

Estudo de biomarcadores preditivos da resistência à inibidores tirosina quinase em paciente com Leucemia Mielóide Crônica

Simone Bonecker¹ (DO), Martin H. Bonamino², Ilana Zalberg Renault¹

¹Divisão de Laboratórios do Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO) – Lab. de Biologia Molecular; ² Programa de Carcinogênese Molecular, INCA, RJ.

INTRODUÇÃO

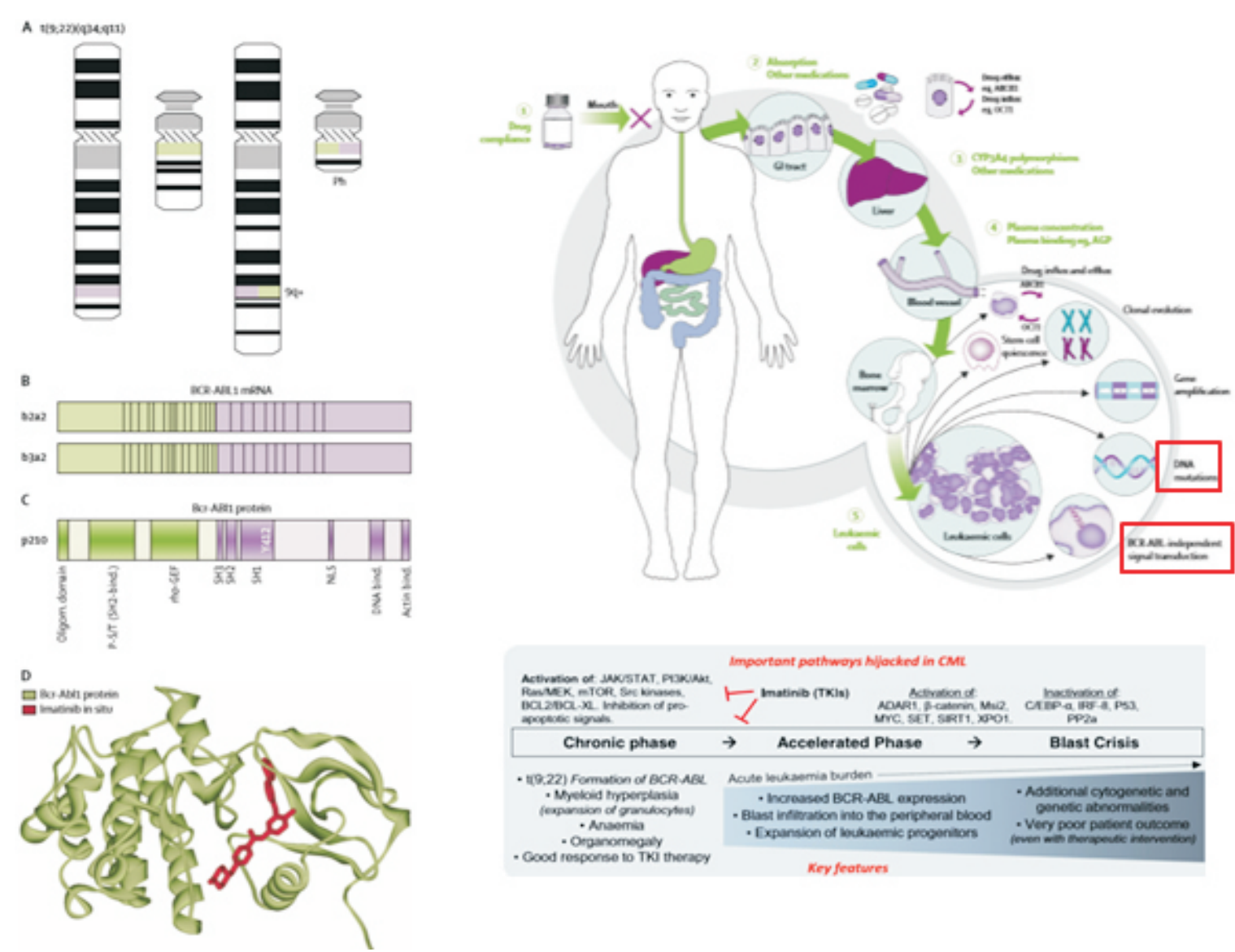


Figura 1: A) Representação dos cromossomos 9 e 22 e a translocação recíproca entre eles; em verde está representado o gene BCR e em roxo o gene ABL; B) Justaposição dos genes translocados e as isoformas mais frequente da LMC; C) Proteína quimérica; D) Representação em 3D da proteína e o local de ligação do Imatinib (Apperley 2015). E) Mecanismos de resistência do IM em pacientes com LMC (Apperley 2007); F) Fases da doença e suas características (Chasey e Melo 2015).

OBJETIVOS

- 1) Caracterizar a nossa coorte de pacientes;
- 2) a expressão dos miRNAs 148a, 150, 155 e 451 e seus alvos determinados *in silico*;
- 3) frequência das mutações no DQ simples, compostas e policlonais e quantificá-las;
- 4) avaliar, por sequenciamento de próxima geração, a frequência de mutações BCR-ABL independentes em pacientes que evoluíram para crise blástica;
- 5) avaliar o perfil de expressão do mRNA das células-tronco leucêmica e compará-las com a sua contraparte não leucêmica.

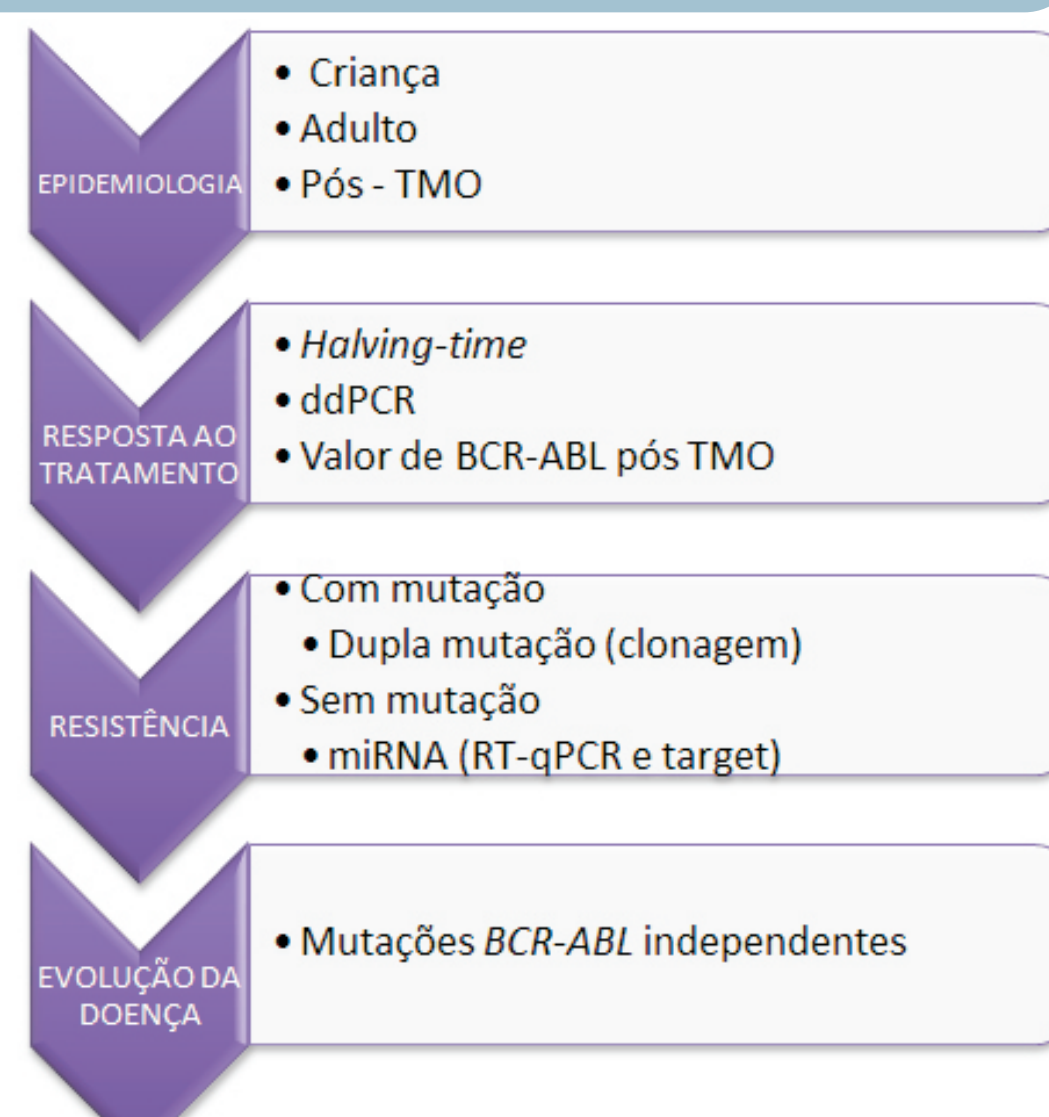


Figura 2: Objetivos do estudo

METODOLOGIA

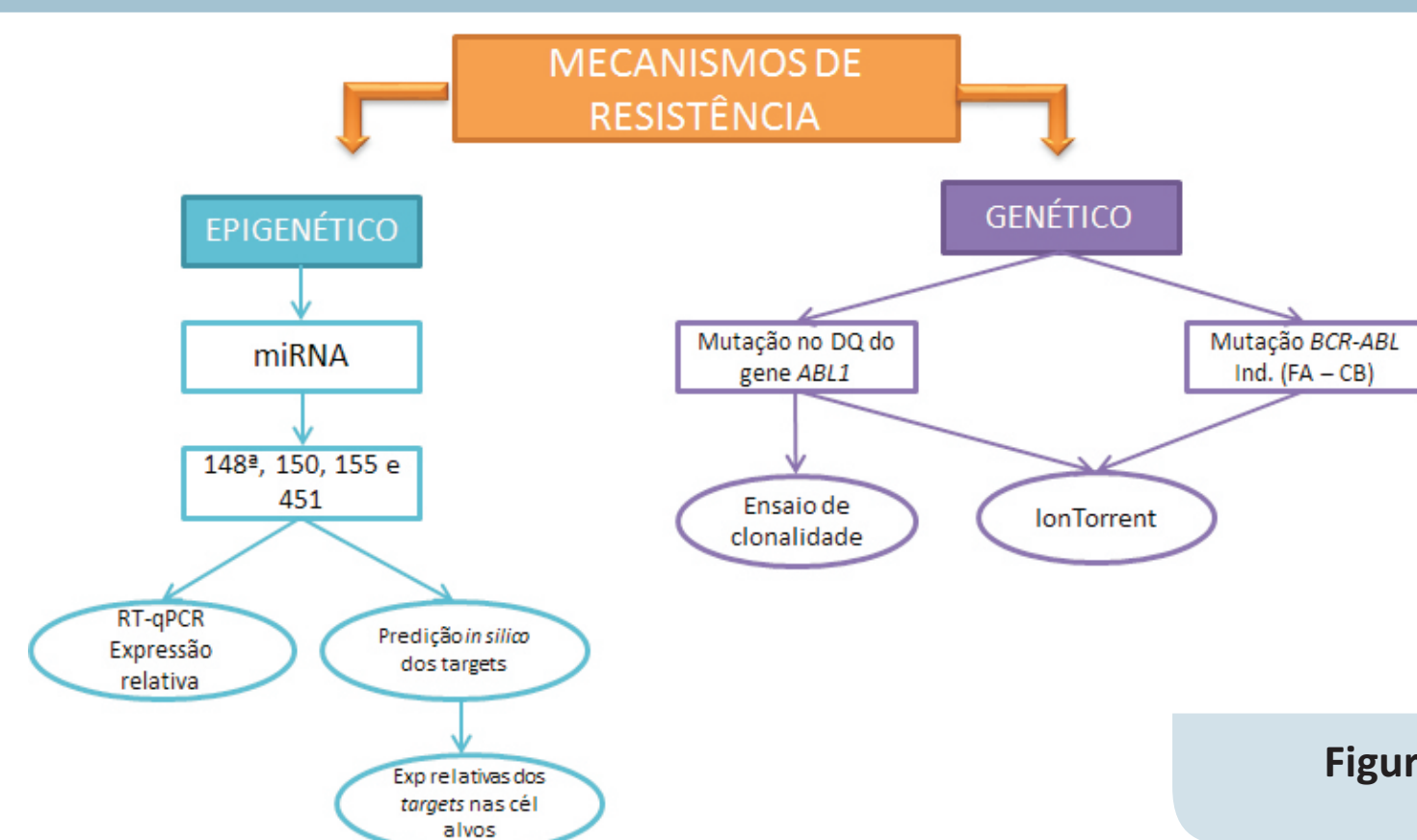


Figura 3: Desenho experimental e metodologia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

LMC na Infância
Tabela I: Characteristics associated with complete cytogenetic or molecular response

Characteristics	CCyR N (%)	P value	MMR N (%)	P value
Gender				
Female	8 (56,7)	0,10	10 (83,3)	1,00
Male	9 (100,0)		7 (77,8)	
Age at diagnosis				
≤ 12 y	9 (81,8)	1,00	9 (81,8)	1,00
> 12 y	8 (80,0)		8 (80,0)	
Sokal Risk				
low	15 (78,9)	1,00	15 (78,9)	1,00
intermediate	2 (100,0)		2 (100,0)	
Time between diagnosis and the initiation of therapy				
< 2,2 months	7 (70,0)	0,58	9 (90,0)	0,58
≥ 2,2 months	9 (90,0)		7 (70,0)	
First line treatment				
Imatinib	12 (80,0)	1,00	4 (66,7)	0,54
Interferon	5 (83,3)		13 (86,7)	
Cytogenetic response				
Complete	-	-	14 (82,4)	1,00
Not complete	-	-	3 (75,0)	
Disease progression				
Yes	0 (0)	0,05	1 (50,0)	0,35
No	17 (89,5)		16 (84,2)	
Adverse events*				
Yes	5 (62,5)	0,25	4 (50,0)	0,01
No	12 (92,3)		13 (100,0)	

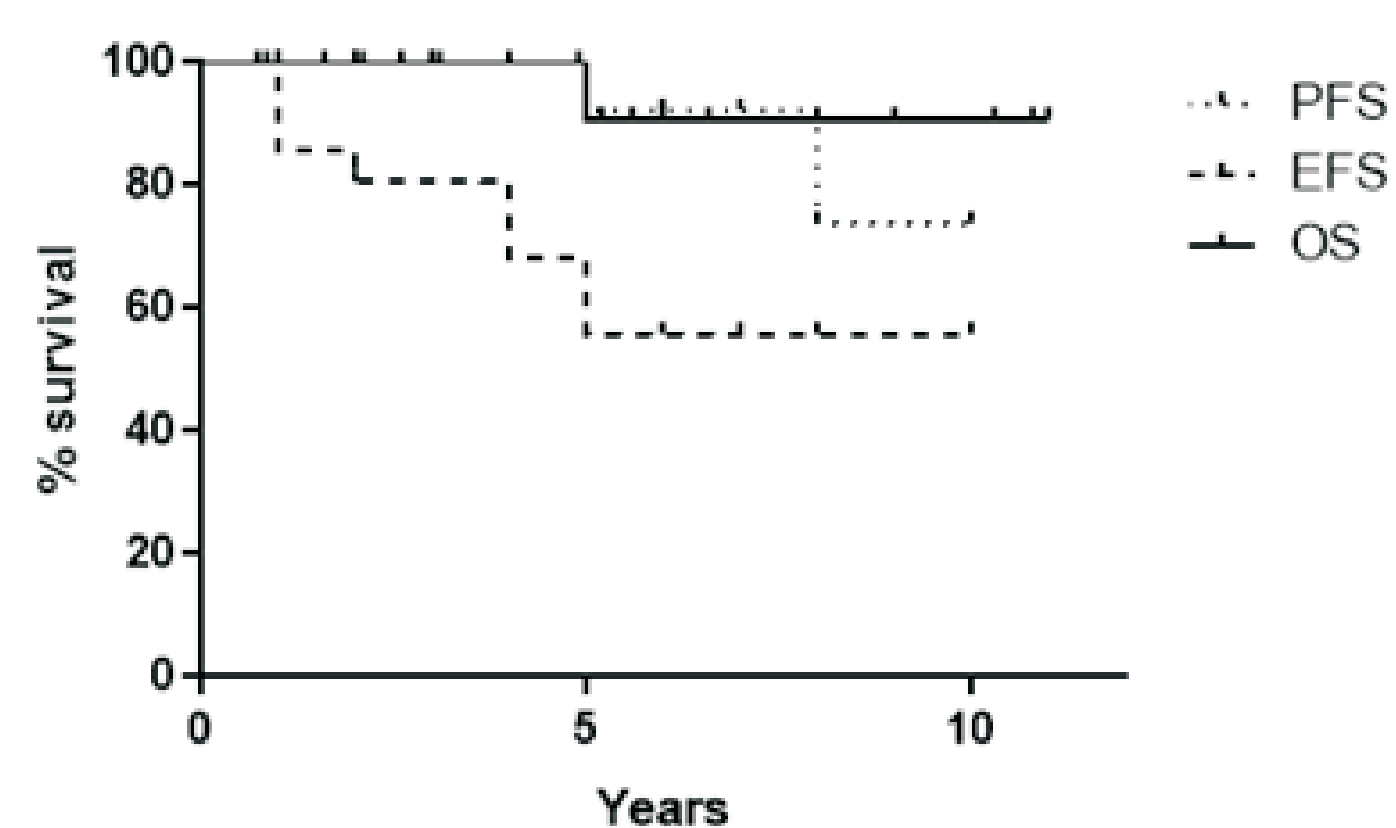


Figura 4: Sobrevivência Livre de Progressão, Sobrevivência Livre de Evento e Sobrevivência Global nos pacientes com LMC na infância.

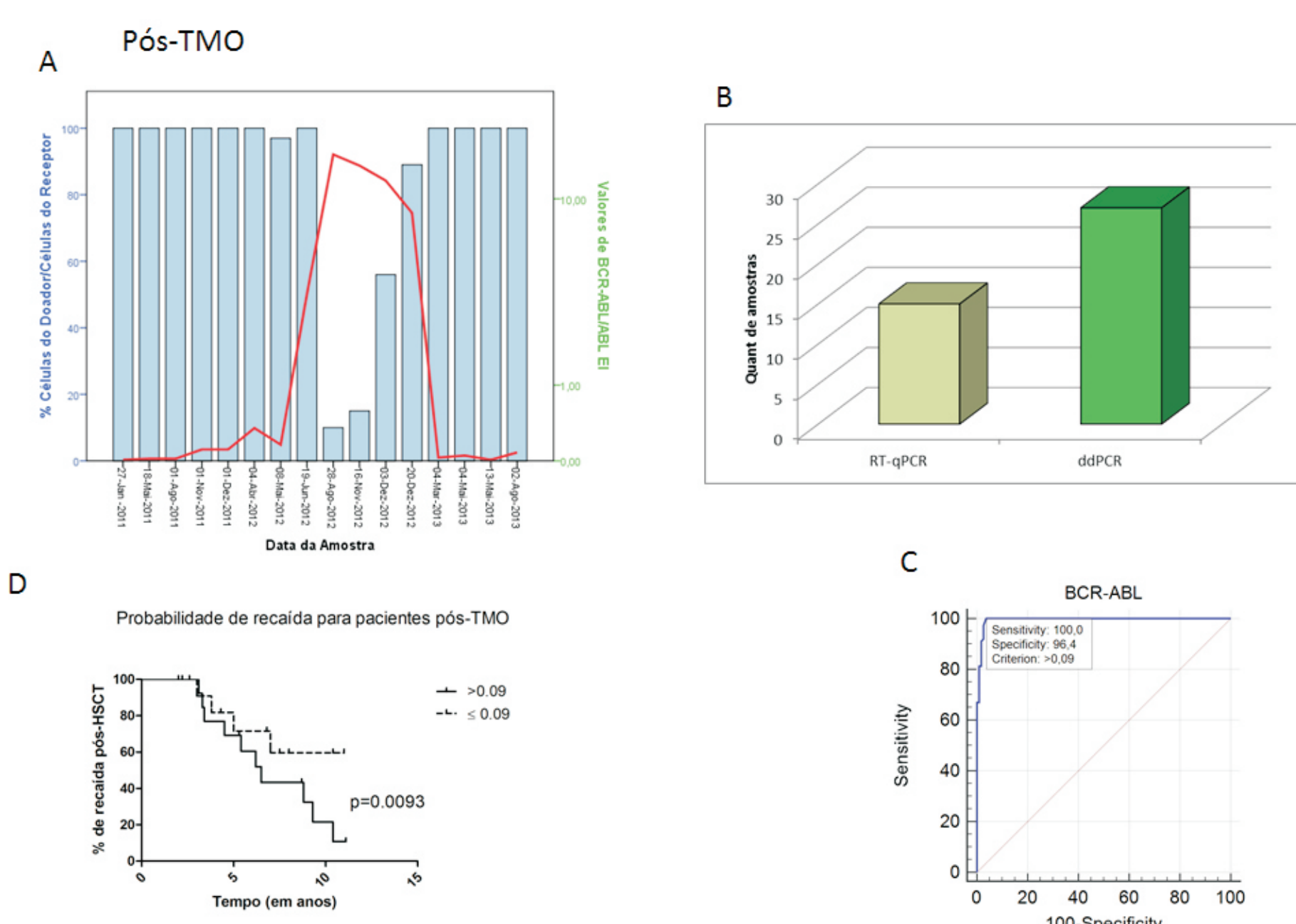


Figura 5: A) Demonstração de um paciente que recaiu ao transplante, em que as barras representam a quantidade de células de um doador após o transplante, mostrando se este está com quimerismo total ou misto, enquanto que as linhas representam os níveis de BCR-ABL. O quanto antes pudermos prever a recaída deste paciente, mais cedo o médico poderá intervir, logo menor a chance de recaída. Pelo gráfico podemos observar que os níveis de BCR-ABL começam a subir antes de ser observada uma redução na quantidade de células do doador. B) Por PCR digital, metodologia mais sensível do que RT-qPCR, pode-se observar que níveis detectáveis do transcrito onde antes era indetectável. C) Pela curva ROC com index de Younder, pode-se chegar ao valor de 0,09%BCR-ABL⁺, ou seja, para valores maiores do que 0,09 em pacientes pós-transplante, foi observado uma maior probabilidade de recaída D.

Das 607 amostras analisadas: 145 (+) 23,89%

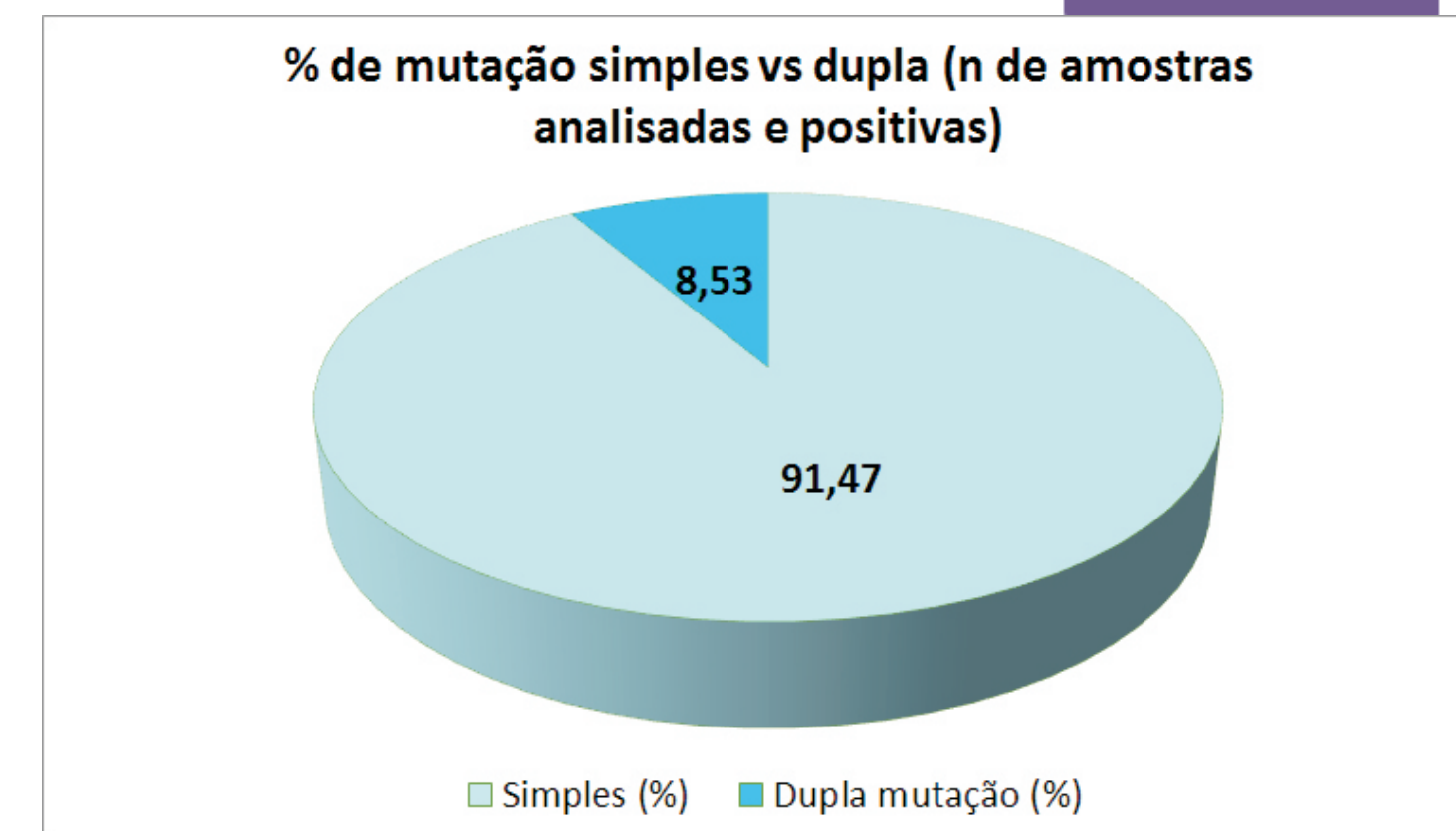


Figura 6: Frequência de pacientes com mutação composta em nossa coorte.

7 pts – 2 amostras ruins - 5 pacientes

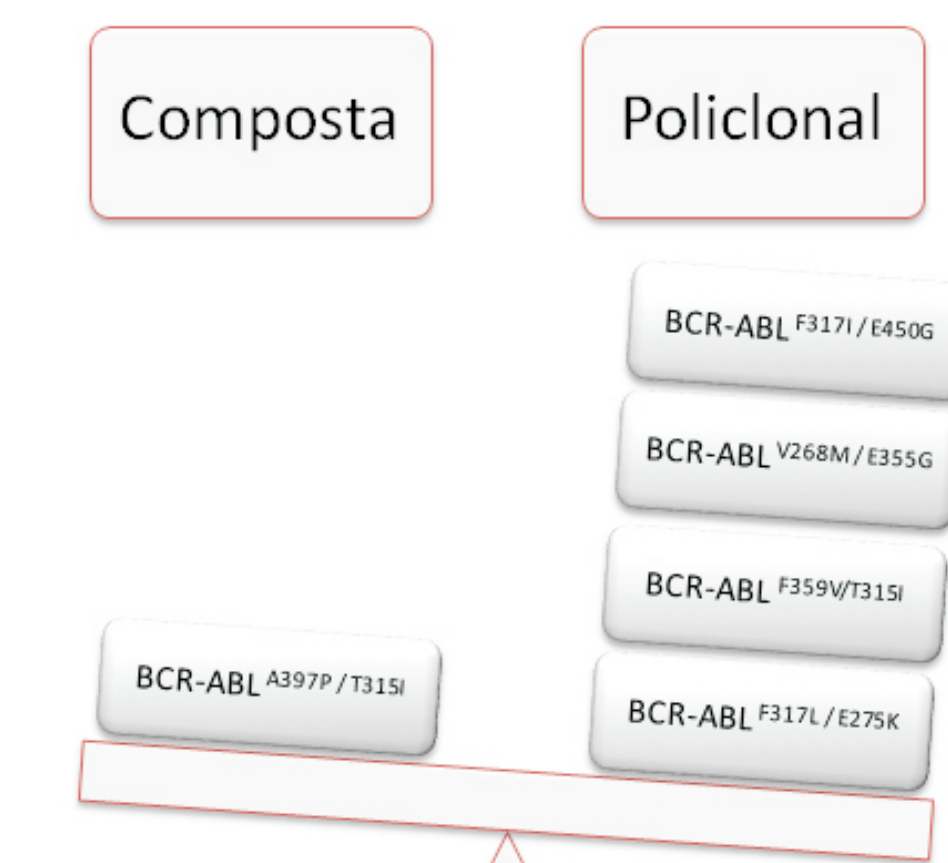


Figura 8: Frequência das mutações duplas classificadas entre compostas ou policlonais.

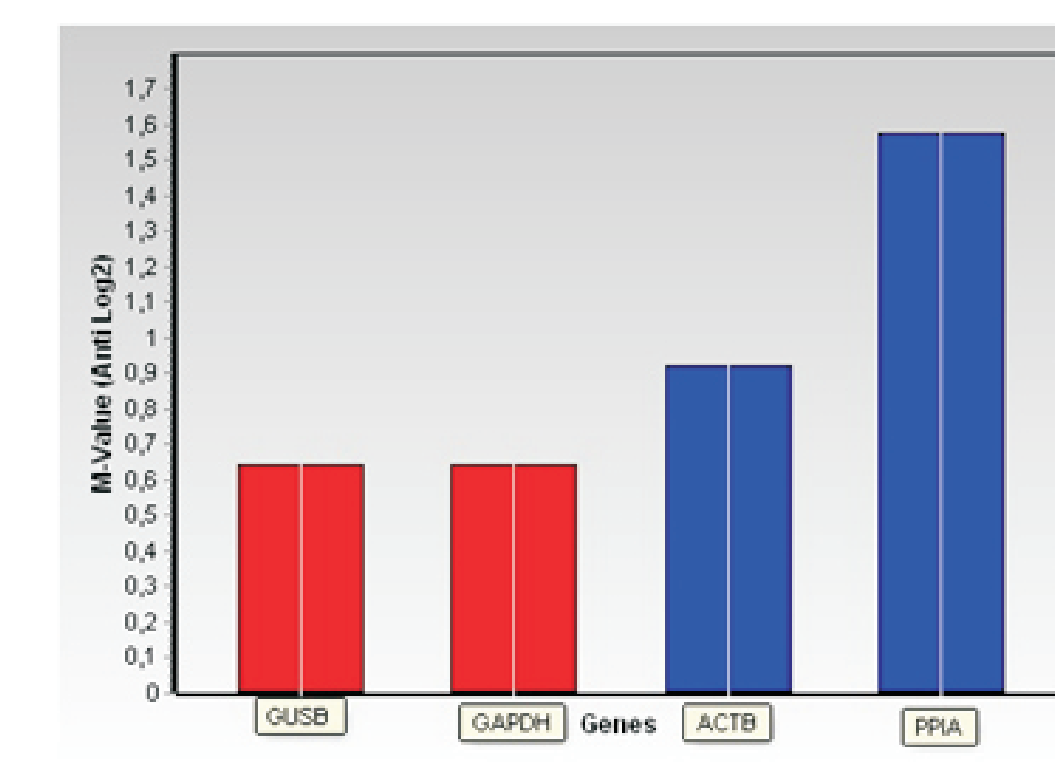


Figura 10: escolha do gene controle para avaliar os targets dos miRNAs selecionados.

Mutações mais frequentes em nosso banco de dados

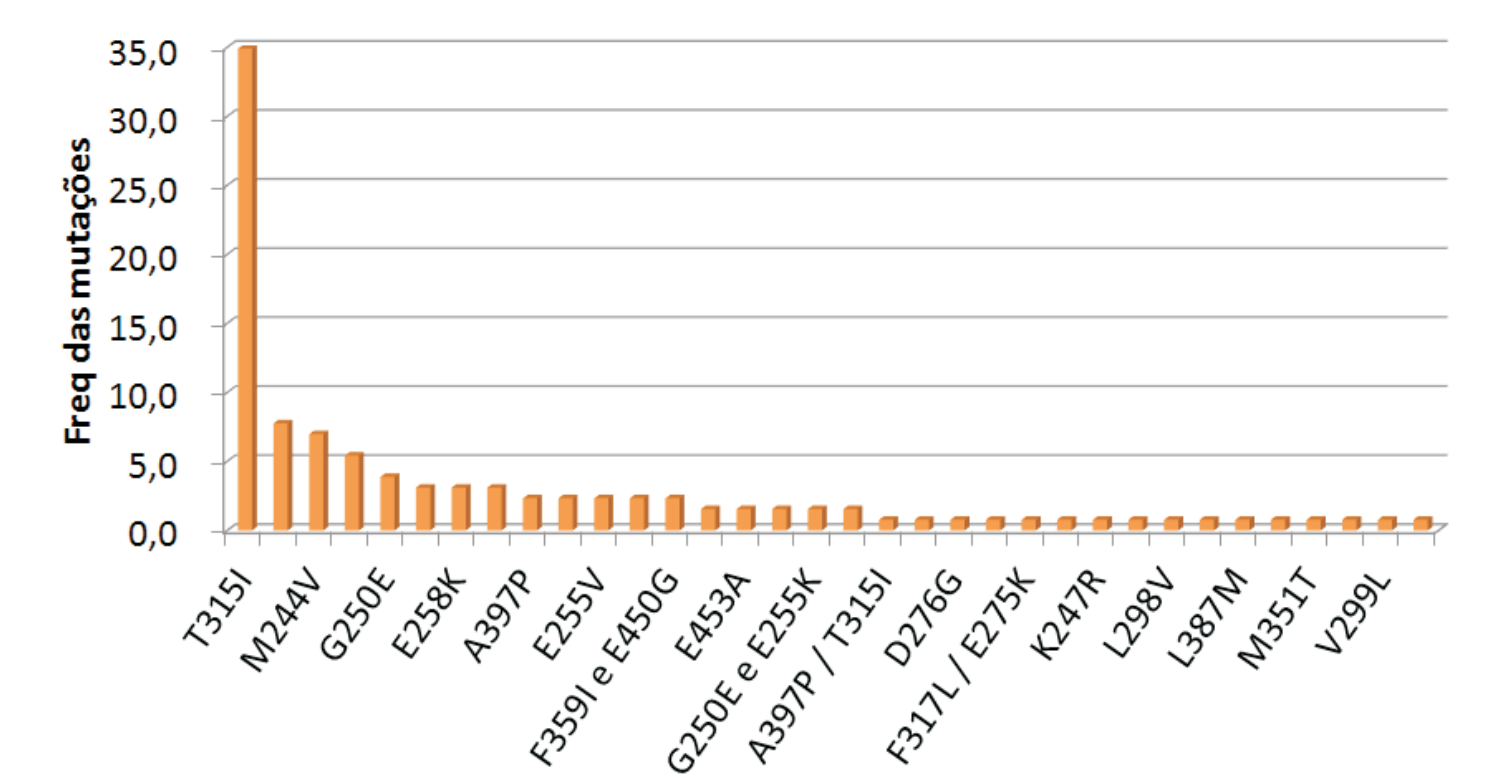


Figura 7: Mutação simples mais frequentes em nossa coorte de pacientes.

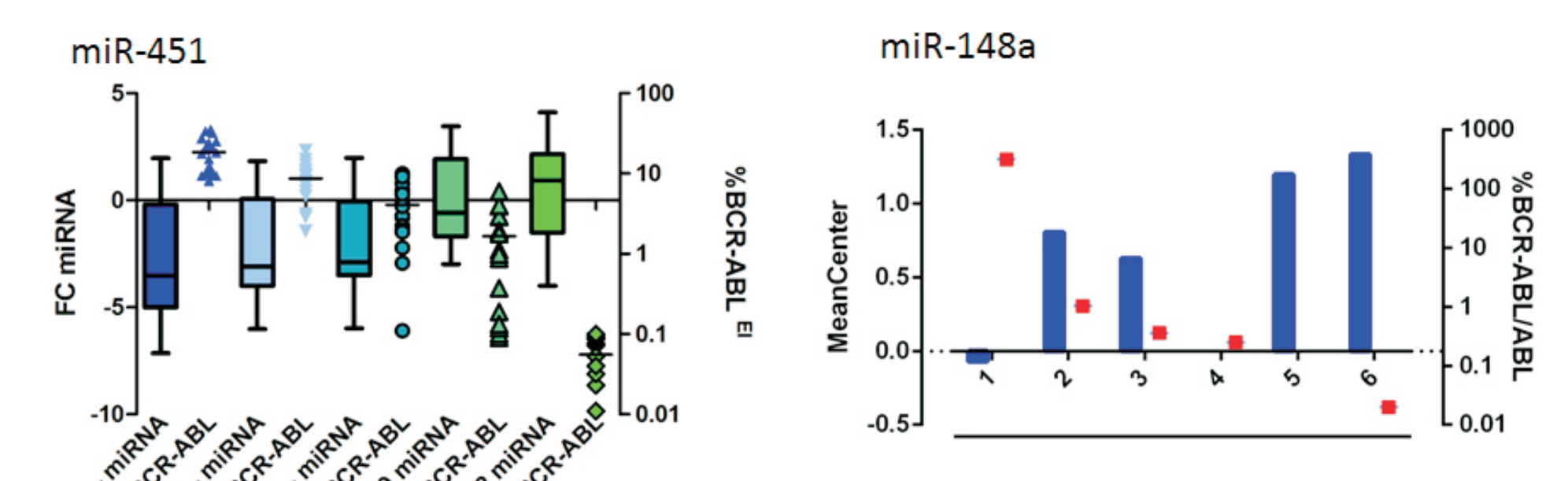


Figura 9: A) Expressão relativa do miR451 e expressão absoluta dos níveis dos transcritos de BCR-ABL; B) As barras em azul representam a expressão relativa do miR148a e os quadrados vermelhos, os níveis absolutos dos transcritos de BCR-ABL.

SHP-1 – Target do miR148a

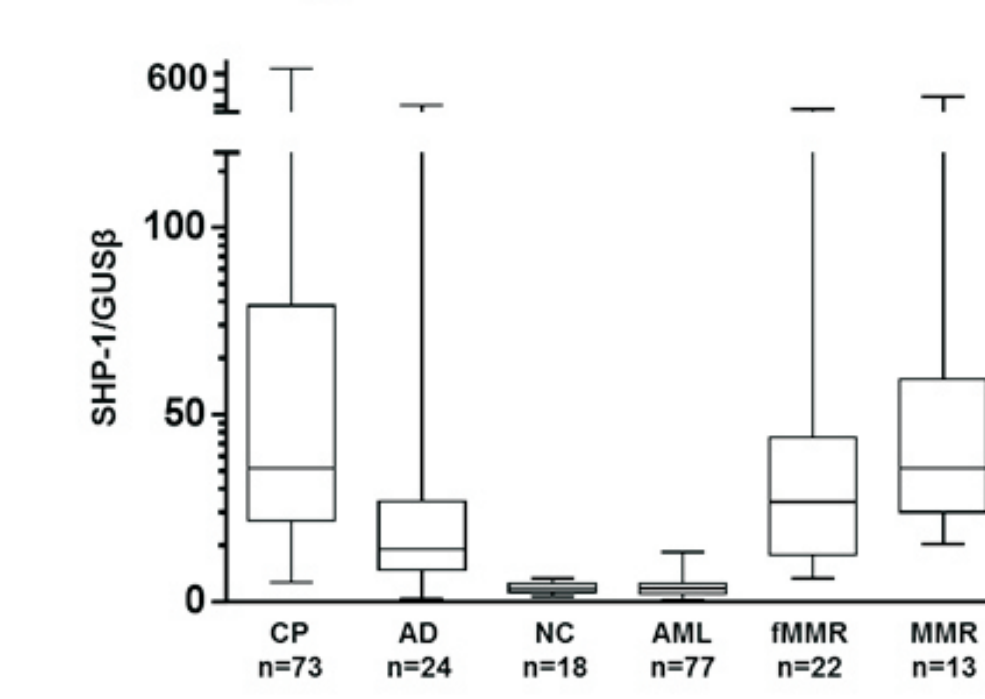


Figura 11: A) Análise de expressão de SHP-1 em pacientes em fase crônica, avançada, sem a doença, com LMA, que falharam na LMC e que atingiram a RMM; B) Níveis de SHP-1 no momento de aceleração da doença.

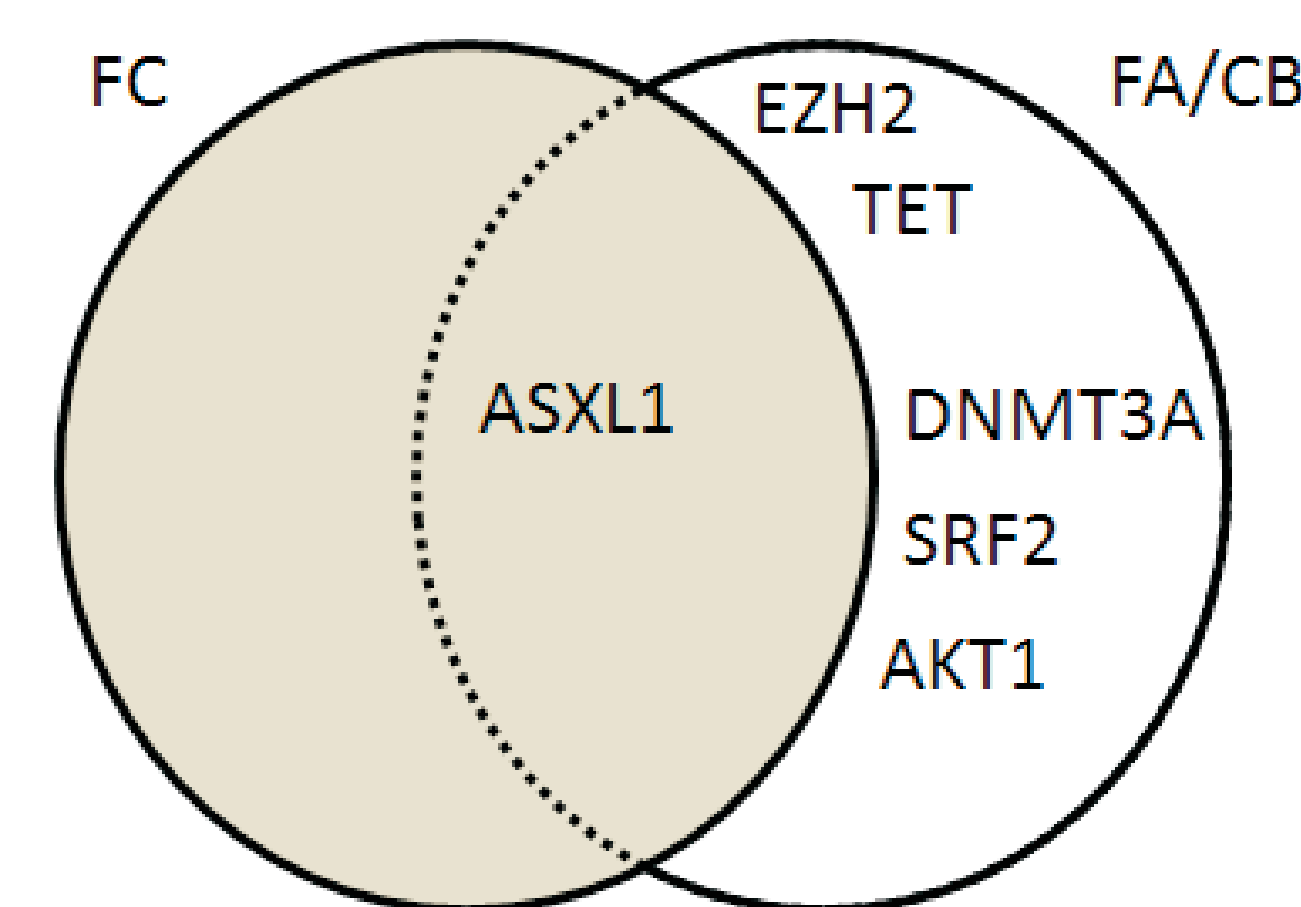
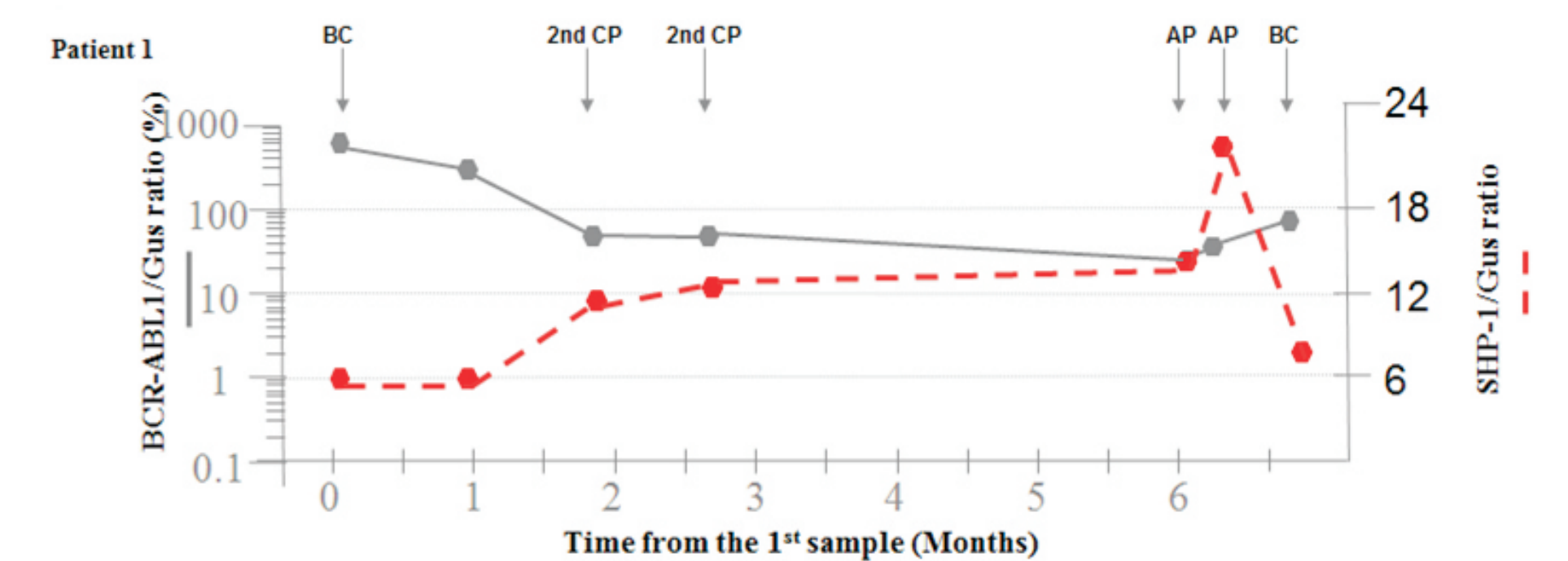


Figura 9: Mutações presentes nas amostras de pacientes em FC que evoluíram para FA e CB respectivamente. Análises preliminares.

CONCLUSÃO

O papel de genes relacionados à Epigenética, assim como miRNAs parecem promissores para elucidar os mecanismos de resistência na LMC. O estudo das células-tronco leucêmica nesta neoplasia também são promissores, visto que as terapias atuais não são capazes de mata-las, por isso, pretendemos avaliar, a expressão do miRNA nas células tronco leucêmicas e compará-las com as células-tronco hematopoiética não leucêmica, ou seja, sua contrapartida normal de um mesmo paciente.

APOIO: FAPERJ, CNPq, INCT para o controle do câncer.

Projeto Gráfico: Serviço de Edição e Informação Técnico-Científica / INCA