



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO PROFISSIONAL EM ANÁLISES CLÍNICAS

**EXPRESSÃO DO GENE *ATP CITRATO LIASE (ACLY)* COMO INDICADOR
DE ERITROTOPOESE E RESPOSTA AO TRATAMENTO COM MESILATO
DE IMATINIBE EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA**

ANDREZA LOPES MAIA

Belém-Pará
2014

ANDREZA LOPES MAIA

EXPRESSÃO DO GENE *ATP CITRATO LIASE (ACLY)* COMO INDICADOR DE ERITROTOPOESE E RESPOSTA AO TRATAMENTO COM MESILATO DE IMATINIBE EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

Artigo apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas Profissional da Universidade Federal do Pará para obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas profissional.

Orientador: José Alexandre Rodrigues de Lemos

Belém-Pará
2014

ANDREZA LOPES MAIA

EXPRESSÃO DO GENE *ATP CITRATO LIASE (ACLY)* COMO INDICADOR DE ERITROTOPOESE E RESPOSTA AO TRATAMENTO COM MESILATO DE IMATINIBE EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

Artigo apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas Profissional, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas Profissional, conforme o Art.63 do Regimento interno, o Trabalho de Conclusão de Mestrado, o qual pode ser apresentado no formato tradicional de dissertação ou outros formatos, conforme o Artigo Terceiro da Portaria Normativa No.7 de 22 de junho de 2009 do Ministério da Educação, que dispõe sobre o Mestrado Profissional.

Formato escolhido: Artigo

Corpo Editorial

Revista: International Journal of Laboratory Hematology

Editor: Szu-Hee Lee

Fator de Impacto: 1.87

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2013: 50/68 (Hematology)

Online ISSN: 1751-553X

Orientador: Prof^o. Dr. José Alexandre Rodrigues de Lemos
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

Banca Examinadora: Prof^o. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

Prof^a. Dra. Caroline Aquino Moreira Nunes
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

Prof^o. Dr. André Salim Khayat
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

Prof^o. Prof. Dr. José Ricardo dos Santos Vieira
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA
(Suplente)

Belém, 07 de abril de 2015

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,
Antônio Carlos e Marta Lopes, que
com a ajuda de Deus me
ensinaram e me incentivaram a
percorrer esta trajetória.

AGRADECIMENTO

Mais uma etapa de minha vida é concluída com sucesso, mais um passo foi dado em busca de um sonho, um ideal. Fazer e escrever uma pesquisa para desenvolver o Mestrado foi para mim como se estivesse brincando de ser pesquisadora. Envolvida em um mundo de perguntas em busca de várias respostas, parecia uma tarefa interminável e enigmática. Contudo foi um momento de muito amadurecimento acadêmico, experiências e superações. Sozinha eu jamais teria alcançado essa realização.

Diante disto gostaria de agradecer a Deus, pois no evangelho de João, capítulo 15, versículo 5 diz: “[...] **Sem mim, nada podereis fazer**”. Verdadeiramente Ele me acompanhou e protegeu em cada momento desta caminhada, concedendo-me a oportunidade de conhecer lugares e pessoas que vieram me proporcionar experiências e sabedoria, na qual foram essenciais para meu amadurecimento no decorrer desta trajetória.

A meus pais, Antônio Carlos e Marta Lopes, muito obrigada pelo amor, apoio, confiança e motivação. As cobranças foram essenciais e colaboraram para que eu percebesse o quanto vocês estão incentivando, torcendo e acreditando na realização dos meus projetos de vida.

A saudade e as preocupações com meus irmãos, que residem em outra localidade, quase me fizeram sair do foco, pois eram muitas conversas eletrônicas com o intuito de manter os laços familiares sempre atualizados. Andrey e Rodrigo Maia, vocês são os melhores irmãos do mundo, obrigada pelo carinho e amizade. A distância apenas contribuiu para valorizarmos mais uns aos outros e assim torcermos juntos pelas nossas realizações.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. José Alexandre Rodrigues de Lemos, pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa sob sua orientação e apoio. Muito obrigada pela liberdade de atuar na sua área de pesquisa, isso me proporcionou uma gama de aprendizado. Sob sua orientação consegui aflorar meu espírito crítico em relação as

pesquisas científicas e expor minhas hipóteses. Tenha certeza que você contribuiu muito com meu aprendizado, não apenas na vida acadêmica mas também com lições de vida. Nossas conversas não precisaram ser longas, pequenas horas da manhã foram suficientes para me impulsionar em construir uma carreira profissional, não apenas como algo único e isolado, mas para complementar e me dar estabilidade diante das várias áreas da minha vida. Tudo que aprendi, repassarei da forma mais simples e objetiva, para que o conhecimento no qual adquiri ajude a enriquecer o aprendizado e o amadurecimento de outras pessoas.

Não poderia deixar de agradecer a colaboração dos meus amigos da Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (HEMOPA). Obrigada por me receberem na Fundação e por fazerem das minhas manhãs, momentos inigualáveis, repletos de risos e aprendizados. Aprendi com vocês que conhecimento gera conhecimento, por esse motivo devemos compartilhar o nosso aprendizado e colaborar com o crescimento uns dos outros, desta maneira alcançaremos juntos o objetivo de um pesquisador: A colaboração para o avanço dos serviços de saúde. Mauricio Koury, Larissa Frances, Carlos Eduardo, Jairo, Renata, Angela, Iago e Thais sou muito grata a vocês. Se minha vida pudesse ser comparada a uma construção, vocês seriam um tijolo de suma importância.

Camila, Adriane, Monique e Thyanne foi muito bom estar envolvida no mesmo projeto de pesquisa que vocês. O carinho, a amizade, as risadas e as brincadeiras me deram forças para equilibrar os momentos de tensão que tive no decorrer da realização deste trabalho.

As amigas inseparáveis, as melhores das melhores, as mais lindas e compreensíveis, Débora Souza, Danielly Castro e Fernanda, muito obrigada por fazerem parte da minha vida. Obrigada por compreenderem minha ausência em alguns momentos, por não desistirem de mim, por morrerem de rir comigo, por me atualizarem

das fofocas, por enxugarem as minhas lágrimas e por dizerem que eu sou a melhor! Como amigas e profissionais da mesma área foi uma honra ter vocês na arquibancada torcendo pelo meu desempenho!

Uma trajetória tão trabalhosa, não seria percorrida sem ajuda de oração dos nossos irmãos em Cristo. A toda Igreja do Evangelho Quadrangular – Sede 2ª Região de Marituba, em especial aos pastores, supervisores e líderes, muito obrigada pelas orações elas foram indispensáveis para que Deus me desse força e fé para acreditar que as promessas iriam se cumprir na minha vida.

Muitas foram as promessas que Deus Cumpriu em minha vida durante estes últimos anos, me fez passar em 2º Lugar neste mestrado de Análises Clínicas Profissional, me deu forças e motivação para desenvolver minha pesquisa e colocou uma pessoa maravilhosa ao meu lado para me auxiliar a finalizar essa pós graduação com imensa felicidade e satisfação. Fabio Martins Queiroz, Deus colocou você no momento certo da minha vida. Obrigada por me incentivar e por estar ao meu lado, isso já é o suficiente para demonstrar o quanto você, desde já está preocupado e torcendo pelo meu crescimento pessoal. Saiba que o meu crescimento será o seu crescimento, pois se Deus quiser e permitir estremos juntos o resto de nossas vidas. Te amo!

Logo, agradeço a todos que fazem parte, direta ou indiretamente, da minha vida! Sozinha eu não teria conseguido, me faltaria forças, coragem, motivação e alegria. Eu correria o risco de tornar toda minha pesquisa sem graça, ou derrepente levaria ela de qualquer jeito, ou me acomodaria, mas vocês colaboraram para que nada disso acontecesse e assim estou aqui para dividir com vocês esta alegria e apresentar a pesquisa na qual vocês contribuíram.

EXPRESSÃO DO GENE *ATP CITRATO LIASE (ACLY)* COMO INDICADOR DE ERITROTOPOESE E RESPOSTA AO TRATAMENTO COM MESILATO DE IMATINIBE EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

ANDREZA LOPES MAIA*^{1,2}

A.L.MAIA

*Autor Correspondente

e-mail: andreza_maia@ymail.com

IAGO BARROSO RAMOS^{1,2}

I.B.RAMOS

e-mail: iago.b.ramos@gmail.com

CAMILA DA SILVA SARMENTO¹

C.S.SARMENTO

e-mail: camila.s.sarmento@gmail.com

JAIRO ALGUSTO AMERICO DE CASTRO²

J.A.A.CASTRO

Email: jairoaacaastro@gmail.com

CAROLINE AQUINO MOREIRA-NUNES^{1,3}

C.A.MOREIRA-NUNES

e-mail: carolfam@gmail.com

JOSÉ ALEXANDRE RODRIGUES DE LEMOS^{1,2}

J.A.R.LEMOS

e-mail: jose.alexandre@icould.br

¹UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Rua Augusto Corrêa, 01 - Guamá. CEP 66075-110.

Caixa postal 479.

Belém - Pará - Brasil

²FUNDAÇÃO CENTRO DE HEMOTERAPIA E HEMATOLOGIA DO PARÁ

Laboratório de biologia celular e molecular

Rua dos Caripunas, 2109 - Batista Campos CEP 66033-000

Belém - Pará - Brasil

³HOSPITAL OPHIR LOYOLA

Av. Magalhães Barata, 992 - São Brás CEP 66060-281

Belém - Pará - Brasil

EXPRESSÃO DO GENE *ATP CITRATO LIASE (ACLY)* COMO INDICADOR DE ERITROTOPOESE E RESPOSTA AO TRATAMENTO COM MESILATO DE IMATINIBE EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

A.L.MAIA^{1,2}, I.B.RAMOS^{1,2}, C.S.SARMENTO¹, J.A.A.CASTRO², C.A.MOREIRA-NUNES^{1,3}, J.A.R.LEMOS^{1,2}

¹UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

²FUNDAÇÃO CENTRO DE HEMOTERAPIA E HEMATOLOGIA DO PARÁ

³HOSPITAL OPHIR LOYOLA

Autor Correspondente: Andreza Lopes Maia, Laboratório de biologia celular e molecular, Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará, Rua dos Caripunas, 2109 - Batista Campos, CEP 66033-000, Belém - Pará - Brasil

RESUMO

INTRODUÇÃO: A Leucemia Mielóide Crônica é uma neoplasia caracterizada pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph). Este possui uma translocação que dá origem ao gene híbrido, cuja proteína é a BCR-ABL. Esta encontra-se envolvida com numerosas vias de transdução de sinais, como a via PI3K/AKT, que por sua vez está ligada a fosforilação da enzima ATP citrato liase (ACLY) envolvida em importantes vias biossintéticas. Diante disso, objetivou-se neste estudo quantificar a expressão do gene *ACLY* em pacientes com LMC tratados com mesilato de imatinibe.

METODOS: Análise da expressão diferencial dos genes *AKT* e *ACLY* em amostras de medula óssea e sangue periférico em grupos de pacientes e controles, através das técnicas de sequenciamento e PCR em Tempo Real, analisando os dados estatísticos no programa BIOSTAT 5.0.

RESULTADOS: A análise do transcriptoma mostrou a diferença de expressão entre os genes nos pacientes e controles, tanto na medula óssea como no sangue periférico. A expressão do *ACLY* em pacientes, na medula óssea, é quatro vezes maior que em controles; no sangue periférico, a proporção é exatamente o inverso. Avaliando o *ACLY* no sangue periférico observou-se que os pacientes em tratamento apresentam um aumento da expressão do *ACLY* em relação aos pacientes que não iniciaram o tratamento com o MI ($p < 0,0001$). Para avaliar a relação entre a resposta ao tratamento dos pacientes e a expressão do *ACLY* realizou-se o teste de regressão ($R^2 = 0.98$) e o teste de correlação revelou

uma forte associação entre a expressão deste gene e no número de eritrócitos (R=0,83).

CONCLUSÃO: O *ACLY* encontra-se envolvido na hematopoese e pode ser um candidato a marcador de resposta ao tratamento com MI em pacientes com LMC.

Palavras-chaves: Leucemia mielóide crônica, ATP citrato liase, Resposta ao tratamento e eritropoese.

INTRODUÇÃO

LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

A produção de células sanguíneas é realizada por um processo altamente organizado chamado de hematopoese. O controle da proliferação, diferenciação e maturação destas células é feito através de uma complexa interação molecular das células com o microambiente da medula óssea. Nos processos neoplásicos, especialmente nos malignos, ocorrem alterações moleculares induzindo as células a um novo comportamento biológico (1).

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma doença neoplásica que se caracteriza por uma desordem clonal mieloproliferativa, originada de uma célula-tronco hematopoiética anormal, que contém o cromossomo Philadelphia (Ph). Este cromossomo, possui o gene híbrido *BCR-ABL* (*Breakpoint Cluster Region-Abelson Leukaemia*) que resulta da translocação recíproca entre regiões dos genes *ABL* (*Ableson Leukemia Virus*) no cromossomo 9 e o *BCR* (*Breakpoint Cluster Region*) no cromossomo 22, designado t(9,22)(q34, q11) (2). A proteína BCR-ABL, produto deste gene quimérico, é uma tirosina quinase intracelular constitutivamente ativa, a qual estimula nas células leucêmicas vias de transdução de sinal que promovem proliferação celular, supressão de apoptose e adesão celular (3,4).

Sua incidência mundial é de aproximadamente 1 a 2 casos por 100.000 pessoas/ano, sem diferença significativa entre os sexos, representando cerca de 15% das leucemias em adultos. De forma global, apresenta maior incidência na

faixa etária de 50-55 anos; no Brasil, contudo, é diagnosticada mais cedo, na faixa de 40-46 anos, com prevalência anual de 10.125 casos (5).

A doença é inicialmente assintomática, com diagnóstico muitas vezes ao acaso durante exames de rotina; Quando sintomática, pode-se observar fadiga, sudorese, perda de peso, sensação de plenitude abdominal, esplenomegalia, hemorragia, púrpura, leucocitose (com desvio à esquerda e células granulocíticas diferenciadas), anemia e trombocitose (6).

O diagnóstico de LMC é baseado no hemograma total (leucocitose e frequentemente trombocitose, granulócitos imaturos, de metamielócitos a mieloblastos, e basofilia), dependendo também da detecção do cromossomo Ph, e / ou o rearranjo do *BCR-ABL* no sangue periférico ou nas células da medula óssea. Em alguns casos o cromossomo Ph não pode ser detectado e a confirmação é feita por métodos moleculares (6).

Ela é subdividida de acordo com os exames clínicos e laboratoriais em três fases: fase crônica, fase acelerada e fase blástica (Figura 1). Geralmente o diagnóstico se dá na fase crônica, caracterizada por uma grande proliferação clonal de células sanguíneas. Porém, como resultado de uma instabilidade genômica, pode prosseguir para uma fase blástica, que pode ou não ser precedida de uma fase acelerada, tornando-se cada vez resistentes à terapia (3,4,7).

A terapia da LMC está compreendida na escolha entre o tratamento medicamentoso e a terapia celular. Sendo que, configura-se como único

tratamento curativo a terapia celular, através do transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH).

Antes de 2000, já havia o tratamento medicamentoso com hidroxiuréia e interferon, que estabeleciam o controle temporário da doença, mas não alteravam a sua progressão para fases avançadas, obtendo assim uma mediana da sobrevivência variando entre 45-55 meses desde o diagnóstico. Com o reconhecimento do oncogene *BCR-ABL* e de sua proteína correspondente, houve a produção de novas drogas mais específicas. Pois observou-se que a proteína BCR-ABL é ativada quando ligada a um grupo de trifosfato de adenosina (ATP) promovendo a ativação descontrolada de várias vias de crescimento e proliferação celular. As novas drogas antineoplásicas consistiram em moléculas que ocupariam o sítio ativo da proteína impedindo assim a ligação do ATP, impossibilitando a sua ativação. (3,4,7).

Foi então que a partir do ano de 1999, foi divulgada a utilização de uma droga inibidora de tirosina-quinase (ITQ), o Mesilato de Imatinibe (MI), sendo portanto altamente eficaz no tratamento de LMC (3). No entanto, um pequeno grupo de pacientes não responde ao tratamento, sendo necessário recorrer ao uso de outras drogas inibidoras de tirosina quinase, como o dasatinib e nilotinib (5).

Para melhor compreensão da fisiopatologia e diagnóstico da LMC, o monitoramento dos pacientes é feito segundo a resposta clínica, hematológica, citogenética e molecular (8) (Figura 2).

Avaliação da resposta molecular se faz importante para analisar a eficácia terapêutica dos inibidores da tirosina-quinase em LMC, que tem por objetivo obter resposta ótima (9) (Figura 3).

As respostas moleculares são definidos como ótima, intermediária ou sem resposta/ falência, independente do ITQ utilizado na terapia. A resposta ótima está associada a uma boa resposta ao tratamento, sugerindo então manter a mesma terapia. Já os pacientes sem resposta significa que o paciente não está respondendo ao tratamento, logo deve haver uma alteração na terapia para limitar o risco de progressão da doença e morte. Entre estas respostas pode-se obter a intermédia. Está indica a necessidade de uma monitorização mais frequente das características da doença e da resposta ao tratamento para que se possa avaliar o momento certo de mudar a terapia em caso de perda de resposta (10).

O monitoramento da resposta ao tratamento requer hemogramas completo, citogenética molecular e testes ao nível de transcrição do *BCR – ABL*, podendo até obter uma análise mutacional (10,11).

Os fatores de prognósticos mais importantes são os fatores de base (identificados antes do tratamento) e os fatores relacionados a resposta (identificados durante o tratamento). Os principais fatores de base são: a fase em que a doença se apresenta e o risco relativo (RR). Este pode ser calculado através dos índices de *Sokal*, *Hasford* e *EUTOS*, estando relacionado com o risco de progressão e morte nos pacientes em fase crônica precoce e com a resposta à terapêutica(10,12).

METABOLISMO CELULAR NORMAL E TUMORAL

Algumas vias metabólicas são importantes à homeostase energética da célula normal, como glicólise, lipogênese e ciclo do ácido tricarboxílico. Embora estas células utilizem várias fontes de energia (glicogênio, ácidos graxos e aminoácidos) a glicose é a fonte principal ao seu crescimento, pois age como combustível aos processos sintéticos e como fornecedor de substratos, tais como NADPH e Acetil-CoA (13,14).

Através da via glicolítica, a glicose é convertida em piruvato; parte deste é convertido em lactato e a outra parte vai para a mitocôndria. Na matriz mitocondrial, o piruvato é descarboxilado em acetil-CoA e utilizado como substrato para o ciclo do ácido tricarboxílico na mitocôndria, gerando ATP através da fosforilação oxidativa. A acetil-CoA combinada com oxalacetato da origem ao citrato. Este pode ser exportado para o citoplasma e é convertido em acetil-CoA citosólica. A acetil-CoA está envolvida em diversas vias biossintéticas, atuando como substrato essencial à síntese de ácidos graxos e na via do mevalonato para síntese de colesterol; é também presente nas reações de acetilação, tal como a acetilação das histonas (15,16).

As células tumorais possuem um comportamento anormal por reprogramarem várias vias metabólicas. Estas alterações visam aumentar a incorporação e a utilização de nutrientes necessários para cumprir as suas altas exigências energéticas, devido a sua taxa de proliferação celular. Estas células utilizam preferencialmente a glicose em vez da fosforilação oxidativa para

produção de ATP. Diante do papel chave da glicose, surge evidências sobre o envolvimento do metabolismo lipídico em tumores (14).

Esta reprogramação, que causa provavelmente a aceleração da lipogênese, é realizada por alterações genéticas de vários genes metabólicos, e as desregulações de alguns destes genes estão envolvidos diretamente na etapa inicial de transformação, enquanto outros contribuem para manutenção e aceleração maligna do fenótipo. Logo, várias etapas da biossíntese de lipídios têm sido consideradas como metas para o tratamento do câncer, visto que contribuindo tanto para a construção de massa (membrana celular), como para a geração de energia (beta-oxidação), a fim de compensar o aumento da taxa de proliferação (17,18).

Yvan-Charvet e colaboradores (2010) descobriram em seus experimentos, com modelo animal, que as células progenitoras mieloides são normalmente reguladas pelo mecanismo de efluxo do colesterol e que o colesterol de alta densidade (HDL) é capaz de suprimir essas células. (19).

O METABOLISMO CELULAR NA LMC

A proteína ABL está fisiologicamente situada entre o núcleo e citoplasma; no entanto, quando fundido com BCR, a oncoproteína perde esta propriedade e é principalmente retido dentro do citoplasma, onde interage com a maioria das proteínas envolvidas na via oncogênica. Esta oncoproteína está ligada as numerosas vias de transdução de sinal importante para o crescimento celular anormal de células progenitoras mielóide, o que permite um crescimento celular autônomo, que de algum modo contorna a apoptose destas células. Inibidores

das enzimas tirosina-quinase levam a célula maligna a entrar em apoptose, reduzindo assim a proliferação tumoral (2,3).

Embora se saiba muito sobre as interações anormais entre a oncoproteína e outras moléculas citoplasmáticas, as vias reais pelos quais o sinal proliferativo leucemogênico é mediado (RAS-MAP quinase, JAK-STAT, e o PI-3K/Akt) são mal definidas e as suas contribuições relativas para a 'fenótipo' leucemia ainda são desconhecidos (2).

Uma destas vias ativadas é a via PI3K, que por sua vez ativa a quinase AKT que possui muitos substratos reguladores do ciclo, crescimento, metabolismo, e sobrevivência celular. A via de sinalização PI3K/AKT é desregulada em vários tipos de cânceres humanos e é considerado um alvo para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos (20,21).

A ENZIMA ATP CITRATO LIASE

A ATP citrato liase (ACLY) é uma enzima homotetramérica, extra mitocondrial, tendo o gene, *ACLY*, localizado no cromossomo 17q21.2, com peso molecular relativo de 110 KDa (22). Ela é uma enzima citosólica que converte o citrato formado na mitocôndria em acetil-CoA, envolvida em várias vias biossintéticas importantes, incluindo lipogênese e colesterogênese. Possui elevada expressão no fígado e no tecido adiposo branco, porém uma baixa expressão no cérebro, coração, músculos e intestino delgado (15,16).

Sua função consiste em clivar o citrato, no citosol, produzindo assim acetil-CoA citosólica e oxaloacetato, agindo na síntese de ácido graxo e via do

mevalonato, logo está envolvida na biossíntese do colesterol e também nas reações de acetilação (15,16).

O *ACLY* é encontrado superexpresso em células cancerígenas (16). Sua atividade enzimática é fundamental para a manutenção das células-tronco, quando inibida impede a proliferação de alguns tipos de células tumorais, pois diminui a capacidade de converter glicose em lipídios e aumenta o potencial de membrana (17,23).

A via (PI3K) / AKT faz a regulação celular em vários tipos de doenças malignas. Em células tumorais, a fosforilação e ativação da *ACLY* são reguladas diretamente por AKT (24). A AKT também mantém baixo os níveis de mRNA da *ACLY* através da ativação de SREBP-1 (16). A *ACLY* também pode ser fosforilada em locais diferentes e por outras quinases, como o difosfato de nucleosídeo-quinase e AMP cíclico dependentes de quinases (25). Bauer e colaboradores (2005), observaram em seus experimentos que apesar da inibição da *ACLY* tornar a célula mais resistente à morte celular, a ativação do AKT diante desta inibição pode induzir a uma leucemia (17).

A Elevada atividade e expressão da *ACLY* foi encontrada em glioblastomas, tumores de pulmão, próstata, bexiga, mama, fígado, estômago e cólon. Logo, pode estar envolvida na diferenciação e proliferação do tumor (16,24,26).

Devido seu envolvimento com a síntese de ácido graxo e/ou a biossíntese do colesterol, vários inibidores da *ACLY* estão sendo utilizados em estudos para análise do bloqueio funcional da enzima, como o 2,2-difluorocitrato,

benzenesulfonamidas, hidroxicitrato, SB-204990, radicicol e RNA de interferência (RNAi) (15). Este bloqueio resulta na parada do crescimento nas células tumorais. Este efeito antiproliferativo se dá pela parada do ciclo celular e indução de apoptose (16).

O metabolismo de ácido graxo tem um papel importante na hematopoiese. Foi descoberto que o gene *SCD1* (*stearoyl-coenzyme A desaturase*), que codifica a enzima estearoil-CoA-9 desa-saturase envolvida no metabolismo de ácidos graxos, testado em experimentos utilizando animais, se apresentou como um supressor de tumor na leucemogênese. A sua exclusão acelerou o desenvolvimento da LMC. Este gene influencia os níveis de fosforilação da AKT, a qual atua em uma importante via metabólica envolvida na biossíntese de lipídeos, vinculado a enzima ATP citrato liase (ACLY) (27).

Este estudo tem como objetivo validar a expressão do gene *ACLY* em células do sangue periférico em pacientes portadores de leucemia mielóide crônica.

MATERIAIS E METODOS

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO *AKT* E *ACLY* EM CÉLULAS MADURAS DO SANGUE PERIFÉRICO (CD66B+) E CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (CD34+) DA MEDULA ÓSSEA.

Caracterização e coleta das amostras

Para a seleção dos pacientes foram triados dentro do ambulatório de Hematologia do Hospital Ophir Loyola um total de 161 pacientes portadores de

LMC que fazem tratamento com MI e que são monitorados através de PCR em tempo real no laboratório de Biologia Celular e Molecular da Fundação HEMOPA. Após a análise e seleção, amostras de medula óssea (MO) e do sangue periférico (SP) foram obtidos de 4 pacientes com LMC tratados com MI em resposta molecular completa com redução de 4 logs, de acordo com os critérios do *LeukemiaNet* (8) e um indivíduo controle sem leucemia.

Todos os pacientes participantes da pesquisa foram convidados e orientados quanto à importância do projeto e através de assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido concordaram em doar seus materiais biológicos para realização do projeto. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação HEMOPA em 14/08/2008 sob o número 0015.0.324.000-08.

Isolamento das subpopulações de células hematopoiéticas

Células CD34+ foram isoladas da MO dos pacientes com LMC, e também do indivíduo controle usando o kit *EasySep[®] - Human CD34+ Selection Cocktail* (*StemCell Technologies, EUA*). Da mesma forma, células granulocíticas maduras do SP (CD66b+) foram isolados dos mesmos pacientes e controle, usando o kit *EasySep[®] - Human Whole Blood CD66b Selection Kit* (*StemCell Technologies, EUA*).

Análise de Citometria de Fluxo

A avaliação da pureza final das CTHs de medula óssea CD34+ e células granulocíticas maduras CD66b+, foram realizadas por citometria de fluxo. A aquisição e análise dos eventos foi feita com o citômetro *FACSCalibur* (*Becton*

Dickinson, EUA). Como as células foram selecionadas imunomagneticamente, utilizando anticorpos anti-CD34 (QBEND10) ou anti-CD66b (clone BIRMA17), foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CD34 (clone 581) e anti-CD66b (clone G10F5) - BD Biosciences PharMingen - as quais foram analisadas pelo software CellQuest® (*Becton Dickinson, EUA*).

Preparação das amostras e sequenciamento do cDNA

As células isoladas de cada um dos 4 pacientes e do indivíduo controle foram submetidas à extração de RNA total por método magnético com o kit *Charge Switch® Total RNA cell kits (Invitrogen, EUA)*. Foram misturados os RNAs isolados dos 4 pacientes para obtenção de um *pool*.

Em resumo foram construídas 4 bibliotecas de fragmentos para análise, duas para cada condição, conforme a tabela 1.

A biblioteca de fragmentos foi obtida utilizando-se o sólido total do RNA-Seq Kit (*Invitrogen, EUA*). O procedimento global deste kit é baseado na hibridação de adaptadores com extremos degenerados, seguida por transcrição inversa e amplificação por PCR da biblioteca (*Applied Biosystems, 2010*). O sequenciamento massivo do cDNA foi realizado dentro dos parâmetros de análise para o transcriptoma, descrito pelo SOLiD™ System 3 plus (*Applied Biosystems*).

Cada uma das 4 bibliotecas de fragmentos foram sequenciadas duas vezes e as análises foram realizadas em paralelo.

Em cada uma das rodadas de sequenciamento, foram depositadas 90 milhões de *beads* em cada um dos “quads” (poços da lâmina de sequenciamento) correspondente à uma amostra, no total de 180 milhões *beads* depositadas somando-se as duas rodadas para cada amostra.

Bioinformatics analysis

Alinhamento

A montagem do transcriptoma foi feito usando o software *Burrows-Wheeler Aligner* (BWA)(28). Como referência para o alinhamento das bibliotecas sequenciadas foi utilizada a última versão do genoma humano (Hg19/GRCh37) disponibilizado pelo *The Genome Reference Consortium*, presente no banco de dados do NCBI - *The National Center for Biotechnology Information*.

Análise de expressão diferencial e anotação funcional

Para a comparação das bibliotecas e a análise da expressão diferencial dos genes de transporte entre as amostras de medula óssea e sangue periférico, de pacientes e do controle (Tabela 2) foi utilizado o pacote *Cufflinks* - [<http://cufflinks.cbc.umd.edu/>] (28). Reads were assembled into transcripts, their abundance estimated and tests for differential expression and regulation between the tissue samples were performed.

A análise da expressão diferencial foi feita através do pacote presente no *Cufflinks* chamado *Cuffcompare*, juntamente com o arquivo do genoma anotado *reference.GTF* - *Ensembl database* (Homo_sapiens.GRCh37.55.gtf) (29).

O módulo de comparação presente no pacote do programa utiliza os valores do FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped) de cada um dos genes em comum comparados e aplica diversos cálculos estatísticos para gerar assim os valores das comparações entre as amostras. O teste de expressão foi feito ao nível dos transcritos e genes presentes nas amostras, foram considerados genes com diferença de expressão, aqueles que apresentaram um *fold change* de 2x (2 vezes) na relação comparativa, ou seja pelo menos o dobro de expressão de um gene em relação ao outro.

Dos valores obtidos do *fold change* o programa gerou a estatística do valor do p , o qual adotamos como significativas as diferenças de expressão dos genes apresentando valor de $p \leq 0,05$.

Tais genes foram classificados de acordo com as bases do *Gene Ontology database*(29).

VALIDAÇÃO INDIVIDUAL DA EXPRESSÃO DO *ACLY* EM CÉLULAS MADURAS DO SANGUE PERIFÉRICO, COM PCR EM TEMPO REAL

Caracterização e coleta das amostras

A pesquisa foi composta de 160 pacientes diagnosticados como portadores de Leucemia Mielóide Crônica, no Hospital Ophir Loyola (Belém-PA), sendo 150 pacientes tratados regularmente com o mesilato de imatinibe e 10 pacientes de diagnóstico (sem tratamento). Todos regularmente atendidos no Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (HEMOPA) para monitoração

molecular do *BCR-ABL*. Foi utilizado 40 indivíduos normais, não portadores de LMC, como amostras controle.

Coletou-se amostras de sangue periférico venoso (5mL), em tubos com anticoagulante EDTA, encaminhando imediatamente para o Laboratório de Biologia Molecular da Fundação HEMOPA onde foram processadas.

Extração de RNA em sangue total e transcrição reversa (RT-PCR)

O RNA total foi extraído pelo método TRIzol® *Reagent* (Invitrogen, USA), conforme instruções do fabricante e algumas modificações. Em seguida realizou-se a reação de RT-PCR no termociclador *Gene Amp PCR System 9700* (*Applied Biosystems*), com o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (*LifeTech*). Uma mistura de 20 µL contendo os reagentes do kit (10x RT Buffer, 25X dNTP Mix, 10x RT *Random Primers* e *MultiScribe TM Reverse Transcriptase*) e água ultra-pura será preparada de acordo com as instruções protocoladas pelo fabricante. A essa mistura foi adicionado 20 µL do RNA hidratado. O total de 40 µL foi levado ao termociclador seguindo o perfil térmico de duas etapas com 37°C por 60 minutos, 85°C por 5 minutos e finaliza com um resfriamento de 4°C. Ao termino da reação o cDNA foi congeladas no freezer -20°C.

PCR-Tempo real

A reação da PCR em Tempo Real foi realizada utilizando o kit comercial *TaqMan Gene Expression Master Mix + Assay-by-Design®* (*Applied Biosystems*), no equipamento *ABI Prism 7000* (*Applied Biosystems*). Quantificou-se o gene *ABL*, como controle, o *ACLY* e os transcritos *B2A2* e *B3A2*. A reação foi composta de 3 µL de cDNA das amostras, anteriormente preparado, 6,8 µL

de água ultra-pura, 10 µL do master mix e 0,8 µL de Assays (de acordo com o gene alvo), totalizando uma reação de 20 µL para cada amostra e gene. Todas as reações ficaram incubadas a 50 °C durante 2 min, 60 °C durante 30 min e 95 °C durante 10 min, seguido por 50 ciclos de 95 °C durante 15 s e 60 °C durante 1 min.

Análise da expressão gênica

A análise da expressão genica teve como base os valores do *cycle threshold* (CT), no qual é o número do ciclo no nível limiar de captação da fluorescência, sendo, portanto a métrica estatística primária de interesse(30). Os dados foram organizados em uma planilha no Windows Excel (Microsoft®) e calculado de acordo com Lemos e colaboradores (2005) (31), conforme mostrado a seguir:

$$\frac{2^{-CT(\text{Alvo})}}{2^{-CT(\text{Controle})}} \times 10^6$$

A partir dos valores de CT, foi realizado a comparação da expressão gênica entre pacientes e controles, levando em consideração a definição de resposta dos pacientes. A comparação foi realizada estatisticamente através do Teste de *t*, para os resultados que apresentarem distribuição normal e/ou teste Mann Whitney, para os testes que não estiverem dentro da normalidade, no qual será considerado significativos os valores de $p \leq 0,05$. Também foi realizado o teste

de regressão, para avaliar a relação entre o estado do paciente e a expressão do gene *ACLY* e o teste de correlação de Person, para avaliar a associação entre a resposta ao tratamento e o número de eritrócitos, utilizando o programa Biostat 5.0.

RESULTADOS

A análise do transcriptoma mostrou que a expressão dos genes *AKT* e *ACLY* variaram em pacientes e controles, tanto na medula óssea como no sangue periférico. Na medula óssea a expressão do *AKT* e *ACLY* foi de 96 e 117 em pacientes, respectivamente e 59 e 29 em controles. A expressão do *ACLY* em pacientes, na medula óssea, é quatro vezes maior que em controles; no sangue periférico, a proporção é exatamente o inverso. Sendo que esta expressão é de 8 nos pacientes e 33 nos controles (Tabela 3).

Na avaliação do sangue periférico quanto a expressão do *ACLY* observamos que os pacientes e o grupo controle apresentam uma diferença ($p=0,009$). Sendo que os pacientes encontram uma média de expressão diminuída em relação ao grupo controle (4,32 e 5,88), dados que corroboram o transcriptoma.

Os pacientes em tratamento apresentam um aumento da expressão do *ACLY* em relação aos pacientes que não iniciaram o tratamento com o MI ($p<0,0001$), sugerindo então que o fármaco interfere na expressão.

Analisando as médias da expressão do *ACLY* no grupo controle e nos grupos de resposta ao tratamento, observamos que a expressão do *ACLY* nos pacientes que estão em resposta ótima e intermediária são estatisticamente

iguais a do grupo controle, sendo que o valor absoluto da média dos pacientes em resposta ótima está mais próxima a do grupo controle. Já o grupo dos pacientes sem Resposta apresenta diferença de expressão quando comparado com o grupo controle ($p=0,02$) (Tabela 4).

Observou-se que há diferença de expressão entre os pacientes sem tratamento e os pacientes não-responsivos ($p=0,0004$) (Tabela 5).

Para avaliar a relação entre o estado do paciente (resposta ao tratamento) e a expressão do *ACLY* realizou-se o teste de regressão. Neste obteve-se um $R^2 = 0.98$ ($p = 0,05$) (Figura 4). A análise revela forte associação entre a expressão de *ACLY* e no número de eritrócitos ($R=0,83$) (Figura 5).

DISCUSSÃO

As células hematopoiéticas residem principalmente no micro ambiente da medula óssea e este mantém o equilíbrio entre a autorrenovação, proliferação e diferenciação destas células. Nos processos neoplásicos, ocorrem alterações moleculares induzindo as células a um novo comportamento biológico, não sendo diferente estas alterações no microambiente da medula óssea. Logo, são observadas várias alterações metabólicas nas células e no micro ambiente medular, durante um processo neoplásico, como o aumento da lipogênese (1,20,22). Isto pôde ser observado em nossos resultados, visto que o *ACLY*, gene que produz uma enzima chave da lipogênese, se encontrou quatro vezes mais expresso na medula de pacientes com LMC quando comparado com indivíduos normais. A elevação da expressão e atividade do *ACLY* também tem

sido relatada em vários tipos de cânceres, pulmão, mama, estomago, ovário, próstata, coloretal e glioblastomas (24,26,32–34).

Em vários tipos de doenças malignas a via PI3K/AKT tem sido mostrada como um regulador crítico para a sobrevivência celular . Em células neoplásicas, a fosforilação e ativação de *ACLY* podem ser reguladas diretamente pela *AKT* (16,25,35). Portanto tendo uma expressão mais elevada de *ACLY* espera-se que o *AKT* também possua uma expressão elevada; este foi o exato resultado observado em nossos experimentos, com o *AKT* apresentando elevada expressão na medula óssea de pacientes com LMC. Porém este aumento de expressão não é na mesma proporção do *ACLY*, sugerindo que este também sofra influência na sua ativação e fosforilação por outras outras quinases.

No sangue periférico observamos o comportamento desses genes de maneira diferente do que encontramos na medula óssea, pois no sangue periférico dos pacientes encontramos uma baixa quantidade quando comparados com os dados de medula óssea. Isto pode ser explicado por Pessetto e colaboradores (2014) no qual sugeriram em seus experimentos que o tratamento com mesilato de imatinibe inibe a sinalização da via PI3K/AKT e induz danos ao DNA (36). A inibição desta via como estratégia genética e farmacológica causará a redução da atividade do *ACLY*, conseqüentemente inibe significativamente a proliferação celular do tumor podendo até suprimir o seu crescimento (22,26). Boren e colaboradores (37) sugeriram que o tratamento com imatinibe pode restringir a síntese de novo ácidos graxo e ácido nucleico por indução de queda da atividade de hexocinase e desidrogenase-glucose-6-

fosfato alterando via de fluxo de carbono no ciclo das pentoses em tumor mielóide. O que também corrobora nossos resultados.

Porém algo contraditório foi observado quando analisado os grupos de resposta ao tratamento. Os pacientes sem tratamento com MI apresentam a expressão mais diminuída do que os pacientes que já iniciaram o uso da droga, sendo que alguns destes pacientes já faziam o uso do interferon e hidroxiureia. Detectamos que o aumento da expressão do *ACLY* no sangue periférico ocorre a partir do uso do MI.

Este aumento de expressão, que provavelmente está sendo induzido pelo uso do fármaco, está vinculado com a melhora do paciente. Logo em nosso experimento verificamos a baixa expressão deste gene correlacionada com a fase inicial da doença e pacientes sem resposta ao tratamento e a alta expressão com respostas ótimas e controles. O aumento da expressão ocorrerá com o uso do MI, mas os aumentos acentuados é que corresponderão as boas respostas e revelarão a relação de dependência entre a expressão do gene *ACLY* e boa resposta terapêutica. Este achado faz do gene *ACLY* um candidato a indicador de resposta.

A variação da expressão do *ACLY* encontrada nos diferentes tipos de respostas ao tratamento se assemelha aos trabalhos de Migita e colaboradores (2008), que observarão nos seus experimentos com linhagem de células de adenocarcinomas de pulmão, a superexpressão do *ACLY* correlacionado com o estágio, o grau de diferenciação do tumor e pior prognóstico, propondo que o *ACLY* poderia ser um marcador útil para identificação do estágio do tumor (24).

Dado semelhante foi encontrado por Jim e colaboradores (2014) acharam uma associação entre o SNP rs9912300 no gene *ACLY* com a redução da sobrevida global dos pacientes com câncer de pulmão (32). Neste trabalho, por se tratar de amostras clínicas de sangue e não linhagem celular, poderia justificar a inversão no comportamento deste gene, encontrando em nossos resultados a baixa expressão deste correlacionada com a fase inicial da doença e pacientes sem resposta ao tratamento e a alta expressão com respostas ótimas. Mesmo paciente sem resposta ao tratamento com MI apresentam elevação da expressão do *ACLY*, o que pode ser justificado pela influência do MI sobre outras vias; além disso, a expressão observada para pacientes sem resposta é inferior as demais categorias submetidas ao MI.

Os resultados também revelam o aumento e estabilização do número de eritrócitos nos pacientes tratados com MI. Os inibidores de tirosina quinase BCR-ABL induzem a diferenciação eritróide. Essa diferenciação foi observada na linhagem celular K562 de LMC, tanto com a administração do MI como do Radicicol, um inibidor de *ACLY* (38,39). Zaide e colaboradores (2012) através da inibição do *ACLY* nesta mesma linhagem celular obtiveram a diferenciação celular (16). Em vivo, foi observado no presente estudo que a inibição do *ACLY* provavelmente ocorre por uma diminuição do espaço físico causada pela linhagem granulocítica que se expande na LMC. Sendo assim quando o paciente apresenta uma boa resposta ao tratamento o número de células leucêmicas diminui, então começa a haver espaço físico para os eritrócitos. Os resultados demonstraram que o aumento do número de eritrócitos está relacionado com o aumento da expressão do *ACLY*.

Alguns pesquisadores relatam que o MI induz um controle favorável, não apenas do crescimento e diferenciação celular, mas também sobre a homeostase de lipoproteínas, colesterol, triglicerídeos e glicose (40). Pacientes com LMC que apresentavam elevadas taxas tanto de colesterol como de triglicerídeos, após serem tratados com MI obtiveram a normalização destas moléculas (41). O *ACLY* atua diretamente nas vias da lipogênese e colesterogênese, logo sua expressão elevada contribui consequentemente com o aumento do colesterol e triglicerídeos(15,16). Nossos pacientes apresentaram elevação da expressão do *ACLY* no decorrer da resposta ao tratamento, porém com certeza não obtiveram taxas elevadas das moléculas já citadas, pois sua elevação foi tendenciando a uma taxa de expressão normal e com certeza as taxas destas moléculas foram estabilizadas em níveis normais com auxílio do MI.

Diante disso concluímos que o *ACLY* encontra-se envolvido na hematopoese e pode ser um candidato a marcador de resposta ao tratamento com MI em pacientes com LMC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Definições de Fases da LMC de acordo com a Organização Mundial de Saúde (Baccarani et al., 2013).

FASE CRÔNICA	FASE ACELERADA	FASE BLÁSTICA
<p>< 10% de blasto no sangue ou na medula óssea < 20% de basófilos no sangue ou na medula Evolução clonal ao diagnóstico</p>	<p>10 a 19% de blastos no sangue ou na medula óssea; 20% de basófilos no sangue; Trombocitopenia persistente (<100 x 10⁹/L) relacionado a terapia; Trombocitose (>100 x 10⁹/L) não responsivo a terapia; Esplenomegalia e aumento de leucócitos;</p>	<p>>20% de blastos no sangue ou na medula óssea; Grandes aglomerados de blastos na biópsia de medula óssea Doença extramedular</p>

Figura 2: Definições de resposta (Baccarani, 2009)

Resposta Hematológica	Resposta Citogenética (em no mínimo 20 metáfases)	Resposta Molecular (PCR quantitativo em sangue periférico)
<p>Leucócitos <10.000/mm³ Basófilos <5%, no sangue periférico. Plaqueta <140.00/mm³ Ausência de células imaturas no sangue periférico</p>	<p>Completa: 0% Ph+ Parcial: 1%-35% Ph+ Menor: 36%-65% Ph+ Mínima: 66%-95% Ph+ Ausência: >95% Ph+</p>	<p>Completa: transcrito BCR-ABL indetectável Maior: redução > 3 log, conforme escala internacional de m RNA do BCR-ABL (BCR-ABL/ABL < ou = a 0,1%) Incompleta: relação BCR-ABL/ABL > 0,1%</p>

Figura 3: Definição da resposta molecular ao ITK (qualquer ITK) como primeira linha de tratamento (BACCARANI et al, 2013).

Tempo após início do tratamento	Resposta Ótima	Resposta Intermediária	Falência
3 meses	BCR-ABL1 <10% e/ou Ph<35%	BCR-ABL1 >10%	Sem qualquer resposta Hematológica e/ou Ph > 95%
6 meses	BCR-ABL1 <1% e/ou Ph+ 0	Menos que RCitP e/ou Ph+ 36 - 95%	BCR-ABL1 >10% e/ou Ph1 >35%
12 meses	BCR-ABL <0.01%	BCR-ABL1 1-10% e/ou Ph+ 1-35%	BCR-ABL1 >1% e/ou Ph1 >0
A qualquer altura	BCR-ABL <0.01%	CCA/Ph- (-7, ou 7q-)	Perda de CHR Perda de CCyR Confirmado perda de MMR mutações CCA / Ph1
<p>CCA\Ph-: cromossoma clonal anormalidades em células ph-.</p> <p>CHR: Resposta Hematologica Completa</p> <p>CCyR: Resposta Citogenetica Completa</p> <p>MMR: Resposta Molecular Maior</p>			

Figura 4: Regressão entre o estado do paciente e a expressão do gene *ACLY*. No eixo das ordenadas encontrasse o estado do paciente, sendo os pontos 1, 2, 3, 4 e 5 os pacientes sem tratamento, sem resposta, resposta sub-ótimas, ótimas e controle, respectivamente. No eixo das abcissas a média da expressão do *ACLY*.

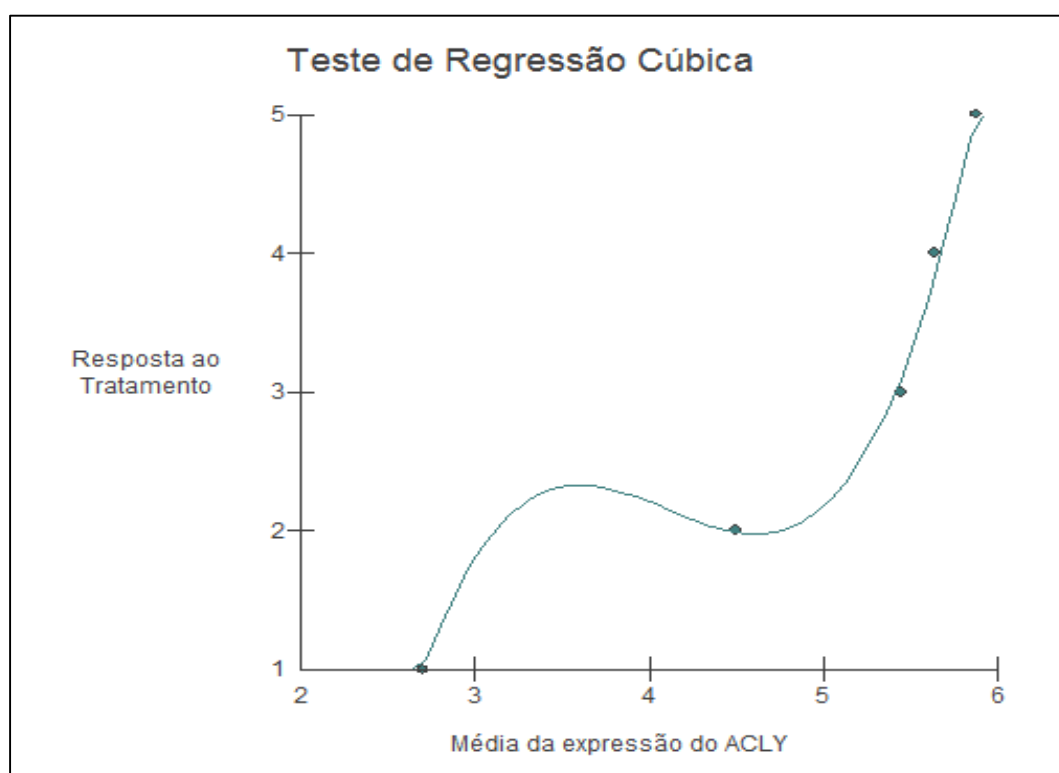
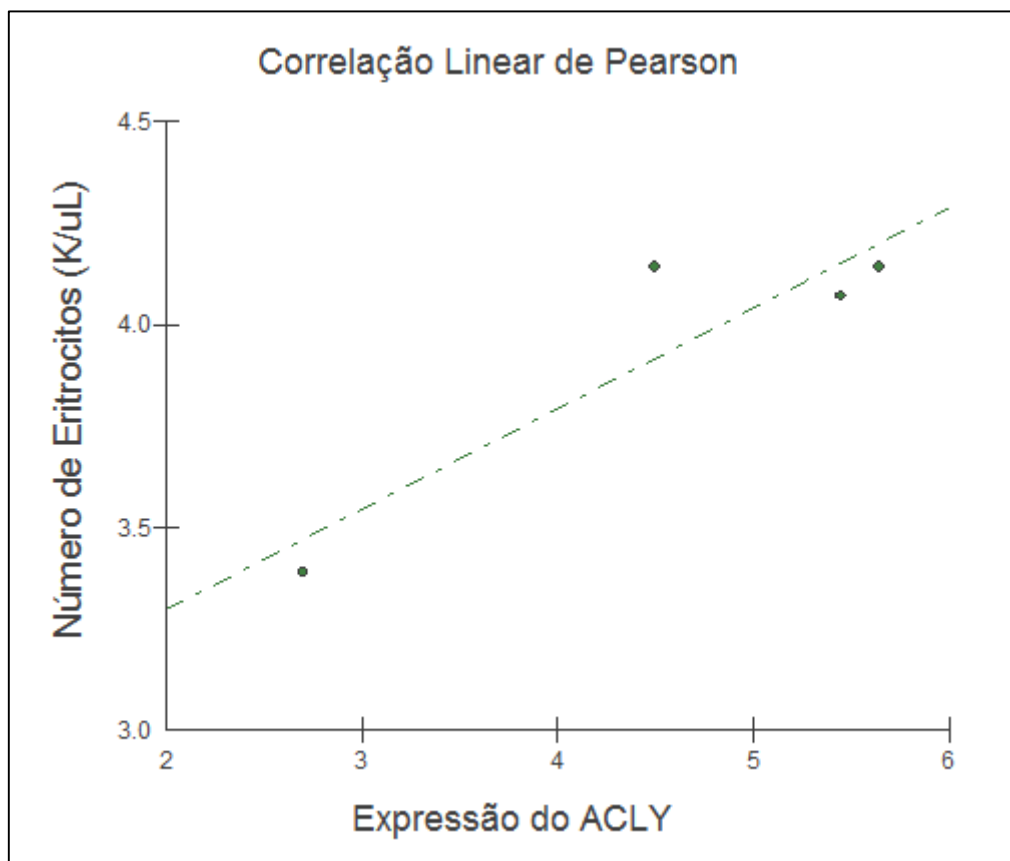


Figura 5: Análise da correlação linear de Pearson entre o número de eritrócitos (K/uL) no sangue periférico e a expressão do *ACLY*.



LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação das amostras biológicas de pacientes e controle

	Pacientes	Controle
Medula Óssea	MO_Pool*	MO_Ctrl*
Sangue Periférico	SP_Pool*	SP_Ctrl*

Tabela 2. Pool de medula óssea de pacientes; Poole de sangue periférico de pacientes; medula óssea do indivíduo controle; sangue periférico do indivíduo controle.

Amostras	Combinação das amostras para análise de expressão diferencial
Pacientes	SP_Pool X MO_Pool
MO_pool (CD34+)	
SP_pool (CD66b+)	SP_Ctrl X MO_Ctrl
Controle	
MO_Ctrl (CD34+)	
SP_Ctrl (CD66b+)	

Tabela 3: Expressão diferencial do *AKT* e *ACLY* em células maduras do sangue periférico e células-tronco hematopoiéticas da medula óssea, pelo sequenciamento.

	<i>AKT</i> (FPKM*)		<i>ACLY</i> (FPKM*)	
	Medula Óssea	Sangue Periférico	Medula Óssea	Sangue Periférico
Pacientes	96	2	117	8
Controles	59	0	29	33

*Fragmento por quilobase por milhão

Tabela 4: Média da expressão diferencial do *ACLY* em células maduras do sangue periférico, pela PCR em Tempo Real.

	Média	p-valor
Controles	5,88	
Resposta ótima	5,64	0,38
Resposta Intermediária	5,45	0,31
Sem Resposta	4,50	0,02

Tabela 5: Diferença da expressão genica dos pacientes sem resposta e sem tratamento.

	Média	p-valor
Sem Resposta	4,50	
Sem Tratamento	2,70	0,0004

REFERENCIAS

1. Anjos AR, Alvares-silva M, Borelli P. Matriz Extracelular e Leucemia. 2000;22(3):404–12.
2. Mughal, Tariq I and Goldman JM. Chronic myeloid leukemia: why does it evolve from chronic phase to blast transformation? *Front Biosci.* 2006;11:198–208.
3. Lopes N, Abreu M. Inibidores de tirosino quinase na leucemia mielóide crônica. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet]. 2009;31:449–53. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v31n6/aop8909.pdf>
4. Comert M, Baran Y, Saydam G. Changes in molecular biology of chronic myeloid leukemia in tyrosine kinase inhibitor era. *Am J Blood Res* [Internet]. 2013;3(3):191–200. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3755521&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
5. Almeida A, Castro I, Coutinho J, Guerra L, Marques H, Pereira AM. Recomendacao para o diagnóstico, tratamento e monitorização da leucemia melóide crônica. *Acta Med Port.* 2009;22:537–44.
6. Souza CA De. Chronic myeloid leukemia treatment guidelines : Brazilian Association of Hematology , Hemotherapy and Cell Therapy . Brazilian Medical Association Guidelines Project – 2012. 2012;34(5):367–82.
7. Grando AC, Wagner SC. Avaliação laboratorial da doença residual mínima na leucemia mielóide crônica por Real-Time PCR. *J Bras Patol e Med Lab.* 2008;44:433–40.
8. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, et al. Chronic myeloid leukemia: An update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol.* 2009;27(35):6041–51.
9. Shinohara Y, Takahashi N, Nishiwaki K, Hino M, Kashimura M, Wakita H, et al. A multicenter clinical study evaluating the confirmed complete molecular response rate in imatinib-treated patients with chronic phase chronic myeloid leukemia by using the international scale of real-time quantitative polymerase chain reaction. *Haematologica.* 2013;98:1407–13.
10. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet Review article Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert pa. 2006;106:1809–20.
11. Bubnoff N Von, Duyster J. Chronic Myelogenous Leukemia. 2010;107(7).
12. Marin D, Markt S, Bua M, Szydlo RM, Franceschino A, Nathan I, Foot N, Crawley C, Nakorn T Na, Olavarria E, Lennard A, Neylon A, O'Brien SG JG and JA. Prognostic factors for patients with chronic myeloid leukaemia in chronic phase treated with imatinib mesylate after failure of interferon alfa. 2003;1448–53.
13. Furuta E, Okuda H, Kobayashi A, Watabe K. *Biochimica et Biophysica Acta Metabolic genes in cancer: Their roles in tumor progression and clinical implications.* BBA - Rev Cancer [Internet]. Elsevier B.V.;

- 2010;1805(2):141–52. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.01.005>
14. Lettieri D, Vegliante R, Desideri E, Rosa M. Biochimica et Biophysica Acta Managing lipid metabolism in proliferating cells: New perspective for metformin usage in cancer therapy. *BBA - Rev Cancer* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;1845(2):317–24. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.02.003>
 15. Chypre M, Zaidi N, Smans K. ATP-citrate lyase: A mini-review. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;422(1):1–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.144>
 16. Zaidi N, Swinnen J V., Smans K. ATP-citrate lyase: A key player in cancer metabolism. *Cancer Res.* 2012;72:3709–14.
 17. Bauer DE, Hatzivassiliou G, Zhao F, Andreadis C, Thompson CB. ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene.* 2005;24:6314–22.
 18. E. Furuta, H. Okuda, A. Kobayashi KW. NIH Public Access. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1805(2):141–52.
 19. Yvan-Charvet L, Pagler T, Gautier EL, Avagyan S, Siry RL, Han S, et al. ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. *Science.* 2010;328(2010):1689–93.
 20. Cillonì D, Saglio G. Molecular pathways: BCR-ABL. *Clin Cancer Res.* 2012;18(4):930–7.
 21. Tasian SK, Teachey DT, Rheingold SR. Targeting the PI3K/mTOR Pathway in Pediatric Hematologic Malignancies. *Front Oncol* [Internet]. 2014;4(May):108. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4032892&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 22. Zu X-Y, Zhang Q-H, Liu J-H, Cao R-X, Zhong J, Yi G-H, et al. ATP Citrate Lyase Inhibitors as Novel Cancer Therapeutic Agents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2012;7:154–67.
 23. Hanai J, Doro N, Seth P, Sukhatme VP. ATP citrate lyase knockdown impacts cancer stem cells in vitro. *Cell Death Dis* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013;4(6):e696. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3702307&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 24. Migita T, Narita T, Nomura K, Miyagi E, Inazuka F, Matsuura M, et al. ATP citrate lyase: Activation and therapeutic implications in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2008;68:8547–54.
 25. Wagner PD, Vu ND. Phosphorylation of ATP-citrate lyase by nucleoside diphosphate kinase. *J Biol Chem.* 1995;270:21758–64.
 26. Beckner ME, Fellows-Mayle W, Zhang Z, Agostino NR, Kant J a., Day BW, et al. Identification of ATP citrate lyase as a positive regulator of glycolytic function in glioblastomas. *Int J Cancer.* 2010;126:2282–95.
 27. Zhang H, Li S. Molecular mechanisms for survival regulation of chronic myeloid leukemia stem cells. 2013;4(3):186–96.
 28. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows – Wheeler transform. 2009;25(14):1754–60.

29. Trapnell C, Williams B, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, Baren MJ Van, et al. Transcript assembly and abundance estimation from RNA-Seq reveals thousands of new transcripts and switching among isoforms. 2011;28(5):511–5.
30. Yuan JS, Reed A, Chen F, Jr CNS. Statistical analysis of real-time PCR data. 2006;12:1–12.
31. De Lemos J a., de Oliveira CM, Scerni a. C, Bentes AQ, Beltrão AC, Bentes IR, et al. Differential molecular response of the transcripts B2A2 and B3A2 to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. Genet Mol Res [electronic Resour GMR. 2005;4(4):803–11.
32. Jin X, Zhang K, Guo X, Myers R, Ye Z, Zhang Z, et al. Fatty Acid Synthesis Pathway Genetic Variants and Clinical Outcome of Non-Small Cell Lung Cancer Patients after Surgery. 2014;15:7097–103.
33. Yancy HF, Mason J a, Peters S, Thompson CE, Littleton GK, Jett M, et al. Metastatic progression and gene expression between breast cancer cell lines from African American and Caucasian women. J Carcinog. 2007;6:8.
34. Zhou Y, Bollu LR, Tozzi F, Ye X, Bhattacharya R, Gao G. ATP Citrate Lyase Mediates Resistance of Colorectal Cancer Cells to SN38. 2013;12(December):2782–92.
35. Berwick DC, Hers I, Heesom KJ, Kelly Moule S, Tavaré JM. The identification of ATP-citrate lyase as a protein kinase B (Akt) substrate in primary adipocytes. J Biol Chem. 2002;277:33895–900.
36. Pessetto ZY, Ma Y, Hirst JJ, von Mehren M, Weir SJ, Godwin a. K. Drug Repurposing Identifies a Synergistic Combination Therapy with Imatinib Mesylate for Gastrointestinal Stromal Tumor. Mol Cancer Ther [Internet]. 2014;13:2276–87. Available from: <http://mct.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1535-7163.MCT-14-0043>
37. Boren J, Cascante M, Marin S, Comín-Anduix B, Centelles JJ, Lim S, et al. Gleevec (STI571) influences metabolic enzyme activities and glucose carbon flow towards nucleic acid and fatty acid synthesis in myeloid tumor cells. J Biol Chem. 2001;1–23.
38. Morceau F, Buck I, Dicato M, Diederich M. Radicicol-mediated inhibition of Bcr-Abl in K562 cells induced p38-MAPK dependent erythroid differentiation and PU . 1 down-regulation. 2008;34:313–29.
39. Hatzivassiliou G, Zhao F, Bauer DE, Andreadis C, Shaw AN, Dhanak D, et al. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. Cancer Cell. 2005;8(October):311–21.
40. Gologan R, Constantinescu G, Georgescu D, Ostroveanu D, Vasilache D, Dobra C, et al. Hypolipemiant besides antileukemic effect of imatinib mesylate. Leuk Res. 2009;33(April 2006):1285–7.
41. Breccia M, Alimena G. The metabolic consequences of imatinib mesylate: Changes on glucose, lypidic and bone metabolism. Leuk Res. 2009;33:871–5.