

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM IMATINIBE SOBRE A SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM
LINHAGEM CELULAR DE LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

Júlia Biz Willig

Porto Alegre, novembro de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM IMATINIBE SOBRE A SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM
LINHAGEM CELULAR DE LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

Trabalho apresentado como requisito parcial para aprovação na Disciplina de Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aluno: Júlia Biz Willig

Professor Orientador: Andréia Buffon

Co-orientador: Aline Beckenkamp

Porto Alegre, novembro de 2016

Este artigo foi elaborado segundo as normas da Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (Anexo I) na qualidade de “Artigo Original”. A versão em língua inglesa será elaborada após as correções e sugestões da banca avaliadora.

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM IMATINIBE SOBRE A SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM
LINHAGEM CELULAR DE LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

Júlia Biz Willig¹

Aline Beckenkamp¹

Diogo André Pilger¹

Andréia Buffon¹

¹ Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

Resumo

A leucemia Mielóide Crônica (LMC) é caracterizada, na ampla maioria dos casos, pela translocação entre os cromossomos 9 e 22 t(9:22)(q34;11). Essa fusão resulta na produção de uma oncoproteína denominada BCR-ABL (Ph+). O imatinibe é o fármaco de primeira escolha no tratamento da LMC, atuando como inibidor seletivo da BCR-ABL-tirosino-quinase, através da competição pelo sítio ativo do ATP. A sinalização purinérgica, já descrita por seu papel relacionado a neoplasias malignas, está envolvida na modulação de nucleotídeos como o ATP, ADP e AMP, através da ação sequencial de enzimas como as NTPDases e ecto-5'-nucleotidase (CD73). Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi caracterizar a expressão e a funcionalidade de componentes do sistema purinérgico, em linhagem celular K-562 (Ph+) e em uma fração celular linfomononuclear controle, após tratamento com imatinibe.

Métodos: A expressão das enzimas da família das NTPDases e ecto-5'-nucleotidase foi avaliada em linhagem K-562 (Ph+), através da técnica de RT-PCR, antes e após 24 e 48 horas de tratamento com imatinibe. Como controle não tumoral foi utilizada uma fração linfomononuclear periférica de indivíduos saudáveis. A atividade de hidrólise dos nucleotídeos (ATP, ADP, UDP e AMP) foi determinada utilizando o método colorimétrico baseado na liberação de fosfato inorgânico.

Resultados: Os resultados obtidos demonstram um aumento significativo na atividade de hidrólise dos nucleotídeos testados na linhagem K-562 (Ph+), quando comparada com a fração linfomononuclear, principalmente após 24h de tratamento. Corroborando com estes dados, a expressão das NTPDases 2, 3, 5 e 6 foi superior em células K-562 (Ph+), em comparação à fração linfomononuclear, podendo justificar a maior atividade de hidrólise encontrada nesta linhagem.

Conclusão: Os resultados obtidos demonstram que a linhagem K-562 (Ph+) expressa as NTPDases 1, 2, 3, 5, 6 e a ecto-5'-nucleotidase (CD73), responsáveis pela modulação dos níveis de nucleotídeos extracelulares e apresentam diferença na expressão em relação as células linfomononucleares. Além disso, após tratamento com imatinibe, houve aumento tanto da expressão como na atividade de hidrólise dos nucleotídeos indicando um possível efeito de ativação destas enzimas em resposta ao ATP acumulado que é deslocado por este fármaco.

Palavras-chave: LMC, BCR-ABL, imatinibe, sistema purinérgico, ATP

1. INTRODUÇÃO

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa, caracterizada por uma expansão clonal das células tronco hematopoéticas pluripotentes, levando ao acúmulo de células da linhagem mielóide na medula óssea, sangue periférico e locais extramedulares [1,2]. A doença, na ampla maioria dos casos, se caracteriza pela presença de uma anormalidade citogenética específica, cromossomo *Philadelphia* (Ph+) resultante da translocação do oncogene ABL no cromossomo 9 e do gene BCR no cromossomo 22, t(9;22) (q34; q11). Essa fusão cromossomal resulta em uma oncoproteína com atividade tirosina quinase potencializada e desregulada, responsável pela diferenciação e proliferação das células malignas [3]. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, a LMC é mais frequentemente diagnosticada entre as pessoas com idades entre 65 e 74 anos, e sua incidência é de 1-2 casos por 100.000 habitantes por ano [4]. Segundo dados do INCA, para o Brasil são esperados 10.070 novos casos de leucemia em 2016 [5].

Os primeiros tratamentos para LMC incluíam quimioterápicos como bussulfan e hidroxiuréia, que eram empregados somente como tratamento paliativo para os sintomas, pois melhoravam a qualidade de vida dos pacientes, mas sem curá-los [1]. Com o passar do tempo, outras opções de tratamento surgiram, como interferon- α , inibidores de tirosina quinase (ITQ) e transplante de células tronco hematopoéticas, sendo este último a única forma de curar a doença [2]. A introdução dos ITQ modificaram drasticamente o tratamento e a sobrevida dos pacientes com LMC melhorando a taxa de sobrevida em aproximadamente 10 anos. Estes fármacos utilizam moléculas de sinalização intracelular como terapia-alvo [6].

O mesilato de imatinibe (Glivec®), primeiro inibidor da tirosina quinase aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), consiste na primeira linha de tratamento para LMC [7]. Ele induz uma remissão hematológica em 99% dos pacientes e citogenética em 74% após 12 meses de tratamento. Sua ação ocorre através da competição pelo receptor celular de ATP no domínio tirosina quinase de ABL, impedindo a habilidade desse cromossomo em transferir grupos fosfato do ATP e resíduos de tirosina fosforilada, o que previne a transdução de sinais para a proliferação celular e apoptose [8]. Este medicamento inibe outras proteínas envolvidas na sinalização, como o receptor de crescimento derivado de plaquetas (PDGR) e fator estimulante das células germinativas pluripotentes (SCF), mas não inibe outras tirosinas quinases, como as proteínas que apresentam mutação em T315I de Abl, uma das responsáveis pela resistência terapêutica [9].

Os nucleotídeos extracelulares da adenina, como o ATP (adenosina 5'trifosfato) e ADP (adenosina 5'difosfato), atuam como moléculas de sinalização celular através de sua ligação a receptores purinérgicos P2 (subtipos P2X e P2Y). Além disso, estão associados com

diversos processos biológicos, como estimulação ou inibição de morte celular, proliferação, migração, diferenciação, secreção de fatores de crescimento e quimiocinas inflamatórias, sendo assim relacionados com o câncer [10, 11]. Os níveis destes nucleotídeos são modulados por uma cascata de hidrólise constituída por diversas enzimas, chamadas de ectonucleotidases. Esta cascata inclui membros das famílias E-NTPDases (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase), os quais hidrolisam nucleotídeos tri e difosfatados; E-NPPS (ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase); AP (ecto-fosfatase alcalina) e enzima ecto-5' nucleotidase (CD73), que hidrolisa o AMP gerado pela hidrólise de ATP e ADP [12].

As NTPDases constituem uma família de 8 membros já clonados e caracterizados. Eles possuem cinco regiões altamente conservadas na sequência de aminoácidos relacionados com o sítio catalítico e apresentam dependência de cátions divalentes, como Ca^{2+} e Mg^{2+} , para sua atividade máxima. Dentro dessa família, as NTPDases 1, 2, 3 e 8 possuem 2 domínios transmembrana e apresentam sítio catalítico voltado ao meio extracelular. A NTPDase 1 hidrolisa ATP e ADP na mesma proporção, já a NTPDase 2 apresenta grande preferência pelo ATP. As NTPDases 3 e 8 possuem preferências intermediárias de ATP, causando um leve acúmulo de difosfonucleosídeos. As NTPDases 5 e 6 possuem somente um domínio transmembrana, estão localizadas no meio intracelular e podem ser clivadas proteoliticamente e liberadas para o meio extracelular. A NTPDase 5 apresenta preferência pelos nucleotídeos difosfatados e baixa afinidade para degradação dos nucleotídeos trifosfatados. As NTPDases 4 e 7 estão localizadas exclusivamente no meio intracelular [13]. A ecto-5' nucleotidase (CD73) possui dois domínios transmembrana, e é responsável pela degradação de AMP em seu respectivo nucleosídeo. Além disso, também tem sua atividade potencializada por cátions divalentes, principalmente por Mg^{2+} [14].

O papel das ectonucleotidases no câncer tem sido abordado na literatura. Estudos em câncer endometrial, por exemplo, indicam que há uma relação entre o aumento da expressão e da atividade das NTPDases com o aumento da progressão tumoral, em amostras de biópsias de pacientes com esta patologia [15]. Além disso, o estudo da sinalização purinérgica já foi avaliado em diversas linhagens celulares, como câncer de bexiga, câncer cervical, câncer cerebral [16, 17, 18]. Porém, há poucas informações sobre o papel da sinalização purinérgica em leucemias, especialmente na LMC. Há relatos que demonstram o aumento da metabolização do ATP e ADP em linfócitos de pacientes com leucemia linfoblástica aguda [19].

Considerando a importância da sinalização purinérgica no câncer, e a ação do imatinibe sobre um sítio de ligação de ATP nas células leucêmicas Ph+, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a expressão e funcionalidade de membros da família das NTPDases e ecto-5' nucleotidase (CD73) em linhagem celular K-562 (Ph+) e em uma fração linfomononuclear.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cultura de células

Foi utilizada a linhagem celular K-562 (Ph+) obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, RS, Brasil). As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% soro fetal bovino (Gibco) e 0,5U/mL penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich) e incubadas a 37°C em 5% CO₂. Como controle foram isoladas células da fração linfomononuclear de sangue periférico de indivíduos sadios obtidas através do gradiente de densidade Ficoll-Histopaque (Sigma-Aldrich). O projeto foi aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob o número 91.564.

2.2 Tratamento com imatinibe

Inicialmente, a fim de determinar o IC₅₀, as células K-562 (Ph+) foram plaqueadas (10.000 células/poço) em placas de 96 poços, e após 24 horas foram tratadas com diferentes concentrações de imatinibe (0,1µM – 10,0 µM), durante 24 e 48 horas. A contagem das células viáveis foi realizada por citometria de fluxo (Citômetro FACSVerse™). A concentração de 1µM (IC₅₀ em 48 horas) foi escolhida para ser utilizada nos demais experimentos (Waechter F, et al., dados não publicados). As células (1x10⁶/garrafa) foram transferidas para garrafas de 25cm² e tratadas com imatinibe durante 2, 6, 24 e 48 horas.

2.3 RT-PCR

O RNA total foi isolado a partir das culturas celulares utilizando-se Trizol (Life Technologies Carlsbad, Calif, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os cDNAs foram sintetizados a partir de 5 µg de RNA total, utilizando-se transcriptase reversa M-MLV (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), e primer randômico hexâmero. A seguir, foi utilizado 1µL do produto da reação de RT (cDNA), 1,0 µL de cada par de primer (10uM) e 1,25 unidades de TaqDNA Polimerase em um volume final de 25µL. As informações relativas aos primers utilizados encontram-se descritas na tabela 1. A reação foi realizada utilizando-se 35 ciclos, e suas condições foram as seguintes: 1 min a 95°C, 1 min a 94°C, 1 min à temperatura de anelamento de cada par de primer específico, 1 min a 72°C e uma extensão final de 10 min a 72°C. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1,5% contendo 2,5µL Gel Red e visualizados em luz ultravioleta. Foi utilizado o gene da β-actina como normalizador da medida da qualidade de extração do RNA.

A quantificação das bandas foi realizada através da densitometria utilizando software ImageJ. Para a construção dos gráficos da quantificação foi utilizada a razão da densitometria das bandas de amplificação enzima/βactina considerando unidades arbitrárias. Como controles positivos foram utilizadas linhagens celulares HaCaT e SiHa com

expressão conhecida das NTPDases e ecto-5' nucleotidase (CD73) já descritas na literatura [17].

2.4 Hidrólise dos nucleotídeos

As células foram lavadas duas vezes com tampão de incubação e o método de Bradford foi utilizado para determinar a quantidade de proteína [20]. As suspensões celulares foram diluídas para uma concentração final de proteína de 4µg/mL. Foi realizada uma pré-incubação durante 10 minutos à 37°C, contendo as suspensões celulares e o meio de reação composto por 120mM NaCl, 5mM KCl, 60mM Glicose, 0,5mM CaCl₂, 50mM Tris-HCl, pH=8 (ATP, ADP, UDP) e 120mM NaCl, 5mM KCl, 60mM Glicose, 1mM MgCl₂, 50mM Tris-HCl, pH=8 (AMP). A reação foi iniciada pela adição de ATP, ADP, UDP (concentração final 3mM) para determinar a atividade das NTPDases e AMP (concentração final 3mM) para o ensaio da ecto-5' nucleotidase (CD73) [21]. A reação foi interrompida após 60 minutos, por adição de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. As amostras foram incubadas em gelo durante 10 minutos antes do ensaio de liberação de fosfato inorgânico (Pi), utilizando verde de malaquita como reagente colorimétrico [22]. Para eliminar a hidrólise não-enzimática do substrato, foram realizados controles contendo os nucleotídeos e o tampão de reação. A atividade específica foi expressa por nmol Pi/mg de proteína/min [21]. Os experimentos foram realizados três vezes (n=3) com amostras em triplicata.

2.5 Integridade celular

Para garantir a integridade celular durante os experimentos, foi realizada a contagem celular utilizando o método de exclusão com o corante azul de tripan.

2.6 Análise estatística

Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey e teste t-Student. O *software* utilizado foi o GraphPad Prism. Foram considerados valores significativos quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Expressão das NTPDases e ecto-5' nucleotidase (CD73) e atividade de hidrólise

Inicialmente, foram avaliados os níveis de expressão de mRNA das enzimas NTPDases e ecto-5' nucleotidase (CD73) na linhagem celular K-562 (Ph+) e em células linfomononucleares (Figura 1A e 1B). Os resultados demonstram que a linhagem celular K-562(Ph+) expressa todas as NTPDases investigadas. Além disso, as NTPDase 2, 3, 5 e 6 apresentam uma expressão superior em K-562(Ph+), quando compara a células

linfomonucleares normais. Ao contrário, a expressão da NTPDase 1 é significativamente inferior na linhagem neoplásica quando comparada com a fração linfomonuclear.

Para avaliar a funcionalidade destas enzimas, determinamos a atividade de hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP e UDP em linhagem K-562(Ph+) (tabela 2). Os resultados indicam que há um aumento significativo nestas atividades de hidrólise para todos os nucleotídeos de adenina e UDP na linhagem K-562(Ph+) quando comparado a células linfomonucleares. Estes resultados de atividade de hidrólise aumentada nas células K-562(Ph+), principalmente em relação ao ATP, corroboram com uma expressão gênica também elevada para a NTPDase 2, conhecida pela preferência por hidrolisar este nucleotídeo.

Para assegurar a integridade celular durante os experimentos de atividade de hidrólise, foi realizada a contagem celular utilizando-se o azul de tripan e não foram observadas alterações na viabilidade celular após a incubação com meio reacional (dados não demonstrados).

Considerando que a expressão da NTPDase 5 também foi maior nas células leucêmicas K-562(Ph+), e sua preferência por hidrolisar nucleotídeos difosfatados, além de determinarmos a atividade de hidrólise do ADP, avaliamos também sua ação sobre o nucleotídeo UDP. Conforme demonstrado na tabela 2, de forma semelhante ao encontrado para a expressão, as atividades de hidrólise de ADP e UDP apresentam um aumento significativo em relação a células linfomonucleares normais, e, portanto, indicam que está enzima possa estar envolvida no metabolismo de dinucleotídeos em células leucêmicas.

Com relação à expressão da ecto-5' nucleotidase (CD73), observamos que as duas linhagens estudadas apresentam expressão desta proteína pela análise por RT-PCR. Entretanto, a atividade de hidrólise para AMP foi significativamente maior em células K-562 (Ph+) e, portanto, estes resultados devem ser melhor investigados.

3.3 Efeito do tratamento com imatinibe

Para melhor investigar o efeito do imatinibe sobre a hidrólise dos nucleotídeos (ATP, ADP, UDP e AMP), foram realizadas curvas de tempo de tratamento, em 2, 6, 24 e 48 horas. Após cada período, as células foram incubadas com os diferentes nucleotídeos conforme descrito em material e métodos. Na tabela 3 apresentamos os resultados do tratamento em células linfomonucleares normais, enquanto que na tabela 4 descrevemos os resultados em células K-562 (Ph+). Foi observado um aumento significativo na hidrólise de todos os nucleotídeos testados após 24 horas em células K-562 (Ph+). Além disso, para a hidrólise do ATP e ADP este efeito já pode ser observado após 6 horas de tratamento,

quando comparado a células K-562(Ph+) não tratadas. Após 48 horas, de tratamento, entretanto, esta atividade diminui, em relação aos tratamentos de 6 e 24 horas retornando para níveis basais. A hidrólise de AMP é a menos eficiente na linhagem celular de LMC, porém após 24h de tratamento pode-se observar um aumento significativo desta hidrólise.

Quando investigamos o efeito do imatinibe sobre a expressão à nível de mRNA das NTPDases e ecto-5' nucleotidase (CD73), encontramos um aumento significativo na expressão das NTPDases, nas células K-562(Ph+) tratadas por 24 horas (Figura 2). Com relação ao tratamento por 48 horas, o imatinibe parece não alterar a expressão das NTPDases, visto que o padrão de expressão foi semelhante ao das células não tratadas, com a exceção da NTPDases 2 e 3, que apresentaram um aumento. Com relação à expressão das NTPDases em linfomononucleares humanos, os resultados estão de acordo com os encontrados para atividade de hidrólise dos nucleotídeos, em que não foram observadas alterações significativas após tratamento (Figura 2).

4. DISCUSSÃO

Diversos estudos já demonstraram a relação das NTPDases com mecanismos de progressão tumoral, entretanto não existem estudos relacionando a sinalização purinérgica, nem sequer como quimioterápicos poderiam modular a expressão e funcionalidade de componentes desta sinalização em LMC. Tendo em vista que o imatinibe atua através da ligação competitiva ao sítio ativo de ligação do ATP da proteína BCR-ABL, inibindo a fosforilação de proteínas envolvidas na transdução de sinais necessários para a proliferação celular e apoptose, este fármaco pode estar relacionado com a sinalização purinérgica. Quando ocorre a interação do imatinibe com o sítio catalítico da proteína BCR-ABL, não acontece a ligação da molécula do ATP, havendo assim, a inibição da proteína e evitando a fosforilação do substrato [8]. Como consequência, o ATP fica disponível no meio celular.

Diante dos resultados apresentados, podemos perceber um perfil de atividade e expressão das NTPDases superior na linhagem de LMC em comparação com células linfomononucleares, com exceção da NTPDase 1 que parece estar mais expressa em células linfomononucleares, e ecto-5' nucleotidase (CD73) que não apresentou alteração significativa. Já existem estudos na literatura correlacionando a ação conjunta dessas duas enzimas em diversos tipos de câncer e parecem estar relacionadas com a resposta imune, através da modulação de ATP extracelular[23]. Além disso, a expressão de NTPDase 1 já está descrita em células mononucleares de pacientes saudáveis [24], que está de acordo com nossos achados. Entretanto, nossos resultados indicam que a patologia da LMC, independente da ação do imatinibe, por si só já apresenta um aumento da sinalização purinérgica.

Quando avaliamos o efeito do tratamento com imatinibe na linhagem celular K-562 (Ph+), podemos observar um aumento significativo na hidrólise de nucleotídeos ATP e ADP após 6 e 24 horas, e para os nucleotídeos AMP e UDP só houve diferença estatística após 24 horas de tratamento, comparando-se com células não tratadas. Além disso, podemos observar que esse aumento da atividade enzimática em K-562 (Ph+) após o tratamento com imatinibe, não ocorre na fração linfomononuclear, visto que o efeito do imatinibe deve ser dependente da ligação deste fármaco ao sítio ativo da proteína BCR-ABL, que não está presente em linfomononuclear. Sendo assim, após a ligação do imatinibe ao sítio ativo do ATP na proteína BCR-ABL, ocorre um acúmulo de ATP que provavelmente leva à ativação da cascata de degradação deste nucleotídeo.

Este aumento da degradação do ATP nas primeiras horas após o tratamento com imatinibe sugere o envolvimento das NTPDases 1 e 2, já que essas enzimas tem a preferência por nucleotídeos trifosfatados. Nossos achados demonstram que a NTPDase 1 está presente tanto na linhagem celular K-562(Ph+), como também na fração linfomononuclear. Esse resultado corrobora com a literatura encontrada, visto que a NTPDase 1 já está descrita para pacientes normais e está relacionada com a resposta imune[24]. A NTPDase 1 vem sendo estudada como um possível marcador de prognóstico em leucemia, como é o caso na Leucemia Linfocítica Crônica que, em um estudo, apresentou a expressão significativamente aumentada desta enzima em linfócitos T no sangue periférico em comparação com controles saudáveis. Os níveis mais elevados foram associados com estágios avançados da doença e interagiram negativamente com tempo para o primeiro tratamento [25]. O aumento da hidrólise de ATP na linhagem celular K-562 (Ph+), pode estar relacionado também com a atuação das NTPDases 2 e 3, uma vez que encontramos a expressão dessas enzimas somente nas células tumorais. Existem poucos estudos na literatura sobre estas NTPDases. Os achados indicam que a NTPDase 2 parece ter envolvimento com resposta inflamatória em células de astrócitos, oriundas de ratos [26]. A co-expressão das NTPDases 1 e 2 esta relacionada com o crescimento tumoral no Tumor de Walker, que também é proveniente destes roedores [27]. Entretanto, o papel das NTPDases 2 e 3 parece ser de grande importância no entendimento do sistema purinérgico na LMC, tendo em vista que estas enzimas são expressas somente na linhagem tumoral investigada, e não em linfomononucleares. Portanto, mais estudos precisam ser desenvolvidos para seu melhor entendimento nesta neoplasia.

Nossos resultados ainda demonstram que há um aumento da taxa de hidrólise de ADP e UDP, o que pode estar relacionado com atividade enzimática de outra NTPDase. A principal enzima que apresenta preferência pelos nucleotídeos difosfatados e baixa afinidade pela degradação dos nucleosídeos trifosfatados é a NTPDase 5, que também está descrita como uma enzima solúvel. Até o momento, esta enzima é a única descrita como sendo um proto-oncogene, também conhecido como PCPH [14, 28]. Este dado correlaciona

com o nosso achado, onde a linhagem tumoral K-562(Ph+) apresenta expressão aumentada de NTPDase 5. Essa enzima está relacionada com um importante *link* no *loop* de sinalização da via PI3K/PTEN, que promove a sobrevivência e o crescimento celular e que frequentemente está ativa nas células tumorais. Também está relacionada com a ativação da via AKT, a qual desempenha um papel crítico no desencadeamento do efeito Warburg, mesmo na presença de oxigênio, aumentando os níveis de lactato e a produção de moléculas importantes para proliferação celular, favorecendo a angiogênese e a metástase [12]. Essas duas vias estão relacionadas com a transformação maligna mediada pela proteína BCR-ABL na LMC [8]. A expressão da NTPDase 6 foi encontrada aumentada na linhagem celular K-562 (Ph+) em relação a células linfomononucleares. Apesar da preferência por nucleotídeos difosfatados, como GDP e IDP, essa enzima também utiliza UDP como substrato, podendo, assim, estar relacionada com a degradação de UDP encontrada.

Cabe ressaltar ainda, que não foi observada nenhuma alteração na expressão gênica da ecto-5' nucleotidase (CD73) após tratamento com imatinibe, tanto em células K-562(Ph+) quanto em linfomononucleares. Nossos resultados demonstram, portanto, que de forma geral, as células K-562(Ph+) são sensíveis ao tratamento com imatinibe, modulando a expressão à nível de mRNA de membros da família das NTPDases aqui estudados, e atividades de hidrólise, enquanto que nenhum efeito significativo foi observado em células linfomononucleares.

5. CONCLUSÃO

Assim, neste trabalho foi demonstrado que a linhagem tumoral K-562(Ph+) expressa as NTPDases 1, 2, 3, 5, 6 e a ecto-5' nucleotidase (CD73), enzimas estas responsáveis pelo controle dos níveis de nucleotídeos extracelulares e apresentam diferença na expressão em relação a células linfomononucleares. O tratamento das células K-562(Ph+) com imatinibe demonstrou um aumento tanto da expressão como na atividade de hidrólise dos nucleotídeos, principalmente após 6 e 24 horas de tratamento, indicando um possível efeito de ativação destas enzimas em resposta ao ATP acumulado que é deslocado por este fármaco. Entretanto mais estudos são necessários para melhor compreensão do sistema purinérgico nessa patologia.

6. REFERÊNCIAS

- [1] Nardinelli L. Acompanhamento molecular de pacientes com leucemia mielóide crônica tratados com mesilato de imatinibe e avaliação dos mecanismos de resistências ao tratamento [tesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008. 118pg.
- [2] Tamascar Ila, Ramanarayanan J. Targeted treatment of chronic myeloid leukemia: role of imatinibe. *OncoTargets and Therapy*. 2009;2: 63-71.
- [3] Santos CC. Tratamento da leucemia mielóide crônica com mesilato de imatinibe no hospital de Clínicas de POA[tesis]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007. 140pg.
- [4] Jabbour E, Kantarjian H. CME Information: Chronic Myeloid Leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy and monitoring. *AJH*. 2016;91(2): 252-265.
- [5] Estimativa 2016, Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde/INCA.122pg.
- [6] Castro M. Expressão de galectina-1 e -4 na leucemia mielóide crônica e sua contribuição para progresso da doença[tesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009. 71pg.
- [7] Ferdinandi R, Mitchell S, Batson S, Tumor I. Treatments for chronic myeloid leukemia: a qualitative systematic review. *Journal of Blood Medicine*. 2012; 3:51-76.
- [8] Michael W. N. Deininger, John M. Goldman, and Junia V. Melo. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000; 96(10): 3343 -3353.
- [9] Lopes N, Abreu M. Inibidores de tirosina quinase na leucemia mielóide crônica. Associação brasileira de Hematologia e hemoterapia. 2009.
- [10] Virgilio F Di, Adinolfi E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene*. 2016: 1-11.

- [11] Brunnstock G, Virgilio F Di. Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signalling*. 2013;9: 491-540
- [12] Zimmermann H. Ectonucleotidases: Some Recent Developments and Note on Nomenclature. *Drug Development research*. 2001;52: 44-56
- [13] Simon C, Roberson J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling*. 2006;2: 409-430.
- [14] Bracco A P. Influência do proto-oncogene PCPH/NTPDASE5 na migração celular e na resistência terapêutica contra a temozolomida em glioblastoma multiforme [thesis]. Porto Alegre: UFCSPA. 82pg.
- [15] Aliagas E, Vidal A, Texidó L, Ponce J. High expression of ecto-nucleotidases CD39 and CD73 in human endometrial tumors. Hindawi publishing Corporation. 2014: 1-8.
- [16] Stella J, Bavaresco L, Braganhol E, Rockenbach L, Farias PF, Wink MR, et al. Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines. *Urologic Oncology*. 2010: 260-270.
- [17] Beckenkamp A, Santana DB, Bruno NA, Calil LN, Casali EA, Paccez D, et al. Ectonucleotidase expression profile and activity in human cervical cancer cell lines. *Biochem.Cell Biol*. 2014; 92: 95-104.
- [18] Cappellari AR, Rockenbach, Dietrich F, Clarimundo T, Braganhola E, Abujamra AL, et al. Characterization of ectonucleotidases in human medulloblastoma cell line: ecto'5NT/CD73 in metastasos as potential prognostic fator. *Plos One* 2012;9(7): 1-11.
- [19] Schetinger MRC, Morsch VM, Bonan CD, Wyse ATS. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofators* 2007;31: 77-98.

[20] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72: 248-254.

[21] Lunkes GL, Lunkes D, Stefanello F, Morsch A, Morsch VM, Mazzanti CM, Schetinger MRC. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies, *Thromb. Res.*2003: 1 –6.

[22] Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for the Ca^{2+} -ATPase activity. *Anal. Biochem.* 1986;157: 375– 380.

[23] Bastid J, Regairaz A, Bonnefoy N, Déjou C, Giustiniani J, Laheurte C, et al. Inhibition of CD39 Enzymatic Function at the Surface of Tumor Cells Alleviates Their Immunosuppressive activity. *Cancer Immunology Research.* 2015: 1-15.

[24] Leal D, Streher CA, Neu TN, Bittencourt FP, Leal C, Silva JEP, et al. Characterization of NTPDase (NTPDases 1; ecto-apyrase;ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2005; 1721: 9-15.

[25] Abousamra NK, El-Din MS, Elzahaf H, Esmael Me. E-diphosphohydrolase-1(E-NTPDase 1/CD39) as a new prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma.* 2015; 21-30.

[26] Wink MR, Braganhol E, Tamajiusukii ASK, Lenz G, Zerbini LF, Libermann TA, et al. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2(NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expresses by rat asatrocytes. *Neuroscience.* 2006;139: 421-432.

[27] Buffon A, Wink MR, Ribeiro B.V, Casali EA, Libermann TA, Zerbini LF, et al. NTPDase and 5'nucleotidase expression profiles and the pattern of extracelular ATP metabolismo in the Walker 256 tumor. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2007;1770; 1259-1265.

[28] Paez JG, Recio JA, Rouzaut A, Notario. Identity between the PCPH proto-oncogene and the CD39L4(ENTPD5) ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase gene. *Int J. Oncology*. 2001;19:1259-1254.

Tabela 1. Sequência de primers das ectonucleotidases e β -actina.

Gene	Sequência (5'=3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)
NTPDase1 F	CTACCCCTTTGACTTCCA	62	176
NTPDase1 R	CTCCCCCAAGGTCCAAAG		
NTPDase2 F	CTCCTACTGCTGTGCGTCC	60	206
NTPDase2 R	TGTCGTTCTCCTTGTCTGCC		
NTPDase3 F	TACCGAACTCCAACCATCA	58	310
NTPDase3 R	CCTTGACTTTTTGCATACA		
NTPDase5 F	CAGGTCAGCTGCATGGCCACA	62	226
NTPDase5 R	TCCAGGGCTCCCAGGGTTGC		
NTPDase6 F	CAGCTGCAGACGGGCACGAG	60	154
NTPDase6 R	GCAGAAAGACCTGGCTTCAGTGCT		
ECTO-5' F	CTCTTGCAACACCCATGTGC	58	225
ECTO-5' R	ACAGCTAATGCCGTGTGTCA		
β- actina F	TATGCCAACACAGTGCTGTCCTGG	58	210
β- actina R	TACTCCTGCTTCCTGATCCACAT		

Tabela 2. Hidrólise dos nucleotídeos de adenina e UDP em linhagem celular K-562 (Ph+) e células linfomononucleares (LMN).

	ATP	ADP	AMP	UDP
LMN	25,20 ± 3,85	21,26 ± 1,70	4,80 ± 2,56	11,77 ± 2,03
K-562 (Ph+)	55,45 ± 0,97*	33,39 ± 5,25*	15,12 ± 2,75*	55,35 ± 3,65*

Nota: Os valores médios ± DP são expressos em relação a atividade específica em nmol de Pi liberado/min/mg de proteína. Os valores são representativos de 3 diferentes experimentos em triplicata. Os dados foram comparados por teste t-Student. *p<0,05, representa diferença estatística quando as células K-562 (Ph+) foram comparadas com células linfomononucleares (LMN).

Tabela 3. Hidrólise dos nucleotídeos de adenina e UDP em células linfomononucleares (LMN) após o tratamento com imatinibe.

	ATP	ADP	AMP	UDP
LMN	25,20 ± 3,85	21,26 ± 1,70	4,80 ± 2,56	11,77 ± 2,03
LMN + 2H imatinibe	28,86 ± 0,79	22,76 ± 0,62	5,68 ± 0,63	16,00 ± 4,46
LMN + 6H imatinibe	27,08 ± 1,44	23,74 ± 1,52	5,75 ± 1,42	15,84 ± 7,82
LIMN + 24H imatinibe	28,65 ± 0,80	21,26 ± 2,15	4,17 ± 0,10	18,01 ± 5,27
LMN + 48H imatinibe	19,90 ± 3,62	19,45 ± 1,75	7,16 ± 0,28	14,43 ± 0,53

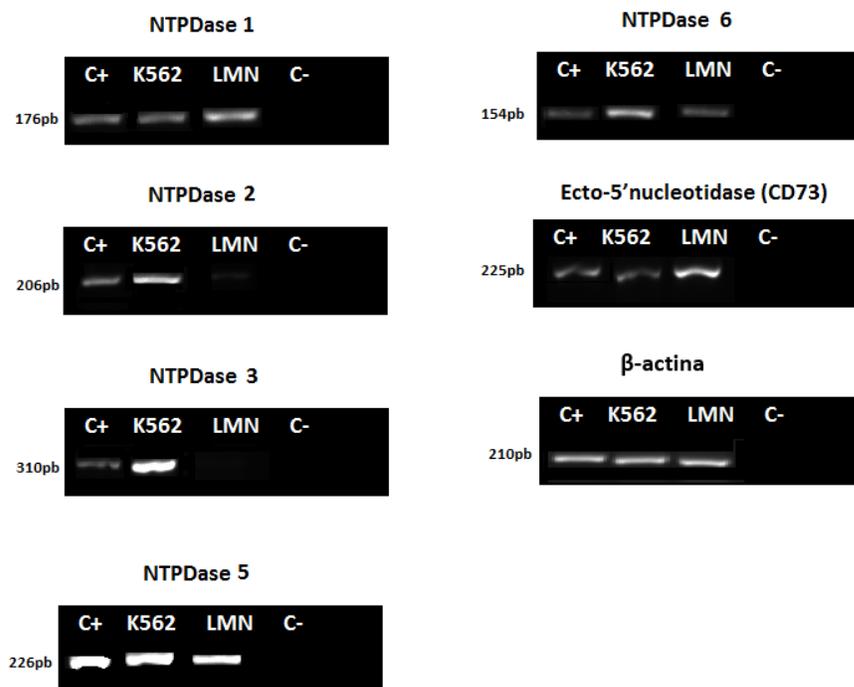
Nota: Os valores médios ± DP são expressos em relação à atividade específica em nmol de Pi liberado/min/mg de proteína. Os valores são representativos de 3 diferentes experimentos em triplicata. Os dados foram comparados por ANOVA seguida pelo teste Tukey's. *p<0,05, representa diferença estatística quando as células linfomononucleares (LMN) tratadas com imatinibe foram comparados com células não tratadas.

Tabela 4. Hidrólise dos nucleotídeos de adenina e UDP em linhagem K562(Ph+) após o tratamento com imatinibe.

	ATP	ADP	AMP	UDP
K-562	55,45 ± 0,97	33,39 ± 5,25	15,12 ± 2,75	55,33 ± 3,6
K-562 + 2H imatinibe	55,79 ± 4,94	36,25 ± 1,92	17,17 ± 3,58	64,53 ± 3,34
K-562 + 6H imatinibe	94,97 ± 2,60*	87,04 ± 1,50*	21,58 ± 1,0	59,23 ± 1,30
K-562 + 24H imatinibe	83,74 ± 4,59*	88,23 ± 5,35*	53,42 ± 1,08*	93,47 ± 5,27*
K-562 + 48H imatinibe	61,13 ± 1,12	50,49 ± 7,65 *	16,23 ± 7,25	20,37 ± 1,74*

Nota: Os valores médios ± DP são expressos em relação a atividade específica em nmol de Pi liberado/min/mg de proteína. Os valores são representativos de 3 diferentes experimentos em triplicata. Os dados foram comparados por ANOVA seguida pelo teste Tukey's. *p<0,05, representa diferença estatística quando as células K-562(Ph+) tratadas com foram comparadas com células não tratadas.

Figura 1. A



B

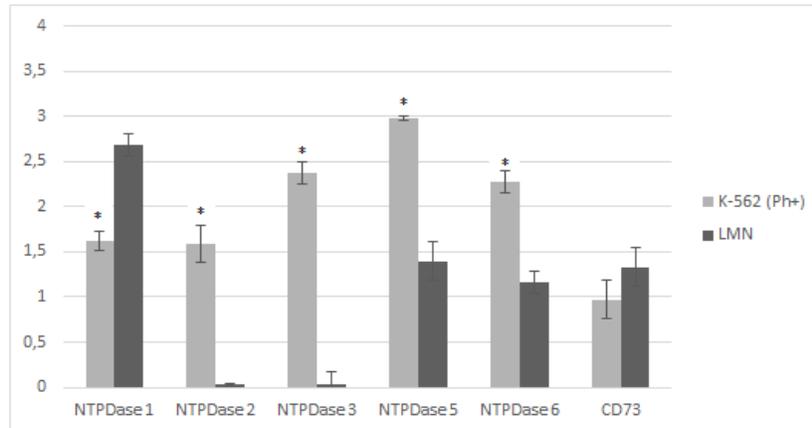


Figura 1. (A) Expressão das NTPDases e CD73 em linhagem celular K-562 (Ph+) e células linfomononucleares por RT-PCR. O RNA total foi isolado a partir de cultura de células, e o cDNA foi analisado por PCR com primers específicos conforme descrito na tabela 1. (B) Densitometria das bandas obtidas por RT-PCR, na razão NTPdase/ β -acina em unidades arbitrárias. Os valores são representativos de 3 diferentes experimentos em triplicata. Os dados foram comparados por teste t-Student. * $p < 0,05$, representa diferença estatística quando as células K-562(Ph+) foram comparadas com células linfomononucleares (LMN).

Figura 2.

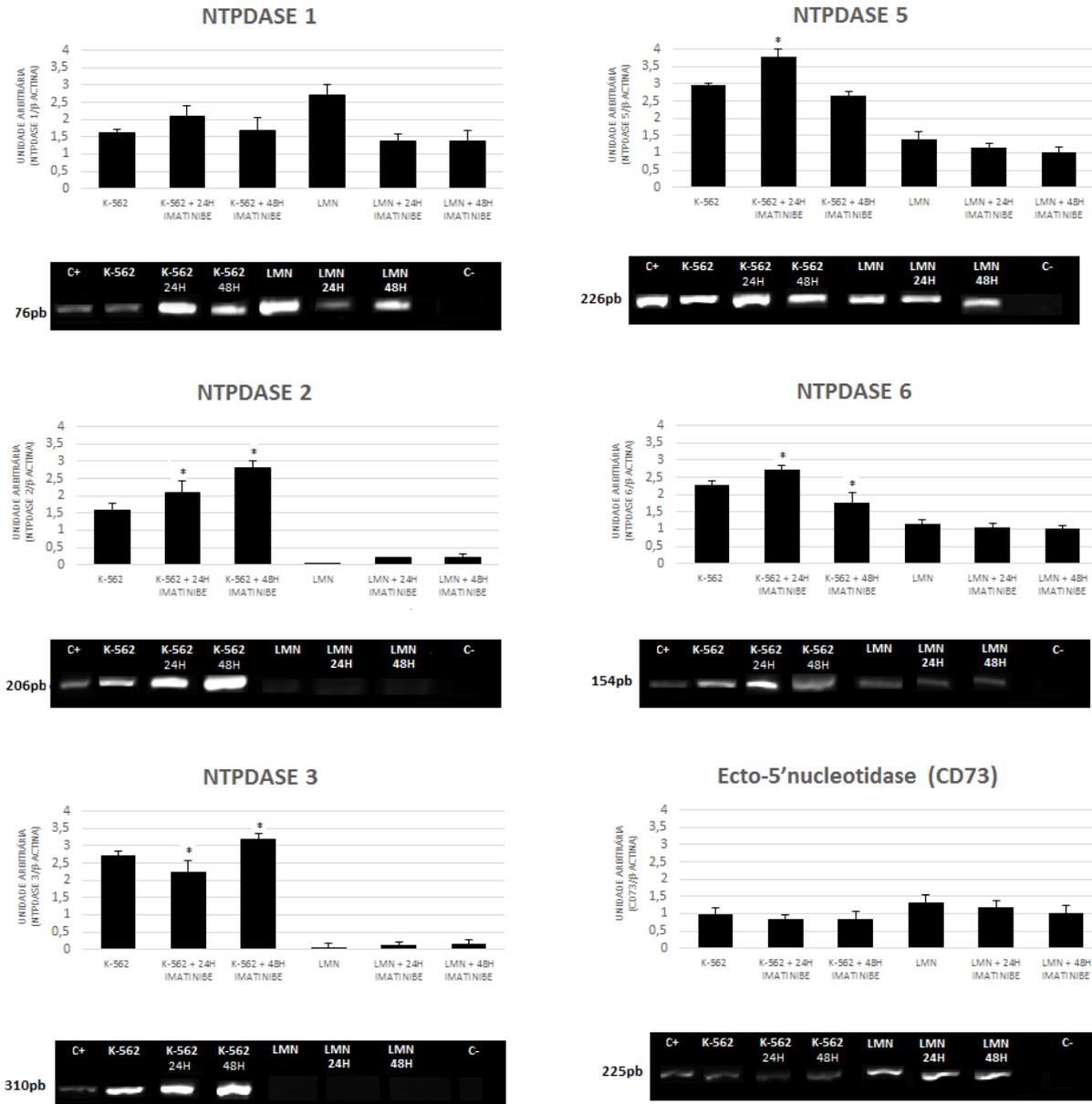


Figura 2. Expressão gênica. Os gráficos de barras indicam a densitometria das bandas obtidas por RT-PCR em relação à razão NTPdase/β-actina em unidades arbitrárias comparando os diferentes tratamentos, logo abaixo mostramos a imagem representativa da expressão dessas enzimas. Os valores são representativos de 3 diferentes experimentos em triplicata. Os dados foram comparados por ANOVA seguida pelo teste Tukey's. * $p < 0,05$, representa diferença estatística quando as células tratadas com imatinibe foram comparadas com células não tratadas.