofo-tirosina na diluição de 1:5000 no mesmo tampão de bloqueio (TBS-tween-molico). Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes com TBS-Tween por cinco minutos. Após as lavagens a membrana foi incubada por 2 horas sob agitação com o anticorpo secundário IgG conjugado a peroxidase na diluição de 1:10000 no tampão TBS-Tween. Após o tempo, a membrana foi novamente lavada 3 vezes com TBS-Tween por 5 minutos e mantida nesse tampão até o momento da revelação. A revelação foi feita por meio do Kit de ECL Western Blotting Analysis System (RPN2108 - GE Healthcare).

### **3.19 Análises espectroscópicas**

As análises de fluorescência foram realizadas em um espectrofluorímetro do tipo ISSK2 (ISS Inc., Champaign, IL) e as análises de dicroísmo circular foram realizadas em um espectropolarímetro JASCO, modelo J-715 1505.

#### 3.19.1 Espectro de triptofano

A grande maioria das amostras biológicas apresenta moléculas conhecidas como fluoróforos intrínsecos, capazes de emitir luz quando excitadas com luz de determinado comprimento de onda. Em proteínas, o principal fluoróforo encontrado é representado pelo grupamento indólico presente em resíduos de triptofano. O espectro de emissão desse grupamento é altamente sensível a polaridade do solvente, sendo que ele absorve próximo do comprimento de onda de 280 nm e emite próximo a 340 nm. Uma avaliação simples e confiável para avaliar o estado estrutural de uma determinada proteína pode ser realizada por meio do espectro de fluorescência da molécula de triptofano. A

emissão do grupamento indólico estará desviada para comprimentos de onda menores ou para a região do azul do espectro eletromagnético em situações em que as moléculas de triptofano estão devidamente escondidas em proteínas em seu estado nativo e deslocadas para comprimentos de onda maiores ou para a região do vermelho em proteínas em estado desnaturado. Nos experimentos realizados com as proteínas em estudo, as amostras foram utilizadas na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , excitadas em 280 nm e a emissão foi monitorada entre os comprimentos de 300 a 400 nm. As fendas utilizadas na excitação e emissão dos polarizadores foram de 1 mm.

### 3.19.2 Desnaturação química

Pelo monitoramento do espectro de emissão de fluorescência de triptofano é possível acompanhar a desnaturação de proteínas por agentes desnaturantes como Uréia e Hidroclorato de Guanidina. Esses agentes desnaturantes promovem a ruptura entre as diversas interações que estabilizam a estrutura tridimensional da proteína, levando ao seu estado desnaturado. Por meio do cálculo do centro de massa espectral de emissão de fluorescência de triptofano, em diferentes concentrações desses agentes, é possível obter alguns parâmetros termodinâmicos como variação de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) e coeficiente de acessibilidade ao solvente ( $m$ ). Nos experimentos realizados com as proteínas em estudo, diversas amostras foram preparadas na concentração de 1  $\mu\text{M}$  com diferentes concentrações de uréia (0 – 9 M) e Hidroclorato de guanidina (0 – 7 M). As amostras foram mantidas em repouso por 2 horas para equilíbrio e transcorrido o tempo foram medidos espectros de triptofano como descrito acima. Para as análises termodinâmicas, o coeficiente de dissociação ( $\alpha$ ) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\alpha = \frac{[cm_{u/g}] - cm_0}{cm_F - cm_0}$$

O coeficiente de dissociação fornece valores de 0 (proteína em seu estado nativo) a 1 (estado desnaturado) por meio da divisão entre os valores de centro de massa para cada concentração de uréia ou guanidina testada ( $[cm_{u/g}]$ ) menos o valor de centro de massa inicial ( $cm_0$ ) dividido pelo centro de massa final ( $cm_F$ ) menos o centro de massa inicial. Após o cálculo do coeficiente de dissociação ( $\alpha$ ), é possível por meio da equação de Gibbs, descrita abaixo, calcular a energia livre envolvida no processo de desnaturação da proteína em estudo, assim como o coeficiente de acessibilidade ao solvente.

$$\Delta G = -RT \ln \frac{\alpha}{1 - \alpha}$$

Nessa fórmula, a variação de energia livre envolvida na transição do estado nativo para o desnaturado da proteína é representado por  $\Delta G$ , a constante de Boltzmann por  $R$ , a temperatura em Kelvin por  $T$  e a constante de dissociação por  $\alpha/1-\alpha$ . Todos os experimentos foram realizados a 25 °C e os dados foram processados no programa Origin 7.0.

### 3.19.3 Espectros de bis-ANS

Alguns corantes aromáticos, não fluorescentes em solução aquosa, se tornam altamente fluorescentes em solventes não aquosos ou ligados a sítios hidrofóbicos em proteínas. A molécula de bis-ANS (1-anilino-8-naftaleno sulfonato) (ROSEN e cols., 1969) tem a capacidade de ao se ligar em regiões hidrofóbicas de proteínas emitir fluorescência. Dessa maneira, essa molécula se tornou muito útil em estudos de interação proteína-ligante e sítios de ligação em proteínas. Para os experimentos realizados com bis-ANS as amostras de proteínas foram utilizadas na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , excitadas em 360 nm e a emissão monitorada entre os comprimentos de 400 a 600 nm. As fendas utilizadas na excitação e emissão dos polarizadores foram de 1 mm.

### 3.19.4 Dicroísmo Circular

O conteúdo de estrutura secundária das proteínas em estudo foi obtido com amostras de proteína na concentração aproximada de 20  $\mu\text{M}$  em tampão 20 mM fosfato de sódio pH 8,0 com cubeta redonda de caminho ótico de 0,002 cm. O espectro final foi o resultado de 3 varreduras na velocidade de 50 nm/minuto. A região analisada foi de 260 nm a 190 nm (UV - distante). Para as análises de deconvolução dos dados e predição do conteúdo das estruturas secundárias, foram utilizados os programas Selcon3 (SREEREMA e WOODY, 1993; SREEREMA e cols., 1999), Continll (PROVENCHER e GLOCKNER, 1981; VAN STOKKUM e cols., 1990) e CDSSTR (COMPTON e JOHNSON, 1986; MANAVALAN e JOHNSON, 1987).

## 4 Resultados

### **4.1 Monitoramento de pacientes pediátricos em tratamento com Mesilato de Imatinibe**

A primeira parte do trabalho teve como alvo principal o monitoramento de dois pacientes pediátricos portadores de Leucemia Mielóide Crônica em tratamento com Mesilato de Imatinibe por meio de técnicas moleculares como RT-PCR Multiplex, Nested e Competitivo. A detecção dos transcritos leucêmicos, característicos da LMC foram também identificados por Hibridização in situ por fluorescência (iFISH). O monitoramento dos pacientes por diferentes técnicas citomoleculares é de grande importância para um maior entendimento da resposta ao Mesilato de Imatinibe dentro da população pediátrica. O uso do medicamento em crianças não é aprovado no Brasil apesar de alguns trabalhos internacionais já terem mostrado boas respostas ao inibidor nessa população. O Trabalho apresentado abaixo reafirma a boa resposta clínica, hematológica de pacientes pediátricos e espera servir como forma de incentivo para a aprovação da terapia no Brasil.

**Positive Response to Therapy with Imatinib Mesylate in Childhood Chronic Myeloid Leukaemia**

**Authors:** Guilherme A.P. Oliveira, BSc.<sup>1,2,3</sup>, Elaine S. Costa, Ph.D., M.D.<sup>4</sup>, Mônica S. Freitas, Ph.D.<sup>3</sup>, Fabianno F. Dutra, BSc<sup>1,2</sup>, Simone F. Maia, M.D.<sup>4</sup>, Maria C. Guerra, M.D.<sup>4</sup>, Maria D.Taberner, Ph.D., M.D.<sup>5</sup>, Radovan Borojevic, Ph.D<sup>1</sup>, Ivone B. Otazu, Ph.D.<sup>1,2,\*</sup> and Jerson L. Silva, Ph.D., M.D.<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Hospital Universitário Clementino Fraga Filho and Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular e Banco de Células do Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil.

<sup>3</sup>Programa de Biologia Estrutural, Instituto de Bioquímica Médica, Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>4</sup>Instituto de Pediatria e Puericultura Martagão Gesteira/IPPMG and Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>5</sup>IECSCYL- Hospital Universitario de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain.

**Key words:** chronic myeloid leukaemia; imatinib mesylate; minimal residual disease; children;

Scientific section heading: Letters to the editor

**\*Corresponding authors:** Jerson L. Silva (e-mail: [jerson@bioqmed.ufrj.br](mailto:jerson@bioqmed.ufrj.br)) and Ivone Otazu (e-mail: [iotazu@tawam-hosp.gov.ae](mailto:iotazu@tawam-hosp.gov.ae)).

**‡Present Address:** Tawam Hospital-Johns Hopkins Medicine, P.O. Box 15258, Al Ain, Abu Dhabi, United Arab Emirates

**Acknowledgements:** This work has been partially supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), CAPES/Ministério da Educação–Brasília–Brazil, Rio de Janeiro Cell Bank /APABCAM, Rio de Janeiro (Brazil), the Millennium Institute for Structural Biology in Biomedicine and Biotechnology (CNPq Millennium Program), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) of Brazil to J.L.S. O.G. is a recipient of the CNPq scholarship.



## ABSTRACT

Chronic myelogenous leukaemia is rare in the pediatric population, accounting for 2-3% of childhood leukaemia cases, with an annual incidence of one case per million children. The low toxicity profile of Imatinib Mesylate has led to its approval as a front-line therapy in children for whom Interferon treatment has failed or who have relapsed after allogenic transplantation. We describe the positive responses of two children with Philadelphia-positive chromosome CML treated with Imatinib for up to 28 months, as evaluated by morphological, cytogenetic, and molecular approaches. Our patients are still alive, in the chronic phase, and are in continuous morphological complete remission (mCR).

## INTRODUCTION

Chronic myelocytic leukaemia (Ph<sup>+</sup> CML) is a rare childhood condition. The only known curative therapy for these children is allogeneic stem cell transplantation (SCT). When there are no matched donors for SCT, therapy with alpha-interferon ( $\alpha$ -IFN) either alone or in combination with cytarabine results in a cytogenetic complete response (CCR) [1], with an outcome similar to that seen in adults [2]. Recently, therapy with Imatinib Mesylate, was more effective in treating newly diagnosed adults in the chronic phase (CML-CP) than  $\alpha$ -IFN, leading to a complete haematological remission and CCR in almost all cases [3]. However, detection of kinase domain mutations by direct sequencing techniques was almost always associated with Imatinib resistance and poor prognoses [4, 5]. To date, few studies have reported the effects of Imatinib in childhood Ph<sup>+</sup> CML [6, 7]. This study reports on two cases of children with Ph<sup>+</sup>BCR/ABL+CML followed for up to 28 months after treatment with Imatinib. The patients showed favourable clinical and haematological responses, as demonstrated by the trends observed using Interphase Fluorescence In Situ Hybridisation (iFISH), RT-PCR, and sequencing.

## PATIENT PRESENTATION

*Case 1* - In May 2005, a 7-year-old male with splenomegaly was admitted to our hospital. His white blood count (WBC) was  $99.7 \times 10^9/L$  with granulocytosis and immature precursors. Haemoglobin levels (Hb) were 11.9 g/dL, and his platelet count (PC) was  $350 \times 10^9/L$ . Thorax radiography was normal. Abdominal ultrasonography showed splenomegaly (11.6cm). BM evaluation revealed hypercellularity consistent with CML-CP. Karyotype was 46, XY, t(9;22)(q34;q11) in 20 metaphases. According to conventional cytogenetics, iFISH, which allows for distinction between Mbcrl and mbcrl gene rearrangements, revealed one clone (88.5%) with Mbcrl/abl gene rearrangements. The occurrence of Mbcrl (b3a2) instead of mBCR rearrangements was confirmed by multiplex and nested-PCR (Figure 1A). In addition, *bcr-abl/abl* ratios showed high levels (up to a 100% increase) in the tumour (Figure 1B). Initially, hydroxyurea cytoreduction (1g/day) resulted in a decrease of the WBC to  $4.6 \times 10^9/L$ .  $\alpha$ -IFN treatment ( $5 \times 10^6 U/d$ ) was then started. High and persistent percentages of Mbcrl/abl gene rearrangements were determined by iFISH (up to 74%). In the 18<sup>th</sup> week of treatment, an abrupt increase of WBC to  $247 \times 10^9/L$  occurred. With no matched donors for SCT,  $\alpha$ -IFN was changed to Imatinib, 300 mg/day, and the patient achieved normal levels of WBC without any adverse side effects (Figure 1C). Concomitantly, the response to Imatinib was followed by different cytomolecular assays (pre-Imatinib and 1, 5, 8, 12, 16, 19, 22, 25, and 28 months after Imatinib). A favourable decrease to <5% of cells with Mbcrl/abl gene rearrangement by iFISH was observed after 5 months of Imatinib, coexisting with *bcr-abl/abl* levels below 10%, presenting b3a2 isoform (Figures 1A and 1B). Nested PCR still detects residual *bcr-abl* transcript 28 months after the beginning of therapy. Nevertheless, iFISH no longer detected Mbcrl/abl gene rearrangement after 19 months of therapy. Finally, direct sequencing of products was performed using five healthy individuals as controls (Figure 2). We did not detect any point substitutions or conflicting sites in any samples from our patients. Previously, nested RT-PCR was performed in the control samples, and negative *bcr-abl* findings were demonstrated. In fact, there was a clear positive correlation between a favourable clinical–haematological remission and an observed trend towards cytomolecular procedures.

Case 2 - In June 2006, a 5-year-old female was admitted with bone pain. WBC was  $155 \times 10^9/L$  with granulocytosis and immature precursors. Hb was 10.8g/dL, and PC was  $559 \times 10^9/L$ . Thorax radiography and abdominal ultrasonography were normal. BM evaluation revealed hypercellularity consistent with CML-CP. Karyotype showed a  $t(9;22)(q34;q11)$  translocation coinciding with 89% Mbc<sub>r</sub>/abl hybridisation by iFISH and b2a2 fusion transcripts by Multiplex-PCR. Initially, hydroxyurea cytoreduction (0.5g/day) decreased WBC count to  $4.6 \times 10^9/L$ . With no matched donors for SCT, the patient was treated with  $\alpha$ -IFN  $5 \times 10^6 U/d$ . On the 8<sup>th</sup> day of treatment, the patient presented with fever, monoarthritis, epistaxis, thrombocytopenia, and megakaryocytic hyperplasia in BM.  $\alpha$ -IFN therapy was changed to prednisone. PC recovered, and the symptoms disappeared. Mbc<sub>r</sub>/abl gene rearrangements decreased to 48% by iFISH, coexisting with b2a2 transcript by Multiplex-PCR (Figure 1A). After that, Imatinib was initiated (300 mg/day), and haematological remission was maintained (Figure 1C). No side effects were observed except an evanescent cutaneous rash. Cytomolecular results were analysed (pre-Imatinib and 6, 9, 12, 15, and 20 months after Imatinib). Similarly to the first case, while residual b2a2 transcripts remain as determined by nested-PCR, iFISH results have been negative starting at 15 months after therapy. Other than that finding, we did not find any substitution or conflicting sites related to resistance in two samples studied (pre-imatinib and after 20 months therapy). In fact, the patient remains in clinical/haematological remission.

## DISCUSSION

While many adult cases of Ph<sup>+</sup> CML have been successfully treated with Imatinib [11], it remains unclear whether Imatinib should be used as a front-line treatment for children with Ph<sup>+</sup> CML. Nevertheless, a phase I study recently reported that Imatinib was well tolerated in Ph<sup>+</sup> children at doses ranging from 260 mg/m<sup>2</sup> to 570 mg/m<sup>2</sup> [6]. However, 60% of children in a phase II study with children in cryptic CP achieved CCR, while only 27% achieved molecular remission [7]. Our current report shows that 2 children with Ph<sup>+</sup> CML had a good response to Imatinib. In both patients, an obvious association was found between a favourable clinical-haematological outcome and cytomolecular remission. While RT-PCR still detected residual BCR-ABL<sup>+</sup> cells, they were not detected by iFISH 19 months (case 2) and 15 months (case 1) after the beginning of treatment. Patients with mCR usually exhibit residual BCR-ABL by RT-PCR after Imatinib treatment applied after the failure of  $\alpha$ -IFN protocols. The presence of this residual has been associated with leukaemic relapse [12]. However, this was apparently not the case for the patients in our study.

In fact, the various methods and haematologic data described in this paper are well defined tools for residual disease assessment [11]. The simultaneous use of these assays is of great relevance for front-line monitoring of Imatinib-based treatments [4, 11, 12]. We have already analysed drug resistance due to kinase mutations by sequencing and could not correlate the presence of Imatinib resistance in both patients, unlike results seen in other studies [4]. As we expected, the positive drug response seen by iFISH evaluations was confirmed by the sequenced regions, in which the alignment of different donors and our patients did not show any point substitutions at least up to 28 months into Imatinib treatment. This is good evidence that patients who achieved negative results by iFISH and sequencing after Imatinib treatment are truly in continuous remission. We used two sequences of c-abl (GenBank accession no. M14752 and X16416) in our analysis. Curiously, sequence M14752 [13] showed a number of nucleotides that differed from other published sequences of c-abl, including X16416 and the sequence found in our patients and donors. These conflicting sites were also reported by others. Most interestingly, a point substitution (1375G>A) was seen in one of these discrepant nucleotides after Imatinib treatment [5]. One possible explanation for this is that the conflicting nucleotides in the M14752 sequence could

have originated from mutated residual clones. This observation supports the theory of pre-existing mutated clones that expand due to drug selection [14]. These clones likely appear in low frequency in patients as is now seen for 1375G>A [5, 15]. In our patients, these conflicting sites were not detected, nor were the substitutions related to Imatinib resistance.

In summary, even though there is recent evidence [7] that children with Ph+-BCR-ABL+CML show positive responses to treatment with Imatinib, this paper is the first work to support this observation based on the use of multiple cytomolecular methods. Interestingly, the cases reported here did not show mutations in the *abl* kinase domain of the *bcr-abl* allele that were previously found to be associated with a poor prognosis. Instead, CCR and mCR were obtained, and these patients have remained in continuous remission for more than 28 (case 1) and 20 months (case 2).

Our intent was to show that sequence analysis and detection of residual tumour tissue by different cytomolecular assays should be used to monitor the risk for relapse, and these results should be taken into account when considering alternative treatments.

## REFERENCES

- 1 Dow LW, Raimondi SC, Culbert SJ, Ochs J, Kennedy W and Pinkel DP. Response to alpha-interferon in children with Philadelphia chromosome-positive chronic myelocytic leukemia. *Cancer* 1991; 68: 1678-1684.
- 2 Millot F, Brice P, Philippe N, et al. Alpha-interferon in combination with cytarabine in children with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002; 24:18-22.
- 3 Pulsipher MA. Treatment of CML pediatric patients: should imatinib mesylate (STI-571, Gleevec) or allogeneic hematopoietic cell transplant be front-line therapy? *Pediatr Blood Cancer* 2004; 43(5):523-533.
- 4 Lahaye T, Riehm B, Berger U, Paschka P, Müller MC, Kreil S, Merx K, Schwindel U, Schoch C, Hehlmann R, Hochhaus A. Response and resistance in 300 patients with BCR-ABL-positive leukemias treated with imatinib in a single center: a 4.5-year follow-up. *Cancer*; 2005 Apr 15;103(8):1659-1669.
- 5 Branford S, Rudzki Z, Walsh S, et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 2003; 102 :276-283.
- 6 Champagne MA, Capdeville R, Krailo M, et al. Imatinib mesylate (STI571) for treatment of children with Philadelphia chromosome-positive leukemia: Results from a Children`s Oncology Group phase 1 study. *Blood* 2004; 104: 2655-2660.
- 7 Millot F, Guilhot J, Nelken B, et al. Imatinib mesylate is effective in children with chronic myelogenous leukemia in late chronic and advanced phase and in relapse after stem cell transplantation. *Leukemia* 2006; 20: 187-192.

8 Primo D, Tabernero MD, Rasillo A, et al. Patterns of BCR/ABL gene rearrangements by interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) in BCR/ABL+ leukemias: incidence and underlying genetic abnormalities. *Leukemia* 2003; 17: 1124-1129.

9 Otazú IB, Zalberg I, Tabak DG, Dobbin J and Seuánez HN. Detection of BCR-ABL transcripts by Multiplex and Nested PCR in Different Haematological Disorders. *Leukemia and Lymphoma* 2000; 37: 205-211.

10 Otazú IB, Tavares RCB, Hassan R, Zalberg I, Tabak DG and Seuánez HN. Estimations of BCR-ABL/ABL transcripts by quantitative PCR in chronic myeloid leukaemia after allogeneic bone marrow transplantation and donor lymphocyte infusion. *Leukemia Research* 2002; 26: 129-141.

11 Hochhaus A, Druker B, Sawyers C, Guilhot F, Schiffer CA, Cortes J, Niederwieser DW, Gambacorti-Passerini C, Stone RM, Goldman J, Fischer T, O'Brien SG, Reiffers JJ, Mone M, Krahnke T, Talpaz M, Kantarjian HM. Favorable long-term follow-up results over 6 years for response, survival, and safety with imatinib mesylate therapy in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon-alpha treatment. *Blood* 2008; Feb 1;111(3):1039-1043.

12 Paschka P, Müller MC, Merx K, Kreil S, Schoch C, Lahaye T, Weisser A, Petzold A, König H, Berger U, Gschaidmeier H, Hehlmann R, Hochhaus A. Molecular monitoring of response to imatinib (Glivec) in CML patients pretreated with interferon alpha. Low levels of residual disease are associated with continuous remission. *Leukemia*. 2003; Sep;17(9):1687-1694.

13 Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Roe BA and Canaani E. Alternative Splicing of RNAs Transcribed from the human abl gene and from the bcr-abl fused gene. *Cell* 1986; 47: 277-284.

14 Lestienne CR, Cornu VS, Duflos NG, et al. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood* 2002; 100: 1014-1018.

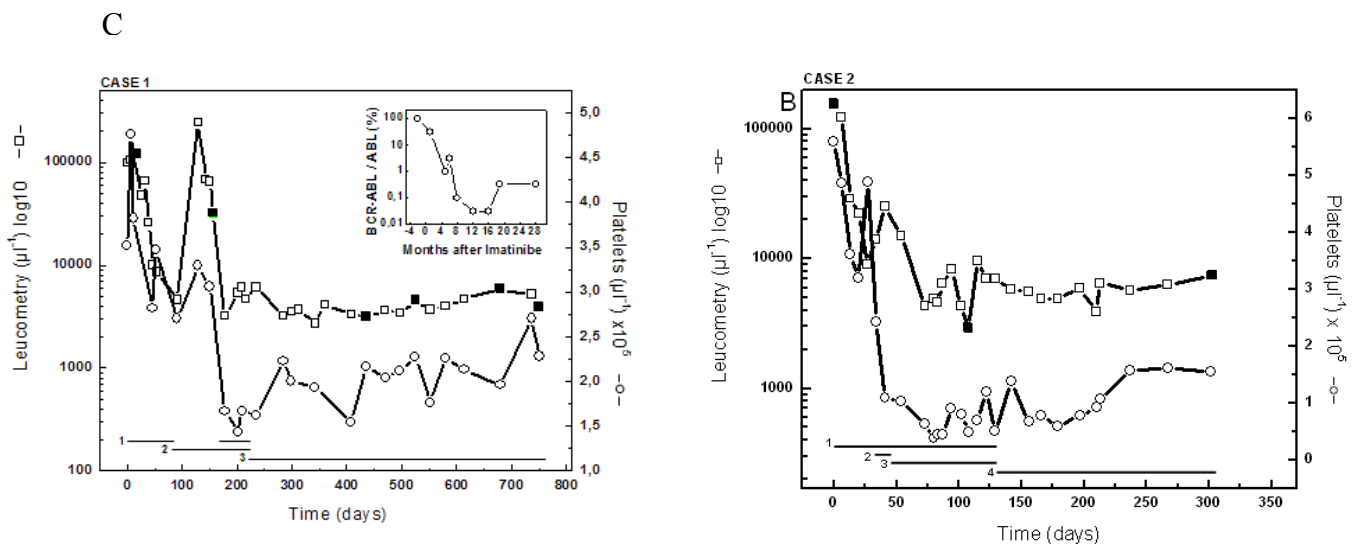
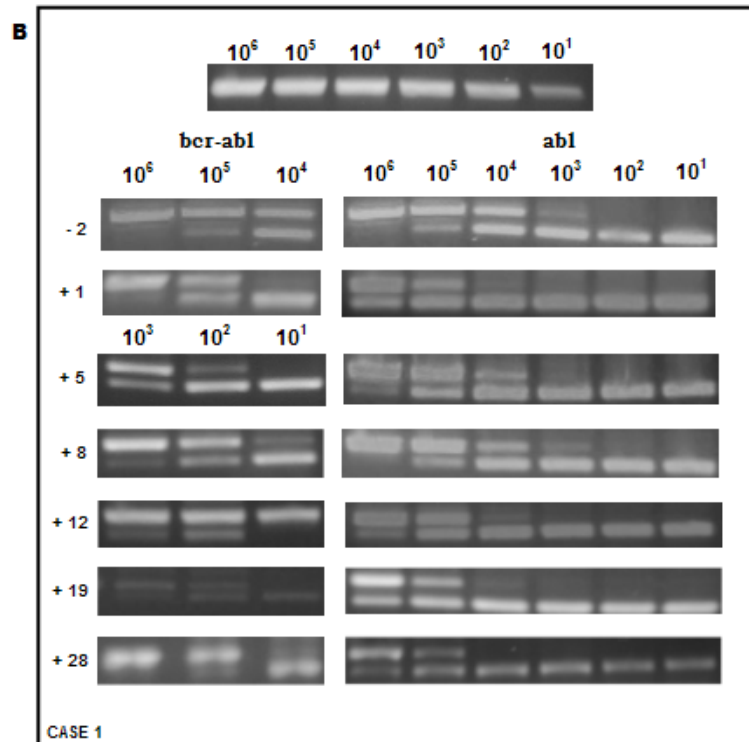
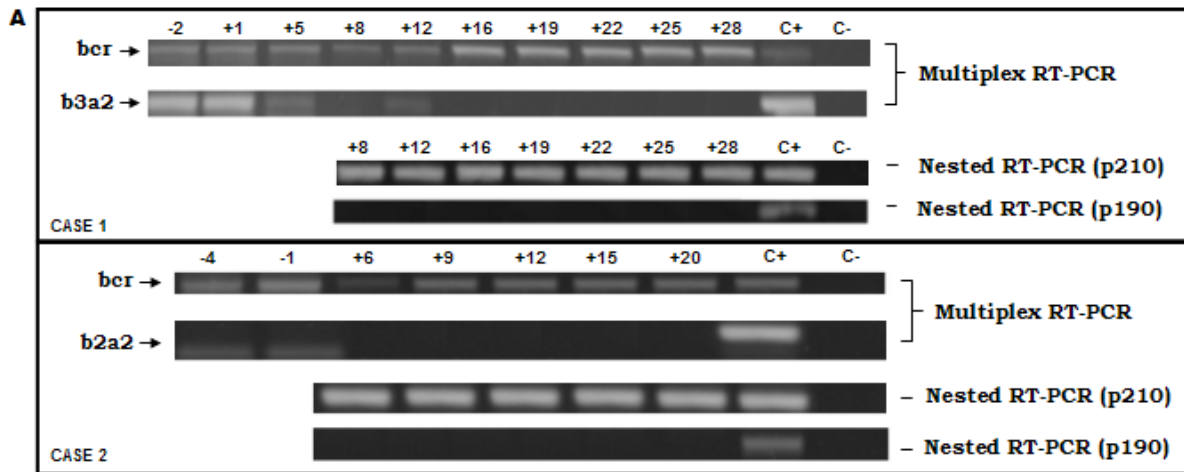


15 Khorashad JS, Anand M, Marin D, et al. The presence of a BCR-ABL mutant allele in CML does not always explain clinical resistance to Imatinib. *Leukemia* 2006; 20: 658-663.

## Legends

Figure 1. **Analysis of haematological responses to treatment in two children with CML and molecular analysis:** **(A)** Multiplex and Nested PCR for case 1 and 2. Negative samples for Multiplex were assessed for Nested b3a2 / b2a2 (p210) and e1a2 (p190). K562 cells were used as positive controls for Multiplex and Nested b3a2 and SUPB15 for Nested e1a2. Samples were classified in months as pre-imatinib (-) and post-imatinib (+) treatment. **(B)** Competitive assays for *bc-abl* transcripts in case 1; quality control for competitor template in the different dilutions used in the assays is shown on the top of Panel B. **(C)** Results are shown from the beginning of treatment for cases 1 and 2. Squares and circles represent WBC and platelet counts respectively. The squares are represented filled to indicate when bone marrow samples were also obtained. Numbered solid lines show the time of each treatment with hydroxyurea (1),  $\alpha$ -IFN (2), and STI571 (3) for case 1 and hydroxyurea (1),  $\alpha$ -IFN (2), prednisone (3), and STI571 (4) for case 2. The inset shows the percentage of *bcr-abl/abl* during Imatinib treatment.

Figure 2. **Sequence analysis** of kinase regulatory domains (SH1 and SH2) at different times during treatment with Imatinib did not detect substitutions before or after the therapy. Our results were aligned with the *abl* sequences from Genbank (accession numbers X16416 and M14752). Samples from our patient are indicated by the \*, and samples from different donors used as a positive control are indicated by D1 – D5.



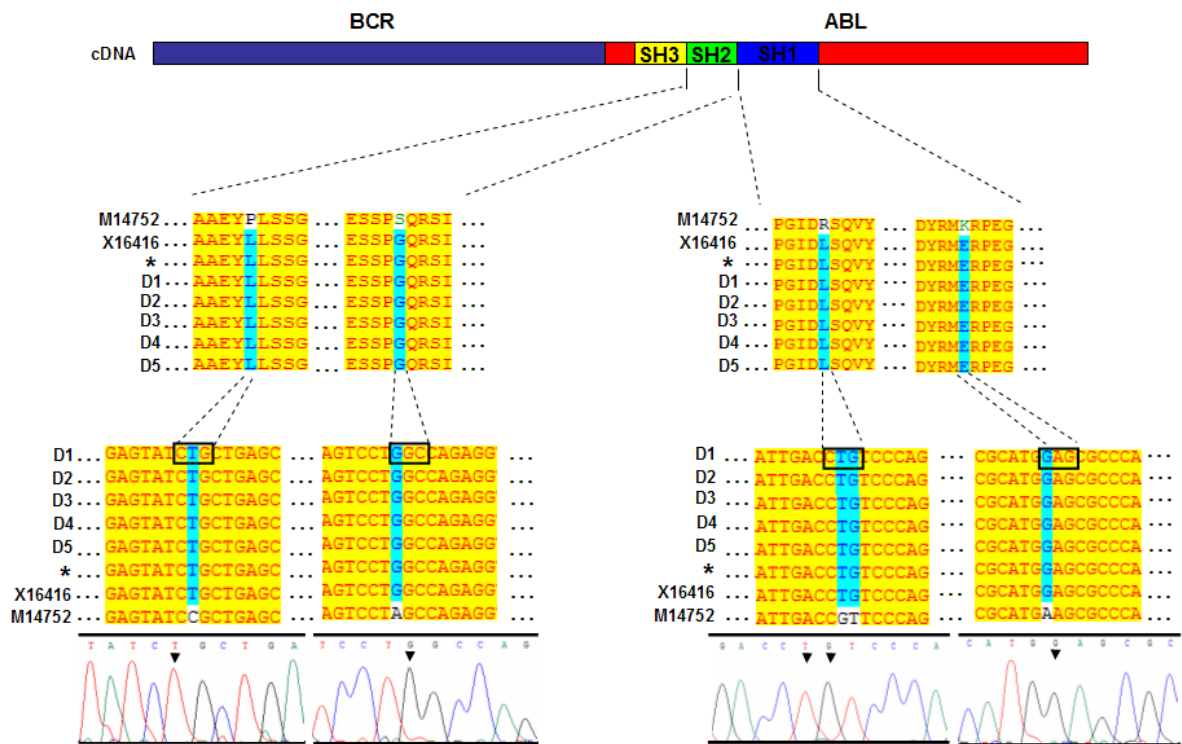
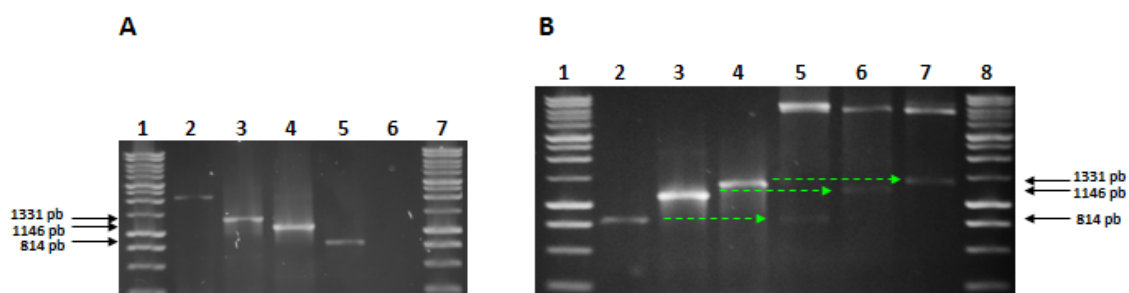


Figure. 2

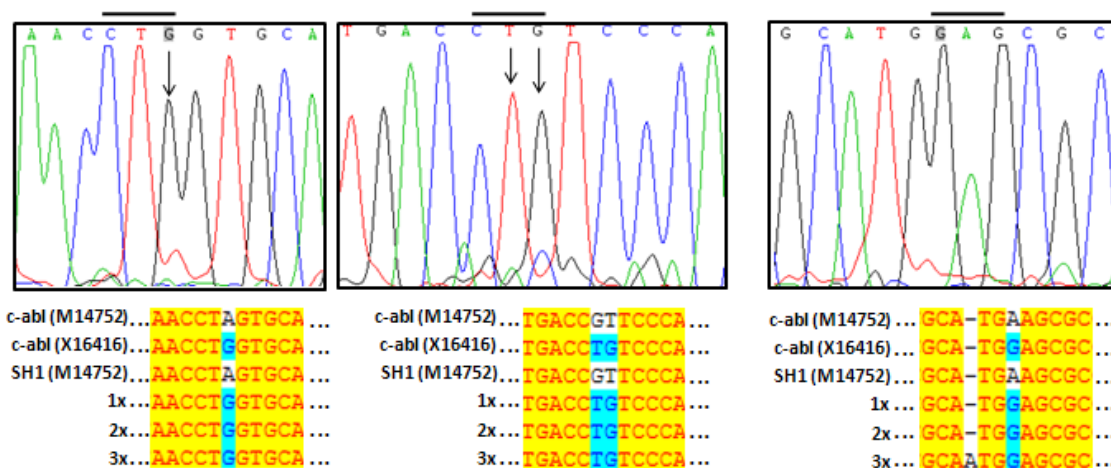
## **4.2 Expressão e purificação da unidade regulatória da proteína Bcr-abl**

A segunda parte do trabalho se deteve no estabelecimento de um protocolo de purificação das construções p210-SH321, p210- $\Delta$ SH3 e p210- $\Delta$ SH3/SH2 em sistema de *E.coli* como forma de obter quantidades suficientes das proteínas em seu estado ativo para posterior investigação estrutural e termodinâmica. Dentro desse contexto, as construções foram inicialmente amplificadas por PCR (**Figura 23a**) e clonadas no vetor pET29a. Uma eletroforese em gel de agarose das amostras pET29a contendo os insertos que foram digeridos com NdeI e BamHI foi feito para confirmar inicialmente o sucesso da clonagem (**Figura 23b**).



**Figura 23. Géis da amplificação das regiões de interesse e clonagem.** (A) gel ilustrando as amplificações por PCR das regiões de interesse. 1 e 7 – marcador molecular, 2 – fragmento amplificado da primeira reação de PCR com os iniciadores Bcrabl-2607-F e Bcrabl-4788-R, 3 – região correspondente a construção p210-SH321, 4 – região correspondente a construção p210- $\Delta$ SH3, 5 – região correspondente a construção p210- $\Delta$ SH3/SH2 e 6 – controle negativo da reação de PCR. (B) gel ilustrando a clonagem dos fragmentos de interesse no vetor pET29a. 1 e 8 – marcador molecular, 2 - região correspondente a construção p210- $\Delta$ SH3/SH2, 3 - região correspondente a construção p210- $\Delta$ SH3, 4 - região correspondente a construção p210-SH321, 5 – pET29a contendo a sequência p210- $\Delta$ SH3/SH2, 6 - pET29a contendo a sequência p210- $\Delta$ SH3 e 7 - pET29a contendo a sequência p210-SH321. As amostras 5, 6 e 7 representam o plasmídeo pET29a com as respectivas construções após digestão com as endonucleases NdeI e BamHI por 2 horas a 37 °C. Géis de agarose 1,4% corados com brometo de etídeo.

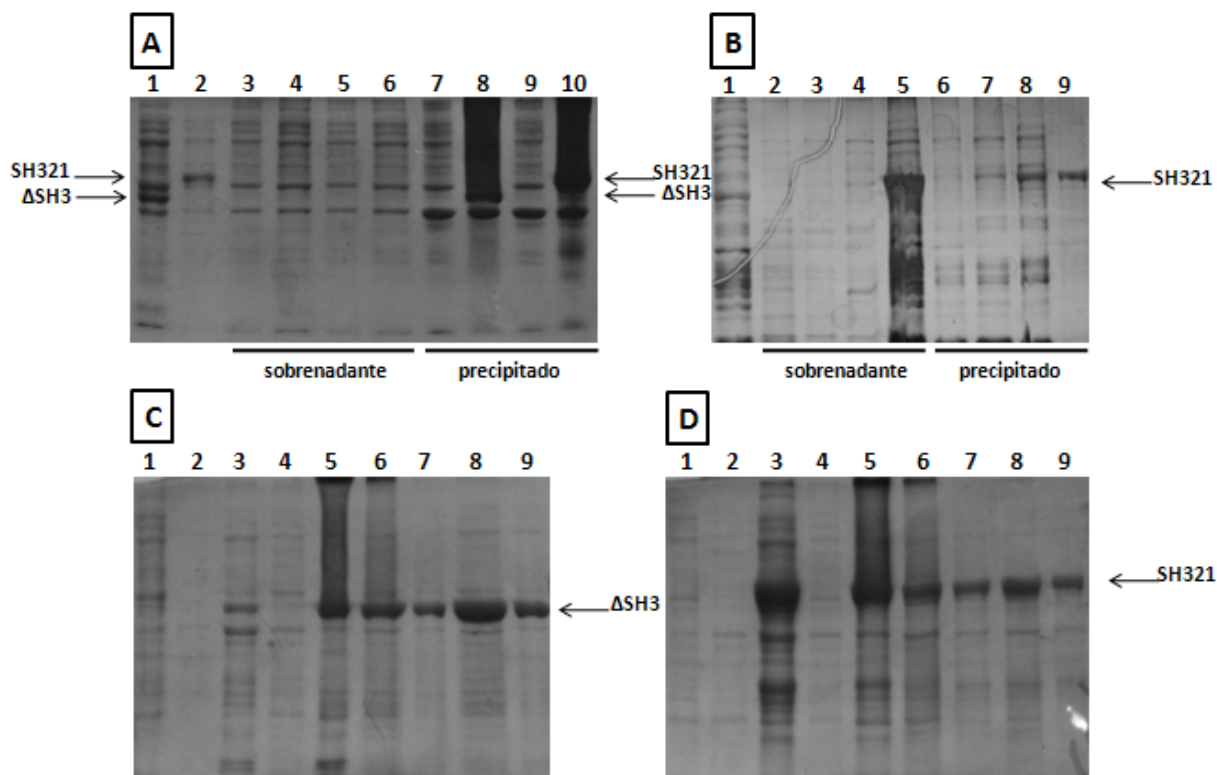
Após clonagem das construções p210-SH321, p210- $\Delta$ SH3 e p210- $\Delta$ SH3/SH2 no vetor pET29a, reações de PCR foram realizadas tendo como molde os plasmídeos clonados e os mesmos iniciadores utilizados para amplificar as regiões de interesse. Após amplificação das regiões correspondentes ao domínio SH3-SH2-SH1, SH2-SH1 e SH1, os fragmentos foram purificados e submetidos à sequenciamento como forma de verificação das sequências clonadas. A análise das regiões sequenciadas foi alinhada com duas sequências do c-abl, M14752 (SHTIVELMAN e cols., 1986) e X16416 (FAINSTEIN e cols., 1989). Todas as regiões sequenciadas foram feitas com reações em triplicata. A análise do alinhamento das duas sequências do c-abl juntamente com as regiões sequenciadas correspondentes ao domínio cinase SH1 evidenciou três diferenças pontuais na sequência publicada M14752 (**Figura 24**). A primeira diferença correspondeu a uma mutação silenciosa do códon CTA para CTG. A segunda diferença, por sua vez, correspondeu à troca CGT para CTG, que codifica o aminoácido arginina e leucina, respectivamente. A última diferença identificada se apresentou no códon AAG que é representado por GAG na sequência M14752 que codifica lisina e ácido glutâmico, respectivamente. A análise da sequência X16416 com as regiões sequenciadas, por sua vez, não apresentou quaisquer alterações nucleotídicas condizentes com mutações. A posterior análise de outras sequências publicadas do c-abl confirmou que as regiões clonadas no vetor pET29a não apresentavam quaisquer alterações nucleotídicas. A análise das regiões sequenciadas correspondentes aos domínios regulatórios SH3 e SH2 juntamente com as sequências M14752 e X16416 não identificaram quaisquer mutações.



**Figura 24. Verificação das sequências clonadas.** As três substituições encontradas na sequência M14752 estão representadas pelo alinhamento com as regiões sequenciadas (1x, 2x e 3x) e com a sequência X16416. Os cromatogramas representados correspondem às regiões sequenciadas.

Após confirmação das sequências nucleotídicas clonadas, os plasmídeos correspondentes foram inseridos em cepa de *E.coli* DH5 $\alpha$  competentes para choque térmico e posteriormente crescido em meio LB líquido até a fase estacionária para a obtenção de grandes quantidades dos mesmos por meio de minipreparações. Após estocagem dos plasmídeos obtidos em -20 °C, diversos testes foram realizados com o objetivo de estabelecer um novo protocolo de purificação para tais construções como descrito na seção Materiais e Métodos. Inicialmente, foi estabelecido que após 2 horas de indução, com 1 mM de IPTG, a quantidade da proteína de interesse produzida pela bactéria não teve aumento significativo. Dessa forma, foi estabelecido o tempo de indução por 2 horas. Em seguida, foi investigada uma condição ótima na qual as proteínas fossem solubilizadas. A lise das bactérias com tampão fosfato pH 8,0 contendo glicerol,  $\beta$ -mercaptoetanol, lisozima e PMSF e ciclos de ultra-som, não foi capaz de solubilizar a proteína de interesse. Uma considerável parte das proteínas se manteve na fração insolúvel, formando corpúsculos de inclusão (**Figura 25A**). Essa

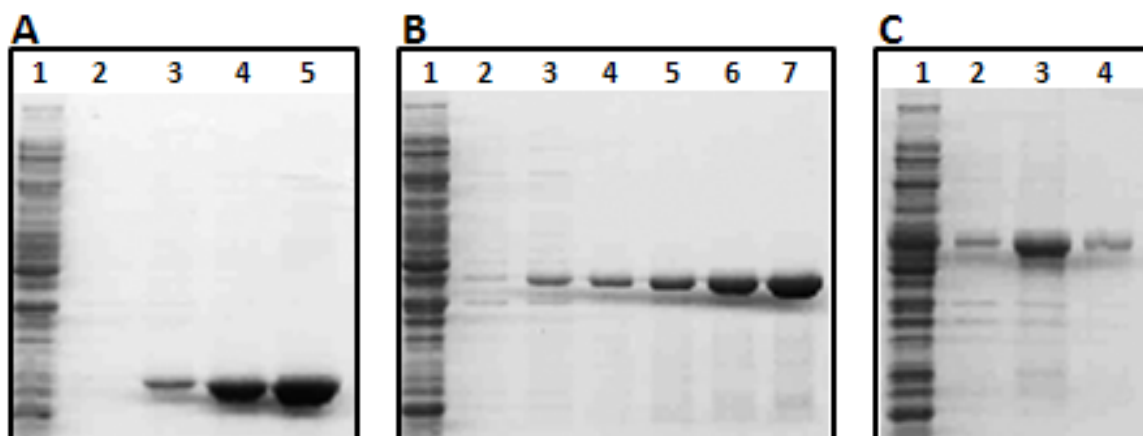
constatação foi possível após comparação com extratos tratados com 8 M de uréia. Após essa análise, foi realizado um teste com diferentes tipos de detergentes (SDS, CHAPs, Octil e Triton) para averiguar se algum deles seria capaz de solubilizar as construções expressas. Entre os detergentes testados, apenas o SDS foi capaz de solubilizar grande parte da proteína de interesse (**Figura 25B**). A partir desse resultado, foram realizados testes com diferentes concentrações de SDS para averiguar qual quantidade de SDS seria capaz de solubilizar maior quantidade da proteína de interesse (**Figura 25C e 25D**).



**Figura 25. Varredura de condições de expressão e processamento das construções de interesse.** (A) 1 e 2 – fração solubilizada com 8 M de uréia das construções p210- $\Delta$ SH3 e p210-SH321 após 2 horas de indução; 3 e 4 – proteínas solubilizadas da construção p210- $\Delta$ SH3 antes e após 2 horas de indução; 5 e 6 - proteínas solubilizadas da construção p210-SH321 antes e após 2 horas de indução; 7 e 8 – proteínas mantidas insolúveis da construção p210- $\Delta$ SH3 antes e após 2 horas de indução e 9 e 10 - proteínas mantidas insolúveis da construção p210-SH321 antes e após 2 horas de indução. (B) teste com diferentes detergentes. 1 – Construção p210-SH321 antes de induzir, 2 e 6 – proteínas solubilizadas e insolúveis da construção p210-SH321 após tratamento com detergente CHAPs, 3 e 7 - proteínas solubilizadas e insolúveis da construção p210-SH321 após tratamento com detergente n-octil, 4 e 8 - proteínas solubilizadas e insolúveis da construção p210-SH321 após tratamento com detergente Triton X 100 e 5 e 9 - proteínas solubilizadas e insolúveis da construção p210-SH321 após tratamento com detergente SDS. (C) e (D) Teste com diferentes concentrações de SDS para a construção p210- $\Delta$ SH3 e p210-SH321. 1 – antes de induzir, 2 ao 9 – após duas horas de indução. 2 e 3 – proteínas solubilizadas e insolúveis sem adição de SDS, 4 e 5 - proteínas solubilizadas e insolúveis com 0,1% de SDS, 6 e 7 - proteínas solubilizadas e insolúveis com 0,5% de SDS e 8 e 9 - proteínas solubilizadas e insolúveis com 1% de SDS. Géis de SDS-PAGE 12,5% corados com Comassie Brilliant Blue G-250.

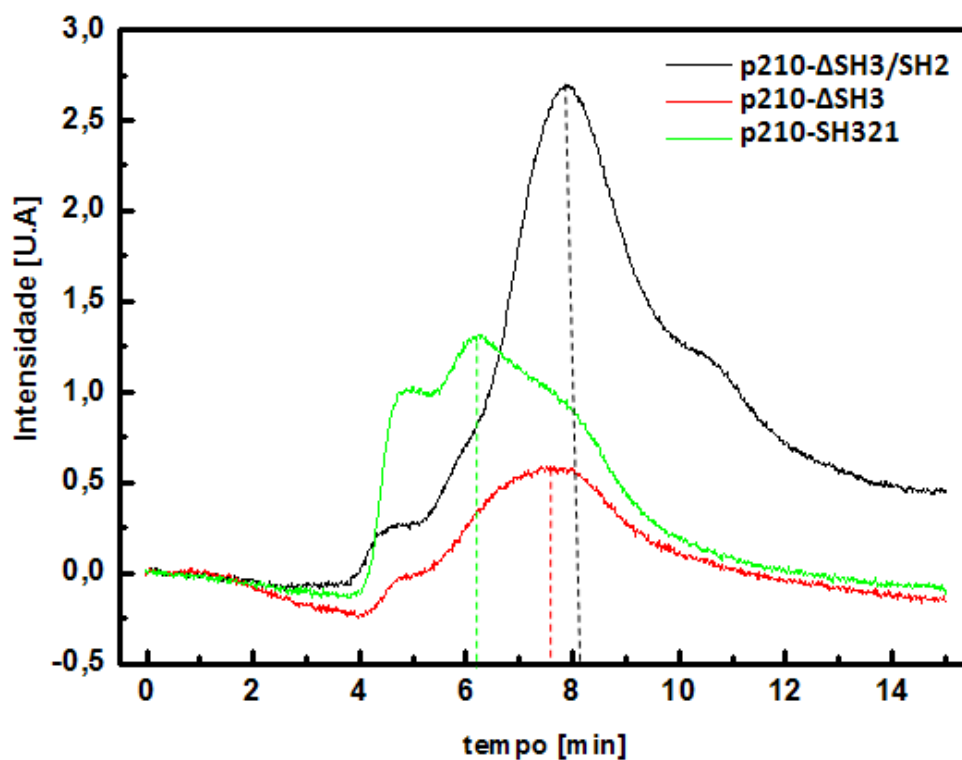


Após verificar que 1% de SDS seria capaz de solubilizar grande parte da proteína alvo, demos início a um protocolo de purificação capaz de minimizar a quantidade de SDS e ao mesmo tempo obter a proteína em grau de pureza satisfatório. Para isso, múltiplas lavagens do corpúsculo de inclusão foram realizadas com uma pequena concentração de SDS (0,05%) como forma de desestabilizar as interações entre as proteínas e dessa forma solubilizá-las. A partir desses testes, foi evidenciado que as primeiras lavagens de SDS eram capazes de separar grande parte das proteínas contaminantes da proteína de interesse. A partir de certo número de lavagem, a proteína mantida no corpúsculo era majoritariamente a proteína alvo, que por desestabilização do mesmo era solubilizada (**Figura 26**).



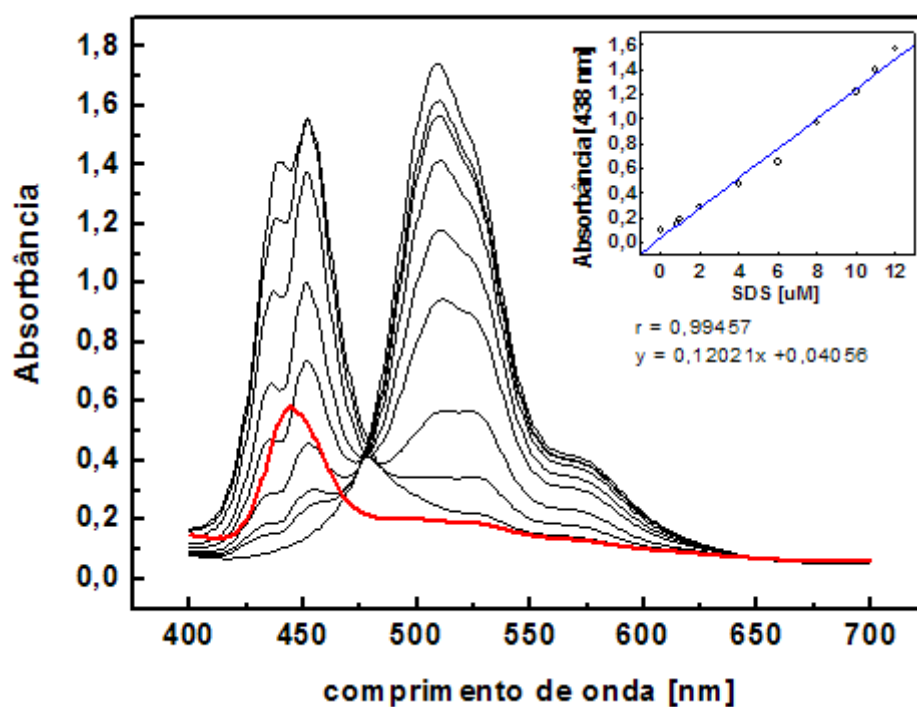
**Figura 26. Protocolo de purificação das construções em estudo. (A), (B) e (C).** Geis de SDS-PAGE 12,5% corados com Comassie Brilliant Blue G-250 da purificação das proteínas p210- $\Delta$ SH3/SH2, p210- $\Delta$ SH2 e p210-SH321, respectivamente. **1** – 1<sup>o</sup> lavagem com tampão de lise (15 mL tampão fosfato de sódio pH 8,0 contendo 1mg/mL de lisozima, 1 mM PMSF, 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol e 5% glicerol), **2** – 2<sup>o</sup> lavagem com 15 mL de tampão fosfato de sódio pH 8,0, **3** – 3<sup>o</sup> lavagem com 15 mL de tampão fosfato de sódio pH 8,0 contendo 0,05% SDS, **4** – 4<sup>o</sup> lavagem com 15 mL de tampão fosfato de sódio pH 8,0 contendo 0,05% SDS **5** – 5<sup>o</sup> lavagem com 15 mL de tampão fosfato de sódio pH 8,0 contendo 0,05% SDS, **6** – 6<sup>o</sup> lavagem com 15 mL de tampão fosfato de sódio pH 8,0 contendo 0,05% SDS e **7** – 7<sup>o</sup> lavagem com 15 mL de tampão fosfato de sódio pH 8,0 contendo 0,05% SDS.

Após estabelecimento do protocolo de purificação, as frações com proteínas em elevado grau de pureza foram submetidas a análise por gel filtração na coluna analítica GPC 300. As amostras injetadas com SDS e após retirada de SDS por diálise apresentaram o mesmo perfil de eluição, sendo a proteína p210-SH321 eluída em 6,21 minutos, a proteína p210- $\Delta$ SH3 em 7,51 minutos e a proteína p210- $\Delta$ SH3/SH2 em 7,86 minutos (Figura 27), condizente com o perfil esperado e de acordo com o peso molecular de cada uma das proteínas.



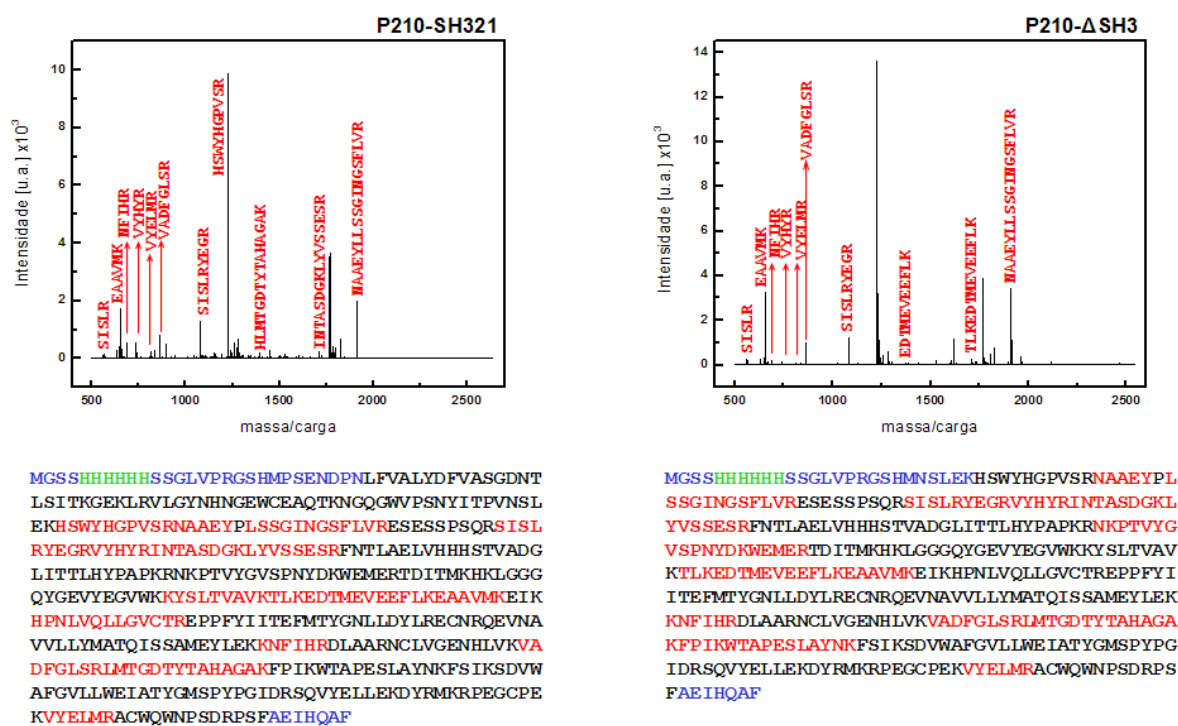
**Figura 27. Análise das proteínas por gel filtração.** Corridas analíticas em coluna GPC 300 monitorada em 280 nm para cada uma das proteínas indicadas pelas linhas coloridas.

As amostras purificadas foram submetidas à diálise e posteriormente mensuradas para a quantidade de SDS residual por meio do protocolo colorimétrico com Stain-all (Figura 28). Para tal, foi estabelecida uma curva de calibração e a partir da equação de reta gerada, foi possível estimar a quantidade de SDS presente nas amostras de acordo com a D.O. em 438 nm. Todas as amostras foram submetidas a diálises de 1 L com 20 mM tampão fosfato pH 8,0. O tampão de diálise foi trocado 4 vezes de 2 em 2 horas. A quantidade de SDS após a diálise foi reduzida de 0,05% (1730  $\mu\text{M}$ ) para 3,8  $\mu\text{M}$ .



**Figura 28. Dosagem de SDS.** O gráfico representa a curva padrão de SDS. O acréscimo de SDS desloca o pico de absorção do stain-all de 510 nm para 453 nm e 438 nm. A linearidade é mantida em 438 nm à medida que se adiciona SDS, como representado no gráfico menor. A partir da obtenção da equação da reta, é possível estimar a concentração de SDS presente nas proteínas em estudo após diálise, representado pela curva em vermelho.

As proteínas purificadas foram submetidas a protocolo de tripsinização e suas identidades foram confirmadas por espectrometria de massa (**Figura 29**). Todos os peptídeos trípticos que obtiveram sinal foram mapeados nas sequências das proteínas correspondentes ao domínio cinase do Abl ou regiões regulatórias. Análises posteriores por Western-blot com anticorpo anti-fosfo-tirosina revelaram que as proteínas p210-SH321 e p210- $\Delta$ SH3 sofreram fosforilações durante a síntese na bactéria, diferentemente da proteína p210- $\Delta$ SH3/SH2, que não foi reconhecida pelo anticorpo. (**Figura 30**).



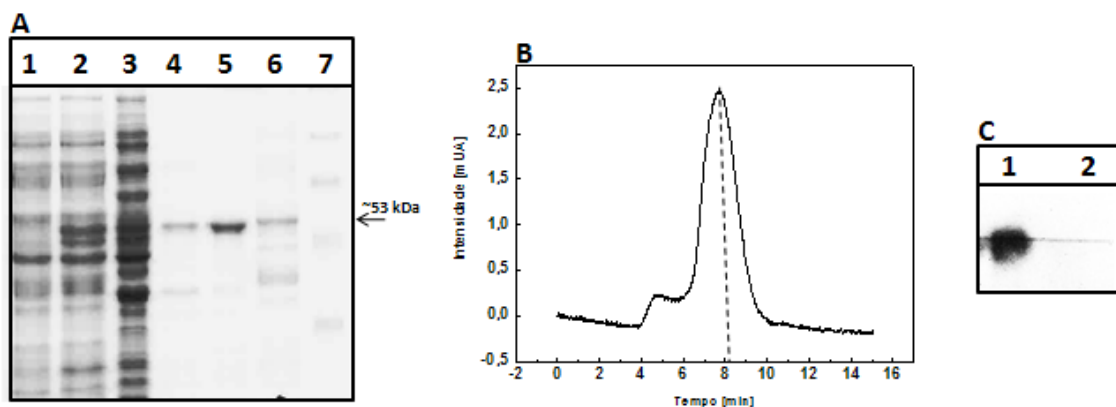
**Figura 29. Espectrometria de massa das proteínas em estudo.** Os gráficos representam as intensidades por massa/carga dos peptídeos gerados a partir da digestão das amostras com tripsina. Abaixo são representados os assinalamentos dos peptídeos em vermelho identificados nas sequências correspondentes das construções p210-SH321 e p210- $\Delta$ SH3. Resíduos em preto correspondem a sequência clonada.



**Figura 30. Western-blot das proteínas em estudo.** A figura representa análises com anticorpo anti-fosfo-tirosina das proteínas **1** - p210- $\Delta$ SH3/SH2, **2** - p210- $\Delta$ SH3 e **3** - p210-SH321.

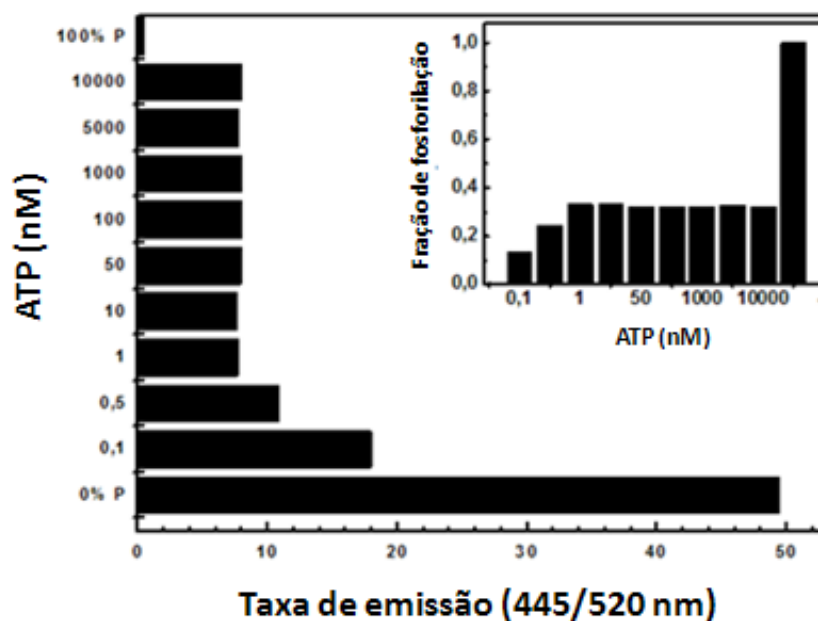
O não reconhecimento do anticorpo nas análises por western-blot na construção p210- $\Delta$ SH3/SH2 nos levaram a conclusão de que o domínio catalítico SH1 não estava sendo fosforilado durante sua síntese na bactéria. As fosforilações detectadas nas outras construções nos levaram a conclusão de que essas proteínas não estavam em sua conformação inativa, uma vez que o processo de fosforilação corresponde ao primeiro evento para a ativação da cinase Abl. A partir desse resultado, decidimos co-transfectar a proteína p210-SH321 juntamente com a fosfatase YopH para verificar se poderíamos obter a proteína em seu estado inativo (desfosforilado). O protocolo de expressão e purificação estabelecido para as construções anteriores foi testado após co-transfecção com ambos os plasmídeos, se mantendo reprodutível mesmo com a incorporação do plasmídeo para YopH (**Figura 31A**). Análise em coluna analítica GPC 300 da construção p210-SH321 co-transfectada com o plasmídeo que codifica para YopH nos evidenciou seu perfil de pureza (**Figura 31B**). Posterior análise por Western-blot com anticorpo anti-fosfo-tirosina nos evidenciaram que a construção p210-SH321 co-transfectada com o plasmídeo para YopH se manteve agora desfosforilada e portanto em sua conformação inativa (**Figura 31C**). A co-transfecção da sequência de interesse com

a fosfatase YopH se mostrou portanto um bom modelo para a obtenção da proteína em seu estado desfosforilado.



**Figura 31. Análises da co-expressão da p210-SH321 com a fosfatase YopH.** (A) protocolo de expressão e purificação da p210-SH321 em seu estado inativo. **1** – amostra antes de indução, **2** – após 2 horas de indução, **3** – primeira lavagem com tampão de lise, **4** – segunda lavagem sem SDS, **5** – terceira lavagem com 0,05% SDS, **6** – solubilização do precipitado formado com 8 M de uréia, **7** – padrão de peso molecular. (B) perfil obtido após purificação e diálise em gel filtração com a coluna GPC 300. (C) análise por western-blot com anticorpo anti-fosfo-tirosina, evidenciando em **1** – p210-SH321 na conformação ativa e em **2** – p210-SH321 expressa na presença da fosfatase YopH.

Por última análise, a atividade biológica da construção p210- $\Delta$ SH3/SH2 foi testada. Para isso foi utilizado um kit (ver materiais e métodos) contendo um peptídeo específico para a proteína Abl. A incubação da construção p210- $\Delta$ SH3/SH2 com o peptídeo e ATP por 1 hora permitiu a fosforilação do substrato. Após incubação por mais 1 hora com a protease sensível apenas aos peptídeos que não foram fosforilados pela cinase e leitura das placas em leitor de fluorescência, fomos capazes de estimar a porcentagem de fosforilação de nossa cinase (**Figura 32**).

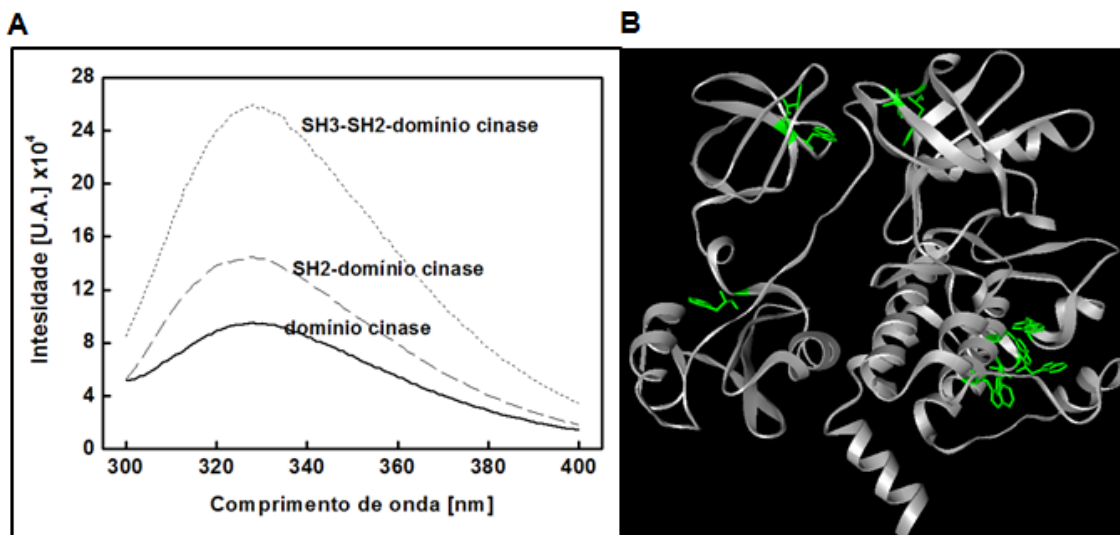


**Figura 32. Atividade cinase por um substrato específico.** O gráfico representa a taxa de emissão entre a coumarina e fluoresceína frente a concentrações crescentes de ATP. O gráfico menor representa a porcentagem de fosforilação da cinase pelo substrato específico. Concentração de proteína utilizada 1  $\mu$ M.

### 4.3 Início da caracterização termodinâmica das construções p210-SH321, p210- $\Delta$ SH3 e p210- $\Delta$ SH3/S2

A terceira parte do trabalho consistiu em experimentos preliminares de caracterização termodinâmica das três proteínas. Inicialmente, os espectros de triptofano sugeriram que todas as proteínas estavam enoveladas, sendo cada uma delas apresentando os seguintes centros de massa espectral: 29633,755  $\text{cm}^{-1}$  para p210-SH321, 29560,146  $\text{cm}^{-1}$  para p210- $\Delta$ SH3 e 29622,969  $\text{cm}^{-1}$  para p210- $\Delta$ SH3/S2 (Figura 33A). O mapeamento dos resíduos de triptofano na estrutura da unidade regulatória (SH3-SH2-SH1) revelaram a presença de 2 resíduos de triptofano no domínio SH3, 1 resíduo no domínio SH2 e 7 resíduos no domínio catalítico SH1. Pela

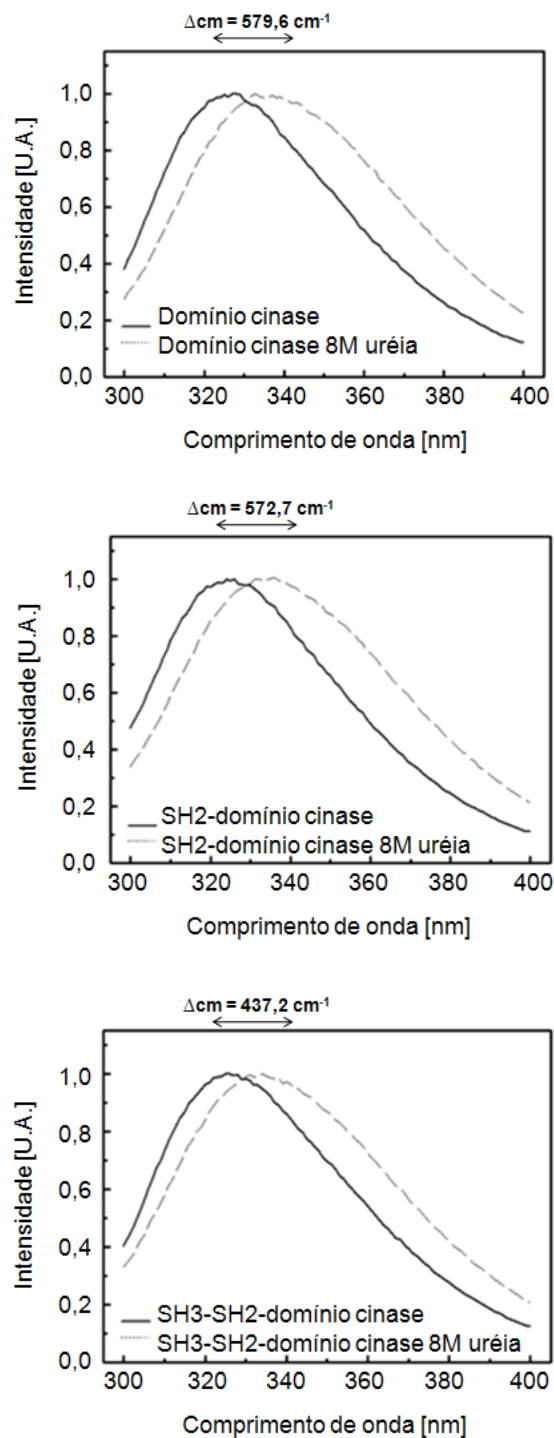
estrutura foi possível perceber que a grande maioria desses resíduos estão internalizados na estrutura protéica (**Figura 33B**), condizendo portanto com os centros de massa deslocados para a região do azul no espectro de triptofano.



**Figura 33. Espectros de fluorescência de triptofanos das proteínas em estudo.** (A) espectro de triptofano da unidade regulatória completa p210-SH321, p210- $\Delta$ SH3 e p210- $\Delta$ SH3/SH2. (B) estrutura cristalográfica (PDB: 1opk) da unidade regulatória completa com resíduos de triptofano mapeadas (bastões verdes). Análise dos triptofanos revela que quase todas as moléculas encontram-se internalizadas na estrutura protéica.

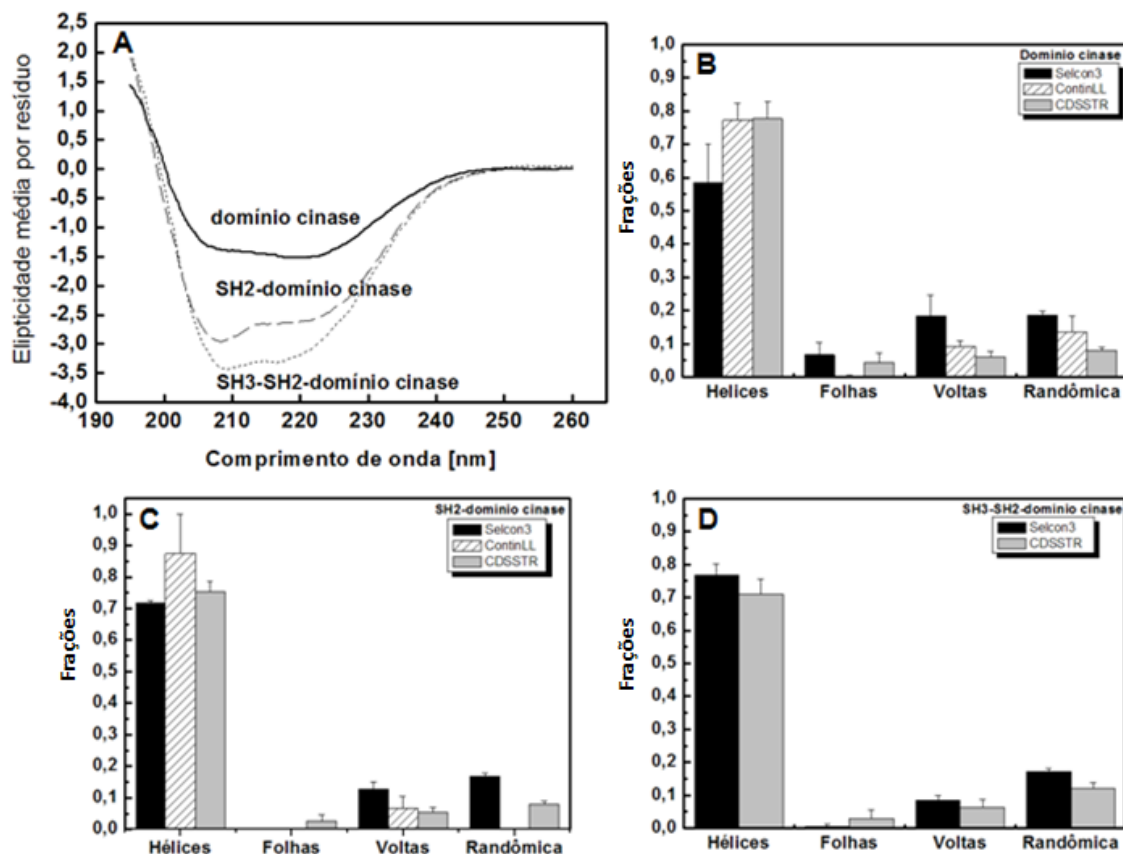
A partir da obtenção dos espectros de triptofano das proteínas em estudo, foi avaliado o primeiro parâmetro de estabilidade, baseado na variação do centro de massa espectral das proteínas quando submetidas a tratamento com agente desnaturante. Com tratamento a 8 M de uréia os espectros de triptofano das proteínas foram deslocados para regiões do vermelho do espectro eletromagnético (**Figura 34**). Tal resultado sugere que as proteínas sofreram desnaturação. O tratamento com uréia foi realizado sem quaisquer variáveis de concentração entre as proteínas assim como durante o experimento, o que nos permitiu a comparação dos centros de massa antes e após o tratamento com uréia para cada uma das construções. A proteína p210-SH321 sofreu variação do centro de massa em  $437,2 \text{ cm}^{-1}$ , enquanto que a proteína p210- $\Delta$ SH3 variou  $572,7 \text{ cm}^{-1}$  e a p210- $\Delta$ SH3/SH2 variou  $579,6 \text{ cm}^{-1}$ .





**Figura 34. Espectros de triptofanos após tratamento com uréia.** Os espectros mostram a variação do centro de massa espectral das três proteínas em estudo na ausência (linha cheia) e na presença (linha pontilhada) de 8 M de uréia. Como representado no gráfico a construção p210-SH321 sofreu menor influência do agente desnaturante frente às outras construções.

A menor variação no centro de massa para a construção p210-SH321 nos sugere fortemente que a unidade regulatória completa (SH3-SH2-SH1) possui maior estabilidade frente ao tratamento com uréia quando comparado com as outras construções p210- $\Delta$ SH3 e p210- $\Delta$ SH3/S2. Análises posteriores por dicroísmo circular nos permitiram mensurar o conteúdo de estrutura secundária das proteínas em questão. O perfil de estrutura secundária de todas as proteínas foi característico de hélices (**Figura 35**), condizente com as estruturas cristalográficas já publicadas. Apesar de as proteínas em estudo apresentarem também folhas- $\beta$ , a desconvolução dos dados obtidos, pela análise nos programas Selcon3, ContinLL e CDSSTR, não evidenciaram grande conteúdo destas estruturas secundárias, sendo uma limitação a análise.



**Figura 35. Análises por Dicroísmo circular.** (A) perfil dos espectros das proteínas p210-SH321, p210- $\Delta$ SH3 e p210- $\Delta$ SH3/SH2 monitorados no UV-distante. Os picos negativos em 208 e 222 nm são característicos de proteínas com grande conteúdo de hélices. (B), (C) e (D) gráficos de frações de estrutura secundária após desconvolução dos dados obtidos nos espectros em (A). Para essa análise foram utilizados os programas Selcon3, ContinLL e CDSSTR. As análises em todos os programas, com diferentes bancos de dados, revelaram perfis semelhantes entre as proteínas em estudo.

Outro parâmetro de estabilidade utilizado na caracterização termodinâmica das proteínas foi obtido a partir de curvas de desnaturação com os agentes desnaturantes uréia e guanidina, por meio do monitoramento do resíduo de triptofano. A partir do perfil obtido nas curvas, é possível a obtenção de alguns parâmetros termodinâmicos, indicativos da estabilidade protéica, como variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) assim como coeficiente de acessibilidade ao solvente ( $m$ ) (Figura 36).

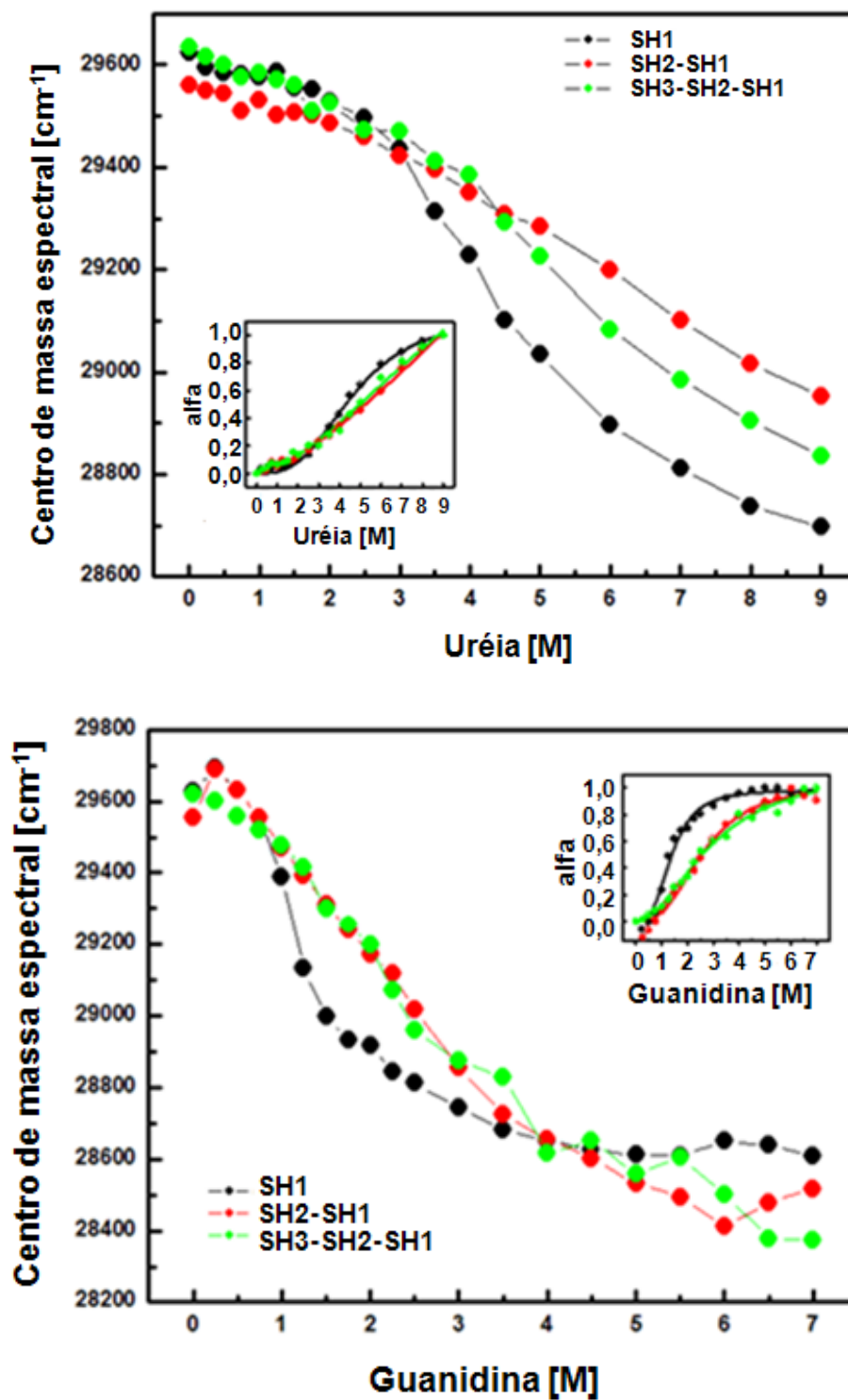
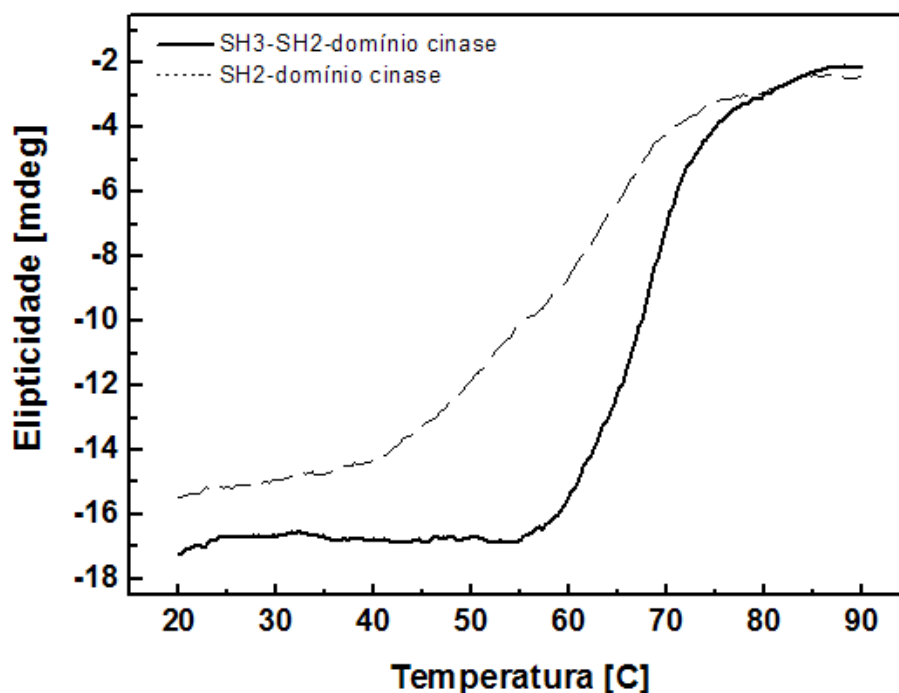


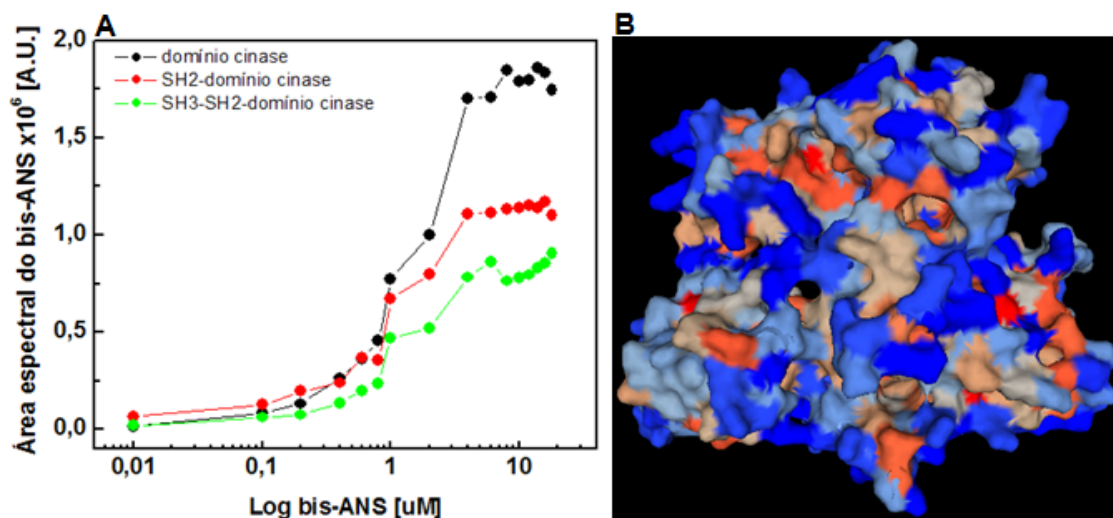
Figura 36. Curvas de centro de massa espectral com agentes desnaturantes. Os gráficos representam os centros de massa em diferentes concentrações de uréia e guanidina das proteínas em estudo; p210-SH321 em verde, p210- $\Delta$ SH3 em vermelho e p210- $\Delta$ SH3/S2 em preto.

A partir dos dados obtidos foi possível concluir que o processo de desnaturação das construções em estudo por meio dos agentes uréia e Hidroclorato de Guanidina ocorrem de maneira pouco cooperativa. O parâmetro de cooperatividade nos dá a informação de como ocorre o processo de desnaturação, sendo que em um processo muito cooperativo a transição do estado nativo para o estado desnaturado ocorre rapidamente, ou seja, em determinada concentração de agente desnaturante, temos a proteína como um todo perdendo estrutura. Por outro lado, em um processo pouco cooperativo, onde temos, por exemplo, domínios protéicos envolvidos, o processo de desnaturação não ocorre na proteína como um todo. No caso das construções em estudo é possível perceber que o domínio SH1 é mais afetado pelos agentes quando comparado aos outros domínios, o que nos leva a crer que os outros domínios influenciam na estabilidade da unidade SH3-SH2-SH1 e torna o processo de desnaturação pouco cooperativo. Após avaliação da estabilidade das proteínas por agentes desnaturantes, foi investigada por dicroísmo circular, a perda de estrutura secundária das proteínas frente ao aumento de temperatura (**Figura 37**). A unidade regulatória completa (p210-SH321) se mostrou mais resistente a desnaturação térmica, quando comparado a proteína p210- $\Delta$ SH3.



**Figura 37. Curva de desnaturalização térmica.** O gráfico representa variação de temperatura entre 20 a 90 °C em dicroísmo circular monitorado a 222 nm das proteínas p210-SH321 (linha cheia) e p210- $\Delta$ SH3 (linha pontilhada). O ponto de início de perda de estrutura se deu em aproximadamente 40 °C para p210- $\Delta$ SH3 e 60 °C para p210-SH321.

A última análise espectroscópica realizada nas proteínas correspondeu a espectros de ligação a bis-ANS. A ligação da molécula de bis-ANS em regiões hidrofóbicas leva a um incremento da fluorescência da sonda, sendo, portanto possível monitorar sítios hidrofóbicos na proteína por análises estequiométricas. Dessa maneira foram realizadas curvas de ligação a bis-ANS adicionando-se concentrações crescentes do mesmo a 1  $\mu$ M de proteína e coletando-se os valores da área espectral da sonda (Figura 38).



**Figura 38. Curva de ligação a bis-ANS.** (A) gráfico representa curva de ligação das proteínas p210-SH321, p210- $\Delta$ SH3 e p210- $\Delta$ SH3/SH2 em escala logarítmica. As amostras foram excitadas em 360 nm e varridas de 400 a 600 nm. O aumento da intensidade foi monitorado pelo cálculo da área espectral do bis-ANS. (B) mapa de superfície da unidade regulatória completa (SH3-SH2-SH1) evidenciando os resíduos mais hidrofóbicos em tons de vermelho e mais hidrofílicos em tons de azul.

A análise dos dados nos revelou que a sonda foi capaz de emitir maior fluorescência durante a ligação ao domínio SH1, quando comparado as outras duas construções. A possível explicação para tal fato seria que novas regiões hidrofóbicas estariam sendo expostas na interface entre os domínios SH3, SH2 e o SH1, antes ocultas por esses domínios, permitindo dessa forma, maior ligação a sonda bis-ANS.

## 5 Discussão

A compreensão dos diversos mecanismos envolvidos na patogênese das doenças neoplásicas exige uma grande comunicação entre a pesquisa básica e aplicada. No caso da Leucemia Mielóide Crônica (LMC), sua patogênese está relacionada à expressão do produto protéico do gene quimérico bcr-abl, que é resultado de uma troca gênica, sem perda cromossomal entre o gene c-abl localizado no cromossomo 9 e o gene bcr localizado no cromossomo 22 (LAURENT e cols., 2001). Essa translocação gênica recíproca forma um derivado cromossômico conhecido como cromossomo Philadelphia (NOWELL e HUNGERFORD, 1960), portando a quimera bcr-abl. A expressão da quimera protéica Bcr-abl, provoca a célula diversas modificações entre elas intensa ativação mitogênica, adesão alterada ao estroma medular e inibição do processo de apoptose (DEININGER e cols., 2000). A doença adota um curso crônico de 3 a 4 anos, podendo evoluir para uma doença aguda seguido de óbito (SAWYERS, 1999). Ainda não é totalmente compreendido os mecanismos envolvidos para a evolução da doença de um curso crônico estável, para uma doença aguda, apesar de algumas hipóteses já terem sido levantadas (JAMIESON e cols., 2004). O principal tratamento curativo para a LMC compreende o transplante de medula óssea, entretanto a terapia com o inibidor Mesilato de Imatinibe adota a linha de frente para a maioria dos casos de LMC (DRUKER e cols., 2001a; DRUKER e cols., 2001b), sendo muito mais eficaz em períodos iniciais da doença (fase crônica), logo após confirmação do diagnóstico.

Dentro desse contexto, a implementação de técnicas de diagnóstico rápido para a identificação do cromossomo Philadelphia ou a quebra cromossomal entre os genes bcr e c-abl são fundamentais para o direcionamento do tratamento com o Mesilato de Imatinibe. O monitoramento pós-tratamento também é uma importante ferramenta para



avaliação do curso da doença. A pesquisa aplicada na área de diagnóstico para LMC, conta com uma grande variedade de técnicas moleculares, citogenéticas e citológicas para a identificação do gene quimérico bcr-abl e ou o cromossomo Philadelphia. Diferentes tipos de RT-PCR podem ser empregados a partir de pequenas quantidades de sangue periférico ou medula óssea de pacientes com suspeitas de LMC. A extração de ARN dessas amostras, seguido da síntese do ADNc (ADNcomplementar) com a enzima transcriptase reversa permite, por meio de protocolos de reação em cadeia da polimerase (PCR), a identificação das quebras gênicas envolvidas no desenvolvimento da LMC dentro da biblioteca gênica de ADNc. O PCR inicial utilizado para a identificação da quebra gênica compreende o protocolo de PCR Multiplex. Esse protocolo permite a identificação dos três principais transcritos leucêmicos envolvidos na LMC (OTAZU e cols., 2000) assim como a amplificação de um segmento de um gene normal como controle da síntese da biblioteca de ADNc. A negatividade em protocolos de PCR multiplex, leva a uma análise mais específica da região de quebra. Para tal, o protocolo de PCR Nested é empregado. Nesse PCR, duas etapas de amplificação são realizadas, com dois jogos de iniciadores distintos, um deles mais externo a sequência de interesse e o outro mais interno a sequência de interesse (OTAZU e cols., 1999). Com esse protocolo é possível selecionar com mais fidelidade a sequência de quebra dentro da biblioteca gênica de ADNc. Outro protocolo ainda utilizado, mas que está sendo substituído pelo PCR em tempo real, é o protocolo de PCR competitivo (CROSS e cols., 1993). Nesse protocolo é possível juntamente com um competidor e diluições seriadas do mesmo e de sua biblioteca de ADNc, estimar a carga tumoral de determinado paciente, ou seja, quantos transcritos leucêmicos são identificados dentro de uma determinada amostragem e dessa forma é possível monitorar a evolução de pacientes submetidos a um determinado tratamento (OTAZU e cols., 2002). O sequenciamento de

ADN, por sua vez, também representa uma importante ferramenta e muito utilizada em terapias longas ou em estágios de recaída molecular. A perda de responsividade por um determinado tratamento, como por exemplo, com o Mesilato de Imatinibe, é muitas vezes recorrente e pode ocorrer devido, entre outros fatores (HOCHHAUS e cols., 2002), a aquisição de mutações dentro do sítio de ligação do inibidor, inviabilizando, portanto sua ligação e seu consequente efeito. Em vista disso, a técnica de sequenciamento de ADN, permite a identificação e classificação de mutações envolvidas com a perda de responsividade por determinado medicamento. No caso do Mesilato de Imatinibe, uma série de mutações já foram identificadas e associadas à resistência molecular ao fármaco e relacionadas com recaída molecular e clínica da doença (BRANFORD e cols., 2003; GORRE e cols., 2001, BUBNOFF e cols., 2002; ROUMIANTSEV e cols., 2002; BRANFORD e cols., 2004; BRANFORD e cols., 2002; CHU e cols., 2005 e JABBOUR e cols., 2006). Com a técnica de sequenciamento e a identificação das mutações condizentes com resistência ao Mesilato de Imatinibe, muitos trabalhos de pesquisa básica voltados para a criação de drogas foram iniciados (WEISBERG e cols., 2005; TOKARSKI e cols., 2006). A busca de novos fármacos capazes de responder as diversas mutações já encontradas em pacientes resistentes ao Mesilato de Imatinibe vem ganhando muita força recentemente. Dessa forma, ao longo dos anos, segundas (WEISBERG e cols., 2005) e terceiras (TOKARSKI e cols., 2006) gerações de inibidores de tirosinas cinases foram surgindo no mercado, capazes de barrar o fenótipo maligno da LMC mesmo nas quimeras protéicas portando mutações. Em contra partida, muitas mutações já descritas em pacientes não possuem inibidores capazes de barrar os efeitos deletérios gerados por tais alterações, como é o caso da mutação T315I (GORRE e cols., 2001). Essa mutação ocorre em grande frequência em pacientes com LMC e se localiza dentro do sítio de ligação do Mesilato de Imatinibe

(GORRE e cols., 2001). Recentemente, foi possível a obtenção da estrutura cristalográfica do domínio SH1 da quimera protéica Bcr-abl, portando a mutação T315I (ZHOU e cols., 2007), o que fornece um grande avanço para futuros estudos na formulação de drogas que inibam o efeito desse mutante. Muito recentemente, uma nova tendência de inibidores vem surgindo como alternativa para barrar os efeitos deletérios causado pela cinase Bcr-abl (QUINTÁS-CARDAMA e cols., 2007). Esses inibidores não focam mais o sítio catalítico da quimera, como o caso do Mesilato de Imatinibe (DRUKER e cols., 2001A; DRUKER e cols., 2001b), o AMN107 (WEISBERG e cols., 2005) e o BMS-354825 (TOKARSKI e cols., 2006), mas sim regiões alostéricas da proteína que estejam envolvidas com algum dos mecanismos de regulação da cinase. Um desses inibidores, conhecido como GNF-2 (ADRIÁN e cols., 2006) se liga no sítio de ligação da molécula de miristoil, envolvido diretamente em um dos mecanismos de regulação do Bcr-abl.

O diagnóstico citogenético, por sua vez, apesar de muito menos sensível que as técnicas moleculares descritas acima, serve também como importante recurso para a identificação de translocações cromossômicas envolvidas em neoplasias. No caso da LMC, o cromossomo Philadelphia pode ser facilmente identificado a partir da técnica de bandeamento G. Os mapas cromossômicos gerados pelo bandeamento G, permitem a identificação dos derivados cromossômicos 9 e 22 em amostras de pacientes portadores de LMC. Com o mesmo procedimento realizado para o diagnóstico citogenético, é possível avaliar pela técnica de Hibridização de fluorescência in situ na interfase (iFISH) a presença do cromossomo Philadelphia. Nessa técnica, sondas fluorescentes específicas são capazes de hibridizar com segmentos do gene bcr e com segmentos do gene c-abl e a partir de análises em microscópio de fluorescência, é possível a

identificação e quantificação dos pontos de quebra característicos da LMC (PRIMO e cols., 2003).

A utilização dessas técnicas está bem difundida na literatura e são empregadas corriqueiramente para o diagnóstico em casos de suspeita de LMC. Dentro desse contexto, na primeira parte do trabalho, as diferentes técnicas aqui descritas, foram utilizadas para diagnóstico e monitoramento de dois pacientes pediátricos portando LMC em tratamento com Mesilato de Imatinibe. A incidência anual de LMC em crianças é muito baixa (1:1000000), e dessa forma os critérios de tratamento ainda não estão muito bem definidos. Apesar de o tratamento com Mesilato de Imatinibe estar direcionado a população adulta, alguns poucos trabalhos já buscaram avaliar o efeito do inibidor na população infantil (MILLOT e cols., 2006). Esses trabalhos estimam a dosagem ótima para o tratamento em crianças (CHAMPAGNE e cols., 2004) assim como boas respostas frente ao tratamento com o inibidor. Em 2001 o tratamento com o inibidor foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) para uso adulto (<http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2001/NEW00759.html>) e em 2003 para uso na pediatria (<http://www.fda.gov/bbs/topics/news/2003/new00909.html>). No Brasil, o Ministério da Saúde não aprova o uso do Mesilato de Imatinibe para a população infantil, sendo, portanto um impedimento ao aumento da sobrevida desses pacientes pediátricos. O trabalho aqui apresentado, relata o monitoramento molecular de dois pacientes pediátricos em uso constante com Mesilato de Imatinibe por meio de RT-PCR Multiplex, Nested, competitivo e sequenciamento, juntamente com as técnicas de bandeamento G e iFISH. Ambos os pacientes apresentaram uma boa resposta clínica e hematológica ao tratamento, confirmados pelas técnicas moleculares empregadas. Esse trabalho confirma que o uso do inibidor na população pediátrica é eficaz e promissor aos pacientes. Trabalhos como esse, apesar de não fornecerem dados inovadores na

literatura internacional da leucemia infantil, devem ser levados em consideração na visão nacional, como forma de incentivo as autoridades responsáveis do Ministério da Saúde a aprovarem sua utilização na pediatria. De forma a corroborar os dados da literatura, o tratamento dos dois pacientes mostraram grandes perspectivas para o aumento da sobrevida dos mesmos.

O monitoramento molecular desses pacientes lançou uma nova proposta de estudo a nível proteômico, facilitando assim a comunicação entre pesquisa aplicada e pesquisa básica. Apesar de os pacientes em estudo terem se mostrado responsivos ao tratamento com Mesilato de Imatinibe, muitos casos de resistência a terapia são descritos, em vista da aquisição ou seleção de mutações no sítio catalítico da enzima. A criação de novas terapias para o tratamento da LMC se faz necessário e dessa forma, o estudo a nível básico, por meio do estabelecimento de novos protocolos de obtenção da enzima “in vitro” para estudos estruturais e biofísicos são de fundamental importância. Dentro desse contexto, a segunda parte do trabalho se engajou na obtenção de um novo protocolo de expressão e purificação da unidade regulatória (SH3-SH2-SH1) e outras construções como SH2-SH1 e SH1. A investigação de protocolos de expressão e purificação já estabelecidos para essas regiões da cinase Abl revelou a grande dificuldade que existe em se obter grandes quantidades da proteína em elevado grau de pureza e baixo custo. Alguns protocolos já estabelecidos utilizam sistemas simples de transfecção com fosfato de cálcio em linhagens eucarióticas, como 293T (PLUK e cols., 2002; SMITH e cols., 2003; HANTSCHHEL e cols., 2003; FRANZ e cols., 1989 STEEN e cols., 2003; BRASHER e cols., 2000) e sistemas de baculovírus com células de inseto SF9 (*Spodoptera frugiperda*) (NAGAR e cols., 2003; CHEN e cols., 2008). Atualmente, o uso de sistemas heterólogos em cepas de *E.coli* para expressão de proteínas recombinantes está ganhando destaque. Alguns poucos protocolos já foram

estabelecidos para a unidade regulatória completa ou os domínios (SH3, SH2 e SH1) isolados do Abl em sistema procarioto (GOSSER e cols., 1995; SEELIGER e cols., 2005; NAM e cols., 1996 ; CHEN e cols., 2007) e muitos deles se utilizam de sequências ou proteínas auxiliares para purificação por afinidade (COWAN-JACOB, 2006). Outra grande problemática encontrada nos protocolos de purificação da unidade catalítica completa da cinase Abl e outras cinases em cepas de *E.coli* consistem na dificuldade em se obter a proteína alvo solúvel. Estima-se que nesse sistema, apenas 5-10% da proteína seja solubilizada, sendo que os 90-95% restantes são mantidos insolúveis em aglomerados protéicos conhecidos por corpúsculos de inclusão (SEELIGER e cols., 2005). Algumas estratégias como o uso de proteínas grandes auxiliares são também utilizadas como forma de se obter maior quantidade da proteína de interesse solúvel (COWAN-JACOB, 2006). Outro ponto ainda questionável é a expressão de grandes quantidades de certas cinases em sua conformação ativa. Grande parte das cinases expressas em *E.coli* na conformação ativa (fosforiladas) apresenta efeito tóxico para a célula (COWAN-JACOB, 2006), e acabam diminuindo o rendimento de produção. Para isso, alguns protocolos já realizam co-transfecção de fosfatases juntamente com a cinase de interesse como forma de diminuir sua toxicidade e produzi-la em seu estado inativo (desfosforilado) (SEELIGER e cols., 2005).

Os mecanismos de regulação de tirosinas cinases já estão bem elucidados a nível estrutural. A cinase Abl se mantém em sua conformação inativa “in vivo”. Os diversos mecanismos de regulação dessas cinases são perdidos quando sua funcionalidade é requerida pela célula. Para a ativação completa do Abl, uma série de eventos estruturais ocorre e compreendem: a possível dissociação de inibidores celulares do domínio regulatório SH3 (WEN e VAN, 1997), a fosforilação sequencial das tirosinas Y412 e Y245 (HANTSCHHEL e cols., 2004; BRASHER e cols., 2000), o desacoplamento do

domínio regulatório SH3 do conector SH2-SH1 (BRASHER e cols., 2000), o desacoplamento da molécula de miristoil do bolso C-terminal do SH1 (NAGAR e cols., 2003; HANTSCHEL e cols., 2003) com o consequente desacoplamento do domínio regulatório SH2 e por fim a ligação de fosfopeptídeos ao domínio SH2 (HANTSCHEL e cols., 2003). Uma vez que o Abl é o responsável por fosforilar diversos substratos, envolvidos em importantes vias de sinalização e que levam a proliferação, migração e sobrevivência celular, esses diversos mecanismos de regulação garantem que a cinase seja estritamente regulada na célula, servindo como importante controle para o bloqueio do processo leucemogênico.

Células leucêmicas, portadoras da translocação bcr-abl e a consequente expressão da quimera protéica Bcr-abl, fazem com que parte desses mecanismos sejam perdidos e, portanto as células passam a apresentar proteínas Bcr-abl em estado sempre ativo, com atividade tirosina cinase desregulada. Apesar de boa parte dos mecanismos de regulação do Abl já terem sido elucidados a nível estrutural, pouco se sabe com respeito a participação termodinâmica das unidades regulatórias SH3 e SH2 frente ao domínio cinase SH1. Avaliações de estabilidade e cooperatividade da unidade regulatória completa, assim como das construções SH2-SH1 e apenas do domínio SH1 seriam de grande importância para o maior entendimento da interface entre os domínios regulatórios SH3-SH2 e o domínio cinase SH1 a nível termodinâmico e possivelmente auxiliariam na descoberta de possíveis sítios adjacentes ao sítio catalítico como alvos para a síntese de novas drogas anti-cancer. Em vista disso, a partir de amostras de sangue periférico, foram amplificadas por PCR Nested as sequências correspondentes aos domínios SH3-SH2-SH1, SH2-SH1 e SH1. Após purificação das regiões, as mesmas foram clonadas no vetor pET29a para posterior expressão na cepa Rosetta DE3. Após estabelecimento da densidade ótica, concentração de indutor e tempo de indução

ideais, foram realizados diversos testes na etapa de solubilização a fim de obter grande parte da proteína solúvel. A única condição encontrada capaz de solubilizar grande parte da proteína de interesse, não mantendo a proteína em corpúsculos de inclusão, foi por meio de tratamento com o detergente aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS). Como estávamos engajados em um protocolo capaz de recuperar grande quantidade de proteína da fração insolúvel, foi investido um maior esforço no tratamento com SDS e não em protocolos usuais de purificação por colunas cromatográficas. Portanto, a constatação de que 1% de SDS era capaz de solubilizar grande parte da proteína, enquanto que 0,1% não era capaz de solubilizar a proteína de interesse, nos levou a adotar a estratégia de lavar o corpúsculo de inclusão sucessivamente com pequenas quantidades de SDS (0,05%) em tampão fosfato pH 8,0. Após diversos testes com diferentes volumes de lavagem e com diferentes quantidades de corpúsculo de inclusão, foi possível separar grande parte dos contaminantes da proteína de interesse. O perfil de lavagem entre as construções se mostrou distinto, sendo necessárias duas lavagens com SDS para a construção p210-SH321, 5 lavagens para p210- $\Delta$ SH3 e 3 para p210- $\Delta$ SH3/SH2. Apesar de as análises termodinâmicas terem indicado a construção p210-SH321 como sendo a mais estável entre as analisadas, a facilidade para solubilização da mesma pode ser devido a diferentes regiões expostas na superfície da proteína quando comparado as outras construções. A proteína p210- $\Delta$ SH3 por ter apresentado maior resistência a solubilização, sendo necessárias cinco lavagens, provavelmente apresenta regiões expostas no corpúsculo de inclusão antes ocluídas pela presença do domínio SH3.

Após estabelecimento do protocolo de purificação, as proteínas foram submetidas à cromatografia por gel filtração. O perfil obtido em cada corrida mostrou possíveis contaminantes na amostra, não detectados por SDS-PAGE. Não foi possível



identificar, dentro da sensibilidade da coloração por prata, os possíveis contaminantes identificados durante a corrida por gel filtração. Uma possível explicação para o perfil obtido seria a interação de outras proteínas com as unidades regulatórias SH3 e SH2 das construções, que por SDS-PAGE migrariam juntamente com a proteína de interesse. Entretanto as análises de espectrometria de massa das amostras extraídas do SDS-PAGE revelaram peptídeos apenas condizentes com a sequência das proteínas alvo. Outra possível explicação para o perfil encontrado seria a formação de possíveis oligômeros em solução (SEELIGER e cols., 2005). A tentativa de corrida em géis nativos não foi bem sucedida, uma vez que em condições nativas as proteínas purificadas não eram capazes de entrar no gel, fato que poderia corroborar a formação de possíveis oligômeros em solução.

Após confirmação da identidade das proteínas por espectrometria de massa e atividade cinase por um substrato específico, as proteínas foram submetidas à análise por western-blot com anticorpo anti-fosfo-tirosina. A análise revelou que as proteínas p210-SH321 e p210- $\Delta$ SH3 sofreram fosforilações durante a síntese na célula bacteriana. Esse resultado sugere que ao longo da síntese as proteínas poderiam estar se autofosforilando por um mecanismo intermolecular, como já sugerido em outros trabalhos (BRASHER e cols., 2000) ou que possivelmente outras proteínas cinases produzidas pela bactéria estariam transfosforilando a cinase Abl. Curiosamente a produção da proteína p210- $\Delta$ SH3/SH2, expressa com o mesmo protocolo utilizado para as outras construções que sofreram fosforilações, não identificou quaisquer fosforilações. Essa observação sugere que o mecanismo de fosforilação das proteínas na bactéria possivelmente não ocorreu por um mecanismo de transfosforilação por outra cinase bacteriana, caso contrário, a proteína p210- $\Delta$ SH3/SH2 também deveria ter sido fosforilada durante sua síntese na célula bacteriana. Dessa forma, acredita-se que a

fosforilação das proteínas em estudo tenha ocorrido por um mecanismo de autofosforilação intermolecular e que possivelmente as unidades regulatórias SH3 e SH2 isoladamente, possam participar desse mecanismo de transferência de grupamentos fosfato.

Uma última análise realizada com as proteínas purificadas consistiu em experimentos de fluorescência intrínseca de triptofano, que permite avaliar o enovelamento protéico, e análises por dicroísmo circular, que permite estimar o conteúdo de estruturas secundárias. Os espectros de fluorescência obtidos para cada uma das construções revelaram que as proteínas estavam estruturadas. A análise por dicroísmo circular das proteínas revelou perfil característico de estruturas em hélices-  $\alpha$  e folhas  $\beta$ , em menor escala, como ocorre de fato nas proteínas em estudo.

A purificação da unidade catalítica completa (SH3-SH2-SH1) em sua conformação ativa (fosforilada) levantou um questionamento para o protocolo de expressão e purificação com SDS. Será que o protocolo com SDS seria reprodutível para a purificação da unidade catalítica completa em sua conformação inativa (desfosforilada)? Para confirmar essa hipótese, foi realizado uma co-expressão com a fosfatase YopH obtida de *Yersinia* (SEELIGER e cols., 2005), juntamente com o plasmídeo contendo a construção p210-SH321 em células BL21 DE3. O mesmo protocolo de expressão e purificação estabelecido para a construção p210-SH321 em sua forma ativa foi realizado e ao fim foi possível purificar a proteína em sua forma desfosforilada. Os resultados por gel filtração e western-blot garantiram sua pureza e a ausência de quaisquer fosforilações em resíduos de tirosina.

Após o estabelecimento de um novo protocolo para a produção de proteínas recombinantes dos domínios SH3-SH2-SH1, SH2-SH1 e SH1 em suas conformações ativas e inativas, foi dado início a estudos espectroscópicos de estabilidade das

construções obtidas. Inicialmente, avaliando a fluorescência da sonda de triptofano, foi possível, por meio do tratamento com o agente desnaturante uréia, comparar a estabilidade entre as construções em estudo. Após a obtenção dos espectros normalizados de fluorescência de triptofano das proteínas sem e com tratamento por uréia, foi possível observar que a construção p210-SH321 teve uma menor variação do centro de massa espectral quando comparado com a construção p210- $\Delta$ SH3 que por sua vez teve menor variação quando comparado com a construção p210- $\Delta$ SH3/SH2. Essa observação sugere fortemente que a unidade catalítica completa (SH3-SH2-SH1) apresenta maior estabilidade frente ao tratamento com uréia e que a depleção dos domínios regulatórios SH3 e SH2 diminui a estabilidade do complexo. Posteriores análises por desnaturação térmica, monitoradas por dicroísmo circular, evidenciaram que a proteína p210-SH321 é mais estável a desnaturação térmica quando comparado a proteína p210- $\Delta$ SH3. O ponto de transição em que a proteína p210-SH321 passou a perder estrutura secundária se deu em aproximadamente 60 °C, enquanto que a proteína p210- $\Delta$ SH3 teve seu ponto de transição em torno de 40 °C, confirmando novamente que a unidade catalítica completa (SH3-SH2-SH1) é mais estável e que a depleção dos domínios regulatórios afetam a estabilidade da proteína truncada. Esses dados de estabilidade foram também confirmados por curvas de desnaturação com agentes desnaturantes entre eles uréia e o hidrocloreto de guanidina. Novamente, a proteína p210- $\Delta$ SH3/SH2 se mostrou mais sensível ao tratamento com os agentes quando comparado as outras proteínas portando os domínios regulatórios SH2 ou SH2 e SH3. Outra avaliação espectroscópica realizada nas proteínas em estudo foram curvas de ligação a sonda bis-ANS. Como já discutido, essa sonda ao se inserir em bolsas hidrofóbicas emite fluorescência. Nesse ensaio, curiosamente a proteína p210- $\Delta$ SH3/SH2 teve maior incremento de fluorescência, com o acréscimo do bis-ANS,

quando comparado com as outras proteínas. Esse resultado sugere fortemente que a maior ligação de bis-ANS ao domínio SH1 ocorre devido à exposição de novas regiões hidrofóbicas antes ocluídas pela presença das unidades regulatórias SH3 e SH2. Esse resultado lança uma nova alternativa para a criação de possíveis agentes para o tratamento da LMC. A presença de novos sítios alvos na interface SH3-SH2 com SH1 assim como o desenho de novas drogas capazes de atuar nesses sítios seria de grande importância para a manutenção da cinase em sua conformação inativa em células Bcr-abl positivas. Como já se sabe a ligação do Mesilato de Imatinibe ocorre apenas com a cinase em seu estado inativo (NAGAR e cols., 2002). A dinâmica das proteínas cinases, por meio da ativação e desativação transiente por fosfatases seria de grande valia nesse tipo de estratégia (NAGAR e cols., 2002). Durante o tempo em que a cinase estivesse em sua conformação ativada, possíveis novas drogas se ligariam na interface SH3-SH2 com SH1 e ao tempo em que a cinase voltasse para sua conformação inativa (por atuação de fosfatases) a ligação do inibidor seria capaz de promover manutenção desse estado inativo.

## 6 Conclusão

Dentro dos esforços em se obter uma maior compreensão dos mecanismos moleculares da Leucemia Mielóide Crônica em pacientes pediátricos assim como a resposta desses ao tratamento com o inibidor Mesilato de Imatinibe, foram realizados monitoramentos clínicos, hematológicos e moleculares de dois pacientes pediátricos diagnosticados com LMC e em tratamento com o inibidor. A avaliação molecular evidenciou uma boa resposta desses pacientes ao longo do tratamento o que reafirma a utilização desse medicamento para uso na pediatria. Acreditamos que trabalhos desse tipo auxiliem na mobilização do Ministério da Saúde a liberar o medicamento para a administração pediátrica.

Por outro lado, com os esforços em se obter um protocolo fácil e eficiente de purificação da unidade catalítica completa assim como de outras construções da cinase Abl, foi possível estabelecer um protocolo de purificação com o detergente aniônico SDS. Nesse protocolo, as proteínas foram obtidas sem o uso de colunas cromatográficas e em elevado grau de pureza. A pequena quantidade de SDS utilizada como estratégia de purificação não foi capaz de alterar a estrutura das proteínas, como demonstrado nos dados de fluorescência e dicroísmo circular assim como sua atividade biológica. Duas das três proteínas em estudo foram produzidas em sua conformação ativa (fosforiladas) dentro da célula, entretanto não apresentaram qualquer perfil de toxicidade as células bacterianas, como ocorre em muitos casos de expressão de cinase ativas (COWAN-JACOB, 2006). Dessa forma, acreditamos que o protocolo aqui estabelecido possa contribuir para a obtenção de grandes quantidades de proteína de maneira prática e rápida para futuros estudos na área estrutural e biofísica.

Somado a isso, com os esforços em se obter um maior conhecimento a nível de estabilidade dos domínios regulatórios SH3 e SH2 frente ao domínio SH1, foi possível avaliar que a depleção desses domínios afeta a estabilidade da unidade catalítica completa e que a depleção desses domínios expõe novas regiões alvo para a síntese de agentes anti-cancer para o tratamento da LMC dentro da interface SH3SH2 com o domínio catalítico.

## Referências

ABELSON, H.T. and RABSTEIN, L.S. (1970). **Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice.** *Cancer Research*, 30: 2, 213-2222.

ADIRÁN, F.J.; DING, Q.; SIM, T.; VELENTZA, A.; SLOAN, C.; LIU, Y.; ZHANG, G.; HUR, W.; DING, S.; MANLEY, P.; MESTAN, J.; FABBRO, D. and GRAY, N.S. (2006). **Allosteric inhibitors of Bcr-abl-dependent cell proliferation.** *Nature Chemical Biology*, 2: 95-102.

ARLINGHAUS, R.B. (2002). **Bcr: a negative regulator of the Bcr-abl oncoprotein in leukemia.** *Oncogene*, 21: 8560-8567.

BARILÁ, D. and SUPERTI-FURGA, G. (1998). **An intramolecular SH3-domain interaction regulates c-Abl activity.** *Nature Genetics*, 18: 280-282.

BERNARDS, A.; RUBIN, C.M.; WESTBROOK, C.A.; PASKIND, M. and BALTIMORE, D. (1987). **The first intron in the human c-abl gene is at least 200 Kilobases long and is a target for translocations in chronic myelogenous leukemia.** *Molecular and Cellular Biology*, 7: 3231-3236.

BRANFORD, S.; RUDZKI, Z. and HUGHES, T.P. (2000). **A novel BCR-ABL transcript (e8a2) with the insertion of an inverted sequence of ABL intron 1b in a patient with Philadelphia-positive chronic myeloid leukaemia.** *British Journal of Haematology*, 109: 635-637.

BRANFORD, S.; RUDZKI, Z.; PARKINSON, I.; GRIGG, A.; TAYLOR, K.; SEYMOUR, J.F.; DURRANT, S.; BROMWETT, P.; SCHWARER, A.P.; ARTHUR, C.; CATALANO, J.; LEAHY, M.F.; FILSHIE, R.; BRADSTOCK, K.; HERRMANN, R.; JOSKE, D.; LYNCH, K. and Hughes, T. (2004). **Real-time quantitative PCR analysis can be used as a primary screen to identify patients with CML treated with imatinib who have BCR-ABL kinase domain mutations.** *Blood*, 104: 2926-2932.

BRANFORD, S.; RUDZKI, Z.; WALSH, S.; GRIGG, A.; ARTHUR, C.; TAYLOR, K.; HERMANN, R.; LYNCH, K.P. and HUGHES, T.P. (2002). **High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance.** *Blood*, 99: 3472-3475.

BRANFORD, S.; RUDZKI, Z.; WALSH, S.; PARKINSON, I.; GRIGG, A.; SZER, J.; TAYLOR, K.; HERMANN, R.; SEYMOUR, J.F.; ARTHUR, C.; JOSKE, D.; LYNCH, K and Hughes, T. (2003) **Detection of Bcr-abl mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis.** *Blood*, 102: 276-283.

BRASHER, B.B. and VAN ETTEN, R.A. (2000). **C-Abl has high intrinsic tyrosine kinase activity that is stimulated by mutation of the Src homology 3 domain and by autophosphorylation at two distinct regulatory tyrosines.** *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 35631-35637.

BUBNOFF, N.V.; SCHNELLER, F.; PESCHEL, C. and DUYSSTER, J. (2002). **BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study.** *Lancet*, 359: 487-491.

BUCHDUNGER, E.; CIOFFI, C.L.; LAW, N.; STOVER, D.; OHNO-JONES, S.; DRUKER, B.J. and LYDON, N.B. (2000). **Abl Protein-Tyrosine Kinase Inhibitor STI571 Inhibits In Vitro Signal Transduction Mediated by c-Kit and Platelet-Derived Growth Factor Receptors.** *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295: 139-145.

CALABRETTA, B. and PERROTI, D. (2004). **The biology of CML blast crisis.** *Blood*, 103: 4010-4022.



CHAMPAGNE, M.A.; CAPDEVILLE, R.; KRAILO, M.; QU, W.; PENG, B.; ROSAMILIA, M.; THERRIEN, M.; ZOELLNER, U.; BLANEY, S.M. and BERNSTEIN, M. (2004). **Imatinib Mesylate (STI571) for treatment of children with Philadelphia chromosome–positive leukemia: results from a Children’s Oncology Group phase 1 study.** *Blood*, 104: 2655 – 2660.

CHEN, S.; BRIER, S.; SMITHGALL, T.E. and ENGEN, J.R. (2007). **The Abl SH2-kinase linker naturally adopts a conformation competent for SH3 domain binding.** *Protein Science*, 16: 572 – 581.

CHEN, S.; DUMITRESCU, T.D.; SMITHGALL, T.E. and ENGEN, J.R. (2008). **Abl N-terminal Cap stabilization of SH3 domain dynamics.** *Biochemistry*, 47: 5795 – 5803.

CHOMCZYNSKI, P. and SACCHI, N. (1987). **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal Bioche*, 162:156–159.

CHU, S.; XU, H.; SHAH, N.P.; SNYDER, D.S.; FORMAN, S.J.; SAWYERS, C.L. and BHATIA, R. (2005). **Detection of BCR-ABL kinase mutations in CD34<sup>+</sup> cells from chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission on imatinib mesylate treatment.** *Blood*, 105: 2093-2098.

CLARK, S.S.; MCLAUGHLIN, J.; CRIST, W.M.; CHAMPLIN, R. and Witte, O.N. (1987). **Unique forms of the abl tyrosine kinase distinguish Ph-positive CML from PH-positive ALL.** *Science*, 235: 85-88.

COLLINS, S.; COLEMAN, H. and GROUDINE, M. (1987). **Expression of Bcr and Bcr-abl fusion transcripts in normal and leukemic cells.** *Molecular and Cellular Biology*, 7: 2870-2876.

COMPTON, L.A. and JOHNSON, W.C. JR. (1986). **Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication.** *Analytical Biochemistry*, 155: 155-167.

COWAN-JACOB, S.W. (2006). **Structural biology of protein tyrosine kinases.** *Cell. Mol. Life Sci.*, 63: 2608-2625.

CROCE, C.M.; HUEBNER, K.; ISOBE, M.; FAINSTAIN, E.; LIFSHITZ, B.; SHTIVELMAN, E. and CANAANI, E. (1987). **Mapping of four distinct BCR-related loci to chromosome region 22q11: order of Bcr loci relative to chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia breakpoints.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84: 7174-7178.

CROSS, N.C.P.; FENG, L.; CHASE, A.; BUNGEY, J.; HUGHES, T.P. and Goldman, J.M. (1993). **Competitive Polymerase Chain reaction to estimate the number of Bcr-abl transcripts in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation.** *Blood*, 82: 1929-1936.

DAI, Z.; QUACKENBUSH, R.C. and COURTNEY, K.D. (1998). **Oncogenic Abl and Src tyrosine kinases elicit the ubiquitin-dependent degradation of target proteins through a Ras-independent pathway.** *Genes Dev.* 12: 1415-1424.

DEININGER, M.W.N.; GOLDMAN, J.M. and MELO, J.V. (2000). **The molecular biology of chronic myeloid leukemia.** *Blood*, 96: 3343- 3356.

DIEKMANN, D.; NOBES, C.D.; BURBELO, P.D.; ABO, A. and HALL, A. (1995). **Rac GTPase interacts with GAPs and target proteins through multiple effector sites.** *EMBO Journal*, 14: 5297-5305.

DRUKER, B.J. (2002). **Inhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase as a therapeutic strategy for CML.** *Oncogene*, 21: 8541-8546.

DRUKER, B.J.; SAWYERS, C.L.; KANTARJIAN, H.; RESTA, D.J.; REESE, S.F.; FORD, J.M.; CAPDEVILLE, R. and TALPAZ, M. (2001b). **Activity of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in the Blast Crisis of Chronic Myeloid Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia with the Philadelphia Chromosome.** *The New England of Journal Medicine*, 344: 1038-1042.

DRUKER, B.J.; TALPAZ, M., Resta, D.J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J.M., Lydon, N.B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S. and Sawyers, C.L. (2001a). **Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia.** *The New England of Journal Medicine*, 344: 1031-1037.

FAINSTEIN, E.; EINAT, M.; GOKKEL, E.; MARCELLE, C.; CROCE, C.M.; GALE, R.P. and CANAANI, E. (1989). **Nucleotide sequence analysis of human abl and bcr-abl cDNAs.** *Oncogene*, 4: 1477 – 1481.

FARAZI, T.A.; WAKSMAN, G. and GORDON, J.I. (2001). **The biology and enzymology of protein N-myristoylation.** *The journal of Biological Chemistry*, 276: 39501-39504.

FOON, K.A. and TODD, R.F. (1986). Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood*, 68: 1-31.

FRANZ, W.M.; BERGER, P. and WANG, J.Y.J. (1989). **Deletion of an N-terminal regulatory domain of the c-abl tyrosine kinase activates its oncogênica potential.** *EMBO Journal*, 8: 137-147.

GLEISSNER, B.; GÖKBUGET, N.; BARTRAM, C.R.; JANSSEN, B.; RIEDER, H.; JANSSEN, J.W.G.; FONATSCH, C.; HEYLL, A.; VOLIOTIS, D.; BECK, J.; LIPP, T.; MUNZERT, G.; MAURER, J.; HOELZER, D.; THIEL, E. and the German Multicenter Trials of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Study Group (2002). **Leading prognostic relevance of the Bcr-abl translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the German Multicenter Trial group and confirmed polymerase chain reactions analysis.** *Blood*, 99: 1536-1543.

GOLDMAN, J.M. (1995). **New directions for the treatment of Chronic Myeloid Leukemia.** *Drugs*, 49: 651-655.

GOLDMAN, J.M. and MELO, J.V. (2003). **Chronic Myeloid Leukemia Advances in Biology and new approaches to treatment.** *The New England Journal of Medicine*, 349: 1451-1464.

GORRE, M.E.; MOHAMMED, M.; ELLWOOD, K.; HSU, N.; PAQUETTE, R.; RAO, P.N. and SAWYERS, C.L. (2001). **Clinical Resistance to STI-571 Cancer Therapy Caused by BCR-ABL Gene Mutation or Amplification.** *Science*, 293: 876-880.

GOSSER, Y.Q.; ZHENG, J.; OVERDUIN, M.; MAYER, B.J. and COWBURN, D. (1995). **The solution structure of Abl SH3, and its relationship to the SH2 in the SH(32) construct.** *Structure*, 3: 1075-1086.

GRAHAM, S.M.; JORGENSEN, H.G.; ALLAN, E.; PEARSON, C.; ALCORN, M.J.; RICHMOND, L. and HOLYOAKE, T.L. (2002). **Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro.** *Blood*, 99: 319-325.

GUILHOT, F.; CHASTANG, C.; MICHALLET, M.; GUERCI, A.; HAROUSSEAU, J.L.; MALOISEL, F.; BOUABDALLAH, R.; GUYOTAT, D.; CHERON, N.; NICOLINI, F.; ABGRALL, J.F.; TANZER, J.; NAVARRO, M.; BORDESSOULE, D.; MORICE, P.; IFRAH, N.; ROCHANT, H.; VILQUE, J.P.; DELAIN, M.; BAUTERS, F. and GUILHOT, J. (1997). **Interferon Alfa-2b Combined with Cytarabine versus Interferon Alone in Chronic Myelogenous Leukemia.** *The New England Journal of Medicine*, 337: 223-229.

HANTSCHHEL, O.; NAGAR, B.; GUETTLER, S.; KRETZSCHMAR, J.; DOREY, K.; KURIYAMA, J. and SUPERTI-FURGA, G. (2003). **A Myristoyl/Phosphotyrosine switch regulates c-Abl.** *Cell*, 112: 845-857.

HANTSCHHEL, O. and SUPERTI-FURGA, G. (2004). **Regulation of the c-abl and Bcr-abl tyrosine kinases.** *Nature molecular cell biology*, 5: 33-44.

HANTSCHHEL, O.; WIESNER, S.; GÜTTLER, T.; MACKERETH, C.D.; RIX, L.L.R.; MIKES, Z.; DEHNE, J.; GÖRLICH, D.; SATTLER, M. and SUPERTI-FURGA, G. (2005). **Structural Basis for the Cytoskeletal Association of Bcr-Abl/c-Abl.** *Molecular Cell*, 19: 461-473.

HARDIN, J.D.; BOAST, S.; MENDELSON, M.; DE LOS SANTOS, K. and GOFF, S.P. (1996). **Transgenes encoding both type I and type IV c-abl proteins rescue the lethality of c-abl mutant mice.** *Oncogene*, 12: 2669-2677.

HE, Y.; WERTHEIM, J.A.; XU, L.; MILLER, J.P.; KARNELL, F.G.; CHOI, J.K.; REN, R. and PEAR, W.S. (2002). **The coiled-coil domain and Tyr177 of bcr are required to induce a murine chronic myelogenous leukemia-like disease by bcr/abl.** *Blood*, 99: 2957-2968.

HEISTERKAMP, N.; KNOPPEL, E. and GROFFEN, J. (1988). **The first Bcr gene intron contains breakpoints in Philadelphia chromosome positive leukemia.** *Nucleic Acids Research*, 16: 10069-10081.

HEISTERKAMP, N.; MORRIS, C. and GROFFEN, J. (1989). **ABR, an active Bcr-related gene.** *Nucleic Acids Research*, 17: 8821-8831.

HEISTERKAMP, N.; STAN, K. and GROFFEN, J. (1985). **Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph translocation.** *Nature*, 315: 758-761.

HÉLÈNE, M.; CORDONNIER, D.; HAMDANE, M.; BAILLY, C. and D'HALLUIN, J.C. (1997). **Determination of the human c-abl consensus DNA binding site.** *FEBS Journal*, 424: 177-182.

HOCHHAUS, A.; KREIL, S.; CORBIN, A.S.; LA ROSÉE, P.; MÜLLER, M.C.; LAHAYE, T.; HANFSTEIN, B.; SCHOCH, C.; CROSS, N.C.P.; BERGER, U.; GSCHAIDMEIER, H.; DRUKER, B.J. and HEHLMANN, R. (2002). **Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to Imatinib (STI571) therapy.** *Leukemia*, 16: 2190-2196.

HOCHHAUS, A.; SKLADNY, R.H.; MELO, J.V.; SICK, C.; BERGER, U.; GUO, J.Q.; ARLINGHAUS, R.B.; HEHLMANN, R.; GOLDMAN, J.M. and CROSS, N.C.P. (1996). **A Novel BCR-ABL Fusion Gene (e6a2) in a Patient With Philadelphia Chromosome-Negative Chronic Myelogenous Leukemia.** *Blood*, 88: 2236-2240.

HOFFMAN, F.M.; FRESCO, L.D.; HOFFMAN-FALK, H. and SHILO, B.Z. (1983). **Nucleotide sequences of the Drosophila src and abl homologs: conservation and variability in the src family oncogenes.** *Cell*, 35: 393-401.

HUNTLY, B.J.P.; SHIGEMATSU, H.; DEGUCHI, K.; LEE, B.H.; MIZUNO, S.; DUCLOS, N.; ROWAN, R.; AMARAL, S.; CURLEY, D.; WILLIAMS, I.R.; AKASHI, K. and GILLILAND, D.G. (2004). **MOZ-TIF2, but not Bcr-abl, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors.** *Cancer Cell*, 6: 587-596.

JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H.; JONES, D.; TALPAZ, M.; BEKELE, N.; O'BRIEN, S.; ZHOU, X.; LUTHRA, R.; GARCIA-MANERO, G.; GILES, F.; RIOS, M.B.; VERSTOVSEK, S. and CORTES, J. (2006). **Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate.** *Leukemia*, 20: 1767-1773.

JACKSON, P. and BALTIMORE, D. (1989). **N-Terminal mutations activate the leukemogenic potential of the myristoylated form of c-abl.** *The EMBO Journal*, 8: 449-456.

JAMIESON, C.H.M.; AILLES, L.E.; DYLLA, S.J.; MUIJTJENS, M.; JONES, C.; ZEHNDER, J.L.; GOTLIB, J.; LI, K.; MANZ, M.G.; KEATING, A.; SAWYERS, C.L. and WEISSMAN, I.L. (2004) **Granulocyte-Macrophage Progenitors as candidate Leukemic stem cells in blast-crisis CML.** *The New England Journal of Medicine*, 351;7: 657-667.

JAMIESON, C.H.M.; WEISSMAN, I.L. and PASSEGUÉ, E. (2004). **Chronic versus acute myelogenous leukemia: A question of self-renewal.** *Cancer Cell*, 6: 531-533.

JIANG, X.; TRUJILLO, J.M. and LIANG, J.C. (1990). **Chromosomal breakpoints within the first intron of the ABL gene are nonrandom in patients with chronic myelogenous leukemia.** *Blood*, 76: 597-601.

KAWASAKI, E.S.; CLARK, S.S.; COYNE, M.Y.; SMITH, S.D.; CHAMPLIN, R.; WITTE, O.N. and MCCORMICK, F.P. (1988). **Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 5698- 5702.

KURZROCK, R.; KANTARJIAN, H.P.; DRUKER, B.J. and TALPAZ, M. (2003). **Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias: From Basic Mechanisms to Molecular Therapeutics.** *Annals Internal Medicine*, 138:819-830.

KURZROCK, R.; KLOETZER, W.S.; TALPAZ, M; BLICK, M.; WALTERS, R.; ARLINGHAUS, R.B. and GUTTERMAN, J.U. (1987). **Identification of molecular variants of p210<sup>bcr-abl</sup> in chronic myelogenous leukemia.** *Blood*, 70: 233-236.

LAURENT, E.; TALPAZ, M.; KANTARJIAN, H. and KURZROCK, R. (2001). **The Bcr gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis.** *Cancer Research*, 61: 2343-2355.

LAURENT, E.; TALPAZ, M.; WETZLER, M. and KURZROCK, R. (2000). **Cytoplasmatic and nuclear localization of the 130 and 160 KDa Bcr proteins.** *Leukemia*, 14: 1892-1897.

LESTIENNE, C.R.; CORNU, V.S.; DUFLOS, N.G.; LAÏ, J.L.; PHILIPPE, N.; FACON, T.; FENAUX, P. and PREUDHOMME, C. (2002). **Several types of mutations of the *Abl* gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment.** *Blood*, 100: 1014-1018.

LI, W.J.; DREAZEN, O.; KLOETZER, W.; GALE, R.P. and ARLINGHAUS, R.B. (1989). **Characterization of Bcr gene products in hematopoietic cells.** *Oncogene*, 4: 127-138.

LU, D.; LIU, J.; CAMPBELL, M.; GUO, J.Q.; HEISTERKAMP, N.; GROFFEN, J.; CANAANI, E. and ARLINGHAUS, R. (1993). **Tyrosine phosphorylation of p160 BCR by p210 BCR-ABL.** *Blood*, 82: 1257-1263.

LUGO, T.G.; PENDERGAST, A.M.; MULLER, A.J. and WITTE, O.N. (1990). **Tyrosine kinase activity and transformation potency of Bcr-abl oncogene products.** *Science*, 247: 1079-1082.

MANAVALAN, P. and JOHNSON, W.C. JR. (1987). **Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra.** *Analytical Biochemistry*, 167: 76-85.

MARU, Y. and WITTE, O.N. (1991). **The Bcr gene encodes a novel Serine/threonine Kinase activity within a single exon.** *Cell*, 67: 459-468.

MAYER, B.J. and BALTIMORE, D. (1994). **Mutagenic analysis of the roles of SH2 and SH3 domains in regulation of the Abl tyrosine kinase.** *Molecular and Cellular Biology*, 14: 2883-2894.



MCWHIRTER, J.R.; GALASSO, D.L. and WANG, J.Y.J. (1993). **A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-abl oncoproteins.** *Molecular and Cellular Biology*, 13: 7587-7595.

MELO, J.V. (1996). **The diversity of Bcr-abl fusion protein and their relationship to leukemia phenotype.** *Blood*, 88: 2375-2384.

MELO, J.V.; MYINT, H.; GALTON, D.A. and GOLDMAN, J.M. (1994). **P190Bcr-abl chronic myeloid leukemia: the missing link with myelomonocytic leukemia?** *Leukemia*, 8: 208-211.

MILLOT, F.; GUILHOT, J.; NELKEN, B.; LEBLANC, T.; DE BONT, E.S.; BEKASSY, A.N.; GADNER, H.; SUFLIARSKA, S.; STARY, J.; GSCHAIDMEIER, H.; GUILHOT, F. and SUTTORP, M. (2006). **Imatinib mesylate is effective in children with chronic myelogenous leukemia in late chronic and advanced phase and in relapse after stem cell transplantation.** *Leukemia*, 20: 187 – 192.

NAGAR, B.; BORNMANN, W.G.; PELLICENA, P.; SCHINDLER, T.; VEACH, D.R.; MILLER, W.T.; CLARKSON, B. and KURIYAN, J. (2002). **Crystal Structures of the Kinase Domain of c-Abl in Complex with the Small Molecule Inhibitors PD173955 and Imatinib (STI-571).** *Cancer Research*, 62: 4236-4243.

NAGAR, B.; HANTSCHHEL, O.; YOUNG, M.A.; SCHEFFZEK, K.; VEACH, D.; BORNMANN, W.; CLARKSON, B.; SUPERTI-FURGA, G. and KURIYAN, J. (2003). **Structural basis for the autoinhibition of c-abl Tyrosine Kinase.** *Cell*, 112: 859-871.

NAM, H.; HASER, W.G.; ROBERTS, T.M. and FREDERICK, C.A. (1996). **Intramolecular interactions of the regulatory domains of the Bcr-abl kinase reveal a novel control mechanism.** *Structure*, 4: 1105 – 1114.

NOWELL, P. and HUNGERFORD, D.A. (1960). **A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia.** *Science*, 142:1497.

OTAZU, I.B.; RIVERO, M.B.; OLÍCIO, R.; PINTO, A.; ZALCBERG, I. and SEUÁNEZ, H.N. (2002). **A rare, in-frame BCR-ABL fusion (e13a3) in a patient with an aggressive chronic myeloid leukaemia.** *Acta Haematologica*, 108: 150-153.

OTAZU, I.B.; TAVARES, R.C.B.; HASSAN, R.; ZALCBERG, I.; TABAK, D.G. and Seuáñez, H.N. (2002). **Estimations of BCR-ABL/ABL transcripts by quantitative PCR in chronic myeloid leukaemia after allogeneic bone marrow transplantation and donor lymphocyte infusion.** *Leukemia Research*, 26: 129-141.

OTAZU, I.B.; ZALCBERG, I.; TABAK, D.G.; DOBBIN, J. and SEUÁNEZ, H.N. (2000). **Detection of BCR-ABL transcripts by Multiplex and Nested PCR in different haematological disorders.** *Leukemia and Lymphoma*, 370: 205-211.

OTAZU, I.B.; ZALCBERG, I.; TABAK, D.G. and SEUÁNEZ, H.N. (1999). **Detection of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukaemia by Nested PCR.** *Leukemia Research*, 23: 185-190.

OVERDUIN, M.; RIOS, C.B.; MAYER, B.J.; BALTIMORE, D. and COWBURN, D. (1992). **Three-Dimension solution structure of the src homology 2 domain of c-abl.** *Cell*, 70: 697-704.

PANE, F.; FRIGERI, F.; SINDONA, M.; LUCIANO, L.; FERRARA, F.; CIMINO, R.; MELONI, G.; SAGLIO, G.; SALVATORE, F. and ROTOLI, B. (1996b). **Neutrophilic-Chronic Myeloid Leukemia: A distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with c3/a2 junction).** *Blood*, 88: 2410-2414.

PANE, F.; INTRIERI, M.; QUINTARELLI, C.; IZZO, B.; MUCCIOLI, G.C. and SALVATORE, F. (2002). **BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations.** *Oncogene*, 21: 8652-8667.

PENDERGAST, A.M.; MULLER, A.J.; HAVLIK, M.H.; MARU, Y. and WITTE, O.N. (1991). **BCR sequences essential for Transformation by the Bcr-abl oncogene bind to the Abl SH-2 regulatory domain in a Non-phosphotyrosine-dependent manner.** *Cell*, 66: 161-171.

PENDERGAST, A.M.; QUILLIAM, L.A.; CRIFE, L.D.; BASSING, C.H.; DAI, Z.; LI, N.; BATZER, A.; RABUN, K.M.; DER, C.J.; SCHLESSINGER, J. and GISHIZKY, M.L. (1993). **Bcr-abl-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with SH2 domain of the GrB2 adaptor protein.** *Cell*, 75: 175-185.

PLATTNER, R.; KADLEC, L.; DEMALI, K.A.; KAZLAUSKAS, A. and PENDERGAST, A.M. (1999). **c-Abl is activated by growth factors and src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF.** *Genes Dev.* 13: 2400-2411.

PLUK, H.; DOREY, K. and SUPERTI-FURGA, G. (2002). **Autoinhibition of c-abl.** *Cell*, 108: 247-260.

PRIMO, D.; TABERNERO, M.D.; RASILLO, A.; SAYAGUES, J.M.; ESPINOSA, A.B.; CHILLON, M.C.; GARCIA-SANZ, R.; GUTIERREZ, N.; GIRALT, M.; HAGEMEIJER, A.; SAN MIGUEL, J.F. and ORFAO, A. (2003). **Patterns of BCR/ABL gene rearrangements by interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) in BCR/ABL+ leukemias: incidence and underlying genetic abnormalities,** *Leukemia*, 17: 1124 – 1129.

PROVENCHER, S.W. and GLOCKNER, J. (1981). **Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism.** *Biochemistry*, 20: 33-37.

QUACKENBUSH, R.C.; REUTHER, G.W.; MILLER, J.P.; COURTNEY, K.D.; PEAR, W.S. and PENDERGAST, A.M. (2000). **Analysis of the biologic properties of p230bcr-abl reveals unique and overlapping properties with the oncogenic p185 and p210 bcr-abl tyrosine kinases.** *Blood*, 95: 2913-1921.

QUINTÁS-CARDAMA, A.; KANTARJIAN, H. and CORTES, J. (2007). **Flying under the radar: the new wave of Bcr-abl inhibitors.** *Nature Reviews Drug Discovery*, 6: 834 – 848.

REN, R. (2005) **Mechanisms of Bcr-abl in the pathogenesis of Chronic Myeloid Leukemia.** *Nature Reviews*, 5: 172-183.

RESH, M.D. (1999). **Fatty Acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1451: 1-16.

REYNOLDS, F.H.; OROSZLAN, S. and STEPHENSON, J.R. (1982). **Abelson Murine Leukemia Virus p210: Identification and characterization of tyrosine phosphorylation sites.** *Journal of Virology*, 44: 1097-1011.

ROSEN, C.G. and WEBER, G. (1969). **Dimer Formation from 1-Anilino-8-naphthalenesulfonate Catalyzed by Bovine Serum Albumin. A New Fluorescent Molecule with Exceptional Binding Properties.** *Biochemistry*, 8: 3915 – 3920.

ROUMIANTSEV, S.; SHAH, N.P.; GORRE, M.E.; NICOLL, J.; BRASHER, B.B.; SAWYERS, C.L. and VAN ETTEN, R.A. (2002). **Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 10700-10705.

RUSCONI, F.; VALTON, E.; NGUYEN, R. and DUFOURC, E. (2001). **Quantification of Sodium Dodecyl sulfate in microliter-volume biochemical samples by visible light spectroscopy.** *Analytical Biochemistry*, 295: 31-37.

SAGLIO, G.; GUERRASIO, A.; ROSSO, C.; ZACCARIA, A.; TASSINARI, A.; SERRA, A.; REGE-CAMBRIN, G.; MAZZA, U. and GAVOSTO, F. (1990). **New type of Bcr/abl junction in philadelphia chromossome-positive chronic myelogenous leukemia.** *Blood*, 76: 1819-1824.

SALOMON, A.R.; FICARRO, S.B.; BRILL, L.M.; BRINKER, A.; PHUNG, Q.T.; ERICSON, C.; SAUER, K.; BROCK A.; HORN, D.M.; SCHULTZ, P.G. and PETERS, E.C. (2003). **Profiling of tyrosine phosphorylation pathways in human cells using mass spectrometry.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 443-448.

SATTLER, M.; SALGIA, R.; OKUDA, K. (1996). **The pro-oncogene product p210CBL and the adaptor protein CRKL and c-CRK links c-Abl, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3`kinase pathway.** *Oncogene*, 12: 839-846.

SAWYERS, C.L. (1999). **Chronic Myeloid Leukeima.** *The New England Journal of Medicine*, 340: 1330-1340.

SAWYERS, C.L.; HOCHHAUS, A.; FELDMAN, E.; GOLDMAN, J.M.; MILLER, C.B.; OTTMANN, O.G.; SCHIFFER, C.A.; TALPAZ, M.; GUILHOT, F.; DEININGER, M.W.N.; FISCHER, T.; O'BRIEN, S.G.; STONE, R.M.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.B.; RUSSELL, N.H.; REIFFERS, J.J.; SHEA, T.C.; CHAPUIS, B.; COUTRE, S.; TURA, S.; MORRA, E.; LARSON, R.A.; SAVEN, A.; PESCHEL, C.; GRATWOHL, A.; MANDELLI, F.; BEN-AM, M.; GATHMANN, I.; CAPDEVILLE, R.; PAQUETTE, R.L. and DRUKER, B.J. (2002). **Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study.** *Blood*, 99: 3530-3539.

SEELIGER, M.A.; YOUNG, M.; HENDERSON, M.N.; PELLICENA, P.; KING, D.S.; FALICK, A.M. and KURIYAN, J. (2005). **High yield bacterial expression of active c-abl and c-Src tyrosine kinases.** *Protein Science*, 14: 3135 – 3139.

SHAH, N.P.; TRAN, C.; LEE, F.Y.; CHEN, P.; NORRIS, D. and SAWYERS, C.L. (2004). **Overriding Imatinib Resistance with a novel ABL kinase inhibitor.** *Science*, 125: 399-401.

SHTIVELMAN, E.; LIFSHITZ, B.; GALE, R.P.; ROE, B.A. and CANAANI, E. (1986). **Alternative splicing of RNAs transcribed from the human abl gene and from the bcr-abl fused gene.** *Cell*, 47: 277-284.

SMITH, K.M.; YACOBI, R. and VAN ETTEN, R.A. (2003). **Autoinhibition of Bcr-abl through its SH3 domain.** *Cell*, 12: 27-37.

SOEKARMAN, D.; DENDEREN, J.; HOEFSLOOT, L.; MORET, M.; MEEUWSEN, T. BAAL, J.; HAGEMEIJER, A. and GROSVELD, G. (1990). **A novel variant of the bcr-abl fusion product in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia.** *Leukemia*, 4: 397-403.

SREEREMA, N.; VENYAMINOV, S.Y. and WOODY, R.W. (1999). **Estimation of the number of helical and strand segments in proteins using CD spectroscopy.** *Protein Science*, 8: 370-380.

SREEREMA, N. and WOODY, R.W. (1993). **A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism.** *Analytical Biochemistry*, 209: 32-44.

STEELMAN, L.S.; POHNERT, S.C.; SHELTON, J.G.; FRANKLIN, R.A.; BERTRAND, F.E. and MCCUBREY, J.A. (2004). **JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis.** *Leukemia*, 18: 189-218.

STEEN, H.; FERNANDEZ, M.; GHAFARI, S.; PANDEY, A. and MANN, M. (2003). **Phosphotyrosine mapping in Bcr/Abl oncoprotein using phosphotyrosine-specific immunium ion scanning.** *Molecular & Cellular Proteomics*, 2: 138-145.

TAKEDA, N.; SHIBUYA, M. and MARU, Y. (1999). **The Bcr-abl oncoprotein potentially interacts with the xeroderma pigmentosum group B protein.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 203-207.

TALPAZ, M.; SILVER, R.T.; DRUKER, B.J.; GOLDMAN, J.M.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; GUILHOT, F.; SCHIFFER, C.A.; FISCHER, T.; DEININGER, M.W.N.; LENNARD, A.L.; HOCHHAUS, A.; OTTMANN, O.G.; GRATWOHL, A.; BACCARANI, M.; STONE, R.; TURA, S.; MAHON, F.X.; REESE, S.F.; GATHMANN, I.; CAPDEVILLE, R.; KANTARJIAN, H.M. and SAWYERS, C.L. (2002). **Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study.** *Blood*, 99: 1928-1937.

TOKARSKI, J.S.; NEWITT, J.A.; CHANG, C.Y.J.; CHENG, J.D.; WITTEKIND, M.; KIEFER, S.E.; KISH, K.; LEE, F.Y.F.; BORZILLERRI, R.; LOMBARDO, L.J.; XIE, D.; ZHANG, Y. and KLEI, H.E. (2006). **The Structure of Dasatinib (BMS-354825) Bound to Activated ABL Kinase Domain Elucidates Its Inhibitory Activity against Imatinib-Resistant ABL Mutants.** *Cancer Research*, 66: 5790-5797.

VAN ETTEN, R.A.; JACKSON, P. and BALTIMORE, D. (1989). **The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization.** *Cell*, 58: 669-678.

VAN ETTEN, R.A.; JACKSON, P.K.; BALTIMORE, D.; SANDERS, M.C.; MATSUDAIRA, P.T. and JANMEY, P.A. (1994). **The COOH terminus of the c-abl tyrosine kinase contains distinct F- and G- actin binding domains with bundling activity.** *Journal of cellular biology*, 124: 325-340.

VAN STOKKUM, I.H.M.; SPOELDER, H.J.W.; BLOEMENDAL, M.; VAN GRONDELLE, R. and GROEN, F.C.A. (1990). **Estimation of protein secondary structure and error analysis from CD spectra.** *Analytical Biochemistry*, 191: 110-118.

WEISBERG, E.; MANLEY, P.W.; BREITENSTEIN, W.; BRÜGGEN, J.; COWAN-JACOB, S.W.; RAY, A.; HUNTLY, B.; FABBRO, D.; FENDRICH, G.; HALL-MEYERS, E.; KUNG, A.L.; MESTAN, J.; DALEY, G.Q.; CALLAHAN, L.; CATLEY, L.; CAVAZZA, C.; MOHAMMED, A.; NEUBERG, D.; WRIGHT, R.D.; GILLILAND, D.G. and GRIFFIN, J.D. (2005). **Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl.** *Cancer Cell*, 7: 129-141.

WEN, S.T. and VAN, E.R. (1997). **The PAG gene product, a stress induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity.** *Genes Dev.* 11: 2456-2467.

WETZLER, M.; TALPAZ, M.; VAN ETTEN, R.A.; HIRSH-GINSBERG, C.; BERAN, M. and KURZROCK, R. (1993). **Subcellular localization of Bcr, Abl and Bcr-abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation.** *Journal of Clinical Investigation*, 92: 1925-1939.

WOODRING, P.J.; HUNTER, T. and WANG, J.Y.J. (2001). **Inhibition of c-abl tyrosine kinase activity by filamentous actin.** *The Journal of biological chemistry*, 276: 27104-27110.

XU, W.; HARRISON, S.C. and ECK, M.J. (1997). **Three-dimensional structure of the tyrosine-kinase c-Src.** *Nature* 385: 595-601.

YAMAGUCHI, H. and HENDRICKSON, W.A. (1996). **Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation.** *Nature*, 384: 484-489.

ZHAO, X.; GHAFFARI, S.; LODISH, H.; MALASHKEVICH, V.N. and KIM, P.S. (2002). **Structure of the Bcr-abl oncoprotein oligomerization domain.** *Nature Structural Biology*, 9: 117-120.



ZHOU, T.; PARILLON, L.; LI, F.; WANG, Y.; KEATS, J.; LAMORE, S.; XU, Q.; SHAKESPEARE, W.; DALGARNO, D. and ZHU, X. (2007). **Crystal Structure of the T315I mutant of Abl kinase.** *Chem Biol Drug Des*, 70: 171-181.

ZHU, Q.; HEISTERKAMP, N. and GROFFEN, J. (1990). **Unique organization of the human Bcr gene promoter.** *Nucleic Acids Research*, 18: 7119-7125.

**Anexo**

UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO DE JANEIRO  
UFRJ

INSTITUTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA MARTAGÃO GESTEIRA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**MEMORANDO DE APROVAÇÃO**

O projeto "Caracterização estrutural de proteínas oncogênicas envolvidas na Leucemia Mielóide Crônica (LMC) e doença residual mínima na LMC pediátrica", de número 44/07, de responsabilidade da Dra. Elaine Sobral da Costa, foi analisado pelo CEP/IPPMP e aprovado nesta data.

Rio de Janeiro, 27 de novembro de 2007

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Ricardo Hugo da Silva e Oliveira".

Ricardo Hugo da Silva e Oliveira  
Coordenador do CEP/IPPMP

## Curriculum Vitae



### Guilherme Augusto Piedade de Oliveira

Bolsista de Mestrado do CNPq

Atualmente é aluno de mestrado do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Tem experiência na área de Bioquímica, com ênfase em Biologia Molecular, atuando principalmente no seguinte tema: Estudos estruturais de caracterização proteica de oncoproteínas envolvidas na Leucemia Mielóide Crônica.  
(Texto informado pelo autor)


Última atualização do currículo em 19/09/2008

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/6191662774695115>




**Certificado  
pelo autor em  
19/09/08**

Links para  
Outras Bases:  
[Univ Federal do Rio de Janeiro](#)  


#### Dados pessoais

<b>Nome</b>	Guilherme Augusto Piedade de Oliveira
<b>Nome em citações bibliográficas</b>	OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade;Oliveira, G.
<b>Sexo</b>	Masculino
<b>Endereço profissional</b>	Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica Ufrj, Laboratório de Termodinâmica de Proteínas e Estruturas Virais Gregório Webe. Alameda Bahúnia, 400, CCS Cidade Universitária 21941-590 - Rio de Janeiro, RJ - Brasil Telefone: (21) 25626756 Ramal: 6756 URL da Homepage: <a href="http://">http://</a>

#### Formação acadêmica/Titulação

<b>2008</b>	Mestrado em Química Biológica  Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil. <i>Título:</i> Caracterização Termodinâmica de proteínas envolvidas no Desenvolvimento da Leucemia Mielóide Crônica (LMC), <i>Orientador:</i> Jerson Lima da Silva. <i>Bolsista do(a):</i> Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, , .
<b>2004 - 2007</b>	Graduação em Ciências Biológicas Modalidade Médica. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil. <i>Título:</i> Caracterização Estrutural de Proteínas Oncogênicas Envolvidas no Desenvolvimento da Leucemia Mielóide Crônica (LMC) e Doença Residual Mínima na Pediatria. <i>Orientador:</i> Jerson Lima da Silva. <i>Bolsista do(a):</i> Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, , .

#### Formação complementar

<b>2008 - 2008</b>	Cell Migration in 2D and 3D matrices. (Carga horária: 3h). Federação das Sociedades de Biologia Experimental.
<b>2008 - 2008</b>	Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos. (Carga horária: 40h). Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.
<b>2008 - 2008</b>	Escola de Inverno em Biol. Estr./Planej. Farmacos. (Carga horária: 80h). Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.
<b>2008 - 2008</b>	Biocalorimetria. (Carga horária: 6h). Instituto de Bioquímica Médica Ufrj.
<b>2008 - 2008</b>	Modificações Redox Pós-traducionais em proteínas. (Carga horária: 4h). Instituto de Bioquímica Médica Ufrj.
<b>2008 - 2008</b>	PCR em tempo real. (Carga horária: 8h). Instituto de Bioquímica Médica Ufrj.
<b>2007 - 2007</b>	Imunologia de Tumores: fisiologia à imunoterapia. (Carga horária: 4h). Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.

- 2007 - 2007** Workshop em Estrutura e Função de Proteínas. (Carga horária: 40h). Instituto Oswaldo Cruz.
- 2007 - 2007** 16 Programa de Bolsas de Verão (Jan/Fev). (Carga horária: 370h). Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron.
- 2007 - 2007** II Workshop em Biologia Estrutural. (Carga horária: 12h). Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron.
- 2007 - 2007** 17 Reunião Anual de Usuários. (Carga horária: 24h). Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron.
- 2006 - 2006** Int. a Métodos de Caract. Estrutural de Proteínas. (Carga horária: 18h). Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron.
- 2006 - 2006** ECM, Integrins and Cell Signalling. (Carga horária: 4h). Sociedade Brasileira de Biologia Celular.
- 2006 - 2006** Transplante de Med. óssea: outro lado da rejeição. (Carga horária: 4h). Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.
- 2005 - 2005** Sequenciamento de Genes Hla Metodologia e Interpre. (Carga horária: 5h). Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea.
- 2005 - 2005** Aplicações de SNPs no estudo de doenças complexas. (Carga horária: 3h). Sociedade Brasileira de Genética.
- 2005 - 2005** Células-Tronco: características e aplicações. (Carga horária: 3h). Sociedade Brasileira de Genética.
- 2005 - 2005** Glicobiologia do Câncer. (Carga horária: 5h). Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.
- 2005 - 2005** Desvendando o ELISA. (Carga horária: 8h). Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.
- 2004 - 2004** Stem Cell And Cellular Therapy. (Carga horária: 30h). Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.
- 2004 - 2004** Células Tronco Terapias Celulares Em Lesões do Sis. (Carga horária: 5h). Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.
- 2004 - 2004** Princípios da Genética Forense. (Carga horária: 5h). Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.
- 2004 - 2004** Montagem e Configuração de Microcomputador. (Carga horária: 90h). SENAI - Departamento Nacional.

#### Atuação profissional

##### Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.

##### Vínculo institucional

**2004 - Atual** Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 20

##### Atividades

**1/2006 - Atual** Atividades de Participação em Projeto, Instituto de Bioquímica Médica Ufrj, Laboratório de Termodinâmica de Proteínas e Estruturas Virais Gregório Webe.

Projetos de pesquisa

[Caracterização estrutural de Proteínas Oncogênicas Envolvidas no Desenvolvimento da Leucemia Mielóide Crônica \(LMC\) e Doença Residual Mínima na Pediatria](#)

**6/2005 - Atual** Atividades de Participação em Projeto, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular.

Projetos de pesquisa

[Análise da expressão de metaloproteinases e seus inibidores teciduais no Lliquen Escleroso Vulvar](#)

**6/2004 - Atual** Estágios, Instituto de Bioquímica Médica Ufrj, Laboratório de Termodinâmica e Estruturas Virais Gregório Weber.

Estágio realizado

Estágio Rotatório / Iniciação Científica.

- 6/2004 - Atual** Estágios , Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular.  
Estágio realizado  
Estágio Rotatório / Iniciação Científica.
- 6/2004 - Atual** Atividades de Participação em Projeto, Instituto de Bioquímica Médica Ufrj, Laboratório de Termodinâmica de Proteínas e Estruturas Virais Gregório Webe.  
Projetos de pesquisa  
[Caracterização estrutural do vírus Mayaro](#)
- 6/2004 - 6/2006** Atividades de Participação em Projeto, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular.  
Projetos de pesquisa  
[Análise da expressão de metaloproteinases e seus inibidores teciduais em diferentes malignidades odontológicas](#)
- 1/2005 - 6/2005** Estágios , Instituto de Bioquímica Médica Ufrj, Laboratório de Proteínas e Amiloidoses.  
Estágio realizado  
Estágio Rotatório.
- 1/2005 - 6/2005** Atividades de Participação em Projeto, Instituto de Bioquímica Médica Ufrj, Laboratório de Proteínas e Amiloidoses.  
Projetos de pesquisa  
[Clonagem e Expressão da Proteína Huntingtina](#)
- 6/2004 - 12/2004** Atividades de Participação em Projeto, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular.  
Projetos de pesquisa  
[Significado da Expressão do Gene BCR-ABL e da doença residual mínima em diferentes malignidades hematológicas](#)

#### Projetos de Pesquisa

- 2006 - Atual** Caracterização estrutural de Proteínas Oncogênicas Envolvidas no Desenvolvimento da Leucemia Mielóide Crônica (LMC) e Doença Residual Mínima na Pediatria  
*Descrição:* Caracterização funcional das diferentes isoformas a serem estudadas; Investigação a nível protéico da participação de alterações mutacionais nos genes que culminam em recaída e correlação com o grau de severidade da doença e à resistência a agentes terapêuticos; Importância dos domínios protéicos para o estabelecimento da doença .  
*Situação:* Em andamento; *Natureza:* Pesquisa.  
*Alunos envolvidos:* Graduação ( 2 ) / Especialização ( 0 ) / Mestrado acadêmico ( 0 ) / Mestrado profissionalizante ( 0 ) / Doutorado ( 3 ) .  
*Integrantes:* Ivone Beatriz Otazu - Integrante / Monica S Freitas - Integrante / Fabianno Ferreira Dutra - Integrante / Jerson Lima da Silva - Integrante / Guilherme Augusto Piedade de Oliveira - Coordenador.  
*Financiador(es):* Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Auxílio financeiro / Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa / Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Auxílio financeiro / Instituto Milênio de Biotecnologia e Biologia Estrutural - Auxílio financeiro..
- 2005 - 2007** Análise da expressão de metaloproteinases e seus inibidores teciduais no Liquen Escleroso Vulvar  
*Descrição:* Neste estudo buscou-se caracterizar o sistema degradador de matriz extracelular, com ênfase na distribuição de metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores teciduais (TIMPs). Avaliamos os níveis de expressão das MMP- 1, MMP- 2, MMP-9, MMP- 13 e TIMP 1 pela Reação em cadeia da polimerase após transcrição Reversa do ARN mensageiro (RT-PCR) em 13 biópsias vulvares de pacientes com LE, sem tratamento prévio, e 4 biópsias de pele vulvar normal de ninfoplastias, e utilizadas como controles.  
*Situação:* Concluído; *Natureza:* Pesquisa.  
*Alunos envolvidos:* Graduação ( 1 ) / Especialização ( 0 ) / Mestrado acadêmico ( 0 ) / Mestrado profissionalizante ( 1 ) / Doutorado ( 1 ) .  
*Integrantes:* Ivone Beatriz Otazu - Integrante / Monica P de Almeida - Coordenador / Gutemberg Almeida - Integrante / Christina Maeda Takiya - Integrante / Luiz Eurico Nasciutti - Integrante / Guilherme Augusto Piedade de Oliveira - Integrante.  
*Financiador(es):* Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - Auxílio financeiro / Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - Bolsa.  
*Número de produções C, T & A:* 2.

- 2005 - 2005** Clonagem e Expressão da Proteína Hungtintina
- Descrição:* Buscamos estabelecer o protocolo de clonagem, expressão e purificação de dois mutantes da proteína Hungtintina envolvida na doença de Hungtinton..
- Situação:* Concluído; *Natureza:* Pesquisa.
- Alunos envolvidos:* Graduação ( 1 ) / Especialização ( 0 ) / Mestrado acadêmico ( 0 ) / Mestrado profissionalizante ( 0 ) / Doutorado ( 2 ) .
- Integrantes:* Carolina Alvares da Cunha de Azeredo Braga - Coordenador / Débora Foguel - Integrante / Guilherme Augusto Piedade de Oliveira - Integrante.
- Financiador(es):* Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Auxílio financeiro..
- 2004 - 2006** Caracterização estrutural do vírus Mayaro
- Descrição:* Neste trabalho foi monitorado o comportamento termodinâmico do estado fusogênico do vírus Mayaro, induzido pela alta pressão hidrostática ou pelo baixo pH.
- Situação:* Concluído; *Natureza:* Pesquisa.
- Alunos envolvidos:* Graduação ( 1 ) / Especialização ( 0 ) / Mestrado acadêmico ( 0 ) / Mestrado profissionalizante ( 0 ) / Doutorado ( 3 ) .
- Integrantes:* Monica S Freitas - Coordenador / Luciana P Gaspar - Integrante / Jerson Lima da Silva - Integrante / Guilherme Augusto Piedade de Oliveira - Integrante.
- Financiador(es):* Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa / Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Auxílio financeiro.
- Número de produções C, T & A:* 2.
- 2004 - 2006** Análise da expressão de metaloproteinases e seus inibidores teciduais em diferentes malignidades odontológicas
- Descrição:* Buscamos a análise da expressão de diferentes metaloproteinases entre elas MMP-1, -2, -9, -13 e seus inibidores teciduais TIMP-1, -2 pela técnica de RT-PCR em diferentes doenças odontológicas entre elas Periodontite Agressiva e Crônica, Gingivite e em um grupo controle. Os resultados moleculares foram posteriormente correlacionados com os dados clínicos de cada paciente..
- Situação:* Concluído; *Natureza:* Pesquisa.
- Alunos envolvidos:* Graduação ( 1 ) / Especialização ( 0 ) / Mestrado acadêmico ( 1 ) / Mestrado profissionalizante ( 0 ) / Doutorado ( 3 ) .
- Integrantes:* Ivone Beatriz Otazu - Integrante / Lorena Da Rôs Gonçalves - Coordenador / Alfredo Carlos Rodrigues Feitosa - Integrante / Eduardo Feres Filho - Integrante / Guilherme Augusto Piedade de Oliveira - Integrante.
- Financiador(es):* Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Auxílio financeiro / Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Auxílio financeiro..
- 2004 - 2004** Significado da Expressão do Gene BCR-ABL e da doença residual mínima em diferentes malignidades hematológicas
- Descrição:* Buscamos por RT-PCRs qualitativos e quantitativos estimar a carga tumoral de pacientes portadores de Leucemia Mieloide Crônica submetidos a diferentes tratamentos como uso de Glivec e transplante de medula óssea..
- Situação:* Concluído; *Natureza:* Pesquisa.
- Alunos envolvidos:* Graduação ( 4 ) / Especialização ( 0 ) / Mestrado acadêmico ( 0 ) / Mestrado profissionalizante ( 0 ) / Doutorado ( 2 ) .
- Integrantes:* Leonardo Chicaybam Peixoto - Integrante / Ivone Beatriz Otazu - Integrante / Fabianno Ferreira Dutra - Integrante / Radovan Borojevic - Integrante / Ana Emília Goulart - Coordenador / Guilherme Augusto Piedade de Oliveira - Integrante.
- Financiador(es):* Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Auxílio financeiro / Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa / Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Auxílio financeiro..

#### Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular.
2. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica.

#### Idiomas

<b>Espanhol</b>	Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Bem.
<b>Inglês</b>	Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Bem.
<b>Português</b>	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
<b>Alemão</b>	Compreende Pouco, Fala Pouco, Lê Pouco, Escreve Pouco.

## Prêmios e títulos

- 2009** Dignidade Acadêmica no grau Cum Laude, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 2008** Menção Honrosa no Trabalho da XXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental FeSBE, Federação de Sociedades de Biologia Experimental FeSBE.
- 2008** Primeiro Lugar (Mestrado) em trabalho apresentado na II Semana de Pós-Graduação de Bioquímica Médica, Instituto de Bioquímica Médica - IBqM - UFRJ.
- 2007** Prêmio de Melhor Trabalho na IX Semana de Biomedicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 2007** Menção Honrosa no Trabalho da XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental FeSBE, Federação de Sociedades de Biologia Experimental FeSBE.
- 2007** Menção Honrosa no Trabalho da XXX Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 2007** Menção Honrosa, I Encontro Científico do Instituto de Bioquímica Médica, Instituto de Bioquímica Médica.
- 2005** Menção Honrosa no Trabalho do 51 Congresso Brasileiro de Genética, Sociedade Brasileira de Genética.
- 2004** Menção Honrosa no Trabalho da XXVI Jornada de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

## Produção em C,T & A

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. GONÇALVES, Lorena da Rós ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; BOROJEVIC, Radovan ; OTAZÚ, Ivone B ; FERES FILHO, Eduardo . Expression of metalloproteinases and their tissue inhibitors in gingiva affected by hereditary gingival fibromatosis: analysis of three cases within a family. *Journal of Periodontal Research*, v. 1, p. 1-4, 2009.
2. GONÇALVES, Lorena da Rós ; Oliveira, G. ; Hurtado, P ; Feitosa, A. ; Thakya, C. M. ; GRANJEIRO, J. M. ; Trackman, P. C. ; Otazu, I. ; Feres-Filho, E. J. . Expression of Metalloproteinases and their tissue inhibitors in inflamed gingival biopsies. *Journal of Periodontal Research*, v. 43, p. 570-577, 2008.

#### Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1. RÓS, Lorena da ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; FEITOSA, Alfredo Carlos Rodrigues ; OTAZU, Ivone Beatriz ; FERES FILHO, Eduardo . Expressão Gênica de Metaloproteinases e seus Inibidores Teciduais em Gengiva de Indivíduos com Doença Periodontal. In: 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPQO, 2006, Atibaia. *Brazilian Oral Research - BOR*, 2006. v. 18. p. 266-266.

#### Resumos publicados em anais de congressos

1. OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; SILVA, Jerson Lima da . Good Response to Therapy with Imatinibe Mesylate in Childhood Chronic Myeloid Leukemia and a New Expression Method for the Catalytic Domain of BCR-ABL Protein. In: XXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2008, Águas de Lindóia. *XXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE*, 2008.
2. ★ OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; FREITAS, Monica S ; DUTRA, Fabianno Ferreira ; OTAZÚ, Ivone B ; SILVA, Jerson Lima da . Structural characterization of oncogenic proteins involved in the development of Chronic Myeloid Leukemia. In: XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (Sbbq) and 10 International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), 2007, Salvador. *XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (Sbbq)*, 2007.
3. ★ OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; FREITAS, Monica S ; MAGALHAES, B. ; OTAZÚ, Ivone B ; SILVA, Jerson Lima da . Structural characterization of oncogenic proteins involved in the development of chronic myeloid leukemia. In: XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2007, Águas de Lindóia. *XII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental*, 2007.

4. FREITAS, Monica S ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; GASPAR, Luciana P ; SILVA, Jerson Lima da . Structural and Thermodynamic Characterization of Viral Membrane Fusion. In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2006, Águas de Lindóia. XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2006.
5. GONÇALVES, Lorena da Rós ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; FEITOSA, Alfredo Carlos Rodrigues ; OTAZU, Ivone Beatriz ; FERES FILHO, Eduardo . Expression of metalloproteinases and their tissue inhibitors in gingiva from periodontitis-affected individuals. In: XIII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2006, Búzios. XIII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2006.
6. FREITAS, Monica S ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; GASPAR, Luciana P ; SILVA, Jerson Lima da . Structural Characterization of Mayaro Virus. In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005, Águas de Lindóia. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005.
7. ALMEIDA, Monica P de ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; PEIXOTO, Leonardo C ; ALMEIDA, Gutemberg ; TAKIYA, Christina Maeda ; NASCIUTTI, Luiz Eurico ; OTAZU, Ivone B . Análise da expressão de metaloproteinases (MMPs) e de seus inibidores teciduais (TIMPs) em líquen escleroso vulvar. In: 51º Congresso Brasileiro de Genética, 2005, Águas de Lindóia. 51º Congresso Brasileiro de Genética, 2005.
8. PEIXOTO, Leonardo Chicaybam ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; DUTRA, Fabiano Ferreira ; GOULART, Ana Emilia ; BOROJEVIC, Radovan ; OTAZU, Ivone Beatriz . Análise por RT-PCR e sequenciamento em indivíduos normais e em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica (LMC). In: 51º Congresso Brasileiro de Genética, 2005, Águas de Lindóia. 51º Congresso Brasileiro de Genética, 2005.
9. ALMEIDA, Monica P de ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; PEIXOTO, Leonardo C ; ALMEIDA, Gutemberg ; OTAZU, Ivone Beatriz ; NASCIUTTI, Luiz Eurico . Estudo Molecular da Expressão de metaloproteinases e seus inibidores teciduais no Líquen Escleroso vulvar. In: 51 Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia, 2005, Rio de Janeiro. 51 Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia, 2005.
10. GOULART, Ana Emilia ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; DUTRA, Fabiano Ferreira ; PEIXOTO, Leonardo C ; MACHADO, Marcela Fontana C. ; MOREIRA, Maria Claudia R ; SCHAFFEL, Roni ; PULCHERI, Wolmar ; OTAZU, Ivone Beatriz ; BOROJEVIC, Radovan . Experiências de implante de estratégias moleculares em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica (LMC) para diagnóstico e monitoramento de transplante de medula óssea (TMO) e mesilato de Imatinib (Glivec). In: 28 Congresso da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2005, Rio de Janeiro. 28 Congresso da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2005.
11. FREITAS, Monica S ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; GASPAR, Luciana P ; SILVA, Jerson Lima da . Structural characterization of Mayaro virus fusion-active state induced by high hydrostatic pressure and low pH. In: Trends in High Pressure Protein Sciences European COST D30 workshop / Satellite meeting of the International Biophysics Congress, 2005, Montpellier. Trends in High Pressure Protein Sciences European COST D30 workshop / Satellite meeting of the International Biophysics Congress, 2005.
12. ALMEIDA, Gutemberg ; ALMEIDA, Mônica Pureza ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; VAL, Isabel ; PEIXOTO, Leonardo C ; OTAZU, Ivone Beatriz ; NASCIUTTI, Luiz Eurico . Molecular study of the Expression of metalloproteases and their tissue inhibitors on Vulvar Lichen Sclerosus. In: Program for the International Society for the Study of Vulvovaginal disease / XVIII World Congress, 2005, Queenstown. Program for the International Society for the Study of Vulvovaginal disease / XVIII World Congress, 2005.

#### Artigos aceitos para publicação

1. Gonaves, L. D. R. ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; BOROJEVIC, Radovan ; Otazu, I. ; Feres-Filho, E. J. . Expression of metalloproteinases and their tissue inhibitors in gingiva affected by hereditary gingival fibromatosis analysis of 3 cases within a family. *Journal of Periodontal Research*, 2008.

#### Apresentações de Trabalho

1. OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; FREITAS, Monica S ; OTAZU, Ivone Beatriz ; SILVA, Jerson Lima da . Caracterização Estrutural de Proteínas Oncogênicas em Portadores de Leucemia Mielóide Crônica (LMC). 2008. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
2. OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; FREITAS, Monica S ; DUTRA, Fabiano Ferreira ; MAGALHAES, B. ; OTAZU, Ivone Beatriz ; SILVA, Jerson Lima da . Caracterização estrutural de proteínas oncogênicas envolvidas no desenvolvimento da Leucemia Mielóide Crônica. 2007. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
3. ★ OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; FREITAS, Monica S ; DUTRA, Fabiano Ferreira ; OTAZU, Ivone Beatriz ; SILVA, Jerson Lima da . Caracterização Estrutural de proteínas oncogênicas em portadores de Leucemia Mielóide Crônica (LMC). 2007. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
4. DUTRA, Fabiano Ferreira ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; OTAZU, Ivone Beatriz ; ROSSI, Maria Isabel ; BOROJEVIC, Radovan . Análise da expressão de metaloproteinases e seus inibidores teciduais em células da medula óssea de doadores voluntários e pacientes com desordens mieloproliferativas. 2007. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
5. ★ OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; FREITAS, Monica S ; DUTRA, Fabiano Ferreira ; MAGALHAES, B. ; OTAZU, Ivone Beatriz ; SILVA, Jerson Lima da . Caracterização estrutural de proteínas oncogênicas envolvidas no desenvolvimento da Leucemia Mielóide Crônica. 2007. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
6. OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; FREITAS, Monica S ; MAGALHAES, B. ; DUTRA, Fabiano Ferreira ; OTAZU, Ivone Beatriz ; SILVA, Jerson Lima da . Structural characterization of oncogenic proteins involved in the development of chronic myeloid leukemia. 2007. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).



7. DUTRA, Fabiano Ferreira ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; OTAZU, Ivone Beatriz ; BOROJEVIC, Radovan ; ROSSI, Maria Isabel ; RODARTE, R. S. . Análise da Dinâmica de Expressão de Moléculas Moduladoras da Medula Óssea em Células de Neoplasias Hematológicas. 2006. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
8. OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; FREITAS, Monica S ; DUTRA, Fabiano Ferreira ; OTAZU, Ivone Beatriz ; SILVA, Jerson Lima da . Caracterização Estrutural de Proteínas Oncogênicas em Portadores de Leucemia Mielóide Crônica (LMC). 2006. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
9. FREITAS, Monica S ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; GASPAR, Luciana P ; SILVA, Jerson Lima da . Caracterização Estrutural e Termodinâmica do Mecanismo de Fusão de Membranas Utilizando como Modelo o Vírus Mayaro. 2006. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
10. GONÇALVES, Lorena da Rós ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; OTAZU, Ivone Beatriz ; FEITOSA, Alfredo Carlos Rodrigues ; FERES FILHO, Eduardo . Expressão Gênica de Metaloproteinases e seus Inibidores Teciduais em Gengiva de Indivíduos com Doença Periodontal. 2006. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
11. ALMEIDA, Mônica Pureza ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; TAKIYA, Christina Maeda ; OTAZU, Ivone Beatriz ; NASCIUTTI, Luiz Eurico . Análise da expressão de metaloproteinases (MMPs) e de seus inibidores teciduais (TIMPs) em líquen escleroso vulvar - Resultados Preliminares. 2005. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
12. FREITAS, Monica S ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; GASPAR, Luciana P ; SILVA, Jerson Lima da . Caracterização Estrutural do vírus Mayaro submetido a Tratamentos Físicos e Químicos: Implicações no mecanismo de Fusão de Membranas. 2005. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
13. GOULART, Ana Emília ; DUTRA, Fabiano Ferreira ; PEIXOTO, Leonardo Chicaybam ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; OTAZU, Ivone Beatriz ; BOROJEVIC, Radovan . Doença residual mínima (DRM): Estudo Molecular em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica (LMC) tratados por transplante alogênico de medula óssea (TMO), mesilato de imatinib (GLIVEC) e interferon alfa (IFN-ALFA). 2005. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
14. ALMEIDA, Mônica Pureza ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; PEIXOTO, Leonardo Chicaybam ; TAKIYA, Christina Maeda ; OTAZU, Ivone Beatriz ; NASCIUTTI, Luiz Eurico . Estudo Molecular das interações células / Matriz Extracelular por meio da expressão de metaloproteinases (MMPs) e inibidores (TIMPs) em células de Líquen Escleroso Vulvar. 2005. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
15. PEIXOTO, Leonardo Chicaybam ; DUTRA, Fabiano Ferreira ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; GOULART, Ana Emília ; SIQUEIRA, Wilen Norat ; OTAZU, Ivone Beatriz ; BOROJEVIC, Radovan . Significado da Expressão de transcrito quimérico BCR-ABL: Análise por sequenciamento em Pacientes com Leucemia Mielóide Crônica (LMC) sem tratamento. 2005. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
16. GOULART, Ana Emília ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; DUTRA, Fabiano Ferreira ; PEIXOTO, Leonardo Chicaybam ; OTAZU, Ivone Beatriz ; BOROJEVIC, Radovan . Significado da Presença do Gene quimérico BCR-ABL em Leucemia Mielóide Crônica (LMC): Estudo de indivíduos normais e pacientes com LMC. 2005. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
17. GOULART, Ana Emília ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; PEIXOTO, Leonardo Chicaybam ; DUTRA, Fabiano Ferreira ; OTAZU, Ivone Beatriz ; BOROJEVIC, Radovan . Significado da expressão do gene BCR-ABL e da doença residual mínima em diferentes malignidades hematológicas. 2004. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

#### Demais tipos de produção bibliográfica

1. FREITAS, Monica S ; OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; SILVA, Jerson Lima da . Hydrostatic pressure as a new approach to isolate Mayaro fusion active state 2007 (Artigo a ser submetido).
2. ★ OLIVEIRA, Guilherme Augusto Piedade ; FREITAS, Monica S ; COSTA, E. S. ; DUTRA, Fabiano Ferreira ; Maia, S. F. ; GUERRA, M. C. ; Taberner, M.D. ; BOROJEVIC, Radovan ; SILVA, Jerson Lima da ; OTAZU, Ivone Beatriz . Good Response to Therapy with Imatinib Mesylate in Childhood Chronic Myeloid Leukemia 2007 (Artigo a ser submetido).

## Eventos

## Participação em eventos

1. XXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE. Good Response to Therapy with Imatinibe Mesylate in Childhood Chronic Myeloid Leukemia and a New Expression Method for the Catalytic Domain of BCR-ABL Protein. 2008. (Congresso).
2. II Semana de Pós-Graduação de Bioquímica Médica. Caracterização Estrutural de Proteínas Oncogênicas em Portadores de leucemia Mielóide Crônica (LMC). 2008. (Seminário).
3. 2nd IZCAM - FAPERJ Spring School - Biological Physics. 2008. (Simpósio).
4. XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry (Sbbq) and 10 International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). Structural characterization of oncogenic proteins involved in the development of Chronic Myeloid Leukemia. 2007. (Congresso).
5. XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental FeSBE. Structural characterization of oncogenic proteins involved in the development of chronic myeloid leukemia. 2007. (Congresso).
6. I Semana de Pós-Graduação de Bioquímica Médica. Caracterização estrutural de proteínas oncogênicas envolvidas no desenvolvimento da Leucemia Mielóide Crônica. 2007. (Seminário).
7. XXIX Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ. Caracterização Estrutural de proteínas oncogênicas em portadores de Leucemia Mielóide Crônica (LMC). 2007. (Seminário).
8. XXXII Reunião da Sociedade Brasileira de Biofísica (Sbbf). 2007. (Simpósio).
9. 800 MHz NMR Facility Inauguration Symposium and the 2nd Annual Meeting of the Millennium Institute for Structural in Biomedicine and Biotechnology. Structural characterization of oncogenic proteins involved in the development of chronic myeloid leukemia. 2007. (Simpósio).
10. IX Semana de Biomedicina. Caracterização estrutural de proteínas oncogênicas envolvidas no desenvolvimento da Leucemia Mielóide Crônica. 2007. (Encontro).
11. XXXV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR. Structural and Thermodynamic Characterization of Viral Membrane Fusion. 2006. (Congresso).
12. XIII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOLOGIA CELULAR. Expression of Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors in gingiva from Periodontitis-Affected Individuals. 2006. (Congresso).
13. VIII Semana de Biomedicina. Expressão de Metaloproteinases e seus Inibidores Teciduais em Gengiva de Indivíduos com Doença Periodontal. 2006. (Congresso).
14. XXXI Meeting of the Brazilian Society for Immunology. 2006. (Congresso).
15. Extra Section of Clinical Immunology - ESCI. 2006. (Encontro).
16. XXVIII Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ. Caracterização Estrutural de Proteínas Oncogênicas em Portadores de Leucemia Mielóide Crônica (LMC). 2006. (Outra).
17. IX CONGRESSO BRASILEIRO DE TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA. 2005. (Congresso).
18. XXXIV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR - SBBq. Structural Characterization of Mayaro Virus. 2005. (Congresso).
19. 51 Congresso Brasileiro de Genética. Análise da Expressão de Metaloproteinases e seus Inibidores Teciduais em Líquen Escleroso Vulvar. 2005. (Congresso).
20. VII Semana de Biomedicina. Caracterização Estrutural do Vírus Mayaro submetido a Tratamentos Físicos e Químicos: Implicações no Mecanismo de Fusão de Membranas. 2005. (Seminário).
21. XXX REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOFÍSICA - International Symposium of Advanced Therapies. 2005. (Simpósio).
22. Primeiro Encontro da Sociedade Internacional de terapia Celular - ISCT. 2005. (Encontro).
23. III ENCONTRO EM TRANPLANTE DE MEDULA ÓSSEA. 2005. (Encontro).
24. XXVII Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ. Estudo Molecular das Interações Células / Matriz Extracelular por meio da Expressão de Metaloproteinases e inibidores em Células de Líquen Escleroso Vulvar. 2005. (Outra).
25. VI semana de biomedicina. 2004. (Seminário).
26. XXVI JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, ARTÍSTICA E CULTURAL DA UFRJ. 2004. (Outra).

# 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](#)