

Estudo proteômico do microambiente medular de pacientes com Leucemia Mieloide Aguda

Rezende MA¹, Oliveira NCA¹, Corrêa SC¹, Abdelhay E¹, Binato R¹

¹Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – CEMO – Laboratório de Células Tronco

INTRODUÇÃO

A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é caracterizada pela proliferação anormal de células mieloides, uma diminuição no nível de apoptose e uma parada de diferenciação celular. Muitos estudos têm sido relatados para a compreensão dos processos leucemogênicos que indicam que a LMA é uma doença derivada de alterações na Célula Tronco Hematopoética, levando a formação de uma Célula Tronco Leucêmica. A manutenção das células-tronco hematopoéticas e a regulação de sua autorrenovação e diferenciação *in vivo* dependem da sinalização entre as células-tronco e o estroma através de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão proteica diferencial de amostras de plasma de MO de pacientes com LMA e plasma de MO de doadores saudáveis através da análise proteômica.

METODOLOGIA

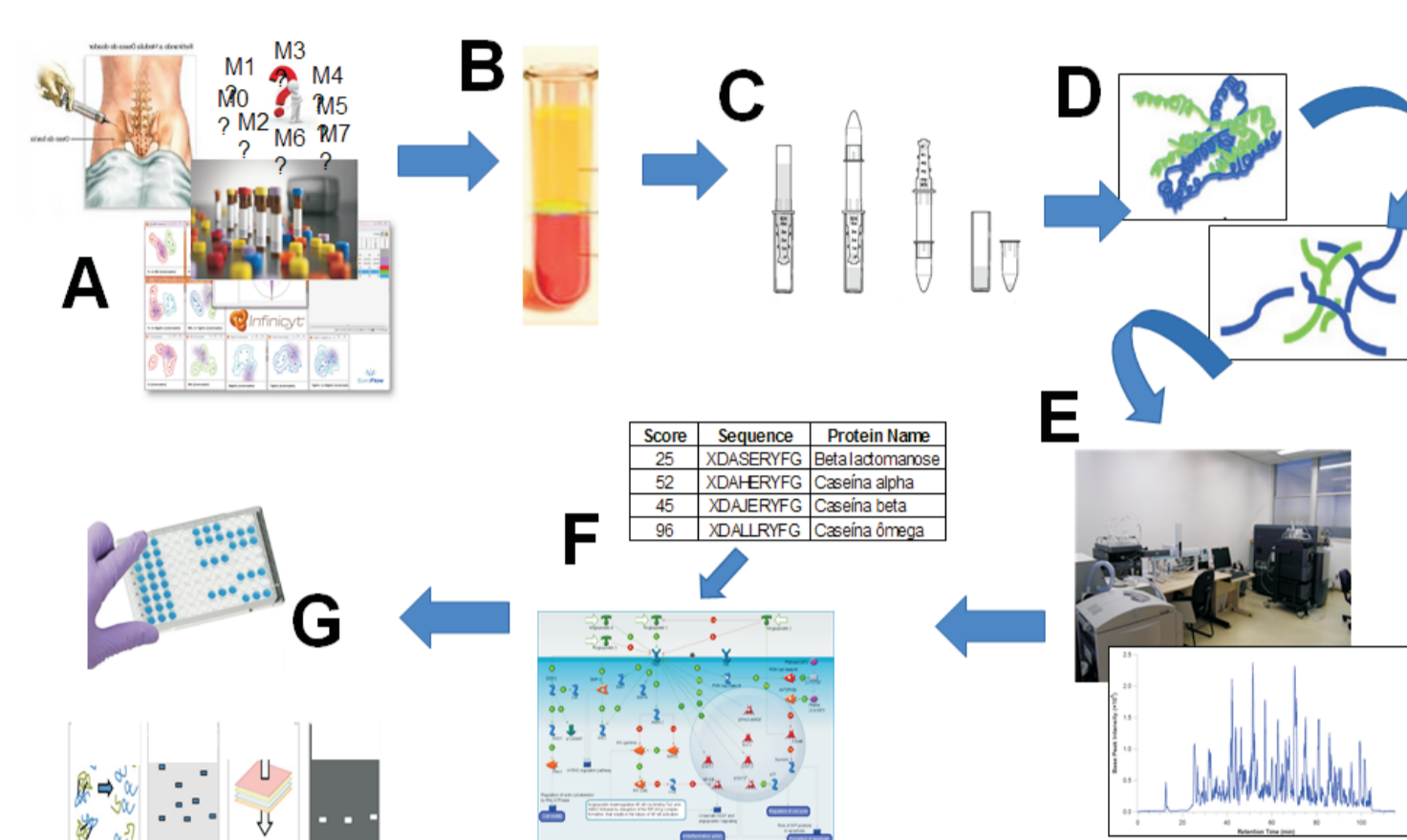


Figura 1: Desenho do estudo. A) Caracterização das amostras de MO por imunofenotipagem; B) Separação do plasma da MO de pacientes com LMA e doadores e tratamento do mesmo com inibidor de protease; C) Concentração das proteínas por coluna Amicon; D) Digestão triptica das proteínas dos plasmas da MO; E) Performance proteômica por cromatografia multidimensional acoplada ao espectrômetro de massas Synapt HDMS; F) Identificação e quantificação das proteínas pela utilizando software Proteinlynx-Global Server v.2.5.2 (PGLS) com a ferramenta de Expression^E. Em seguida, a análise *in silico* foi realizada utilizando o software Metacore™ G) Estudos das principais proteínas identificadas foram realizados por Western-blot e ELISA.

RESULTADOS

Distribuição de pacientes com LMA

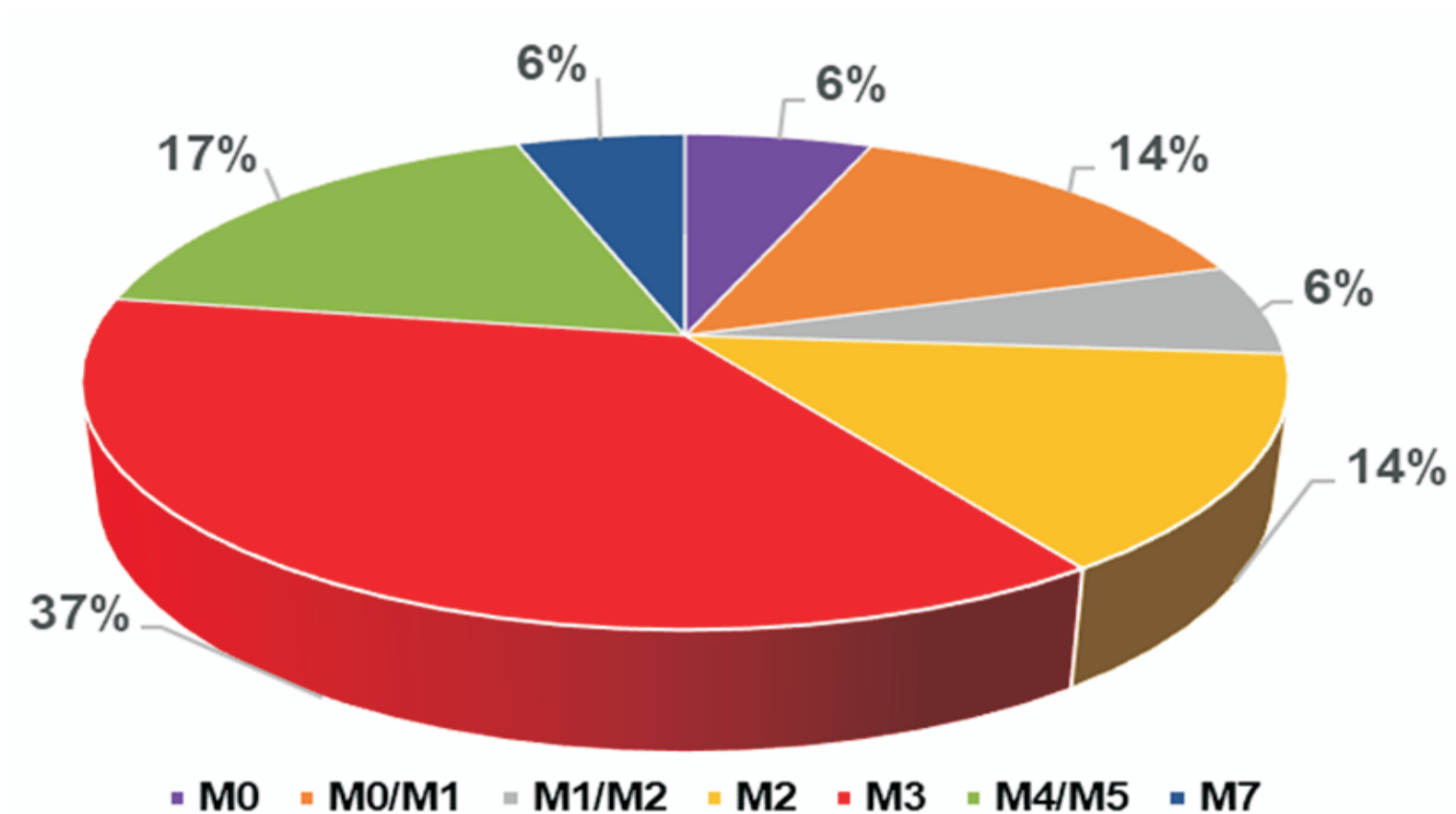


Figura 2: Distribuição imunofenotípica da MO de pacientes com LMA. A) Distribuição de pacientes com LMA de acordo com os subtipos FAB caracterizados por imunofenotipagem.

Análise proteômica

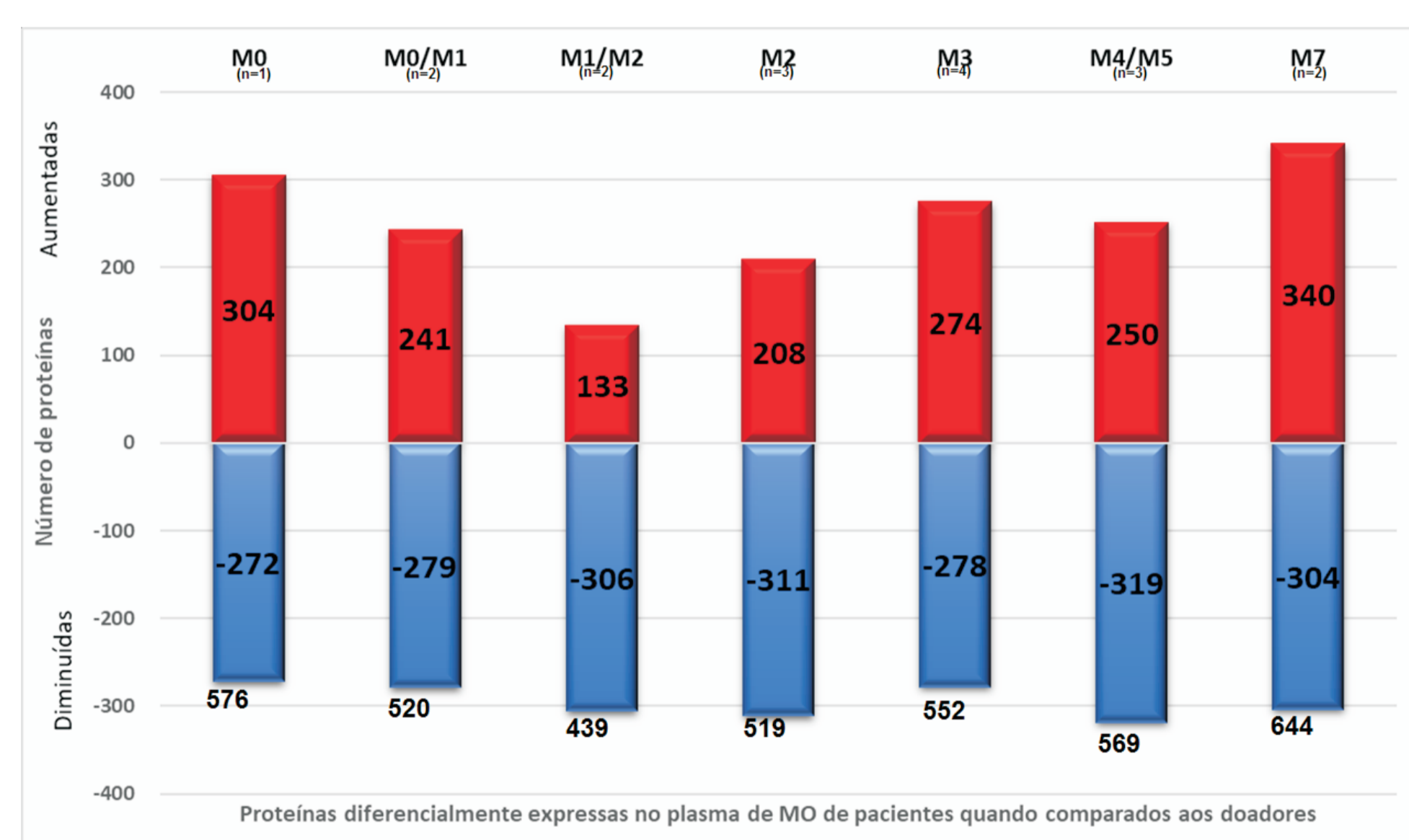


Figura 3: Análise proteômica. Proteínas diferencialmente expressas no plasma da MO de pacientes com LMA dos diversos subtipos quando comparados com o plasma da MO de doadores saudáveis.

Processos biológicos alterados

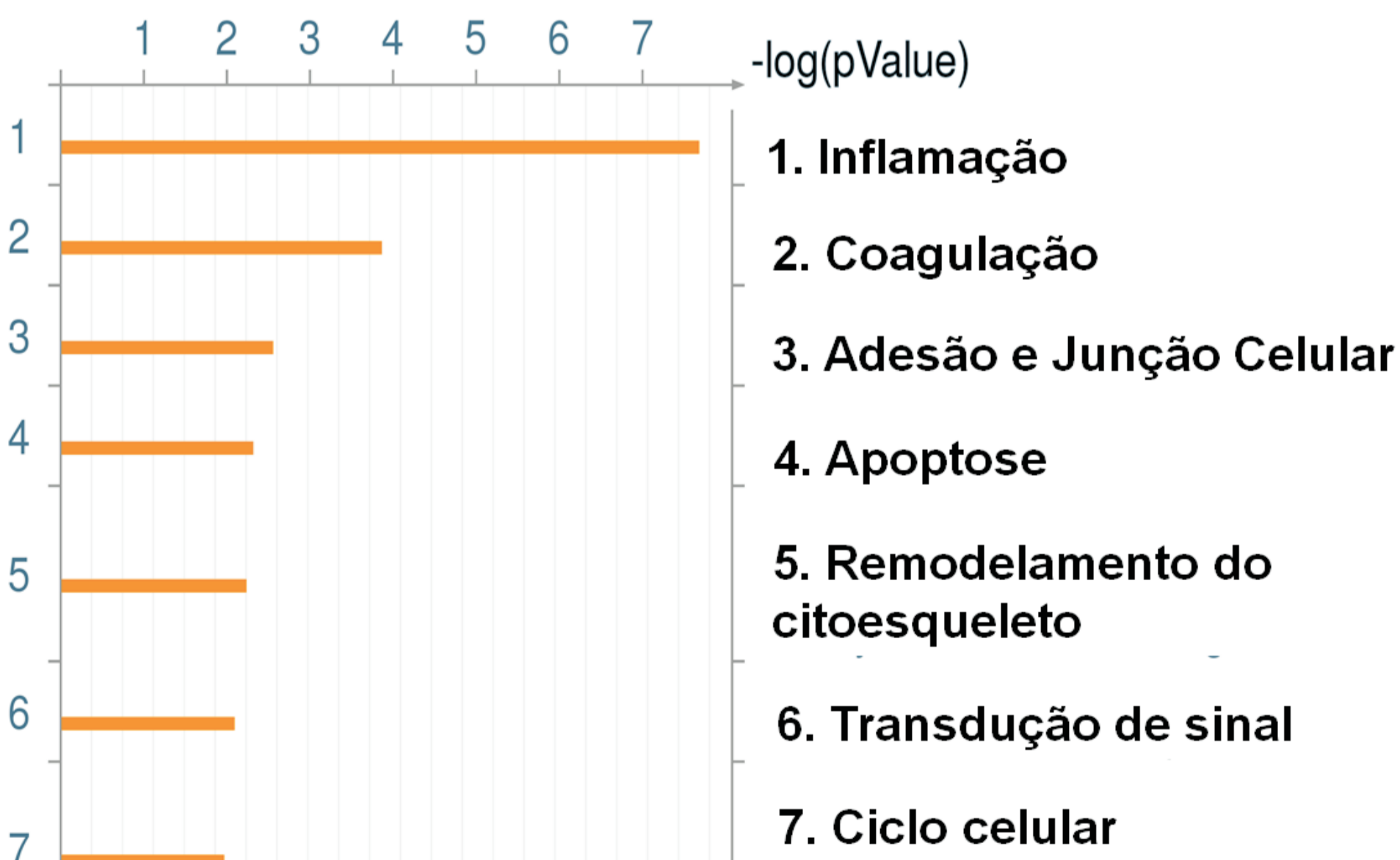


Figura 4: Análise in silico. Principais processos biológicos encontrados na análise *in silico* através do software Metacore do proteoma do plasma da MO dos pacientes com LMA.

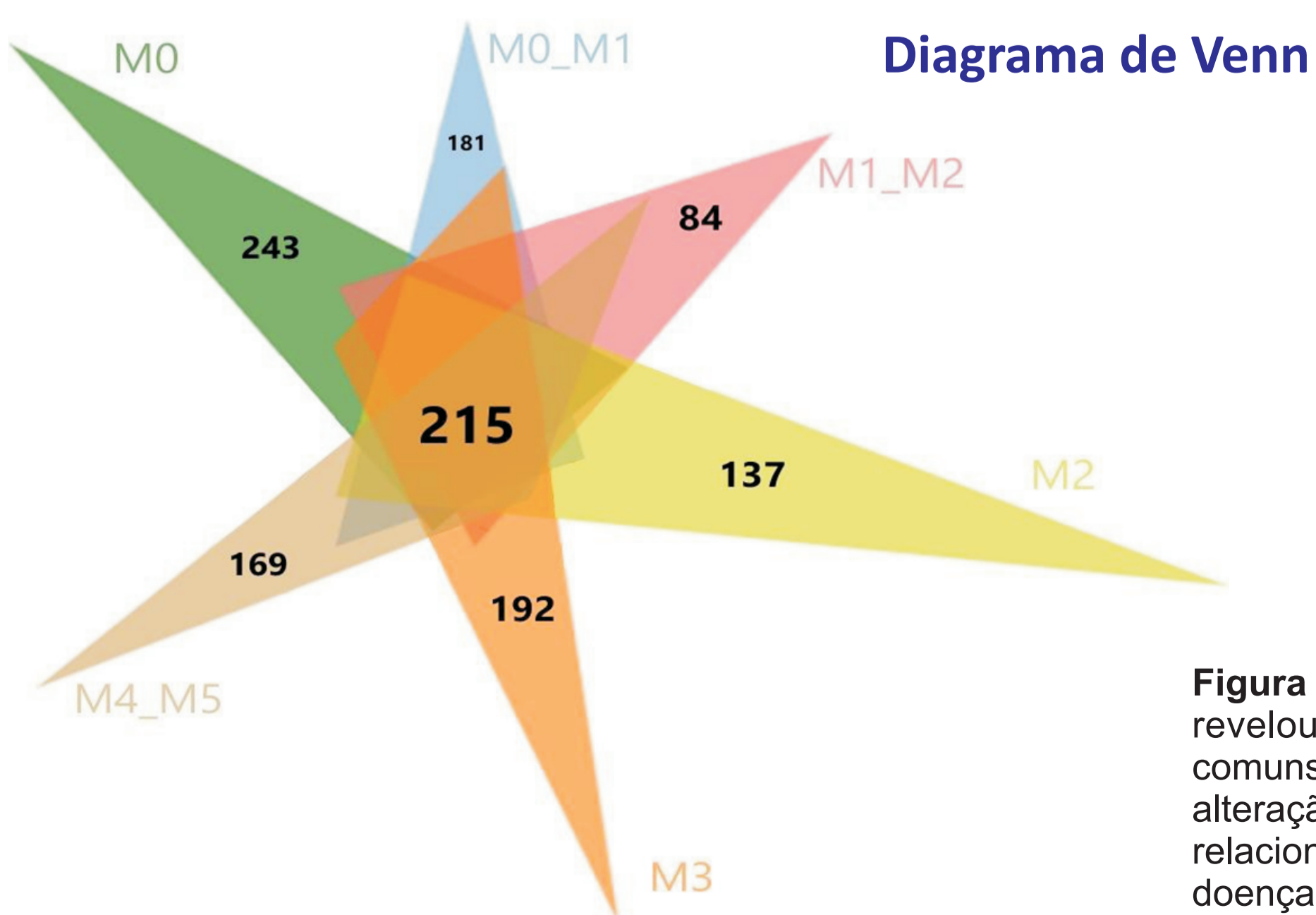


Figura 5: Diagrama de Venn. O Diagrama de Venn revelou 215 proteínas diferencialmente expressas comuns a todos os subtipos de LMA, indicando que uma alteração comum a todos os subtipos pode estar relacionada com importantes alterações no contexto da doença.

Análise in silico das proteínas comuns

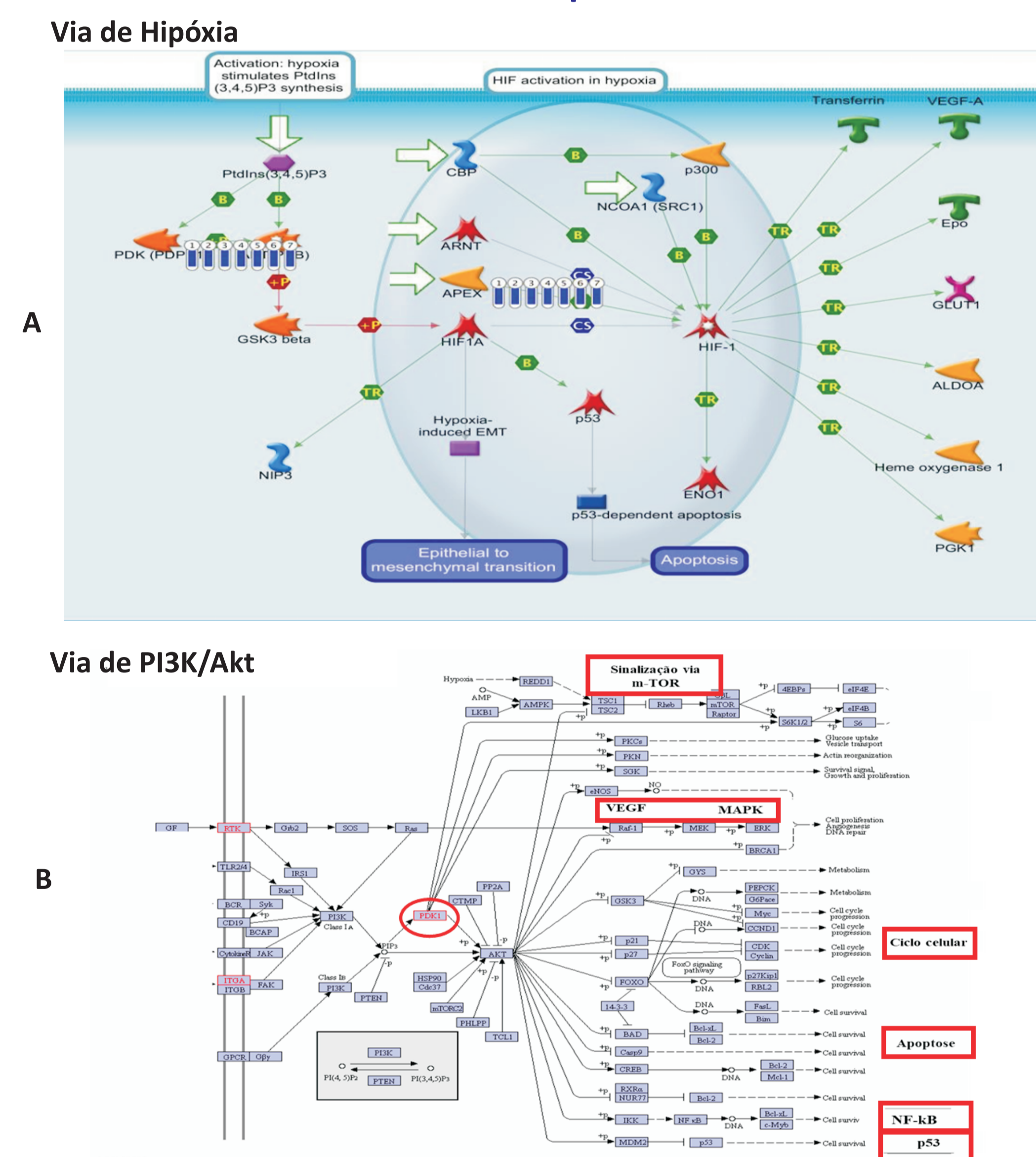


Figura 6: Principais vias de sinalização relacionadas com as proteínas comuns encontradas no plasma de pacientes com LMA. Dentre as proteínas que participam das vias de hipóxia e PI3K, destaca-se a proteína PDK1, que apresenta sua expressão diminuída em todos os subtipos de LMA. PDK1 é uma importante proteína cinase que pode estar relacionada com a regulação de várias vias de sinalização importantes, como a via de HIF1 α (A) e a via de Akt (B).

Akt está alterado no plasma da MO dos pacientes com LMA

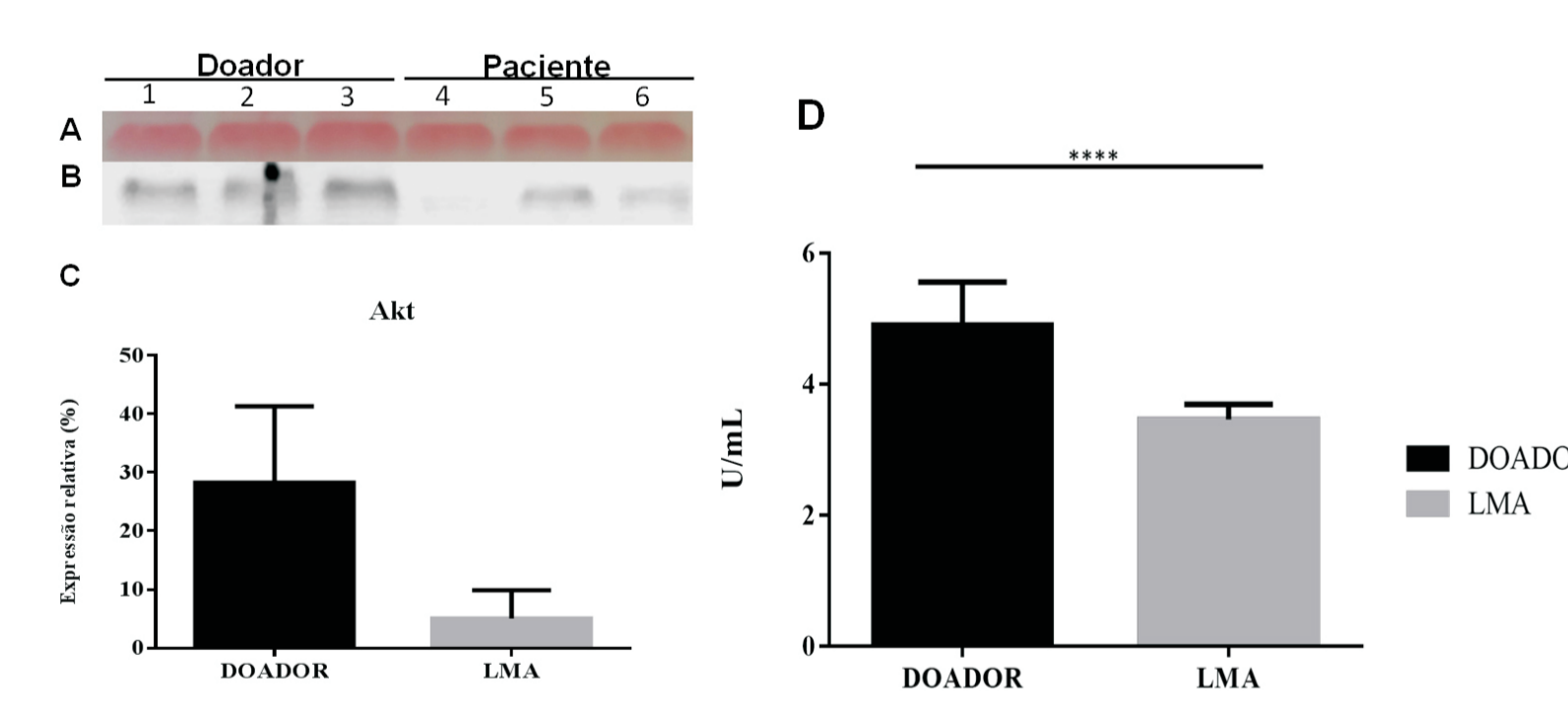


Figura 7: Akt fosforilado está alterado no plasma da MO de pacientes com LMA. A) Controle loading ou de carregamento do ensaio de Western Blot pela coloração com reagente *Rouge Ponceau*. B) Western Blot da proteína Akt fosforilada. Plasma de MO de doadores saudáveis (colunas 1, 2 e 3) e de pacientes (colunas 4, 5 e 6). Observa-se uma diminuição na expressão da proteína Akt fosforilado no plasma da MO de pacientes com LMA apesar de não ser estatisticamente significativo. C) O Gráfico mostra a expressão relativa de Akt fosforilado no plasma MO de pacientes com LMA quando comparados aos doadores saudáveis. D) A análise por ELISA confirma a expressão diminuída do Akt fosforilado em uma coorte maior de pacientes (n=22) e doadores (n=8).

HIF1- α também está alterado no plasma da MO dos pacientes com LMA

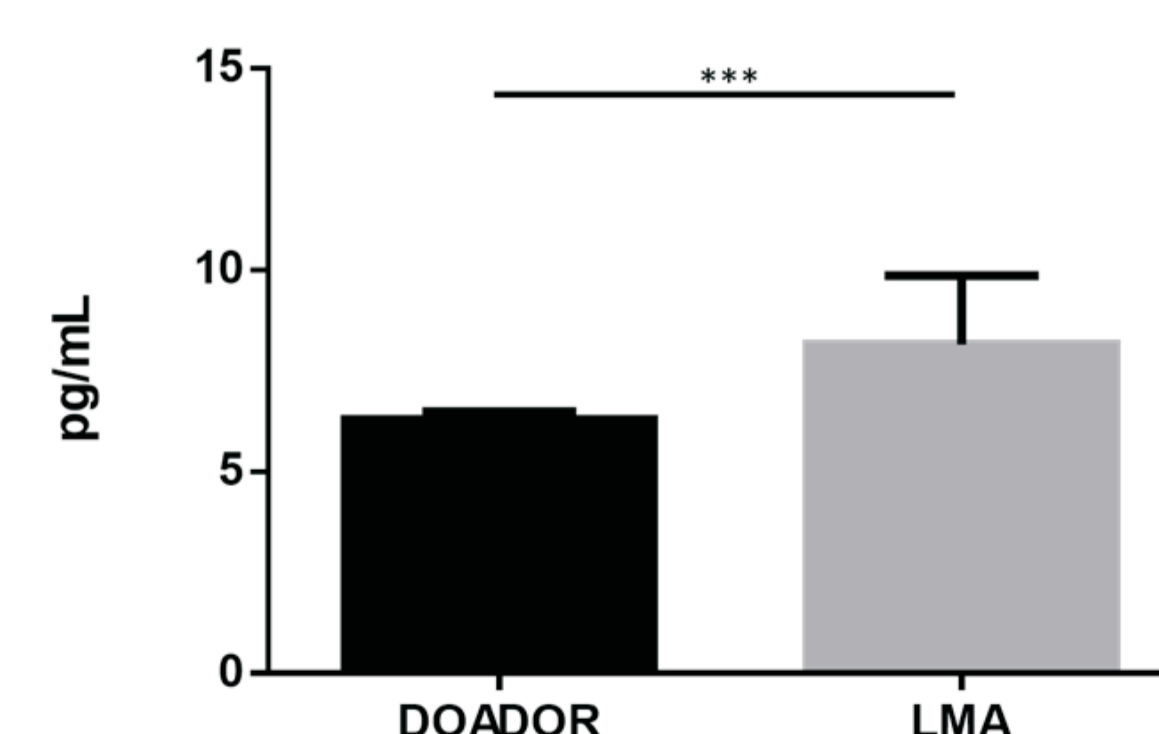


Figura 8: HIF1- α também está alterado no plasma da MO de pacientes com LMA. A) O ensaio de ELISA demonstrou que HIF1- α também se encontrou alterado no plasma da MO de pacientes com LMA (n=18) quando comparados aos doadores de MO (n=10) sendo significativamente estatístico (p = 0,001) pelo teste de Man-Whitney.

CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a alteração da expressão de proteínas no plasma, especialmente a proteína PDK1, pode estar relacionada com um importante papel do microambiente medular no desenvolvimento da LMA.