

Gustavo Stelzer (IC), Luciana Gutiyama, Simone Bonecker, Ilana Zalberg

Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO), Instituto Nacional do Câncer

INTRODUÇÃO

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é caracterizada pela presença do cromossomo Filadélfia (Figura 1) que codifica a oncoproteína BCR-ABL1, condição necessária para a transformação maligna. Inibidores tirosina quinase (ITK), específicos a ABL1, se ligam ao sítio de ligação do ATP, no domínio tirosina quinase de ABL1, inibindo a transdução de sinais de proliferação e morte celular (Figura 2).

O uso de ITK em pacientes com LMC é o maior caso de sucesso de uma terapia com alvo específico. Entretanto, a resistência a ação do ITK é ainda um problema clínico relevante. O principal mecanismo associado à resistência é a presença de mutações pontuais no domínio quinase. Entretanto, o sequenciamento direto do domínio quinase de pacientes com LMC evidencia, além de mutações, inserções e deleções. Ao contrário das mutações que têm seu papel amplamente conhecido na literatura, não se sabe qual o valor de deleções e inserções na resistência aos ITK.

t(9;22)(q34;q11)

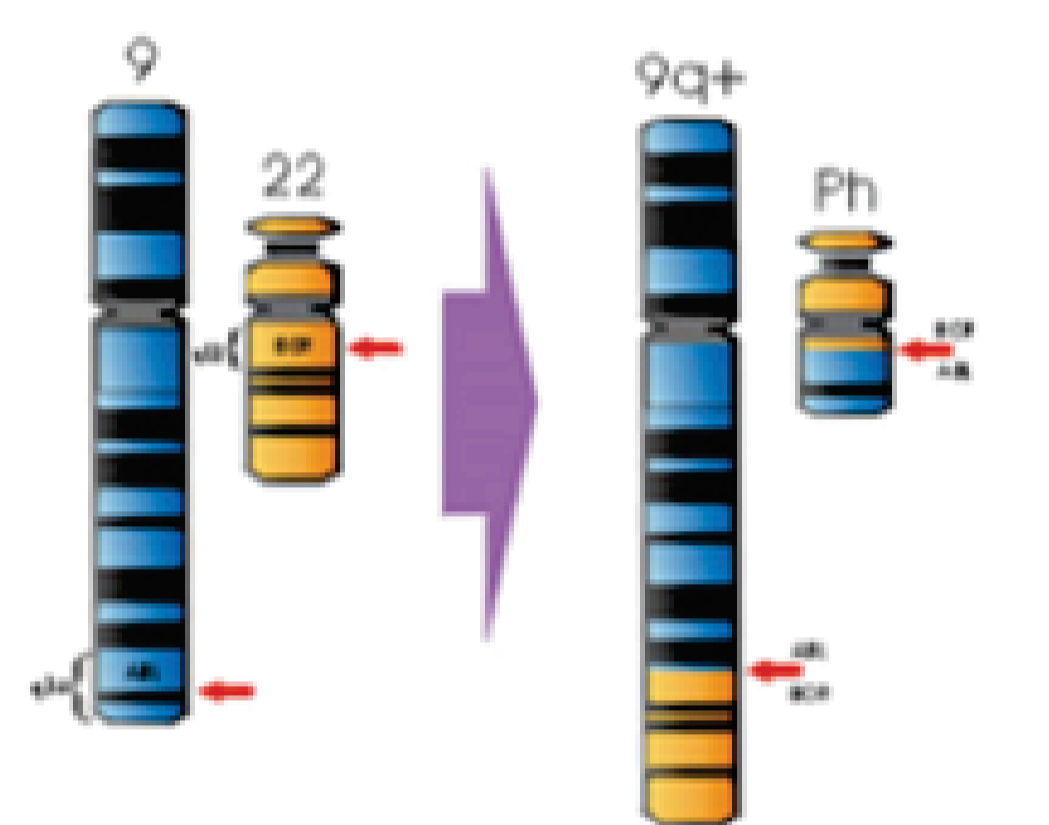


Figura 1: Translocação entre os cromossomo 9 e 22 gerando um cromossomo 22 diferenciado, o cromossomo Filadélfia (Ph). Disponível em: <http://www.unesp.br/prope/projtech/Saude/saude48a.htm>

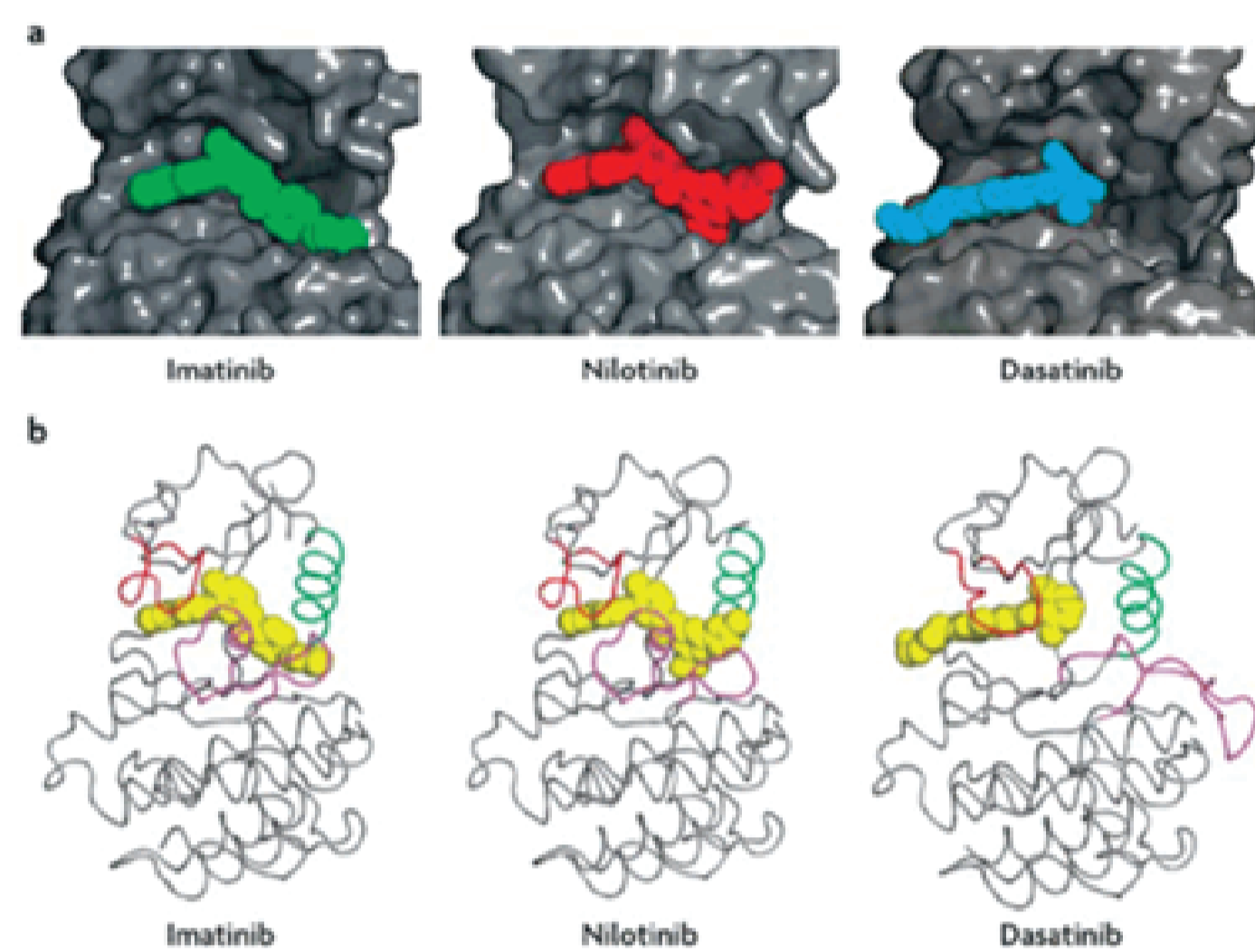


Figura 2: Proteína Tirosina Quinase formando complexo com diferentes inibidores da tirosina quinase. (a) Conformação em três dimensões da proteína tirosina quinase com inibidores ligados. (b) Esquema de proteína ligada aos inibidores em estrutura condensada. Disponível em: Nature Reviews Cancer, 2007, Nature Publishing Group.

METODOLOGIA DO ESTUDO

Caracterizar a ocorrência de inserções e deleções no domínio tirosina quinase do gene BCR-ABL1, associadas e avaliar seu possível papel na resistência ao uso de ITK. O estudo do tipo casos e controles onde os controles foram pacientes respondedores e respondedores tardios aos ITKs em comparação com pacientes em falha ao tratamento, devido à resistência primária e secundária. Os marcos de resposta para resposta e resistência podem ser observados na Tabela 1. As amostras foram submetidas a sequenciamento direto e a análise realizada por programas de análise específicos *Mutation Surveyor V5.0.1*® *SoftGenetics*.

Tabela 1: Parâmetros utilizados para avaliação de resposta dos pacientes com LMC em uso de ITK em primeira linha de tratamento.

Tempo	Resposta ótima	Atenção	Falha ao tratamento
Linha de base	NA	Alto risco ou CCA/Ph+, rota principal	NA
3 meses	BCR-ABL1 ≤ 10% ou Ph+ ≤ 35%	BCR-ABL1 > 10% ou Ph+ 36 - 95%	Não CHR ou Ph+ > 95%
6 meses	BCR-ABL1 ≤ 1% ou Ph+0 (CCyR)	BCR-ABL1 1 - 10% ou Ph+ 1 - 35 % (PCyR)	BCR-ABL1 > 10% ou Ph+ > 35%
12 meses	BCR-ABL1 ≤ 0,1%(RMM)	BCR-ABL1 0,1 - 1%	BCR-ABL1 > 1% ou Ph+ > 1%

Fonte: Bacarani et al. 2013.

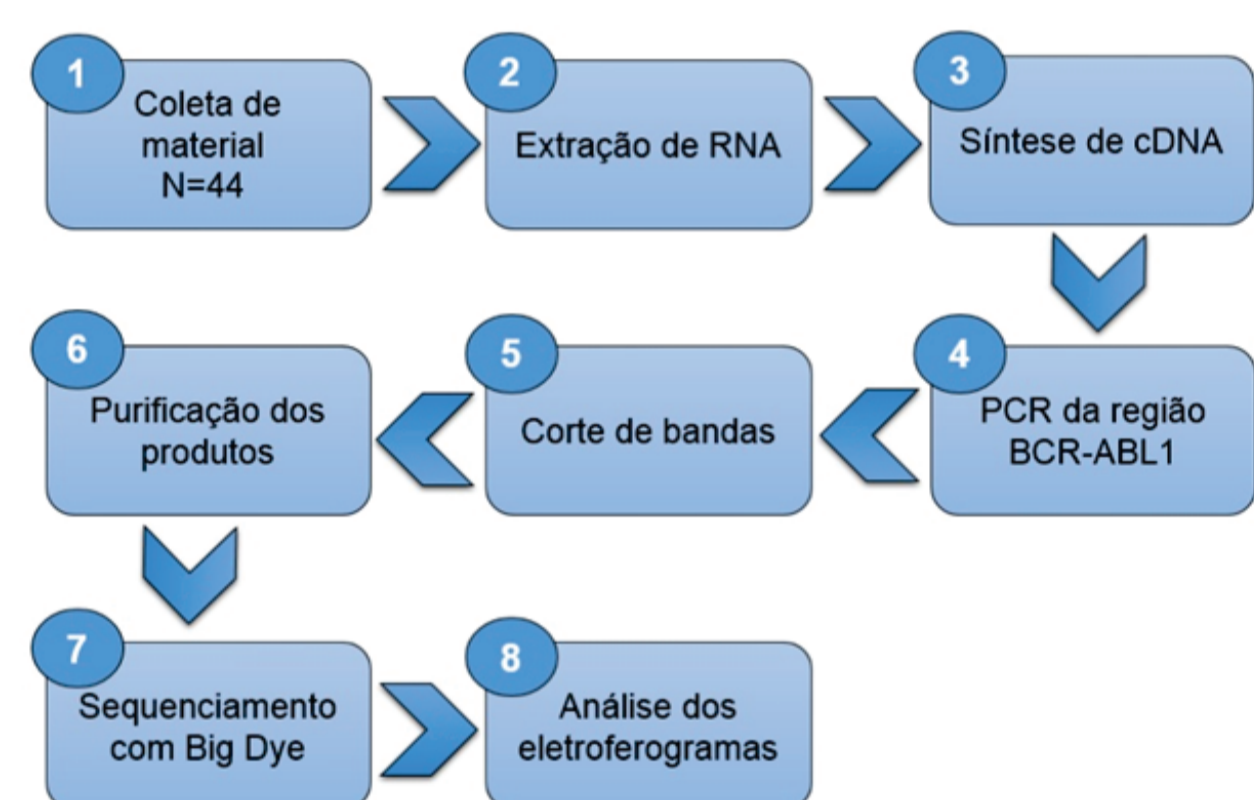


Figura 3: Fluxograma da metodologia empregada no estudo.

RESULTADOS

Após a divisão dos pacientes quanto à resposta ao tratamento, constatou-se que 12 destes eram respondedores ótimos, 8 respondedores tardios, 16 apresentaram resistência primária e 8 adquiriram resistência ao longo do tratamento (resistência secundária) (Gráfico 1). A inserção mais frequente é a de 35 pares de base (ins35) (Figura 6 C) e a deleção mais frequente foi a completa do exon 7 (185 pb) (Figura 6 A). 37,5% (6/16) dos pacientes com resistência primária apresentaram ins35 e apenas um paciente apresentou mutação pontual (T315I), enquanto no grupo de pacientes em resistência secundária, 4 (50%) pacientes obtinham essa mesma inserção (Gráfico 2). Quanto às deleções, dois pacientes em resistência primária e um de resistência secundária apresentaram deleções completas do exon 7 (185 pb) (Gráfico 2). Foi observada a presença de deleção parcial do exons 7 (72 pb) (Figura 6 B) em um paciente respondedor ótimo e um respondedor tardio (Gráfico 2).

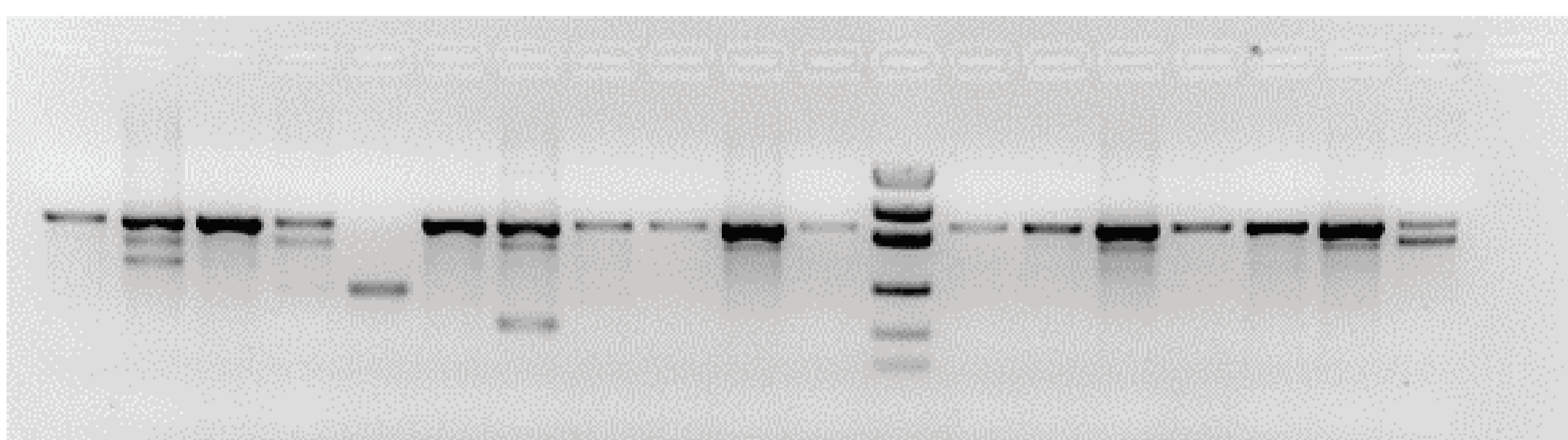


Figura 4: Produtos do PCR de amplificação do domínio quinase em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo sob luz UV.

Figura 5: Tabela de características dos pacientes analisados no estudo.

Total de pacientes analisados	44
Idade ao diagnóstico (mediana em anos)	45 (12-73)
Gênero masculino	30 (68,2%)
Tempo de tratamento (mediana em meses)	73 (13-181)
Fase da doença:	
Fase crônica	31 (70%)
Fase acelerada	2 (4,5%)
NI	11(25%)
Inibidor atual:	
Imatinib	31 (70%)
Nilotinib	4 (9%)
Dasatinib	9 (20,5%)

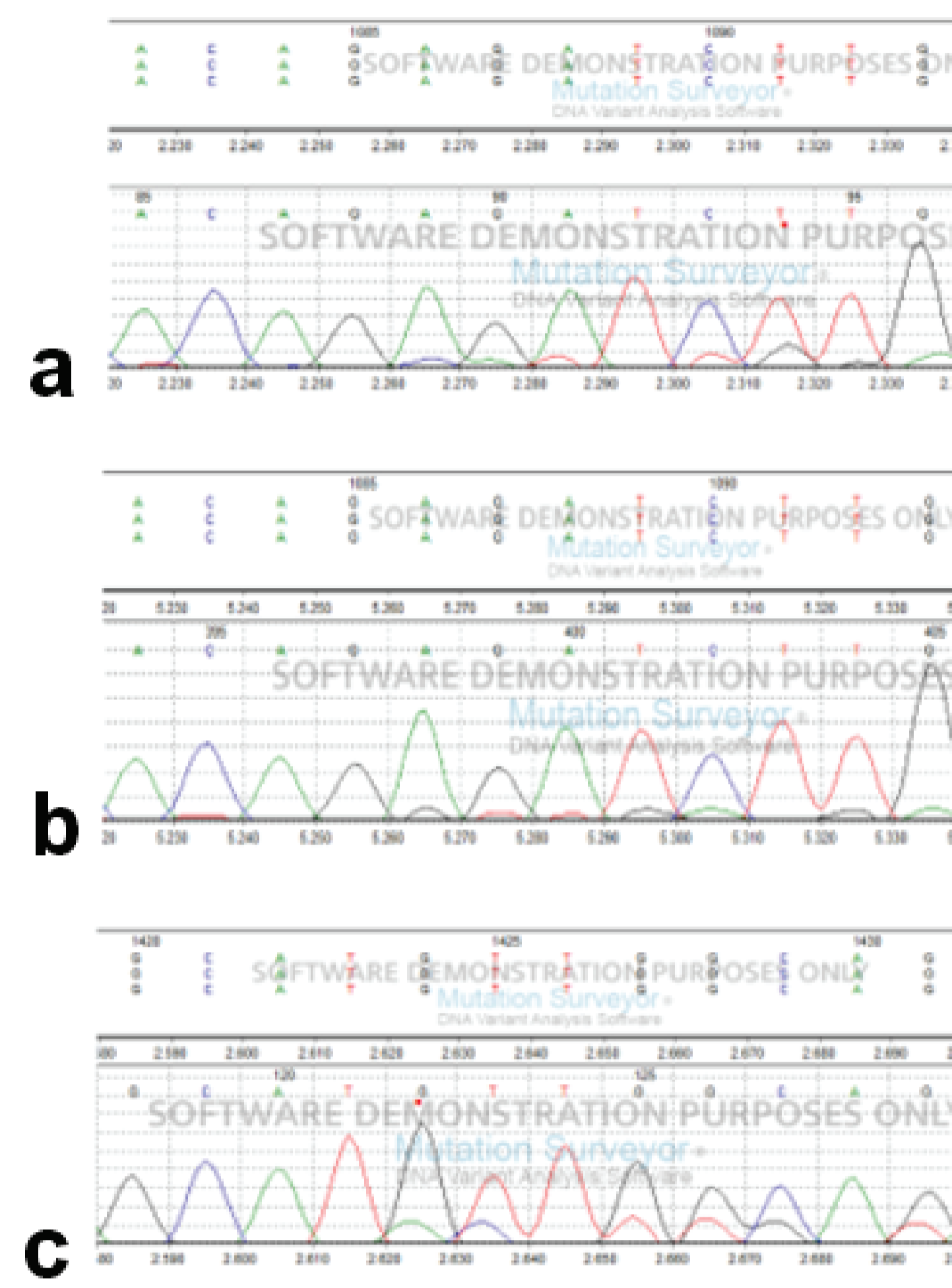


Figura 6: Eletroferograma da região BCR-ABL1 dos transcritos sequenciados. (a) Deleção completa do exon 7 (185 pb) presente em parte dos transcritos; (b) Deleção parcial do exon 7 (72 pb) presente em alguns dos transcritos; (c) Inserção entre os exons 8 e 9 (35 pb).

Separação dos pacientes quanto à resposta molecular

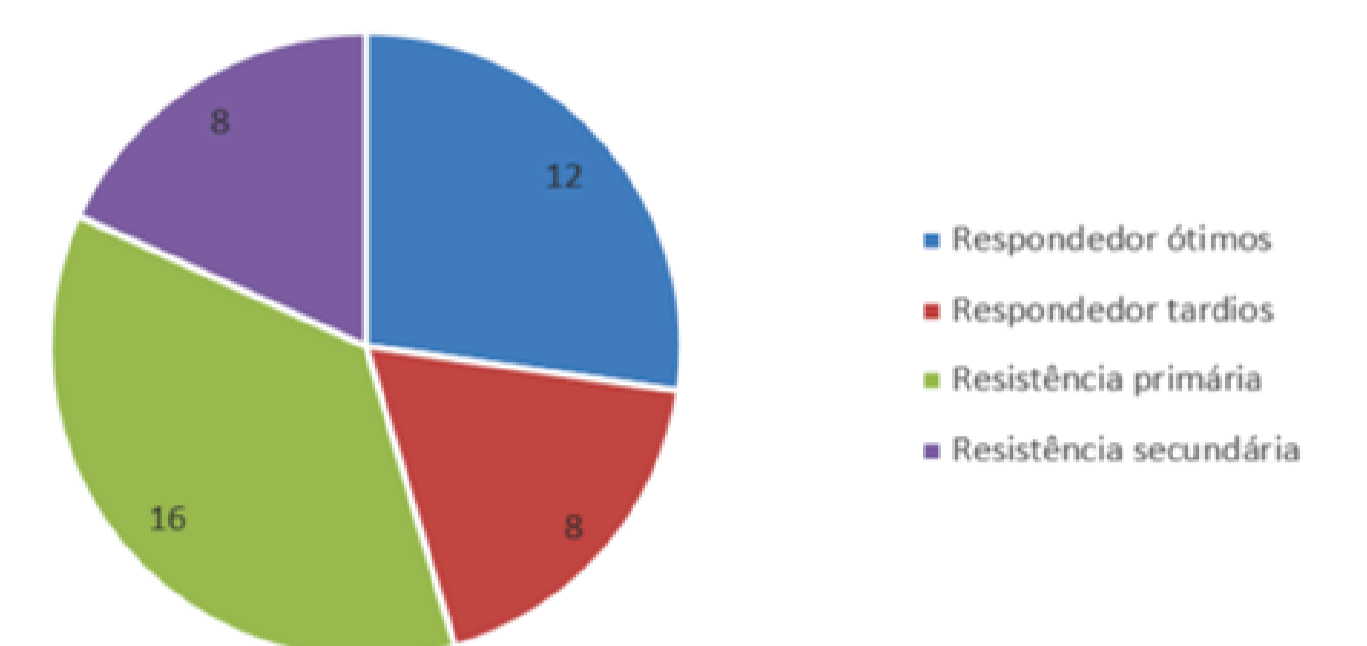


Gráfico 1: Distribuição da coorte de pacientes em relação à resposta hematológica.

Resultados dos eletroferogramas

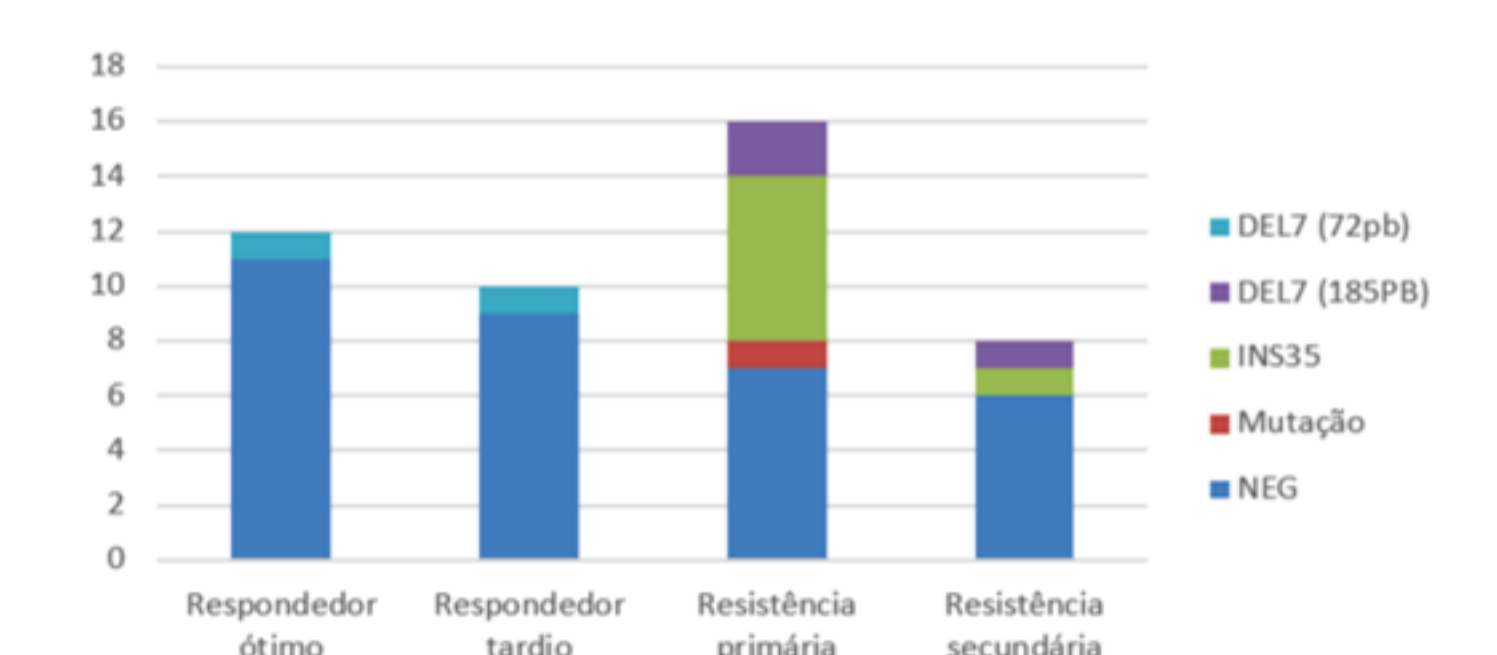


Gráfico 2: Gráfico dos resultados dos eletroferogramas dos pacientes sequenciados.

DISCUSSÃO

A presença de inserção foi exclusivamente em pacientes com resistência ao inibidor, sugerindo uma possível relação entre esta alteração genética e diferentes tipos de resistência, visto que, segundo dados da literatura (Lee et al., 2008), essa inserção poderia alterar a estrutura tridimensional da proteína quimérica BCR-ABL1, dificultando a atuação do inibidor. As deleções estavam presentes em todos os grupos em menor incidência. A presença de deleções de 185 pb, teoricamente, afetaria a estrutura da mesma maneira que a inserção e, devido ao número de bases, a decodificação da sequência restante seria comprometida (*frame shift*). A deleção de 72 pb comprometeria somente uma porção da proteína, já que esta seria uma deleção *in frame*.

CONCLUSÃO

Através da caracterização de eventos de deleção e inserção dos pacientes em diferentes respostas, pode-se notar uma prevalência de eventos de inserção e deleção do tipo *frame-shift* em pacientes em falha ao tratamento, enquanto pacientes com respostas ótima ou tardia apresentaram deleções *in frame*.

PERSPECTIVA

Aumentar o N do estudo para verificar se a proporção dos eventos de inserção e deleção se mantém nos diferentes grupos de resposta e se os dados são estatisticamente significativos.

Análise de sequências de doadores saudáveis com intuito de avaliar a frequência das mesmas inserções e deleções encontradas nos pacientes.

Realização da análise longitudinal de pacientes com inserções e deleções em paralelo aos níveis de transcritos BCR-ABL1 a fim de determinar o aparecimento destes eventos, relacionando-os com a resposta do paciente ao inibidor.

Realização de ensaios *in vitro* para determinação da sensibilidade de diferentes deleções e inserções aos inibidores tirosina quinase.

REFERÊNCIAS

- Nowell, P.C., and Hungerford, D.A. (1960). A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 142, 1497.
- Baccarani M, Deininger MW, Rosti G et al. (2013) European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 122(6):872–884.
- Nature Reviews Cancer, 2007, Nature Publishing Group.
- Lee, T.S., Ma, W., Zhang, X., Giles, F., Cortes, J., Kantarjian, H., Albitar, M. (2008). BCR-ABL alternative splicing as a common mechanism for imatinib resistance: evidence from molecular dynamics simulations. *Mol. Cancer Ther.* 7, 3834–3841.