



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTU SENSU* EM ONCOLOGIA

Danielle Cardoso da Silva

**“Caracterização do perfil de resistência da linhagem de
leucemia mieloide crônica K-IM, resistente ao imatinibe”**

Orientadora: Dr^a Flavia da Cunha Vasconcelos

Co-orientadora: Dr^a Raquel Ciuvalschi Maia

Rio de Janeiro

Março 2017



Instituto Nacional de Câncer

José Alencar Gomes da Silva

Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Oncologia

Danielle Cardoso da Silva

**“Caracterização do perfil de resistência da linhagem de leucemia
mieloide crônica K-IM, resistente ao imatinibe”**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*
do Instituto Nacional de Câncer como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Oncologia.

Orientadora: Dr^a Flavia da Cunha Vasconcelos

Co-orientadora: Dr^a Raquel Ciuvalschi Maia

Rio de Janeiro

Março 2017

S586c Silva, Danielle Cardoso da.

Caracterização do perfil de resistência da linhagem de leucemia mieloide crônica K-IM, resistente ao imatinibe / Danielle Cardoso da Silva. – Rio de Janeiro, 2017.

79 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2017.

Orientadores: Flavia da Cunha Vasconcelos; Rachel Ciuvalschi Maia.

1. Leucemia Mielogênica Crônica BCR-ABL Positiva. 2. Mesilato de Imatinib. 3. Resistência a Medicamentos Antineoplásicos. I. Vasconcelos, Flavia da Cunha (Orient.). II. Maia, Rachel Ciuvalschi (Orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99419



Instituto Nacional de Câncer

José Alencar Gomes da Silva

Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Oncologia

Danielle Cardoso da Silva

**“Caracterização do perfil de resistência da linhagem de leucemia
mieloide crônica K-IM, resistente ao imatinibe”**

Orientadora: Dr^a Flavia da Cunha Vasconcelos

Co-orientadora: Dr^a Raquel Ciuvalschi Maia

Rio de Janeiro, 30 de Março de 2017

Banca examinadora:

Dr. Leonardo Augusto Karam Teixeira (INCA)

Dr. Andre Luiz Mencialha (UERJ)

Dr^a. Thereza Christina Barja-Fidalgo (UERJ)

Dr. Julio Cesar Madureira de Freitas Junior (Suplente interno)

Dr^a. Miriam Bianchi de Frontin Werneck (Suplente externo)

Rio de Janeiro

Março 2017

Aos meus pais, por terem me
dado o suporte necessário para
que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Dra. Flavia, os ensinamentos e o companheirismo nesses três últimos anos. Você tem me ajudado a crescer muito. Obrigada pela amizade, os conselhos e os momentos alegres.

À Dra. Raquel Maia, minha co-orientadora e chefe do do Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, por ter me aceitado como aluna em seu laboratório e por todo o apoio. Ser parte desse laboratório tem me proporcionado muito aprendizado e crescimento como pessoa e como profissional.

Ao Dr. Miguel a colaboração para os experimentos de sequenciamento. Obrigada pela orientação e por ter disponibilizado o seu tempo, o espaço e os equipamentos do seu laboratório para esse fim.

À Dra. Claudete pelos questionamentos científicos muito edificantes sempre que discutimos o trabalho em nossas reuniões.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite para participar dessa importante etapa da minha vida e contribuir para o enriquecimento do meu trabalho.

Às agências de fomento e ao INCA por terem patrocinado esse projeto e cedido a infraestrutura para o seu desenvolvimento.

Aos membros do Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular. Ser parte dessa família é uma grande honra. Obrigada por todos os ensinamentos, ajuda, discussões científicas, apoio, exortações, momentos descontraídos, conversas, brincadeiras. Vocês são minha segunda família.

À Tandressa que chegou há não muito tempo, mas já ocupa um espaço enorme no meu coração. Guria, vai dar tudo certo, você é uma pessoa muito especial.

À Deborah que tem trilhado o caminho do mestrado juntamente comigo, passamos juntas por todas as provas e processos. Obrigada, gata, por me animar a seguir em frente e não desistir. Vamos embarcar numa nova etapa juntas também, acredite. You are Golden!

À Lauana que tem um coração enorme e é a melhor companhia para um café da tarde. Obrigada pela amizade, por nossas conversas, pela confiança e os conselhos.

Ao Gabriel meu maninho na ciência. Obrigada por me fazer rir sem controle! Obrigada por me incentivar a aprender cada dia mais. Seu esforço será recompensado, menino. Keep up the good work.

À Thaís, fofa, pelos ótimos momentos de muitas risadas.

À Paloma, minha dupla, pelas discussões científicas e pelas nossas conversas não científicas igualmente edificantes. Obrigada pela amizade e pelo incentivo.

À Paula pela disposição em me ajudar quando eu mais precisava.

À Fernanda por compartilhar o conhecimento e as células.

Ao Gustavo pela ajuda, o incentivo, o carinho, por apresentar sempre um novo ponto de vista e me fazer refletir.

Ao Luciano pela amizade, as conversas, as brincadeiras. No laboratório, ninguém entende minhas piadas nerds como você!

À Gabriela por me incentivar a fazer o melhor que posso e ser um exemplo para mim de organização e responsabilidade.

À Roberta por colocar os meus pés no chão quando eu precisei e por me incentivar.

À Marcela por me auxiliar nas questões científicas e procedurais, quando precisei.

À Michelle, Marcos, Aline, Rebeca pelas conversas científicas e não científicas.

Ao meu namorado, Ayrton, por estar comigo, andando lado a lado. Pelo companheirismo, por sua paciência, por ser aquele que ouve todas as minhas queixas e lamentações e ainda tem uma palavra encorajadora. Obrigada por compartilhar comigo os sonhos e planos e me incentivar a buscar meus sonhos e lutar pelos meus objetivos. Obrigada pelo cuidado, o carinho e o amor.

Ao Muhamed o apoio incondicional. Obrigada pelas críticas e correções, pelo incentivo, pelos conselhos. Obrigada pela amizade, por estar sempre disposto a me ajudar e não medir esforços ao fazê-lo.

À minha família, pelo amor incondicional, suporte, auxílio, direcionamento. Vocês são meu porto seguro, meu exemplo de vida, sem vocês, não chegaria até aqui. Agradeço ao meu pai que sempre me deu o suporte e o incentivo para que eu me desenvolvesse academicamente. À minha mãe, que incansavelmente cuida de nós. Ao meu irmão pelo companheirismo, pelos momentos divertidíssimos juntos, por ser a minha melhor companhia. Esforça-te e sê corajoso.

A minha prima, Mara, que por um ano morou comigo e me suportou. Obrigada pela amizade, os conselhos e o incentivo para sempre seguir em frente.

Aos meus tios, Bítia e Leandro que estão sempre dispostos a ajudar, quando preciso.

As minhas primas Sofia e Manu por ser a alegria da minha vida. Esforcem-se e vocês irão longe.

A minha família de São Paulo que sempre me acolhe de braços abertos.

Aos meus amigos do laboratório, faculdade, igreja... De onde quer se seja. Vocês são o meu segundo porto seguro. Lutamos juntos, buscamos juntos, crescemos juntos. Obrigada por estarem ao meu lado, mesmo que distantes fisicamente.

Agradeço à Beatriz, Bárbara, Felipe e Mário a amizade mesmo cada um tendo seguido um rumo diferente. Além do incentivo e das discussões científicas, vocês me proporcionam as melhores risadas sempre!

À Deus o cuidado, o amor, a misericórdia, o sustento. Palavras nunca serão suficientes para agradecer-Lo.

Enfim, agradeço a todos vocês que fazem parte da minha vida e que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desse trabalho. A memória não é muito boa, então me perdoem se esqueci de citar alguém.

“Do or do not, there is no try”

Mestre Yoda

RESUMO

Caracterização do perfil de resistência da linhagem de leucemia mieloide crônica K-IM, resistente ao imatinibe

Danielle Cardoso da Silva

O advento da terapia alvo-específica com o imatinibe (IM) transformou o panorama da resposta ao tratamento, progressão e sobrevida dos pacientes de leucemia mieloide crônica (LMC). Apesar do sucesso e do desenvolvimento de inibidores de tirosina-quinase (TKIs) mais potentes, persiste a problemática da resistência ao tratamento. A relevância do estudo dos mecanismos de resistência aos TKIs atualmente reside na frequência das falhas terapêuticas não relacionadas à mutação em BCR-ABL, o principal alvo da terapia. Tendo por finalidade estudar os diversos mecanismos que cooperam para a aquisição de resistência, foi desenvolvida em nosso laboratório uma linhagem de LMC resistente ao IM. A linhagem resistente, denominada K-IM, foi selecionada pelo cultivo da linhagem K562 em concentrações crescentes de IM, alcançando 1,0 μM do fármaco. Sem apresentar mutação no domínio quinase de BCR-ABL, ela se constitui um bom modelo para o estudo dos outros mecanismos de resistência ao IM. A linhagem apresentou aumento nos níveis de RNA mensageiro (RNAm) de *BCR-ABL* que não se traduziu em aumento da atividade de Bcr-Abl ou no impedimento da sua inibição pelo tratamento com IM. A linhagem K-IM se mostrou significativamente mais resistente do que a parental. Embora o tratamento com 1,0 μM de IM tenha promovido um acúmulo de células nas fases G0/G1 do ciclo celular, não foi acompanhado de indução à morte celular nem impediu o aumento do número de células em cultura. Foram avaliadas as proteínas transportadoras de efluxo por serem determinantes para a resistência à múltiplas drogas, porém a sua atividade não foi observada na linhagem K-IM. Uma vez que as proteínas antiapoptóticas XIAP e survivina são muito estudadas como fatores de quimiorresistência, seus níveis de RNAm e proteína foram avaliados. A K-IM apresentou níveis similares à K562 de RNAm de XIAP, porém apresentou aumento de survivina nas duas instâncias, sugerindo que essa proteína exerça um papel na sua resistência. Procurando vias que poderiam induzir a expressão de survivina, foi observado um aumento na fosforilação das proteínas ERK1/2 que persistiu inclusive após tratamento com IM. Esse achado aponta para uma ativação da via de MAPK/ERK de forma independente à Bcr-Abl e associada à resistência. A diminuição dos níveis de survivina após tratamento com IM sugere que ela esteja sujeita à sinalização por Bcr-ABL e não relacionada à via de MAPK/ERK, nessa linhagem em particular. Nossos dados sugerem que diferentes mecanismos de resistência podem atuar de maneira dependente ou independente de Bcr-Abl e simultaneamente na promoção da resistência na linhagem celular K-IM. Esta linhagem pode representar um excelente modelo para o estudo da resistência, assim como auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para sobrepujar a resistência observada em pacientes com LMC.

Palavras-chave: leucemia mieloide crônica, imatinibe, resistência, Bcr-Abl, ERK1/2, survivina

ABSTRACT

Characterization of the chronic myeloid leukemia cell line K-IM resistance to imatinib

Danielle Cardoso da Silva

The advent of target-specific therapy with imatinib (IM) has transformed the scenario of response to treatment, progression and survival of patients with chronic myeloid leukemia (CML). Despite the success and development of more potent tyrosine kinase inhibitors (TKIs), the problem of resistance to treatment remains. The relevance of the study of mechanisms of resistance to TKIs currently lies in the frequency of therapeutic failures unrelated to mutation in BCR-ABL, the main target of therapy. Aiming to study the various mechanisms that cooperate for the acquisition of resistance, a CML cell line resistant to IM was developed in our laboratory. The resistant cell line, called K-IM, was selected by culturing the K562 cell line at increasing concentrations of IM, reaching 1.0 μM of the drug. Without presenting mutation in the BCR-ABL kinase domain, it constitutes a good model for the study of the other mechanisms of resistance to IM. The cell line showed an increase in *BCR-ABL* messenger RNA (mRNA) levels which did not result in increased Bcr-Abl activity or in the impairment of its inhibition by IM treatment. The K-IM cell line was significantly more resistant to IM than the parental cell line. Although treatment with 1.0 μM of IM promoted cell accumulation in the G0/G1 phases of the cell cycle, it was not accompanied by induction of cell death nor prevented the increase in the number of cells in culture. The efflux transporter proteins were evaluated because they are determinant for multidrug resistance, but their activity was not observed in the K-IM cell line. Since the antiapoptotic proteins XIAP and survivin are studied as chemoresistance factors, their mRNA and protein levels were evaluated. K-IM showed similar levels to K562 of XIAP mRNA, but showed higher survivin levels in both instances, suggesting that this protein plays a role in its resistance. Searching for pathways that could induce survivin expression, an increase in ERK1/2 protein phosphorylation was observed that persisted even after treatment with IM. This finding points to an activation of the MAPK/ERK pathway independently of Bcr-Abl and associated with resistance. Decreased survivin levels following IM treatment suggest that it is regulated by Bcr-Abl signaling and unrelated to the MAPK/ERK pathway in that particular cell line. Our data suggest that different resistance mechanisms may act in a Bcr-Abl-dependent or independent manner and simultaneously promote resistance in the K-IM cell line. This cell line may represent an excellent model for the study of resistance, as well as help in the development of new therapeutic strategies to overcome the resistance observed in patients with CML.

Keywords: chronic myeloid leukemia, imatinib, resistance, Bcr-Abl, ERK1/2, survivin

LISTA DE ABREVIações

ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ALK	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i>
A-LOOP	Alça de ativação
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APS	Persulfato de amônio
ATP	Adenosina trifosfato
BAD	<i>Bcl-2-associated death protein</i>
BCL-2	<i>B cell lymphoma 2</i>
BCR	<i>Breakpoint cluster region</i>
BCRP	Proteína de resistência do câncer de mama
BIR	<i>Baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat</i>
c-ABL	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>
CAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CBL	<i>Casitas B-lineage Lymphoma</i>
CCYR	Resposta citogenética completa
CDNA	DNA complementar
CHR	Resposta hematológica completa
c-IAP1	<i>Cellular inhibitor of apoptosis protein 1</i>
c-IAP2	<i>Cellular inhibitor of apoptosis protein 2</i>
CK1	<i>Casein kinase 1</i>
CK2	<i>Casein kinase 2</i>
CMR	Resposta molecular completa
CPC	Chromosomal passenger complex
CRKL	<i>CT10 (Chicken tumor virus 10) regulator of kinase-like</i>
CT	<i>Cycle threshold</i>
CYR	Resposta citogenética
DAS	Dasatinibe
DIABLO	<i>Direct IAP-binding protein with low pI</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DUSP	<i>Dual-specificity phosphatase</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FA	Fase acelerada
FB	Fase blástica
FC	Fase crônica
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
Flt-3	<i>Fms-like tyrosine kinase 3</i>
FTC	Fumitremorgin C
GAB2	<i>GRB2 Associated Binding Protein 2</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>

GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)</i>
HSC70	<i>Heat Shock Protein 70</i>
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis protein</i>
IBM	<i>IAP binding motif</i>
ILP2	<i>Insulin-like peptide 2</i>
IM	<i>Imatininbe</i>
INCENP	<i>Inner centromere protein is a protein</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
JMML	<i>Juvenile myelomonocytic leukemia</i>
LMC	<i>Leucemia mieloide crônica</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MDR1	<i>Multidrug resistance 1</i>
MMR	<i>Resposta molecular maior</i>
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
MTT	<i>3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2-5-difenil tetrazólio brometo</i>
NAIP	<i>Neuronal apoptosis inhibitory protein</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NGF	<i>Nuclear growth factor</i>
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
PBS	<i>Phosphaste buffered salina</i>
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PDGFR	<i>Platelet derived growth factor receptor</i>
Pgp	<i>Glicoproteína-P</i>
Ph	<i>Cromossomo Philadelphia</i>
PHA	<i>Pheophorbide A</i>
PI	<i>Propidium iodide</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PKA	<i>Protein Kinase A</i>
PKC η	<i>Protein kinase C η</i>
P-LOOP	<i>Alça de ligação ao fosfato</i>
PMT	<i>Photomultiplier</i>
RAS	<i>Retrovirus-associated DNA sequences</i>
RHO	<i>Rhodamine 123</i>
RING	<i>Really interesting gene</i>
RNA	<i>Ácido ribonucleico</i>
RNAM	<i>Ácido ribonucleico mensageiro</i>
RPM	<i>Rotação por minuto</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSK	<i>Ribosomal s6 kinase</i>
RT-qPCR	<i>Quantitative reverse transcription PCR</i>
SCR	<i>Short consensus repeats</i>
SDS	<i>Dodecil sulfato de sódio</i>

SDS-PAGE	<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	Soro fetal bovino
SH2	<i>Scr homology 2</i>
SH3	<i>Scr homology 3</i>
SMAC	<i>Second mitochondrial derived activator of caspases</i>
SOS	<i>Son of sevenless</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TAE	<i>Tris-acetate-EDTA</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCF	<i>T-Cell-Specific Transcription Factor</i>
TEMED	Tetrametiletenodiamina
TKI	Inibidor de tirosina quinase
UV	Radiação ultravioleta
VRP	Verapamil
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

	LISTA DE FIGURAS	página
Figura 1.1	O cromossomo Philadelphia.	2
Figura 1.2	Domínios e sinalização de Bcr-Abl.	4
Figura 1.3	Mecanismos de resistência aos inibidores de tirosina quinase.	8
Figura 1.4	Mapa das substituições de aminoácido no domínio quinase da Bcr-Abl identificados em amostras de pacientes relatados resistentes em artigos científicos.	9
Figura 1.5	Amplificação e superexpressão de Bcr-Abl.	10
Figura 1.6	Representação esquemática das proteínas IAPs.	16
Figura 4.1	Seleção de linhagens resistentes.	32
Figura 4.2	Desenvolvimento de linhagens resistentes.	33
Figura 4.3.	Resposta da linhagem K562 ao tratamento com imatinibe.	34
Figura 4.4.	Resposta da linhagem K-IM ao tratamento com IM.	35
Figura 4.5	Resposta da linhagem K562 ao tratamento com dasatinibe.	35
Figura 4.6	Resposta da linhagem K-IM ao tratamento com dasatinibe.	36
Figura 4.7	Análise comparativa da resposta das linhagens de LMC aos inibidores de tirosina quinase.	37
Figura 4.8	Indução da morte celular por imatinibe nas linhagens K562 e K-IM.	38
Figura 4.9	Análise da indução de morte celular pelo imatinibe.	39
Figura 4.10	Fragmentação do DNA induzida pelo tratamento com imatinibe.	40
Figura 4.11	Efeito do imatinibe na distribuição das fases do ciclo celular.	41
Figura 4.12	Análise do ciclo celular nas linhagens K562 e K-IM após incubação com o inibidor de tirosina quinase imatinibe.	42
Figura 4.13	Avaliação do crescimento celular após tratamento com imatinibe.	44

Figura 4.14	Níveis de RNA mensageiro de <i>BCR-ABL</i> .	45
Figura 4.15	Avaliação indireta da atividade da proteína Bcr-Abl.	46
Figura 4.16	Avaliação da inibição de Bcr-Abl pelo IM.	46
Figura 4.17	Expressão de glicoproteína-P (Pgp).	47
Figura 4.18	Avaliação da atividade das proteínas transportadoras de efluxo.	48
Figura 4.19	Avaliação dos níveis de RNA mensageiro das proteínas inibidoras da apoptose.	49
Figura 4.20	Avaliação da expressão de survivina.	49
Figura 4.21	Avaliação do conteúdo proteico de ERK1/2.	50
Figura 4.22	Avaliação das proteínas ERK1/2 após tratamento com IM.	51
Figura 4.23	Avaliação da proteína survivina após tratamento com IM.	52
Figura 4.24	Avaliação nos níveis proteicos e de fosforilação de Shp2 após tratamento com IM.	53
Figura 6.1	Mecanismos de resistência ao imatinibe.	61

	LISTA DE TABELAS	página
Tabela 1.1	Definições de resposta ao tratamento em LMC.	6
Tabela 3.1	<i>Primers</i> para o sequenciamento dos exons de 4 e 10 do gene BCR-ABL.	23
Tabela 3.2	Especificações das reações de amplificação dos exons de interesse.	24
Tabela 3.3	Ciclos de amplificação dos exons de interesse.	24
Tabela 3.4	Sondas utilizadas.	26
Tabela 3.5	Anticorpos utilizados.	31

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Leucemia mieloide crônica	1
1.2	O Cromossomo Philadelphia	1
1.3	A Bcr-Abl	2
1.4	Tratamento	4
1.5	Resposta ao tratamento	5
1.6	Falha terapêutica	7
1.7	Resistência	7
1.8	Mecanismos de resistência relacionados à Bcr-Abl	7
1.8.1	Mutação	7
1.8.2	Amplificação e superexpressão de Bcr-Abl	10
1.9	Mecanismos independentes de Bcr-Abl	10
1.9.1	Proteínas transportadores de efluxo	10
1.9.2	Desregulação de vias	12
1.9.2.1	ERK1/2	13
1.9.2.2	Shp2	15
1.9.3	Proteínas inibidoras da apoptose	16
1.9.3.1	Survivina	17
1.9.3.2	XIAP	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo geral	21
2.2	Objetivos específicos	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1	Linhagens celulares	22
3.2	Reagentes	22
3.3	Sequenciamento	22
3.4	Viabilidade celular	25
3.5	Quantificação dos níveis de RNA mensageiro	25
3.6	Análise proteica por citometria de fluxo	26
3.7	Atividade dos transportadores de efluxo	27
3.8	Contagem de células	28
3.9	Avaliação da morte celular	28
3.10	Avaliação do ciclo celular e da fragmentação de DNA	29
3.11	Western Blot	30
3.12	Análise estatística	31
4	RESULTADOS	32
4.1	Desenvolvimento da linhagem K-IM	32
4.2	Avaliação da indução de citotoxicidade por inibidores de tirosina quinase	33
4.2.1	Avaliação da viabilidade celular em resposta ao tratamento com inibidores de tirosina quinase	33

4.2.2	Avaliação da indução de morte celular pelo IM	37
4.2.3	Avaliação de população sub-G0/G1 após tratamento com IM	39
4.3	Avaliação da proliferação celular após tratamento com o IM	40
4.3.1	Avaliação do efeito do tratamento com IM na distribuição das fases do ciclo celular	40
4.3.2	Avaliação da proliferação celular, por contagem de células, após tratamento com o IM	43
4.4	Avaliação do status de Bcr-Abl	44
4.4.1	Análise de mutação no gene <i>BCR-ABL</i>	44
4.4.2	Análise dos níveis de RNA mensageiro de <i>BCR-ABL</i>	45
4.4.3	Avaliação indireta da atividade da proteína Bcr-Abl	45
4.4.4	Avaliação da atividade de Bcr-Abl após tratamento com IM	46
4.5	Avaliação da expressão e atividade das proteínas transportadoras de efluxo	47
4.5.1	Avaliação da expressão de Pgp	47
4.5.2	Avaliação da atividade dos transportadores de efluxo	47
4.6	Avaliação das proteínas inibidoras da apoptose	48
4.6.1	Análise dos níveis de RNA mensageiro de XIAP e survivina	48
4.6.2	Avaliação dos níveis proteicos de survivina	49
4.7	Avaliação de desregulação de vias de sinalização	50
4.7.1	Avaliação da expressão e fosforilação de ERK1/2	50
4.7.2	Avaliação dos níveis proteicos de survivina após tratamento com IM	51
4.7.3	Avaliação da proteína fosfatase Shp2 na linhagem K-IM	52
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÕES	60
7	PERSPECTIVAS	62
8	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia mieloide crônica

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa cuja característica patognomônica é a presença do cromossomo Philadelphia (Ph) (NOWELL, 1962). A LMC representa cerca de 20% de todos os casos de leucemia em adultos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017) e sua incidência varia de 0,6 a 2 por 100 000. Embora possa ocorrer em qualquer idade, a mediana de idade ao diagnóstico é de 64 anos (ROHRBACHER; RASFORD, 2009).

A história natural da LMC tem três fases denominadas fase crônica (FC), fase acelerada (FA) e fase blástica (FB). A FC é a fase inicial da doença, na qual a maioria dos pacientes é diagnosticada. A FA é determinada pela presença de 15% ou mais blastos no sangue periférico e medula óssea, 20% ou mais de basófilos no sangue periférico e contagem de plaquetas menor que 100 000/ μ l. A FB é definida pela presença de 30% ou mais blastos no sangue periférico ou medula óssea, a presença de aglomerados de blastos na medula óssea ou a presença de doença extramedular com células imaturas (por exemplo, um sarcoma mieloide) (THOMPSON; KANTARJIAN; CORTES, 2015).

1.2 O cromossomo Philadelphia

A LMC é caracterizada pela presença do cromossomo Ph, sendo a primeira doença associada a uma anormalidade cromossômica (NOWELL, 1962). Anos depois da descoberta do cromossomo Ph, em 1973, sua origem foi traçada como a translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 (ROWLEY, 1973) (Figura 1.1). Essa translocação funde os genes *BCR* (*breakpoint cluster region*) e *c-ABL* (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog*), gerando o gene *BCR-ABL* que codifica a proteína homônima.

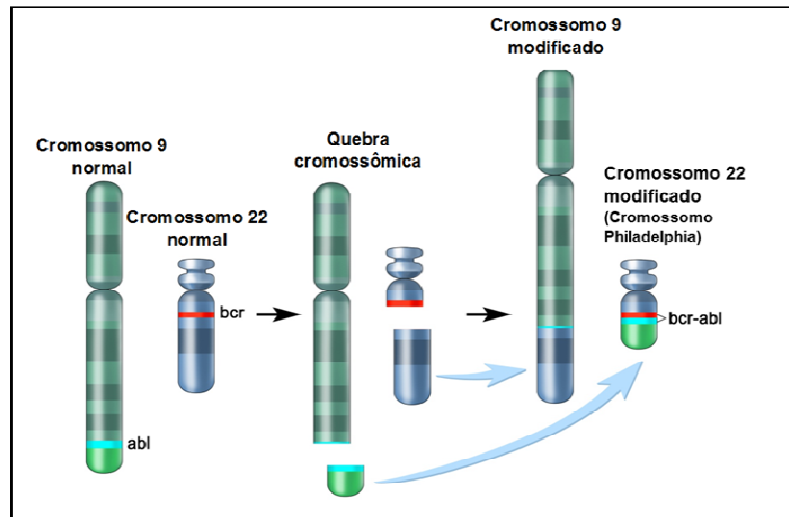


Figura 1.1: Cromossomo Philadelphia: A translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 gera o cromossomo Philadelphia. Modificado de National Cancer Institute <https://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR533336-750.jpg>

1.3 A Bcr-Abl

A Bcr-Abl foi caracterizada como a responsável pela patogênese da LMC (LUGO *et al.*, 1990). Ela apresenta atividade tirosina-quinase constitutiva por que alguns mecanismos de auto-inibição presentes em c-Abl não ocorrem da mesma forma na proteína fusionada. A fusão dos genes exclui o primeiro exon do gene *ABL1*, levando ao encurtamento da região do Cap, que é importante para a regulação da atividade tirosina-quinase da c-Abl. Essa região, juntamente com os domínios SH2 (Scr *homology* 2) e SH3 (Scr *homology* 3), participa de interações intramoleculares formando uma estrutura de grampo que inviabiliza a interação dos substratos com o domínio quinase (HANTSCHHEL; SUPERTI-FURGA, 2004). A translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 gera três principais produtos, dependendo da altura em que o gene BCR é quebrado: p190, p210 e p2130, cada uma com um potencial diferente de transformação, sendo a p210 a responsável pela LMC (LI *et al.*, 1999). Geralmente, na LMC, a quebra no gene BCR ocorre no íntron entre os exons b2 e b4 ou entre os exons b3 e b4, gerando os genes b2a2 e b3a2, ambos codificam a p210 (PASTERNAK *et al.*, 1998).

A p210^{Bcr-Abl} é uma proteína que apresenta um domínio *coiled-coil* que permite a sua dimerização, um domínio SH2, que interage com tirosinas fosforiladas, um domínio SH3 que interage com regiões ricas em prolinas, o domínio tirosina-quinase, sequências de endereçamento nuclear (NLS, do inglês *nuclear localization signal*), um domínio de ligação ao DNA e um domínio de ligação à actina (CILLONI; SAGLIO, 2012) (Figura 1.2).

Bcr-Abl promove a transformação leucêmica pela ativação de diferentes vias de sinalização como Ras-Raf-MEK-ERK; PI3K-Akt e JAK2-STAT5 promovendo proliferação e resistência à apoptose (CILLONI; SAGLIO, 2012). O domínio *coiled-coil* da Bcr é importante na leucemogênese porque permite a dimerização de moléculas de Bcr-Abl e leva à ativação dessas (ZHANG *et al.*, 2001). Bcr-Abl então promove a ativação das vias mitogênicas MAPK/ERK e PI3K/Akt pela interação com a proteína adaptadora GRB2, que se liga a tirosina 177 fosforilada de Bcr-Abl, recruta Gab2 (SATTLER *et al.*, 2002) e leva a ativação de Ras (PENDERGAST *et al.*, 1993). Ras é necessária para a transformação promovida por Bcr-Abl (SAWYERS; MACLAUGHLIN; WITTE, 1995). Esse complexo proteico ativa tanto MAPK/ERK quanto PI3K/Akt (SATTLER *et al.*, 2002) levando a proliferação exacerbada e a resistência à apoptose. Bcr-Abl ativa ERK1/2 e isso está relacionado à proliferação de forma independente de fatores de crescimento (CORTEZ; REUTHER; PENDERGAST, 1997). Também foi observado que ativação de PI3K é essencial para a proliferação de células Bcr-Abl positivas (SKORSKI *et al.*, 1995). Outra via ativada por Bcr-Abl que medeia seus efeitos de proliferação e sobrevivência é a via de JAK/STAT. JAK2 interage com Bcr-Abl e é ativada, depois leva a ativação de STAT5 (CARLESSO; FRANK; GRIFFIN, 1996). STAT5 está constitutivamente ativada por Bcr-Abl (SHUAI *et al.*, 1996). STAT3 também é regulada por Bcr-Abl levando à proliferação e resistência (BEWRY *et al.*, 2008; MENCALHA *et al.*, 2014). A ativação de STAT3 por Bcr-Abl, ocorre por meio de JAK1/2 e ERK1/2 (COPPO *et al.*, 2006). c-Myc também é importante para transformação leucêmica, como mostrado por Sawyers e colaboradores, a expressão de um dominante negativo de c-Myc impediu a transformação leucêmica induzida por p190^{BCR-ABL} (SAWYERS; CALLAHAN; WITTE, 1992). Além disso, foi mostrado que superexpressão de c-Myc restaurou o fenótipo leucêmico em linhagens que expressavam p190^{BCR-ABL} mutado nos domínios de ligação a GRB2 e no domínio SH2 (AFAR *et al.*, 1994). Foi comprovado recentemente que o gene *BCR-ABL* tem sua transcrição regulada por c-Myc (SHARMA *et al.*, 2015). O principal alvo de fosforilação de Bcr-Abl é a proteína adaptadora CRKL (*CT10 (Chicken tumor virus 10) regulator of kinase-like*) que se liga ao domínio SH2 da Bcr-Abl e forma um complexo proteico com CBL (*Casitas B-lineage Lymphoma*) (DE JONG *et al.*, 1995). Existe uma correlação direta entre a presença de Bcr-Abl e a fosforilação de CRKL (TEN HOEVE *et al.*, 1994). Portanto, os níveis de CRKL sob a forma fosforilada podem ser utilizados para avaliar, de forma indireta, a atividade de Bcr-Abl. Por essa estratégia é possível identificar a resistência *in vitro* (VASCONCELOS *et al.*, 2013), assim como prever a resposta de pacientes ao tratamento (WHITE *et al.*, 2007) (Figura 1.2).

1.4 Tratamento

Devido à importância da Bcr-Abl para a patogênese da LMC, o tratamento é feito com moléculas que a inibem, denominadas inibidores de tirosina-quinase (TKIs).

O primeiro TKI desenvolvido foi o imatinibe (IM), que atua como inibidor competitivo no sítio de ligação do ATP e inibe não só a Bcr-Abl (BUCHDUNGER *et al.*, 1996) como também o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e c-Kit (DRUKER *et al.*, 2001). O IM se liga somente à forma inativa da Bcr-Abl e impede a ligação da proteína ao ATP (SCHINDLER *et al.*, 2000). O IM é utilizado como primeira linha de tratamento para a LMC. Os dados de um estudo clínico com pacientes de LMC após seis anos de tratamento com IM relatou que a sobrevida livre de progressão de doença foi de 93% e a sobrevida global de 95% (HOCHHAUS *et al.*, 2009).

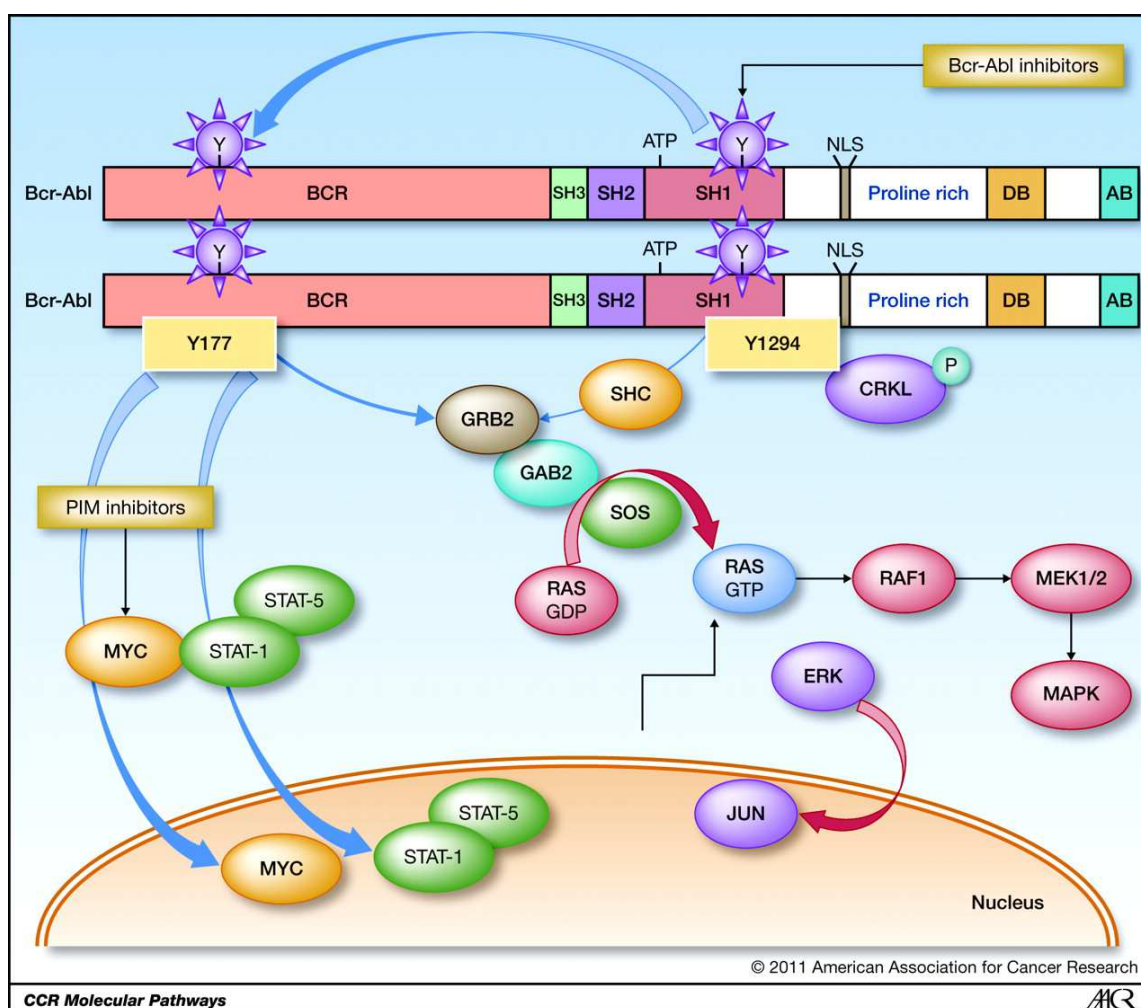


Figura 1.2: Domínios e sinalização de Bcr-Abl. A Bcr-Abl apresenta o domínio *coiled-coil* que é importante para a dimerização da proteína; os domínios de interação com proteínas SH2 e SH3; o domínio quinase; regiões ricas em prolina; seqüências de localização nuclear; domínio de interação com o DNA e um domínio de

interação com actina. As proteínas adaptadoras GRB2 e SOS se ligam à tirosina 177 fosforilada na região do BCR, enquanto que os substratos de fosforilação, como o CRKL, interagem com o domínio quinase. Figura adaptada de Cilloni D; Saglio G. Molecular pathways: BCR-ABL. Clin Cancer Res. 2012 Feb 15;18(4):930-7.

Os TKIs denominados de segunda geração dasatinibe (DAS) e nilotinibe vêm sendo utilizados como primeira e segunda linha de tratamento da LMC (KUJAK; KOLESAR, 2016).

O nilotinibe tem forma molecular semelhante ao IM e foi desenvolvido como um inibidor 10 vezes mais potente de Bcr-Abl (WEISBERG *et al.*, 2005). Assim como o IM, o nilotinibe só inibe a Bcr-Abl quando esta está na sua forma inativa e também inibe o PDGFR e c-Kit. Estudos clínicos com pacientes resistentes ao IM relataram que a sobrevida global após um ano de tratamento com nilotinibe foi de 95% (KANTARJIAN *et al.*, 2007).

O DAS foi desenvolvido como um inibidor de Scr e Bcr-Abl e se liga tanto à forma ativa quanto inativa da Bcr-Abl (SHAH *et al.*, 2004). Em pacientes de LMC a sobrevida global em seis anos para pacientes que falharam o tratamento com IM foi de 71% com o uso do DAS e 49% para a sobrevida livre de progressão (SHAH *et al.*, 2014).

O Bosutinibe é um TKI de terceira geração usado como segunda e terceira linha de tratamento da LMC. Ele também foi desenvolvido como inibidor de Scr e, além de Bcr-Abl, inibe Syk, ALK, RET, Flt-3, PKA, CK1 e CK2, que também são proteínas quinases envolvidas na ativação de várias vias de sinalização e relacionadas à tumorigênese (PUTTINI *et al.*, 2006). Estudos com pacientes de LMC mostram taxa de sobrevida de global em dois anos em pacientes resistentes ao IM de 92% e sobrevida livre de progressão de 79% (CORTES *et al.*, 2011).

O Ponatinibe é um TKI de terceira geração usado como terceira linha de tratamento da LMC. É o único TKI desenvolvido até agora e aprovado para o tratamento da LMC que inibe a Bcr-Abl com a mutação T315I (O'HARE *et al.*, 2009). A taxa de sobrevida global em um ano para pacientes que falharam a três TKIs é de 94% e 80% para sobrevida livre de progressão de doença (CORTES *et al.*, 2013).

1.5 Resposta ao tratamento

A resposta ao tratamento na LMC é avaliada por parâmetros hematológicos, citogenéticos e moleculares. A resposta hematológica completa é definida por aspectos clínicos e pela avaliação do sangue periférico. A resposta citogenética é definida pela porcentagem de metáfases Ph⁺ em um aspirado de medula óssea, podendo também ser

determinada por ensaio de FISH em amostra de sangue periférico caso não haja metáfases Ph+ em pelo menos 200 metáfases analisadas (TESTONI et al., 2009). A resposta molecular é definida pela quantidade de transcritos de *BCR-ABL* em células do sangue periférico (THOMPSON; KANTARJIAN; CORTES, 2015). Para uniformizar o resultado dos níveis de transcritos de *BCR-ABL*, uma vez que existe grande variabilidade na sensibilidade, foi estipulada uma escala universal (BRANFORD et al., 2008). A nomenclatura das respostas e o seu significado estão descritos na Tabela 1.1.

Após o diagnóstico, os pacientes com LMC devem realizar hemogramas a cada 1-2 semanas até atingir uma resposta hematológica completa e depois a cada três meses (THOMPSON; KANTARJIAN; CORTES, 2015). A análise citogenética deve ser feita no momento do diagnóstico e depois em 3, 6 e 12 meses de tratamento (BACCARANI et al., 2013). Após alcançada a resposta citogenética maior, os exames de medula óssea são recomendados a cada 1-3 anos (JABBOUR, 2016).

Tabela 1.1: Definições de resposta ao tratamento em LMC

Resposta	Definição
Resposta Hematológica Completa (CHR)	Contagem de leucócitos $<10 \times 10^9/l$, basófilos $<5\%$, plaquetas $<450 \times 10^9/l$, ausência de granulócitos imaturos, baço impalpável
Resposta Citogenética menor (Minor CyR)	36-95% metáfases Ph+ na medula óssea
Resposta Citogenética maior (Major CyR)	1%-35% metáfases Ph+ na medula óssea
Resposta Citogenética Completa (CCyR)	0% metáfases Ph+ na medula óssea
Resposta Molecular Maior (MMR)	$\leq 0,1\%$ BCR-ABL na Escala Internacional
Resposta Molecular Completa (CMR)	BCR-ABL indetectável com sensibilidade $\geq 4,5$ ou $5,0$ logs

Tabela modificada de Thompson PA; Kantarjian HM; Cortes JE. Diagnosis and Treatment of Chronic Myeloid Leukemia in 2015. Mayo Clin Proc. 2015 Oct;90(10):1440-54.

Para pacientes com resposta citogenética completa durável, os exames moleculares de sangue periférico são feitos de 3-6 meses. Para pacientes com resposta molecular maior, com frequência de 6 meses (THOMPSON; KANTARJIAN; CORTES, 2015). Estudos mostraram que uma vez alcançada a resposta citogenética completa, a aquisição ou não de resposta molecular maior não altera a sobrevida dos pacientes (KANTARJIAN et al., 2009).

1.6 Falha terapêutica

A falha terapêutica é descrita como a falha em alcançar CHR e menos de 95% das metáfases Ph⁺ em 3 meses ou não apresentar menos de 35% de metáfases Ph⁺ e menos de 10% de transcritos de *BCR-ABL* em 6 meses ou não apresentar menos de 1% de *BCR-ABL* e não alcançar CCyr em 12 meses. Além desses critérios, a progressão para FA ou FB constitui falha terapêutica em qualquer momento do tratamento. A perda de resposta é definida como perda de CCyr ou CHR ou progressão para FA ou FB. A perda de resposta não deve ser definida pela perda de MMR por causa das flutuações inerentes da técnica (THOMPSON; KANTARJIAN; CORTES, 2015).

1.7 Resistência

O tratamento com o IM é eficaz para a maioria dos pacientes, porém cerca de 20-30% dos pacientes necessitam de tratamento alternativo devido ao desenvolvimento de resistência ou intolerância (EIDE; O'HARE, 2015).

Diversos mecanismos moleculares foram relacionados à resistência e podem ser relacionados ou não à Bcr-Abl (Figura 1.3).

1.8 Mecanismos de resistência relacionados à Bcr-Abl

Alguns mecanismos de resistência decorrem de alterações na molécula alvo do tratamento, a proteína Bcr-Abl, tais como a aquisição de mutações, a amplificação gênica e a superexpressão da proteína.

1.8.1 Mutação

A resistência pode decorrer de diversos mecanismos moleculares diferentes, sendo o mais frequentemente encontrado na clínica a mutação no gene *BCR-ABL* (BRANFORD *et al*, 2003; SOVERINI *et al*, 2006). A avaliação de mutação no gene *BCR-ABL* deve ser feita em amostras dos pacientes que falham a terapia ou que progridam para FA ou FB ou que tenham aumento de 1 log nos níveis de RNAm de *BCR-ABL* (JABBOUR, 2016). Estima-se que cerca de 50% dos pacientes resistentes apresentam mutações no gene *BCR-ABL*, além disso, as

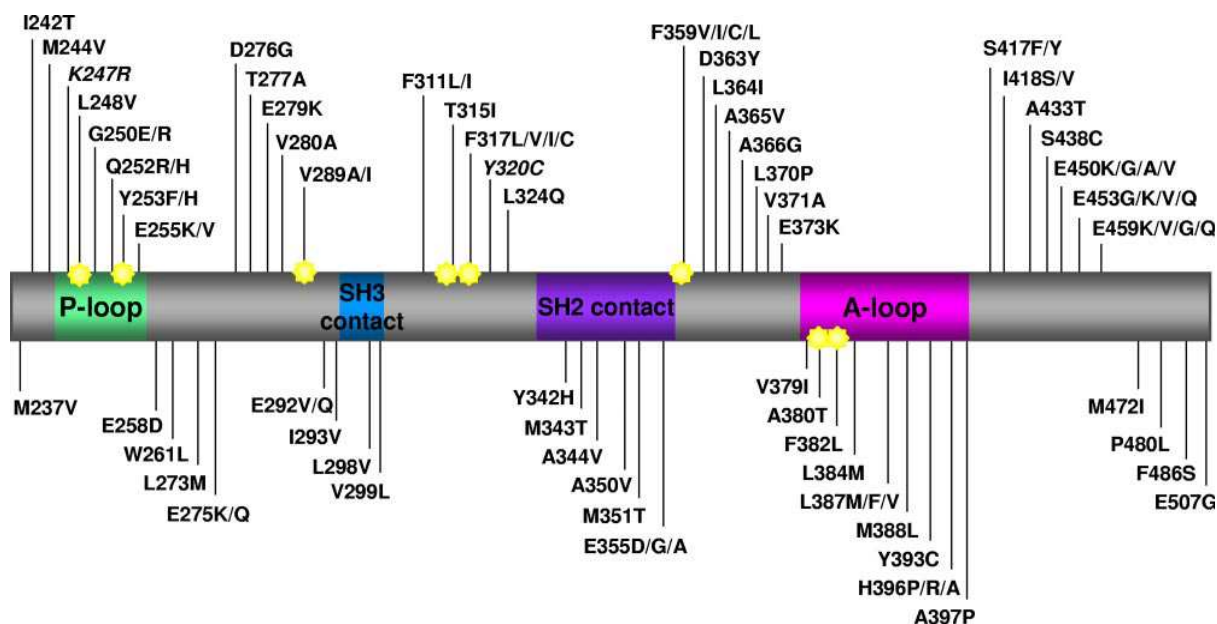


Figura 1.4: Mapa das substituições de aminoácido no domínio quinase da Bcr-Abl identificados em amostras de pacientes relatados resistentes em artigos científicos. Os principais motivos no domínio quinase estão indicados, sendo P-Loop o domínio de ligação ao fosfato; SH2 e SH3, os domínios de interação com proteínas; A-Loop, o domínio de ativação. As estrelas indicam a posição dos aminoácidos diretamente envolvidos com a ligação ao imatinibe. K247R e Y320C estão em itálico porque foram descritos como polimorfismos de único nucleotídeo. Modificado de Soverini et al., 2011.

As mutações mais frequentes são E225K/V, Y253F/H, T315I, G250E, M351T, M244V e F359V/I, F317L, E355G/A (SOVERINI *et al.*, 2006; JABBOUR *et al.*, 2006; MÜLLER *et al.*, 2009). A mutação T315I é extensamente estudada por conferir resistência a todos os TKIs disponíveis, exceto o ponatinibe, e por estar presente entre 4 - 20% dos casos de mutação (KALEEM *et al.*, 2015; CORTES *et al.*, 2012). Além da T315I, outras mutações também conferem resistência aos TKIs de segunda geração. O DAS não se mostrou eficaz na inibição dos mutantes V299, T315I e F317 (SHAH *et al.*, 2014), enquanto que o nilotinibe não foi eficaz na inibição de Y253H, E255, F359 e T315I (HUGHES *et al.*, 2009). As mutações podem promover a resistência de três formas diferentes (KALEEM *et al.*, 2015):

1) Inibição direta causada pela alteração dos resíduos que interagem diretamente com o TKI, impedindo sua ligação. Exemplos desse mecanismo são as mutações T315I, F317L e F359C/V.

2) Inibição indireta por provocar mudanças conformacionais que impedem a ligação do TKI, como por exemplo G250E, Q252H, Y253H e E255K/V.

3) A manutenção da forma ativa da Bcr-Abl, por exemplo: M351T e H369R/P, que impedem a atuação de TKIs como o IM e o nilotinibe.

1.8.2 Amplificação e superexpressão de Bcr-Abl

Outras alterações relacionadas à Bcr-Abl que podem ocorrer e promover a resistência são a amplificação gênica e a superexpressão da proteína. A amplificação gênica, ou seja, o aumento do número de cópias do gene *BCR-ABL*, pode promover a superexpressão da proteína Bcr-Abl, aumentando a demanda de moléculas de TKI para que ocorra a inibição eficaz da atividade de Bcr-Abl (GORRE *et al.*, 2001) (Figura 1.5).

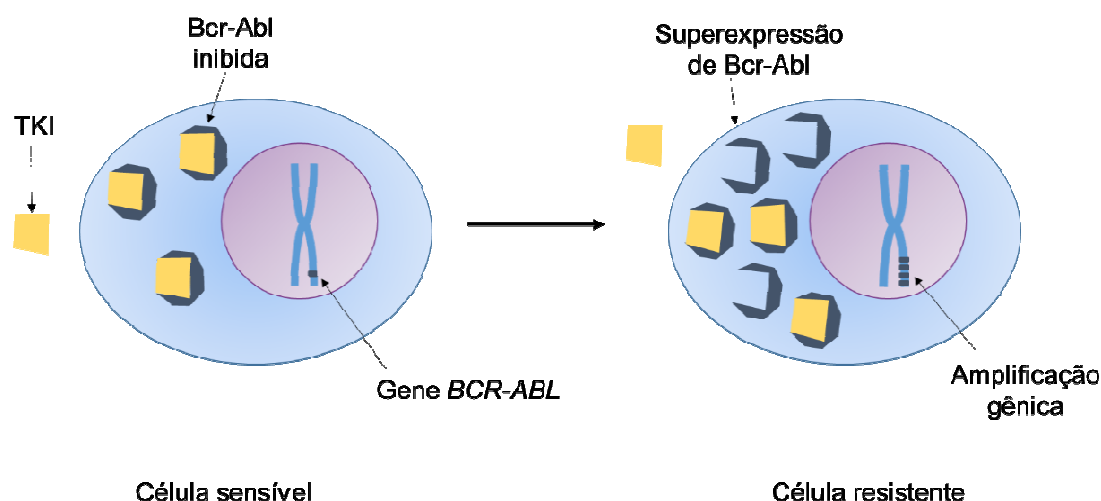


Figura 1.5: Amplificação e superexpressão de Bcr-Abl. Em uma célula sensível, a quantidade de imatinibe administrada no tratamento padrão é suficiente para a inibição efetiva das moléculas de Bcr-Abl. No entanto, numa célula que apresenta amplificação gênica e/ou superexpressão de Bcr-Abl, a quantidade de moléculas de Bcr-Abl excede a quantidade de moléculas de imatinibe disponíveis. Assim, a inibição da sinalização de Bcr-Abl não é eficaz, tornando a célula resistente.

1.9 Mecanismos independentes de Bcr-Abl

Foi observado que alguns pacientes continuam a apresentar resposta insatisfatória mesmo quando Bcr-Abl está inibida. Nesses casos, as células leucêmicas sobrevivem à inibição do Bcr-Abl por acionarem mecanismos de resistência que não dependem diretamente de Bcr-Abl (EIDE; O'HARE, 2015). Exemplos desses mecanismos são: a superexpressão de proteínas transportadoras de efluxo da família ABC; a desregulação de vias de sinalização oncogênicas que podem levar a um aumento da proliferação ou resistência à morte celular programada (YANG; FU, 2015).

1.9.1 Proteínas transportadoras de efluxo

Em diferentes tipos de câncer a expressão e atividade de proteínas transportadoras de efluxo ABC foram associadas à resistência (FRĄCZEK *et al.*, 2016).

A família ABC (ATP binding cassettes) de transportadores de efluxo é composta por 49 membros em humanos e dividida em sete subfamílias. São proteínas transmembrana com domínios de ligação ao ATP, que se utilizam da energia da sua hidrólise para transportar solutos contra um gradiente eletroquímico (KATHAWALA *et al.*, 2015). Elas executam um papel fisiológico importante na regulação do transporte entre barreiras epiteliais, sendo encontradas no trato gastrointestinal, hepatócitos, barreira hemato-encefálica, barreira placentária, plexo coróide entre outras (NIGAM, 2015). Pelo menos duas proteínas dessa família, a glicoproteína-P (Pgp) e a proteína de resistência do câncer de mama (BCRP) foram associadas à resistência aos TKIs em LMC (POLILLO *et al.*, 2015).

A Pgp, também chamada MDR1, é codificada pelo gene *ABCB1* no cromossomo 7. É uma proteína transportadora de 170 kDa que apresenta 2 domínios transmembrana e dois domínios de ligação ao ATP. Está presente na mucosa intestinal, rins, fígado e barreira hemato-encefálica. Transporta moléculas anfipáticas, neutras ou positivamente carregadas, dentre elas estão os taxanos, alcalóides da vinca, antraciclinas, antibióticos e alguns TKIs (SAUNA *et al.*, 2001).

A BCRP é uma proteína de 72 kDa, codificada pelo gene *ABCG2* no cromossomo 4. Ela é uma hemi-transportadora, apresentando somente um domínio de ligação ao ATP e um domínio transmembrana. Para executar sua atividade transportadora ela precisa oligomerizar e formar um transportador completo. Está localizada principalmente na membrana plasmática e é encontrada na placenta, intestino delgado, fígado, vasos sanguíneos. Foi descrita por transportar metabólitos da clorofila, análogos de nucleotídeos, pigmentos orgânicos, alguns TKIs, antraciclinas, inibidores de topoisomerase I, metotrexato e flavopiridol (MAO; UNADKAT, 2005).

Essas proteínas de efluxo se ligam a uma grande variedade de substratos. Estima-se que a Pgp tenha mais de 300 substratos diferentes. Embora ainda não esteja elucidado o mecanismo que torna isso possível, acredita-se que ela apresente múltiplos domínios de ligação ao substrato nos domínios transmembrana (CALLAGHAN 2015).

Por essa característica, essas proteínas estão associadas ao fenômeno de resistência à múltiplas drogas (MDR). Os transportadores de efluxo podem transportar para o exterior da célula um amplo espectro de fármacos não relacionados estruturalmente ou funcionalmente. Tanto a Pgp quanto a BCRP transportam um grande número de quimioterápicos e estão relacionadas à resistência em muitos tipos tumorais por reduzirem a concentração citoplasmática dos fármacos, reduzindo sua eficácia (GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002). Em amostras de LMC, foi observada expressão de Pgp na maioria dos pacientes sem distinção

entre as fases da doença (VASCONCELOS *et al.*, 2011). Também foi visto que apesar de a expressão de Pgp ser similar entre pacientes sensíveis e resistentes ao IM, a atividade da Pgp era maior nos pacientes resistentes ao IM (VASCONCELOS *et al.*, 2013). Além disso, em linhagens celulares foi visto que Pgp e survivina estão envolvidas com a resistência à apoptose induzida por vincristina (SOUZA *et al.*, 2011).

A expressão de BCRP também foi observada na maioria das amostras de pacientes de LMC, porém não foi encontrada correlação entre a atividade de BCRP e a resistência ao IM (VASCONCELOS *et al.*, 2013).

1.9.2 Desregulação de vias

Um mecanismo observado em tratamentos alvo-específicos é a desregulação de vias de sinalização que funcionam como um mecanismo compensatório à via inibida pelo tratamento (ROYCHOWDHURY; TALPAZ, 2011). Na LMC, a Bcr-Abl ativa diferentes vias de sinalização que promovem a transformação e a manutenção das células leucêmicas (DEININGER; GOLDMAN; MELO, 2000). Na inibição de Bcr-Abl, essas vias podem atuar de forma independente a Bcr-Abl para garantir a sobrevivência da célula e, como consequência, promover a resistência (EIDE; O'HARE, 2015).

Algumas proteínas-quinase, como Lyn e Syk, podem ter ativação aumentada em modelos resistentes ao IM e nilotinibe. Inicialmente foi mostrado que a inibição de Lyn sensibilizou células de LMC que eram resistentes ao IM (DONATO *et al.*, 2003). Num segundo estudo, com análise proteômica de linhagens de LMC resistentes, foi relatado que a quinase da família Scr Lyn interage com a quinase esplênica Syk para promover a resistência ao IM e que a inibição de ambas, mas não de cada uma isoladamente, sensibilizou as células aos TKIs (GIOIA *et al.*, 2011). Em um estudo de desenvolvimento de linhagens resistentes foi observado que o aumento na ativação na via PI3K/Akt precedia o desenvolvimento de um fenótipo altamente resistente ao IM (BURCHERT *et al.*, 2005). Em outro estudo, Wang e colaboradores relataram que a incubação de células sensíveis com o meio condicionado de células resistentes conferiu resistência ao IM e nilotinibe com manutenção da fosforilação de STAT5. Então foi demonstrado que a via de JAK2/STAT5 era ativada por GM-CSF, de forma independente de Bcr-Abl, e que a inibição dessa sinalização sensibilizava novamente as células aos TKIs (WANG *et al.*, 2007). Em um trabalho com uma linhagem resistente derivada de K562, o tratamento com IM inibiu a fosforilação das proteínas das vias mitogênicas *downstream* Bcr-Abl, exceto de ERK1/2. O tratamento com inibidor de ERK1/2 em combinação com IM reduziu a fosforilação de ERK1/2 e sensibilizou as células ao

tratamento, mostrando que a ativação da via de MAPK/ERK independente de Bcr-Abl também está relacionada à resistência aos TKIs (NAMBU *et al.*, 2010).

1.9.2.1 ERK1/2

ERK 1 é uma proteína de 44 kDa codificada pelo gene *MAPK3*, no cromossomo 16 e ERK2 é uma proteína de 42 kDa codificada pelo gene *MAPK1*, no cromossomo 22. ERK1 e 2 foram identificadas como MAP2 quinases, serina/treonina-quinases, ativadas por fatores de crescimento como o NGF e insulina. Elas apresentam grande homologia entre si (84%), sendo ERK2 um pouco menor do que ERK1, ambas tem um domínio catalítico e são expressas em todos os tecidos (BOULTON; GREGORY; COBB, 1991a; BOULTON *et al.*, 1991b). Elas são constituintes da família das proteínas quinase, que é uma das maiores que existem, contabilizando 518 genes (ROSKOSKI, 2012).

Embora haja controvérsia quanto a disparidade de ações entre ERK1/2, aparentemente todos os sinais que as ativam, ativam ambas paralelamente (LEFLOCH; POUYSSÉGUR; LENORMAND, 2009).

Alguns relatos colocaram em dúvida se as funções de ERK1/2 eram redundantes uma vez que foi mostrado que embriões que não expressavam ERK1 eram viáveis e a atividade de ERK2 compensava a sua falta, porém os embriões que não expressavam ERK2 não eram viáveis (HATANO *et al.*, 2003). Esse dado sugeria que talvez ERK2 tivesse funções que não eram comuns à ERK1. No entanto, um estudo mostrou que a deleção de apenas um alelo de ERK2 em células que tinham os dois genes normais não era deletéria. Similarmente, a deleção de um alelo de ERK2 e um alelo de ERK1 também era suficiente para a manutenção da viabilidade dos embriões, porém eram observados menores níveis de ativação de ERK1/2 total. A análise quantitativa da estequiometria das duas proteínas mostrou que ERK1 está presente em menor quantidade que ERK2 tanto em RNAm quanto em proteína. Esse novo conhecimento indica que os níveis totais de ativação de ERK1/2 são cruciais para a viabilidade, não os níveis de uma delas isoladamente (LEFLOCH; POUYSSÉGUR; LENORMAND, 2008).

As proteínas ERK1/2 estão expressas ubiquamente e participam da via de sinalização das MAPK. As proteínas MAPK são serina/treonina quinases que participam da transdução de sinais da superfície para o interior da célula. As cascatas de sinalização consistem de pelo menos três componentes: uma MAPKKK, uma MAPKK e uma MAPK. As MAPK ativadas catalisam a fosforilação de diversos substratos como fatores de transcrição, quinases,

fosfatases e outras. A via de sinalização das MAPK está envolvida em processos fundamentais como desenvolvimento, proliferação, apoptose e diferenciação (WORTZEL; SEGER, 2011).

A ativação da via comumente ocorre da seguinte forma: Um receptor tirosina-quinase de membrana, ao ser ativado pelo seu ligante, dimeriza e se autofosforila expondo sítios SH2 intracelulares, de interação com proteínas (LEMMON; SCHLESSINGER, 2010). Proteínas adaptadoras, como a Shc, se ligam a esses sítios e recrutam a proteína adaptadora GRB2 e o fator de conversão de guanina Sos (MARGOLIS *et al.*, 1999). Sos ativa a GTPase Ras, que por sua vez, ativa a MAPKKK Raf (MARGOLIS; SKOLNIK, 1994). Raf fosforila as MAPKK MEK1/2 (ROSKOSKI, 2010). MEK1/2 são tirosina/treonina quinases e fosforilam ERK1/2 (ROSKOSKI, 2012).

Diferente dos outros integrantes da via, ERK1/2 apresentam uma vasta gama de alvos citoplasmáticos e nucleares, tendo sido documentados mais de 175 alvos até agora (YOON; SEGER, 2006). Dentre os alvos nucleares estão os fatores de transcrição da família TCF, como Elk1 e também c-Fos, importante em processos como proliferação, diferenciação e transformação (EFERL; WAGNER 2003). Dentre os alvos citoplasmáticos estão quinases da família RSK que também atuam em processos como proliferação e sobrevivência (ANJUM; BLENIS, 2008), cAMP fosfodiesterase, fosfolipase A2, proteínas do citoesqueleto como a paxilina (YOON; SEGER, 2006).

A regulação da ativação da via das MAPK é feita por fosfatases que regulam a intensidade e a duração do sinal. A família de MAPK fosfatases dual-específicas contém 10 membros tirosina/treonina fosfatases. Dessas, as fosfatases DUSP1, 2, 4, 5, 6, 7 e 9 foram relacionadas à regulação de ERK (OWENS; KEYSE, 2007).

A via MAPK/ERK é uma das vias ativadas por Bcr-Abl que participam na leucemogênese da LMC (DEININGER; GOLDMAN; MELO, 2000). Em uma linhagem de LMC resistente ao IM, foi observada fosforilação de ERK1/2 de forma independente de Bcr-Abl, indicando que elas podem constituir um mecanismo de resistência (NAMBU *et al.*, 2010). Outro estudo mostrou ativação de ERK1/2 pela proteína PKC η e de forma independente de Bcr-Abl associada à resistência (MA *et al.*, 2014). Além disso, foi visto que o aumento de Gab2 induzia maior ativação de ERK1/2 através da sua interação com Shp2 e estava relacionada à resistência aos TKIs (WÖHRLE *et al.*, 2013).

1.9.2.2 Shp2

Shp2 é uma fosfatase citosólica de aproximadamente 70 kDa codificada pelo gene *PTPN11* no cromossomo 12 que contém dois domínios SH2, de interação com proteínas, além do domínio catalítico fosfatase. É amplamente expressa em tecidos adultos como coração, cérebro, fígado, rim, pulmão e baço. Por apresentar o domínio SH2, que é comumente encontrado em quinases, foi proposto que ela teria um papel na transdução de sinal mediada por receptores tirosina-quinases. Foi observado que Shp2 interage com EGFR e PDGFR e se torna fosforilada após ativação do receptor. Na sua atuação na via de PDGFR, Shp2 se liga ao receptor e associa a proteína adaptadora GRB2 ao receptor de PDGFR. Além de interagir diretamente com GRB2, Shp2 também interage com Sos (FENG; HUI; PAWSON, 1993, LI *et al.*, 1994; BENNETT *et al.*, 1994). O complexo GRB2-Sos é conhecido por ativar Ras em resposta à ativação de receptores tirosina-quinase (MARGOLIS; SKOLNIK, 1994). Shp2 participa da ativação da via de MAPK/ERK uma vez que o *knockout* de Shp2 diminui a ativação da via após incubação com EGF. Shp2 interage diretamente com a proteína adaptadora Gab1 e ambas interagem com o complexo GRB2 e Sos para a ativação da via (SHI *et al.*, 2000).

Mutações autossômicas dominantes em *PTPN11* são a causa da síndrome de Noonan cujas características mais frequentes envolvem dismorfismo facial, ptose, orelhas com implantação baixa, baixa estatura, estenose pulmonar, miocardiopatia hiopertrófica (TARTAGLIA; GELB, 2005).

Shp2 foi a primeira fosfatase descrita como um oncogene uma vez que mutações somáticas em *PTPN11* são encontradas em cerca de 35% dos casos de leucemia mielomonocítica juvenil (JMML) e foi observado que mutações em *PTPN11* causam hipersensibilidade ao GM-CSF, que é uma das características da JMML (CHAN; FENG, 2007).

Na LMC, foi observado que a Shp2 é importante para a transformação leucêmica, uma vez que a expressão de uma forma truncada inibiu a transformação de células murinas e induziu a degradação de Bcr-Abl, mostrando que a Shp2 é importante para a estabilização de Bcr-Abl. O silenciamento de Shp2 com oligos antisense em linhagem de LMC levou a diminuição nos níveis de Bcr-Abl e a expressão de uma forma de Shp2 sem atividade catalítica, embora não tenha levado à degradação de Bcr-Abl, diminuiu a fosforilação total de tirosinas e a ativação das vias *downstream* Bcr-Abl (CHEN *et al.*, 2007).

Portanto, a proteína Shp2 está intrinsecamente envolvida na regulação da via de MAPK/ERK, atua na transformação leucêmica por Bcr-Abl, mas também pode ser ativada por receptores tirosina-quinase. Esses dados suportam a ideia de Shp2 poder estar envolvida em um mecanismo de resistência em LMC pela ativação da via MAPK/ERK de forma independente de Bcr-Abl.

1.9.3 Proteínas inibidoras da apoptose

As proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) constituem uma família de 8 proteínas (XIAP; c-IAP1; c-IAP2, Naip, Apollon, livina, survivina, e ILP2) caracterizadas pelo domínio BIR (SILKE; VUCIC, 2014) (Figura 1.6). A superexpressão de IAPs confere proteção contra estímulos pró-apoptóticos em muitos tumores sólidos e neoplasias hematológicas. Além disso, foi demonstrada expressão elevada de IAPs em quase todos os tipos de câncer (VUCIC; FAIRBROTHER, 2007).

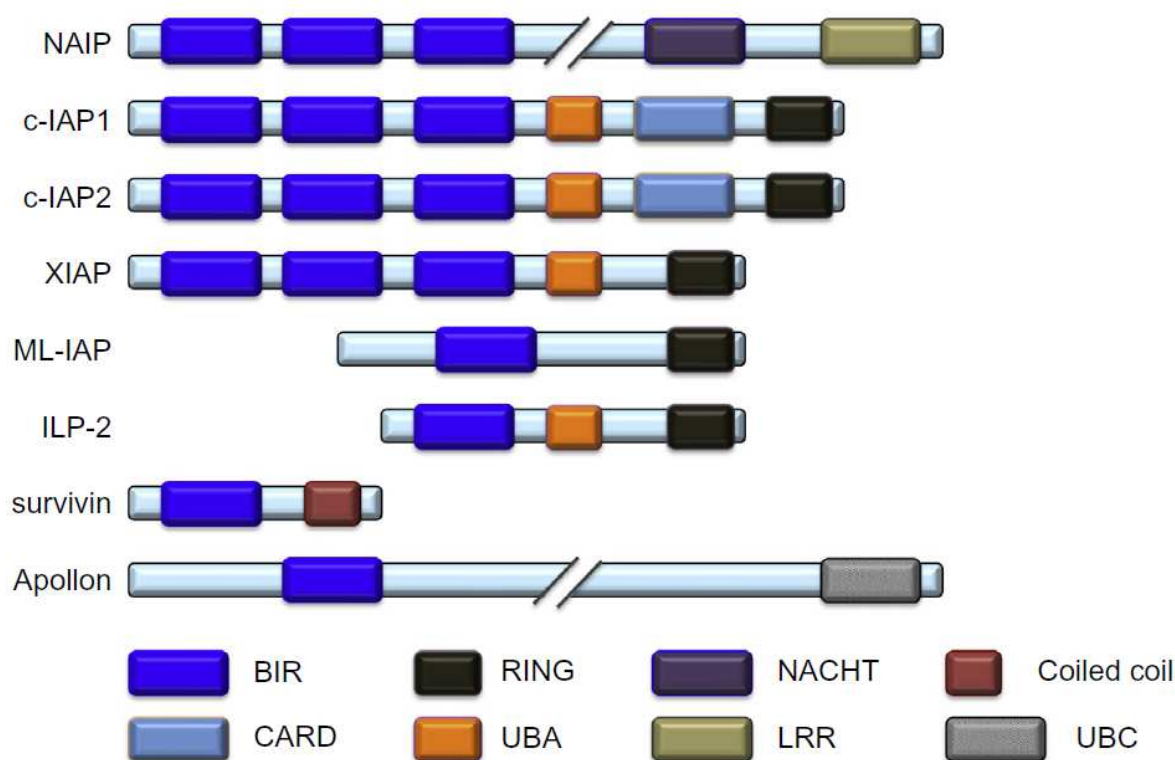


Figura 1.6: Representação esquemática das proteínas IAPs. BIR: *baculovirus IAP repeat*; CARD: *caspase recruitment domain*; LRR: *leucine-rich repeat*; NACHT: NAIP, CIITA, HET-E e TP1; RING: *really interesting gene*; UBA: *ubiquitin-associated domain*; UBC: *ubiquitin-conjugating domain*. Modificado de Silke J, Vucic D. IAP family of cell death and signaling regulators. *Methods Enzymol.* 2014;545:35-65.

1.9.3.1 Survivina

Survivina foi descrita em 1997 como uma IAP de aproximadamente 15 kDa codificada no cromossomo 17 que possui somente um domínio BIR e nenhum domínio RING. Ela estava expressa em células transformadas de linhagens mieloides e linfoides, mas não em tecidos não transformados adultos. Foi visto que a expressão de survivina ocorria em tecidos fetais, mas não em tecidos normais diferenciados e também estava expressa abundantemente em diversos tipos de neoplasias como adenocarcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma de pâncreas, cólon, mama e próstata, além das neoplasias hematológicas como linfoma de Hodgkin. A expressão diferencial de survivina entre tecidos normais adultos e neoplásicos a colocou como uma potente candidata a alvo terapêutico para o tratamento do câncer (AMBROSINI; ADIDA; ALTERI, 1997).

Estudos posteriores mostraram que ela atua também na divisão celular. Foi observado que a expressão de survivina é alta em células em proliferação, mas diminuída quando as células estão paradas na fase G1 do ciclo celular. Foi observado que o pico de expressão de survivina ocorre nas fases G2 e M do ciclo celular. A análise do promotor de survivina evidenciou regiões de regulação com elementos de repressão transcricional de G1 e a máxima atividade do promotor de survivina foi observada na fase G2/M. Quando avaliada a localização de survivina durante a mitose, foi observado que ela estava atrelada aos fusos mitóticos tanto na metáfase, anáfase e telófase. A survivina também estava associada aos centríolos durante a intérfase, mas a despolimerização dos microtúbulos dispersou a survivina pelo citoplasma, mostrando que a interação entre survivina e os microtúbulos é dependente da dinâmica dos mesmos. A survivina interage com os microtúbulos pelo seu domínio *coiled-coil* e quando um mutante sem esse domínio foi superexpresso nas células não houve interação com o fuso mitótico e, além disso, as células foram induzidas à morte celular pelo tratamento com taxol. A survivina protegeu as células da indução de morte por taxol, mas foi ineficaz contra fármacos despolimerizantes de microtúbulos. A mutação do domínio BIR da survivina inativou o seu papel antiapoptótico contra o taxol, embora não tenha impedido a survivina de se ligar aos microtúbulos. A superexpressão de mutantes com o domínio BIR inativo deslocou a survivina selvagem dos microtúbulos e isso foi coincidente com o aumento da atividade da caspase-3. Esses dados mostraram que a survivina tem um papel no ciclo celular, interagindo com o fuso mitótico e seu papel antiapoptótico contra o taxol depende dos seus domínios BIR e *coiled-coil* íntegros (LI *et al.*, 1998). O papel da survivina na regulação da mitose é mais complexa do que somente interação com o fuso mitótico. Survivina está associada ao cinetócoro dos cromossomos condensados durante a metáfase e se concentra no

centro da célula durante a anáfase e na região de constrição, na telófase. Sua dinâmica de localização durante as fases da mitose é compatível com a de uma proteína do Chromosomal Passenger Complex (CPC). A associação de survivina com o cinetócoro permaneceu apesar do tratamento com nocodazol, mostrando que é independente da sua ligação aos microtúbulos. A mutação dos domínios BIR e C-terminal impediu a localização da survivina tanto com o fuso mitótico, quanto com o cinetócoro (SKOUFIAS *et al.*, 2000).

O CPC é formado pela interação entre survivina, borealina e INCENP, além da aurora B. Esse complexo é crucial para a segregação cromossômica correta, pois ele desestabiliza ligações impróprias entre o fuso e o cromossomo, promove a formação de microtúbulos associados aos cromossomos e controla os eventos finais da citocinese (LENS; VADER; MEDEMA, 2007). Os dois domínios da survivina são necessários para a interação com as outras duas proteínas. Todas as três proteínas são necessárias para que o complexo se co-localize com o cinetócoro e execute sua função satisfatoriamente. A aurora B não interage diretamente com survivina ou borealina, interagindo somente com INCENP. Complexos formados por INCENP, borealina e aurora B não cumprem a função do complexo CPC (JEYAPRAKASH *et al.*, 2007).

O foco no estudo dos mecanismos pelos quais a survivina atua na divisão celular parece ter ofuscado a busca pelo seu papel na inibição da apoptose. No entanto, muitos trabalhos suportam a expressão de survivina como um fator citoprotetor em células normais e tumorais (SOLEIMANPOUR; BABAEI, 2015).

Um importante achado na elucidação do mecanismo pelo qual survivina inibe a apoptose é a descrição da sua interação com Smac/Diablo (SONG; YAO; WU, 2003). Smac/DIABLO é uma proteína mitocondrial que é liberada para o citoplasma em resposta a estímulos apoptóticos. A função pró-apoptótica de Smac/DIABLO envolve a inibição de IAPs, como a XIAP e c-IAP2, promovendo indiretamente a ativação das caspases 3, 6, 7 e 9 (DU *et al.*, 2000; VERHAGEN *et al.*, 2000). Ensaios de co-imunoprecipitação e de interação mostraram que a survivina se liga diretamente à proteína Smac/DIABLO e que essa interação é dependente dos domínios BIR e C-terminal da survivina e do domínio N-terminal de Smac. Além disso, survivina não interage diretamente com as caspases 3, 7 e 9. A fim de elucidar o mecanismo pelo qual a interação entre survivina e Smac poderia levar à inibição da apoptose, foram feitos ensaios de ativação de caspases em diferentes condições que mostraram que a survivina interage com Smac/DIABLO impedindo que este interaja com XIAP e iniba seus efeitos. A XIAP na sua forma ativa, inibe diretamente a atividade das caspases 3, 7 e 9 (SONG; YAO; WU, 2003).

A survivina é muito estudada no contexto do câncer uma vez que quase todos os tipos de neoplasias apresentam maior expressão de survivina do que os tecidos normais. Além disso, survivina foi relacionada a agressividade e resistência à terapia (JAISWAL; GOEAL; MITTAL, 2015).

Na LMC, foi observada expressão de survivina na grande maioria dos pacientes e níveis maiores estavam associados à progressão da doença (CONTE *et al.*, 2005). Também foram encontrados níveis maiores de survivina em pacientes em fase crônica tardia em relação aos recém-diagnosticados (REIS *et al.*, 2011). Foi descrita ativação da expressão de survivina pelas MAPK/ERK1/2 e JAK2/PI3K/c-myc. Em ambos os estudos, a survivina se mostrou importante para a manutenção da sobrevivência e proliferação das células Bcr-Abl positivas (CARTER *et al.*, 2006; FANG *et al.* 2009). Além disso, a sua superexpressão foi correlacionada com um perfil de resistência à apoptose em células de LMC (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2011).

1.9.3.2 XIAP

XIAP é uma proteína de 57 kDa da família das IAPs, codificada pelo gene *BIRC4*, no cromossomo X, está expressa de forma ubíqua em tecidos normais. Possui três domínios BIR, um domínio RING (LISTON *et al.*, 1996) e um domínio de ligação à ubiquitina (UBA) (GYRD-HANSEN *et al.*, 2008). Inibe a apoptose por inibir diretamente as caspases 3, 7 e 9 (DEVERAUX *et al.*, 1998).

XIAP se liga diretamente às caspases 3 e 7 pelo seu domínio BIR2 e pela região de ligação entre os domínios BIR1 e BIR2 (RIEDL *et al.*, 2001; CHAI *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2001) e interage com a caspase 9 pelo domínio BIR3 (SRINIVASULA *et al.*, 2001). Similar a algumas outras IAPs, a XIAP apresentam um domínio RING que tem função ubiquitina E3 ligase e pode promover autoubiquitinação ou transubiquitinação das proteínas que interagem com ela (VAUX; SILKE, 2003). Pelo domínio RING, XIAP ubiquitina caspase 3 (SUZUKI; NAKABAYASHI; TAKAHASHI, 2001), Smac/DIABLO e caspase 9, endereçando-as à degradação (MORIZANE *et al.*, 2005).

Por outro lado, o papel antiapoptótico de XIAP é contrabalanceado pelas proteínas Smac/DIABLO e HtrA2/Omi (High temperature requirement A 2/Omi), que se ligam a ela por um domínio de ligação às IAPs, IBM (do inglês, *IAP binding motif*), e a inibem (SUZUKI *et al.*, 2001; GAO *et al.*, 2007).

O domínio BIR1 da XIAP foi relacionado à sua atividade de transdução de sinais intracelulares, uma vez que por esse domínio ela interage com TAB1, ativando-a, e leva a ativação subsequente de NFκB (LU *et al.*, 2007).

XIAP é muito estudada como alvo terapêutico (SCHIMMER *et al.*, 2006; VUCIC; FAIRBROTHER, 2007). XIAP inibe a apoptose induzida por vários estímulos e em vários modelos diferentes (DEVERAUX *et al.*, 1997; TAKAHASHI *et al.*, 1998; HOLCIK *et al.*, 2000). Está superexpressa em vários tumores e relacionada à pior prognóstico e menor sobrevida global (TAMM *et al.*, 2004; SCHIMMER *et al.*, 2006; MIZUTANI *et al.*, 2007).

Em LMC, a XIAP foi identificada como uma das proteínas superexpressas em células CD34⁺ de pacientes (QUINTÁS-CARDAMA *et al.*, 2012). A análise de amostras de pacientes mostrou que cerca de 50% apresentaram superexpressão de XIAP, independente da fase da doença e uma correlação positiva entre a expressão de Pgp e XIAP. Além disso, em linhagens celulares, o aumento de expressão de XIAP após o tratamento com IM estava relacionado ao perfil de resistência ao IM, enquanto a diminuição da expressão de XIAP estava relacionada à sensibilidade (SILVA *et al.*, 2013). Em outro trabalho, Seca e colaboradores relataram que o silenciamento de XIAP foi suficiente para reduzir a viabilidade celular tanto de linhagens sensíveis quanto resistentes e sensibilizá-las ao tratamento com IM (SECA *et al.*, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Caracterizar o perfil de resistência na linhagem celular de leucemia mieloide crônica, K-IM, resistente ao imatinibe (IM).

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver linhagens resistentes ao IM
- Avaliar a citotoxicidade induzida por inibidores de tirosina quinase nas linhagens celulares K562 e K-IM;
- Avaliar a indução de morte celular pelo IM nas linhagens K562 e K-IM;
- Avaliar o efeito do IM no ciclo celular e na proliferação celular, por contagem de células, das linhagens K562 e K-IM;
- Avaliar o *status* do principal alvo do IM, Bcr-Abl, através dos níveis de RNAm, atividade da proteína e presença de mutação no domínio quinase e comparar o *status* de Bcr-Abl entre as linhagens celulares K-IM e sua parental K562;
- Avaliar os níveis proteicos e de atividade dos transportadores de efluxo Pgp e BCRP nas linhagens celulares K562 e K-IM;
- Comparar os níveis proteicos e de RNAm de proteínas inibidoras da apoptose (XIAP e survivina) entre as linhagens K562 e K-IM antes e depois do tratamento com IM;
- Buscar desregulações em vias de sinalização que possam contribuir para a resistência ao IM (ERK1/2, Shp2).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas as linhagens de LMC K562 e a linhagem resistente K-IM.

A linhagem celular K562 foi isolada a partir da efusão pleural de uma paciente de com LMC na fase blástica da doença (LOZZIO; LOZZIO, 1975). Para o desenvolvimento desse projeto, a linhagem K562 foi gentilmente cedida pela Dra. Vivian Rumjanek. Foi feita a análise do perfil de STR (Short Tandem Repeats) e o perfil da linhagem foi compatível com o descrito para a linhagem K562.

A linhagem celular resistente ao IM, K-IM, foi desenvolvida pelo nosso grupo a partir da linhagem celular K562. O processo de indução de resistência ao IM será descrito no tópico Resultados

Ambas as linhagens foram mantidas em meio RPMI (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) e tampão HEPES 4,2 mM (Acros Organics) a 37 °C e 5% CO₂. Ao meio de cultura da linhagem celular K-IM foi adicionado 1,0 µM de IM. IM foi retirado da cultura três dias antes da realização dos experimentos.

3.2 Reagentes

Foram utilizados os inibidores de tirosina quinase IM (Nacto Pharma Limited) e dasatinibe (Santa Cruz Biotechnology). O dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) foi utilizado como veículo dos TKIs.

3.3 Sequenciamento

Para a análise de mutação no gene de *BCR-ABL* os exons de 4 a 10, que codificam o domínio quinase da proteína, foram sequenciados com o uso dos seguintes *primers* específicos que flanqueiam as regiões de interesse:

Tabela 3.1: Primers para o sequenciamento dos exons de 4 a 10 do gene *BCR-ABL*

	<i>Primers (5' - 3')</i>	Tamanho do amplicon (bp)	Temperatura de <i>melting</i> (°C)
4F	ATT TAG GAA TTT GGA GAT TTT TAG T	504	55,3
4R	CAT CTT CTT GGT TGA GCT TTC		56,7
5F	TGT GTA GTG AAT TAA GGC TCA GC	456	58,6
5R	GAG GTA GAC TTC CAG GCA GAT G		60,3
6F	GAG AAT TGA AAA GTT TGG CCC CA	423	65,4
6R	GCA GAG CAC AAA TAT TCC AAC GA		63,5
7F	TCA CTG GCT TGA GAA GAA GAA AAG	425	61,4
7R	CTG AAT TTA GCC CTG GAT GCA TG		64,9
8F	CCG TGG GCA TTA ATA CAA ACT TCC	493	64,6
8R	GGA AGA GCA AGA AAG AGG CAG AA		63,4
9F	CTG AGG TCT GCT GCA AAG GTA A	421	61,8
9R	GCT TTA AAA GAC AAG TCA CGC AC		60,3
10F	ATA TTC CTG CCA GCA TCT AAC GT	462	61,2
10R	GCA GCA GAC AAG AAA GCA CAA TA		61,8

Foram sintetizados primers que flanqueavam os exons de 4 a 10 do gene BCR-AB, que são os exons que codificam o domínio quinase da Bcr-Abl.

Amostras de DNA total das células da linhagem K-IM foram purificadas com o uso do kit QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen) segundo as especificações do fabricante. Após purificação, as amostras foram avaliadas qualitativamente e quantitativamente por eletroforese em gel de agarose 0,8% e ao Nadodrop 1000 (Thermo Scientific). Foi feita a

amplificação dos exons de interesse usando os *primers* específicos e a enzima *Platinum® TaqDNA Polymerase* (Invitrogen) e as reações foram preparadas segundo discriminado na tabela 3.2 e os ciclos de amplificação foram configurados conforme descrito na tabela 3.3. Após amplificação, as amostras foram mais uma vez submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% para avaliar a sua integridade. Os produtos de PCR foram purificados com o uso do kit *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE) segundo o protocolo do fabricante. Os exons foram sequenciados por sequenciamento direto no 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) ou no 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). O sequenciamento foi analisado usando o software MEGA ver. 5.0.

Tabela 3.2: Especificações das reações de amplificação dos exons de interesse

Reagente	Volume por reação (µl)
Tampão 10x	5,0
50 MgCl ₂	1,5
Primers	0,5
dNTPs	0,5
Taq	0,2
H ₂ O	40,3
Volume final	48,0

Tabela 3.3: Ciclos de amplificação dos exons de interesse

Temperatura	Tempo	
95°C	5 minutos	
95°C	1 minuto	35 ciclos
55°C	1 minuto	
72°C	1 minuto	
72°C	5 minutos	
4°C	indefinidamente	

3.4 Viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular foi feita pelo ensaio de MTT (3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio; Sigma Chemical Company). Esse método, descrito por Mosmann (MOSMANN, 1983) se baseia na redução do MTT por desidrogenases mitocondriais que clivam o anel tetrazólico e assim geram cristais de formazan que são insolúveis em água. Os cristais, quando solubilizados em solventes orgânicos, exibem coloração violeta que pode ser medida por um espectrofotômetro e cuja intensidade é proporcional ao número de células que metabolizaram o MTT e por isso são consideradas viáveis.

Para o experimento, 1×10^4 células foram plaqueadas em poços de placa de 96 poços, no volume final de 200 μ l com diferentes concentrações de IM (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 5,0 μ M) e DAS (2,0; 10,0; 50,0; 100,0; 200,0 nM) por 24, 48 ou 72 horas à 37° C a 5% CO₂. Nas últimas 4 horas de incubação, foram adicionados 20 μ l de MTT na concentração de 5,0 mg/ml em PBS. As placas foram centrifugadas a 2000 RPM por 5 minutos (Allegra X-22R Centrifuge, Beckman Coulter), o sobrenadante foi removido e os cristais de formazana foram dissolvidos em DMSO e lidos ao espectrofotômetro (EZ Reader 400, Biochrom) a 570 nm. A porcentagem de células viáveis foi obtida pela porcentagem da densidade ótica dos tratamentos em relação à densidade ótica do controle (células sem droga).

3.5 Quantificação dos níveis de RNA mensageiro

Os níveis de RNA mensageiro foram avaliados pelo método de RT-qPCR, que é um método de PCR quantitativa utilizando sondas Taqman® (Applied Biosystems). As sondas Taqman são compostas por um oligonucleotídeo que é flanqueado por um fluorocromo numa extremidade e por um *quencher* na outra. A proximidade entre o fluorocromo e o *quencher* impede que a fluorescência seja captada pelos detectores do termociclador, porém, quando a Taq polimerase sintetiza a cópia do gene-alvo, sua função 5'-3' nuclease quebra a sonda, liberando o *quencher* e o fluorocromo cuja fluorescência pode então ser detectada por não estarem mais próximos. A intensidade de fluorescência correspondente ao número de cópias amplificadas em cada ciclo, tornando possível a quantificação dos transcritos na amostra.

Foram armazenadas em Trizol (Invitrogen Life Technologies) 5×10^6 células e o RNA total foi extraído conforme metodologia descrita pelo fabricante. O RNA foi quantificado no espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) e a integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de Agarose 2% imerso em tampão TAE 1X (40 mM Tris acetato, 1

mM EDTA) à tensão constante de 100 V e depois analisadas no transiluminador (UV Transilluminator, UVP) para a observação das bandas correspondentes às subunidades 40s e 60s do RNA ribossômico. Foi utilizado o kit SuperScript III First-Strand (Invitrogen) para sintetizar o cDNA a partir de 2 µg de RNA. Os níveis de RNA mensageiro foram quantificados por RT-qPCR utilizando sondas Taqman® específicas para os genes *BCR-ABL*, *BIRC4*, *BIRC5* e *GUSB* (Applied Biosystems) (Tabela 3.4). Após o término da reação de amplificação foram obtidos os valores de CT (*cycle threshold*) que indicam o número fracionário de ciclos em que os valores de fluorescência emitida pela reação ultrapassaram um limiar fixado. Os valores de CT foram então submetidos ao cálculo de $2^{-\Delta\Delta CT}$ que quantifica os níveis de RNA mensageiro na amostra de interesse em relação a uma amostra controle.

Tabela 3.4: Sondas utilizadas

Alvo	Número de Catálogo	Fabricante
<i>BCR-ABL</i>	HS03024784	ThermoFisher Scientific
<i>BIRC4</i>	HS01597783	ThermoFisher Scientific
<i>BIRC5</i>	HS00153353	ThermoFisher Scientific
<i>GUSB</i>	HS00939627	ThermoFisher Scientific

3.6 Análise proteica por citometria de fluxo

A expressão de Pgp na superfície celular foi avaliada por citometria de fluxo utilizando anticorpo anti-Pgp (clone UIC2) conjugado a ficoeritrina (Beckman Coulter). 5×10^5 células foram lavadas duas vezes com PBS pH=7,4, incubadas com PBS 2% SFB por 15 minutos e então centrifugadas novamente a 2000 RPM por 3 minutos (Allegra X-22R, Beckman Coulter). Em seguida, as células foram ressuspensas em 200 µl de PBS 2% SFB, foram adicionados 2,5 µl de anticorpo e as células foram incubadas por 30 minutos protegidas da luz. Após a incubação, as células foram novamente lavadas duas vezes em PBS 2% SFB e então foram ressuspensas em 500 µl de formaldeído 1% e analisadas no citômetro de fluxo Cyan ADP (Beckman Coulter). Os parâmetros de dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) da luz do laser (488 nm) foram utilizados para excluir *debris* e células mortas e então, um total de 10.000 eventos foi adquirido. A fluorescência da ficoeritrina foi analisada pelo fotomultiplicador (PMT) equipado com filtro de 575/25 nm. A aquisição e a análise dos dados foram realizadas com programa Summit 4.3.

3.7 Atividade dos transportadores de efluxo

Para a análise da atividade dos transportadores de efluxo, as células foram incubadas com um substrato fluorescente na presença ou ausência de um modulador. Nesse ensaio, uma célula que apresenta atividade de proteínas transportadoras de efluxo, ao ser incubada somente com o substrato fluorescente, retém parte do substrato e extrai outra parte, gerando um pico de fluorescência. Por outro lado, quando incubada com o substrato e o modulador, o substrato não é extruído e o pico de intensidade de fluorescência é mais alto do que o da condição só com o substrato. O mesmo não acontece com células que não apresentam atividade do transportador, porque a retenção de substrato é sempre a mesma, uma vez que não há proteína que o exporte, e os picos de intensidade de fluorescência das duas condições experimentais coincidem.

Para a análise da atividade dos transportadores de efluxo, foram separadas 5×10^5 células que foram lavadas com PBS pH=7,4 por duas vezes e, em seguida, incubadas com moduladores e substratos para os transportadores analisados.

Para a análise da atividade da Pgp, as células foram incubadas com o substrato fluorescente Rodamina 123 (Rho) por 45 minutos a 37 °C e 5% CO₂ na presença ou ausência do modulador verapamil (VRP) que é um inibidor de canal de íon cálcio e também inibe a Pgp (KATHALAWA *et al.*, 2014). Após essa incubação, as células foram lavadas com PBS pH=7,4 gelado e incubadas na presença ou ausência de VRP por mais 45 minutos à 37 °C e 5% CO₂. Em seguida, as células foram analisadas em citômetro de fluxo. A fluorescência foi captada utilizando-se PMT equipada com filtro de 530/40 nm no citômetro de fluxo Cyan ADP.

A análise de atividade de BCRP foi feita utilizando o substrato fluorescente Pheophorbide A (PhA) que é um metabólito da quebra da clorofila e um substrato específico para BCRP (ROBEY *et al.*, 2004), com o qual as células foram inicialmente incubadas por 30 minutos na presença ou ausência de Fumitremorgin C (FTC) que é uma toxina fúngica isolada de *Aspergillus fumigatus* que age como um potente inibidor da BCRP (RABINDRAN *et al.*, 2000). Após a incubação, as células foram lavadas com PBS pH=7,4 gelado e em seguida incubadas por 60 minutos na presença ou ausência de FTC à 37 °C e 5% CO₂. Finalmente, as células foram adquiridas usando PMT equipada com filtro de 680/30 nm no citômetro de fluxo Cyan ADP.

A análise da atividade dos transportadores foi feita pela razão da média da fluorescência do tubo contendo substrato e modulador sobre a média da fluorescência do tubo somente com o substrato resultando na intensidade de fluorescência (RIF) que denota atividade do transportador caso seja maior do que 1.

3.8 Contagem de células

Para a quantificação das células viáveis na amostra, as células foram coradas com azul de tripan (Sigma) que é um corante não permeável à membrana plasmática íntegra. As células não coradas pelo azul de tripan são quantificadas como células viáveis (STROBER, 2001). Para tanto, 1×10^4 células foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas com diferentes concentrações de imatinibe (1,0 e 5,0 μM) por até 7 dias. A cada 24 horas, 90 μl de células foram acrescidas de 10 μl de azul de tripan (10 mg/ml) e 10 μl de suspensão de células foram adicionados à câmara de Neubauer e contadas ao microscópio óptico (Nikon Eclipse TS 100, Nikon). O valor da densidade celular foi expresso em número de células $\times 10^4/\text{ml}$.

3.9 Avaliação da morte celular

Em alguns tipos de morte celular, uma das mudanças iniciais é a modificação da composição fosfolipídica da membrana plasmática, em especial a exposição da fosfatidilserina na face externa membrana. A fosfatidilserina é um fosfolipídio que em condições normais está em grande quantidade na camada interna da membrana plasmática e está virtualmente ausente na face externa. Porém, no início da apoptose, a fosfatidilserina é transportada para a face externa para atuar como um dos sinais “*eat-me*” que as células apoptóticas exibem para que os corpos apoptóticos sejam fagocitados (LAUBER *et al.*, 2004).

A anexina V é uma proteína da família das anexinas, que são proteínas que se ligam aos fosfolipídios e ao cálcio. A anexina V, em especial, apresenta afinidade para com a fosfatidilserina e é usada para identificá-la em células comprometidas com a morte celular programada (VAN ENGELAND *et al.*, 1998).

O iodeto de propídio (PI) é uma molécula intercalante de DNA que é fluorescente. Não é permeável à membrana plasmática, por isso só entra em células cuja estabilidade da membrana foi corrompida ou que foram propositalmente permeabilizadas (RIEGER *et al.*, 2011).

O ensaio de dupla marcação por anexina V e PI baseia-se nas propriedades dessas duas moléculas distintas para identificar diferentes estágios da morte celular. As células são marcadas com a anexina V em seus estágios iniciais, quando a apoptose é tardia, os corpos apoptóticos perdem a integridade da membrana e o PI consegue entrar e intercalare no DNA, no caso de células que perderam a integridade da membrana, mas não passaram por um processo de morte celular programada, o PI cora o material genético presente (SILVA *et al.*, 2006).

As células foram incubadas com 1,0 ou 5,0 μM de IM por 24, 48 e 72 horas e então foram separadas 1×10^5 células. As células foram lavadas em PBS pH=7,4 por duas vezes e depois ressuspensas em 90 μl de solução de anexina V conjugada a fluorocromo Alexa 488 (Invitrogen) diluída em tampão de ligação 1x (Invitrogen). Após incubação de 15 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz, foram adicionados 400 μl de tampão de ligação 1x e 10 μl de PI (Sigma) e então as células foram analisadas no citômetro de fluxo Cyan ADP. Foram adquiridos 10000 eventos para cada condição experimental e a fluorescência da anexina V foi detectada pelo filtro 530/40 nm e a fluorescência do PI pelo filtro 575/25 nm). Os dados foram analisados no software Summit 4.3. Após análise, foram somados os eventos positivos para a marcação por anexina e os eventos duplo-positivos para determinar o percentual de morte celular.

3.10 Avaliação do ciclo celular e da fragmentação de DNA

O PI, por ser uma molécula intercalante de DNA, pode ser usado para avaliar o conteúdo de DNA presente nas células. Análises de ciclo celular e fragmentação de DNA são feitas a partir da marcação por PI de células permeabilizadas, considerando que a intensidade de fluorescência do PI é diretamente proporcional ao conteúdo de DNA na célula.

Para os ensaios de avaliação de distribuição do ciclo celular e fragmentação de DNA, 1×10^5 células foram plaqueadas com 1,0 ou 5,0 μM de IM pelos tempos de 24, 48 e 72 horas e depois lavadas duas vezes com PBS pH=7,4 para então serem ressuspensas em 300 μl de PBS pH= 7,4 e acrescidas gota a gota com 700 μl de álcool absoluto gelado (Merck) enquanto estavam sob constante agitação no vortex (Maxi Mix II, Thermolyne). Após esse procedimento, as células foram guardadas à -20 °C overnight. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 3 minutos (Allegra X-22R, Beckman Coulter) e ressuspensas em solução de PI 0,02 mg/ml (Sigma) e RNase (Sigma) (100 $\mu\text{g/ml}$) em PBST (PBS pH=7,4,

0,1% Triton X-100) e incubadas por 30 minutos à 37 °C. Após a incubação, as amostras foram lidas no citômetro de fluxo (Accuri) e analisadas pelo software FlowJo. As fases do ciclo celular foram determinadas de acordo com a intensidade de fluorescência, que é correspondente ao conteúdo de DNA nos eventos. O DNA fragmentado foi determinado como a porcentagem de eventos com intensidade de fluorescência menor do que o pico correspondente às fases G0/G1 do ciclo celular.

3.11 Western blot

A análise de proteínas foi feita pela técnica de Western Blotting que consiste em uma eletroforese de proteínas desnaturadas e carregadas negativamente pelo tratamento com tampões contendo SDS (Dodecil sulfato de sódio) e β -mercaptoetanol em gel de poliacrilamida seguida de transferência para uma membrana e incubação com anticorpos específicos para a proteína de interesse seguida da incubação de anticorpos secundários conjugados ou a uma enzima (peroxidase ou fosfatase alcalina). Na etapa final, as membranas são incubadas com um reagente contendo o substrato para a enzima e a reação produz quimioluminescência que pode ser detectada por um scanner específico ou pode ser usado um filme fotográfico sensível no qual a exposição à luz resultante da reação cria uma imagem dos anticorpos ligados à membrana. A intensidade de luz resultante é proporcional à quantidade de proteína-alvo presente na amostra.

As proteínas foram extraídas com tampão Cell Extraction Buffer (Invitrogen) segundo as especificações do fabricante. A quantificação de proteína foi feita pelo método de Lowry utilizando o kit de dosagem de proteínas (BIO-RAD) Tris-HCl 0,06 M, pH 6,8; SDS 2%, glicerol 10%, Azul de bromofenol 0,025% e β -mercaptoetanol 200 mM. As proteínas foram separadas por eletroforese em um gel SDS-PAGE de 12% ou 7% à tensão de 110 V. Foi utilizado Tampão de Corrida (BIO-RAD) e foram usados 15 μ l do padrão de peso molecular Novex Sharp Pre-Stained Protein Standards (Invitrogen). Após a eletroforese, foi feita a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Biosciences) numa cuba úmida, usando Tampão de Transferência (BIO-RAD) à tensão constante de 100 V por 2 ou 4 horas.

Então as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% em TBS-T 0,05% por 2 horas e depois incubadas com anticorpos primários monoclonais contra as proteínas CRKL, pCRKL, survivina, ERK1/2, pERK1/2, Shp2, pShp2 e Hsc70 (Tabela 3.5) overnight à 4 °C. No dia seguinte, as membranas foram lavadas com TBST-0,05% e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho ou anti-camundongo conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich), na

diluição 1:40000 em TST-T 0,05%, leite 5%, por 1 hora. As membranas foram então lavadas com TBST-0,05% e incubadas com reagente ECL (Amersham) contendo substrato para a enzima peroxidase e foram escaneadas pelo C-Digit Blot Scanner (Li-cor Biosciences). A análise das imagens foi feita pelo software Image Studio Lite Ver 3.1 (Li-Cor Biosciences).

Tabela 3.5: Anticorpos utilizados

Anticorpo	Número de catálogo	Diluição	Fabricante
anti-CRKL	#3182	1:1000	Cell Signaling
anti-p-CRKL	#3181	1:1000	Cell Signaling
anti-ERK1/2	#4695	1:1000	Cell Signaling
anti-p-ERK1/2	700012	1:1000	Invitrogen
anti-survivina	#2808	1:1000	Cell Signaling
anti-Shp2	#3752	1:1000	Cell Signaling
anti-p-Shp2	#3751	1:500	Cell Signaling
anti-Hsc70	sc-7298	1:1000	Santa Cruz

3.12 Análise estatística

A análise estatística foi executada no software Graphpad Prism Ver. 5. Foram feitas análises utilizando o teste one-way ANOVA com pós-teste de Dunnett.

4 RESULTADOS

4.1 Desenvolvimento da linhagem K-IM

A linhagem K-IM foi desenvolvida a partir do cultivo da linhagem de LMC K562 em concentrações contínuas e crescentes de IM. O estabelecimento de linhagens resistentes através da seleção por fármacos não é uma tarefa simples, uma vez que as linhagens sensíveis apresentam significativa redução de viabilidade mesmo quando expostas a concentrações baixas de fármaco (MAHON *et al.*, 2000) (Figura 4.1).

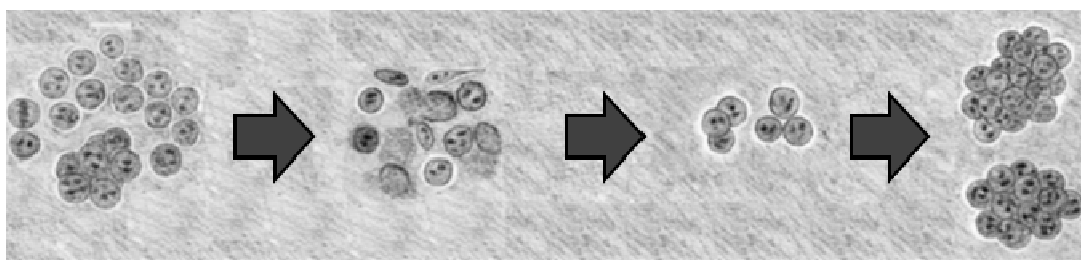


Figura 4.1: Seleção de linhagens resistentes. O processo de seleção de linhagens pelo cultivo com quantidades crescentes de drogas frequentemente envolve expressiva redução na viabilidade celular sempre que a concentração é aumentada. Uma parte da população inicial sobrevive à pressão seletiva imposta pela droga e prolifera e então a concentração é aumentada e o ciclo se repete.

O estabelecimento de uma linhagem resistente ao IM foi idealizado e iniciado pela minha orientadora Dra. Flavia C. Vasconcelos (dados não publicados). A partir de minha iniciação científica aumentei o nível de resistência da linhagem K-IM de 0,2 μM para 1,0 μM . Aliquotas de células viáveis congeladas foram armazenadas a cada incremento na concentração do IM.

Inicialmente, a linhagem K562 foi exposta a 0,01 μM de IM. Após intervalos de três dias a linhagem era repicada com a adição de IM. Após duas semanas, no mínimo, se a linhagem apresentasse aumento no número de células e reduzida morte celular a concentração do IM era aumentada. Inicialmente eram feitos incrementos de 0,01 μM . Quando a linhagem foi resistente a 0,1 μM de IM os incrementos passaram a ser da ordem de 0,1 μM até a linhagem tornar-se resistente a 0,6 μM . Até atingir a concentração de 1,0 μM os incrementos foram de 0,2 μM a cada repique.

A nova linhagem derivada da K562 e resistente a 1,0 μM de IM recebeu o nome de K-IM 1,0. No decorrer desta dissertação ela será utilizada em diversos experimentos e chamada apenas de K-IM. Ao longo do processo de indução de resistência foram criadas várias

linhagens resistentes a diferentes concentrações de IM. Estas linhagens estão crio preservadas (-80°C) e serão utilizadas em trabalhos futuros.

Seguindo esse protocolo de seleção, foram necessários cerca de seis meses para que a concentração de IM em cultura passasse de $0,2\ \mu\text{M}$ para $1,0\ \mu\text{M}$ (Figura 4.2).

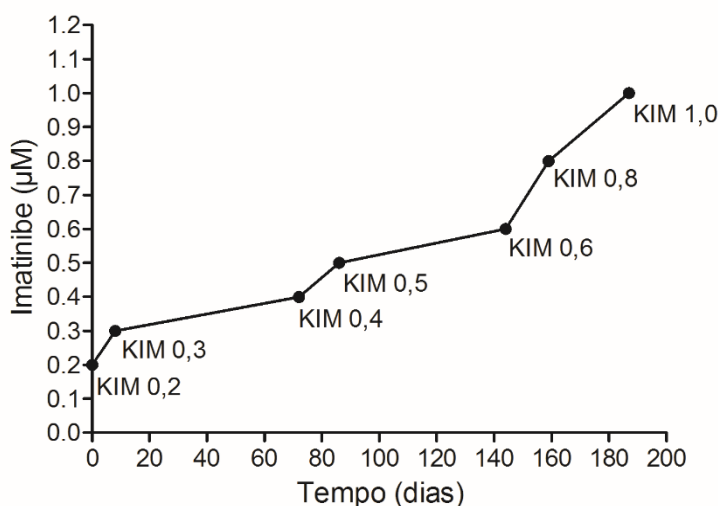


Figura 4.2: Desenvolvimento de linhagens resistentes. A linhagem K562 foi cultivada em concentrações crescentes de imatinibe. Foram selecionadas linhagens resistentes à medida que a concentração do imatinibe foi aumentada em cultura. A abscissa representa o tempo (em dias) necessário para aumentar gradativamente a concentração de imatinibe.

4.2 Avaliação da indução de citotoxicidade por inibidores de tirosina quinase

Uma vez desenvolvida a linhagem cultivada a $1,0\ \mu\text{M}$ de IM, era necessário caracterizar o perfil de resposta da linhagem K-IM ao IM. Para tanto, a indução de citotoxicidade pelos TKIs foi avaliada por ensaio de viabilidade, indução de morte celular e avaliação da fragmentação do DNA.

4.2.1 Avaliação da viabilidade celular em resposta ao tratamento com inibidores de tirosina quinase

As células das linhagens K-IM e K562 foram tratadas com diferentes concentrações de IM (variando de $0,5\ \mu\text{M}$ a $5,0\ \mu\text{M}$) e DAS (variando de $2\ \text{nM}$ a $200\ \text{nM}$) por 24, 48 ou 72 horas e depois a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT.

Na linhagem K562 (Figura 4.3) o efeito do IM foi tempo-dependente. Em 24 horas a redução de viabilidade foi discreta, cerca de 20%; em 48 horas foi observada redução mais

significativa, cerca de 50%, e em 72 horas foi o tempo que o IM teve seu efeito máximo nos tempos testados, induzindo uma redução de viabilidade de cerca de 80%.

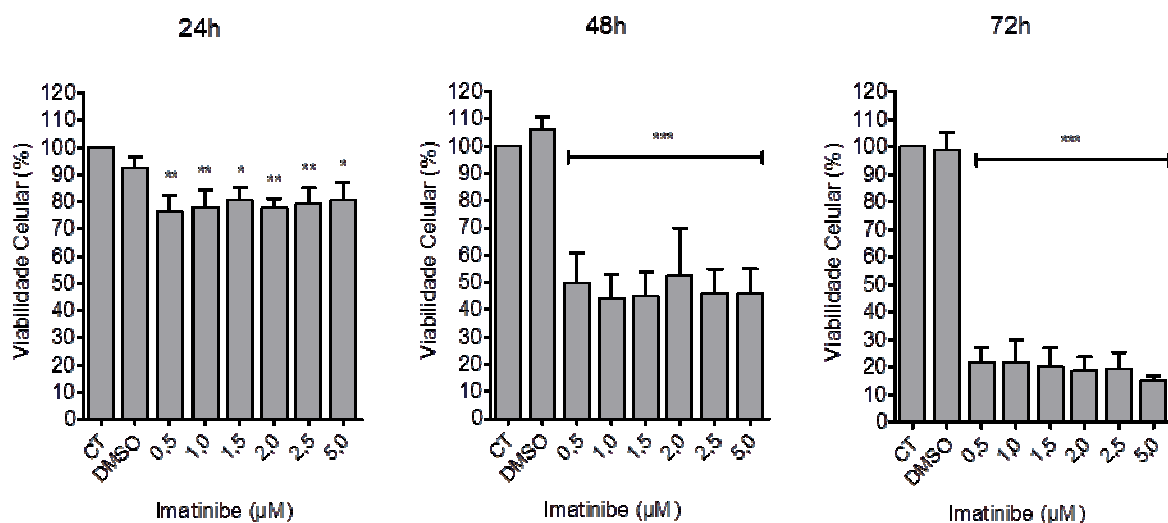


Figura 4.3: Células da linhagem K562 foram incubadas com diferentes concentrações de imatinibe ou com o veículo (DMSO) por 24, 48 e 72 horas e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Gráficos representam a média de três experimentos independentes e as barras representam o erro padrão. A análise estatística foi feita usando o teste one-way ANOVA com pós-teste de Dunnett. * corresponde a $p < 0,05$; ** corresponde a $p < 0,01$ e *** corresponde a $p < 0,001$.

Na linhagem K-IM (Figura 4.4) o IM apresentou efeito tanto tempo-dependente quanto dose-dependente. Em 24 horas a redução da viabilidade foi de cerca de 10%, em 48 horas foi evidenciado o efeito dose-dependente com redução de 15% em 0,5 µM até 40% em 5,0 µM. Em 72 horas o IM induziu redução de viabilidade variando de 15% em 0,5 µM a 50% em 5,0 µM. A concentração de IM usada em cultura (1,0 µM) promoveu uma redução de viabilidade em relação ao controle de 15% em 24 horas e 25% em 48 e 72 horas.

O efeito de outro TKI utilizado na clínica, o DAS, foi avaliado nas linhagens celulares. DAS é utilizado na clínica como segunda linha de tratamento para os pacientes resistentes ao IM (KUJAK; KOLESAR, 2016).

Na linhagem K562 o DAS, assim como o IM, apresentou efeito tempo-dependente. Em 24 horas a redução de viabilidade foi de cerca de 30% em todas as concentrações testadas; em 48 horas a redução de viabilidade foi de cerca de 50% e em 72 horas, de 75% (Figura 4.5).

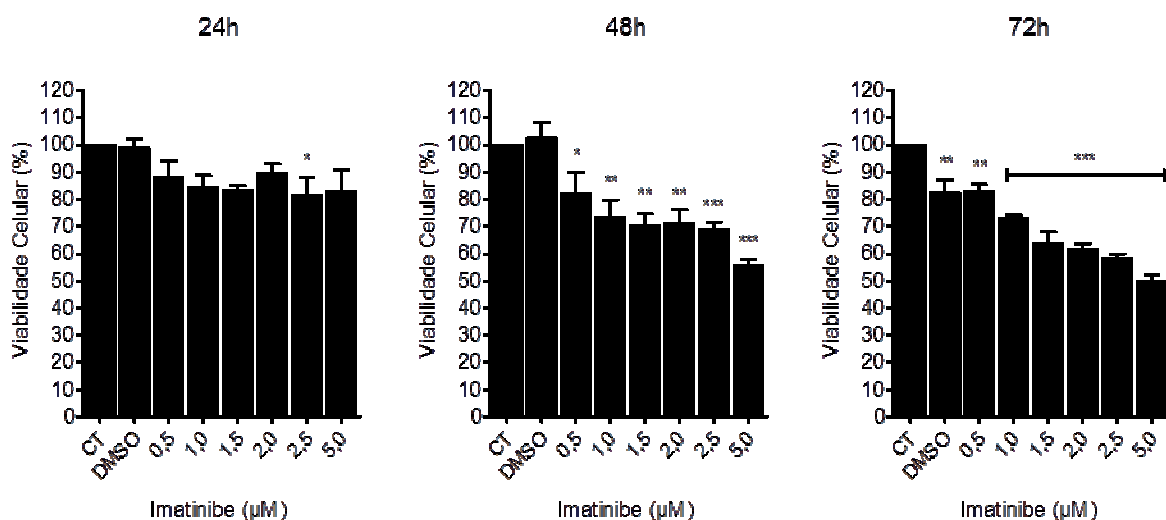


Figura 4.4: Resposta da linhagem K-IM ao tratamento com imatinibe. Células da linhagem K-IM foram incubadas com diferentes concentrações de imatinibe ou com o veículo (DMSO) por 24, 48 e 72 horas e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Gráficos representam a média de três experimentos independentes e as barras representam o erro padrão. A análise estatística foi feita usando o teste one-way ANOVA com pós-teste de Dunnett. * corresponde a $p<0,05$; ** corresponde a $p<0,01$ e *** corresponde a $p<0,001$.

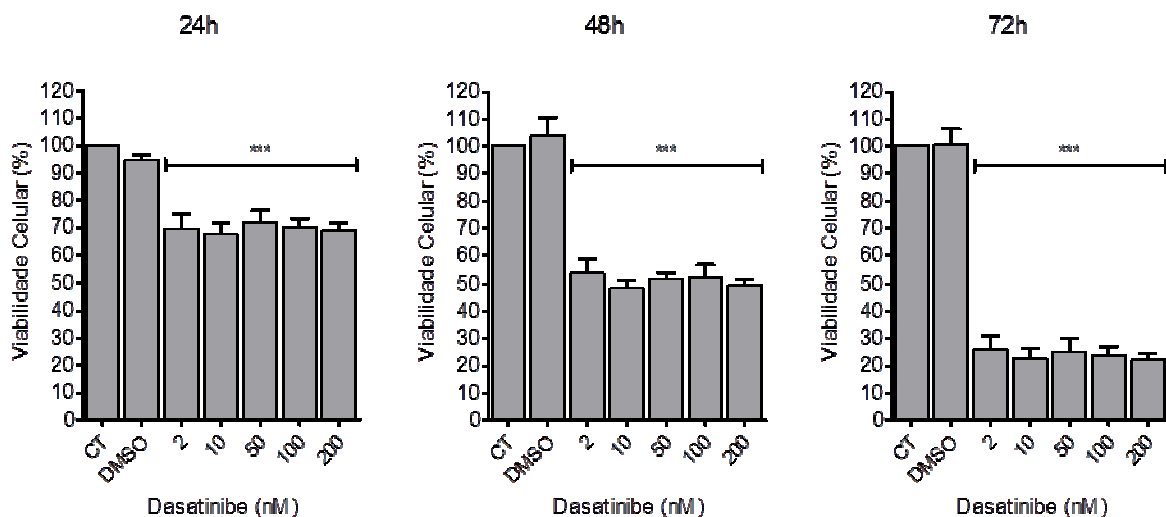


Figura 4.5: Resposta da linhagem K562 ao tratamento com dasatinibe. Células da linhagem K-IM foram incubadas com diferentes concentrações de dasatinibe ou com o veículo (DMSO) por 24, 48 e 72 horas e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Gráficos representam a média de três experimentos independentes e as barras representam o erro padrão. A análise estatística foi feita usando o teste one-way ANOVA com pós-teste de Dunnett. * corresponde a $p<0,05$; ** corresponde a $p<0,01$ e *** corresponde a $p<0,001$.

O tratamento com DAS teve efeito tempo- e dose-dependente nas células da linhagem K-IM. Em 24 horas a redução de viabilidade foi de cerca de 20%. Em 48 horas a redução de viabilidade variou de 10% em 2 nM a 55% em 200 nM, enquanto que em 72 horas a redução

de viabilidade em relação ao controle variou de 40% em 2 nM a 60% em 200 nM (Figura 4.6).

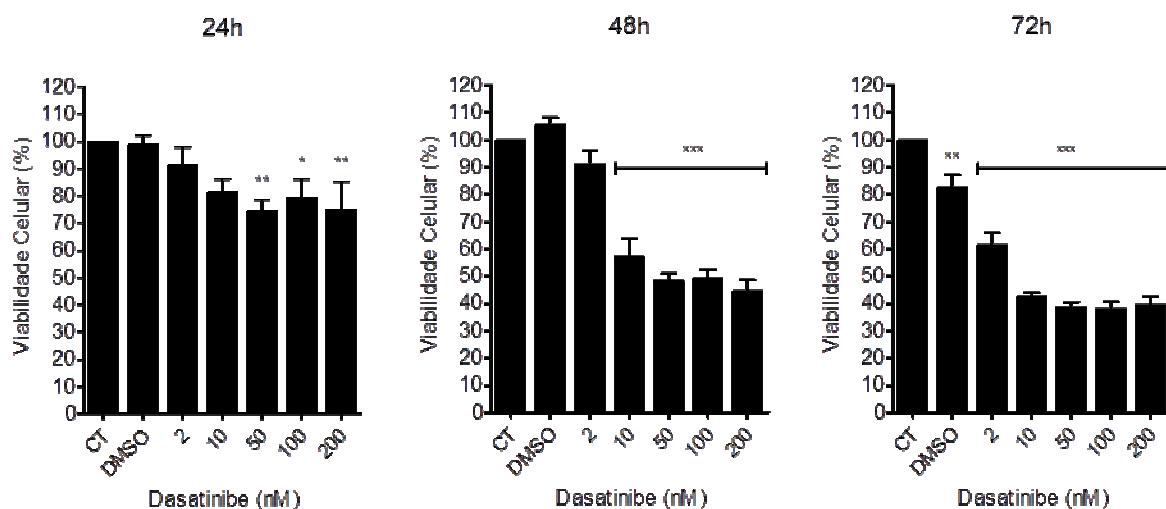


Figura 4.6: Resposta da linhagem K-IM ao tratamento com dasatinibe. Células da linhagem K-IM foram incubadas com diferentes concentrações de dasatinibe ou com o veículo (DMSO) por 24, 48 e 72 horas e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Gráficos representam a média de três experimentos independentes e as barras representam o erro padrão. A análise estatística foi feita usando o teste one-way ANOVA com pós-teste de Dunnett. * corresponde a $p < 0,05$; ** corresponde a $p < 0,01$ e *** corresponde a $p < 0,001$.

Os TKIs IM e DAS induziram efeito tempo-dependente nas duas linhagens. Foi feita uma análise comparativa entre a resposta das duas linhagens aos TKIs, no tempo de 72 horas, que foi o tempo no qual os TKIs tiveram seu efeito mais pronunciado. Foi observado que a linhagem K-IM apresentou porcentagem de viabilidade significativamente maior do que a linhagem K562 em todas as concentrações testadas (Figura 4.7).

Esse resultado mostra que a linhagem K-IM, apesar de apresentar redução na viabilidade em resposta aos tratamentos, foi mais resistente do que a linhagem K562. O uso do DAS, um TKI de segunda geração reverteu parcialmente a resistência da linhagem K-IM, que ainda assim apresentou porcentagem de viabilidade maior do que a linhagem K562. O DMSO não induziu alteração na viabilidade celular na linhagem K562 em nenhum dos tempos testados, porém no tempo de 72 horas o tratamento com DMSO induziu diminuição na viabilidade celular da linhagem K-IM significativamente diferente do controle. A porcentagem de DMSO na amostra foi similar à utilizada no tratamento com 5,0 μ M, que corresponde a 0,005% da amostra.

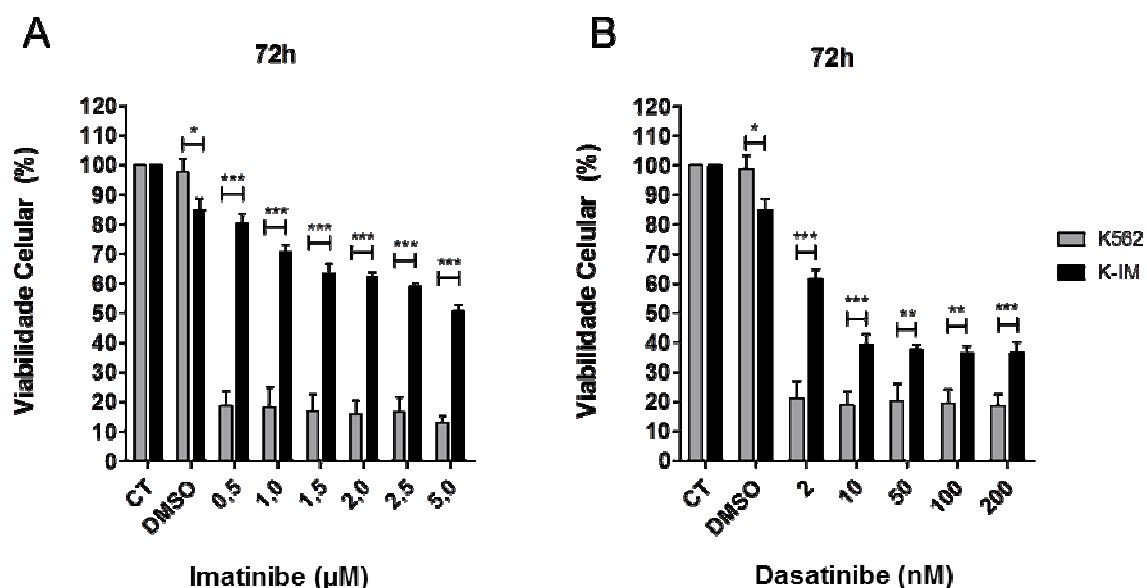


Figura 4.7: Análise comparativa da resposta das linhagens de LMC aos inibidores de tirosina quinase. Células das linhagens K562 e K-IM foram incubadas com diferentes concentrações de imatinibe (A) ou dasatinibe (B) ou com o veículo (DMSO) por 24, 48 e 72 horas e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Gráficos representam a média de três experimentos independentes e as barras representam o erro padrão. A análise estatística foi feita usando o teste two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * corresponde a $p < 0,05$; ** corresponde a $p < 0,01$ e *** corresponde a $p < 0,001$.

4.2.2 Avaliação da indução de morte celular pelo IM

A fim de avaliar se a redução na viabilidade induzida pelo tratamento com o IM estava associada à indução de morte celular, as células das linhagens K562 e K-IM foram tratadas com algumas concentrações selecionadas pelo do ensaio MTT (1,0 ou 5,0 μM de IM) por 24, 48 e 72 horas e avaliadas quanto à marcação com anexina V e/ou PI (Figuras 4.8 e 4.9).

A linhagem K562 respondeu de forma tempo-dependente ao IM. Em todos os tempos houve um percentual de morte espontânea de até 10% no controle (Figura 4.9). Em 24 horas a morte induzida pelo IM foi significativa somente na concentração de 5,0 μM sendo o percentual de células mortas de cerca de 30%. Em 48 horas, o percentual de células mortas foi de cerca de 50% e em 72 horas, foi de cerca de 50 % a 1,0 μM e 60% a 5,0 μM (Figura 4.9 A).

Na linhagem K-IM não houve indução significativa de morte nos tempos de 24 e 48 horas. Houve um percentual de morte intrínseca de cerca de 10-20% no controle nos tempos testados. Em 72 horas, somente em 5,0 μM houve indução significativa de morte em relação ao controle, de cerca de 30% (Figura 4.9 B).

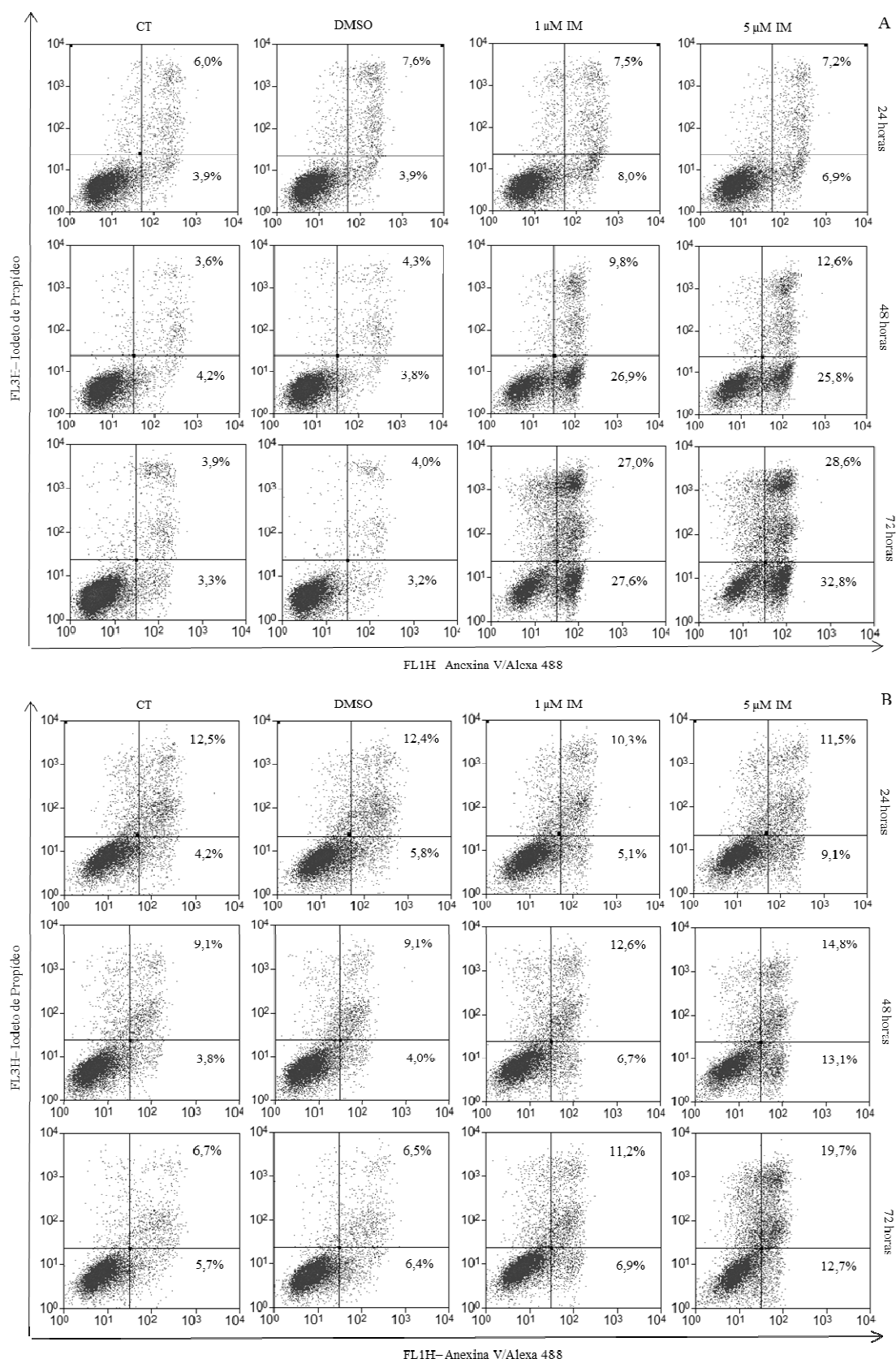


Figura 4.8: Indução da morte celular por imatinibe nas linhagens K562 e K-IM. Imatinibe (IM) foi incubado nas concentrações de 1 μ M e 5 μ M nas linhagens A) K562 e B) K-IM. A ocorrência de morte celular espontânea (na ausência de drogas – CT) assim como na presença do veículo utilizado para dissolver o IM (dimetilsulfóxido –DMSO) foram avaliadas também. A marcação com anexina V (conjugada ao fluorocromo alexa 488) associada ou não à marcação com iodeto de propídeo foi avaliada por citometria de fluxo. O percentual de células marcadas apenas com iodeto de propídeo foi excluído da análise. Gráficos representativos de 3 experimentos independentes.

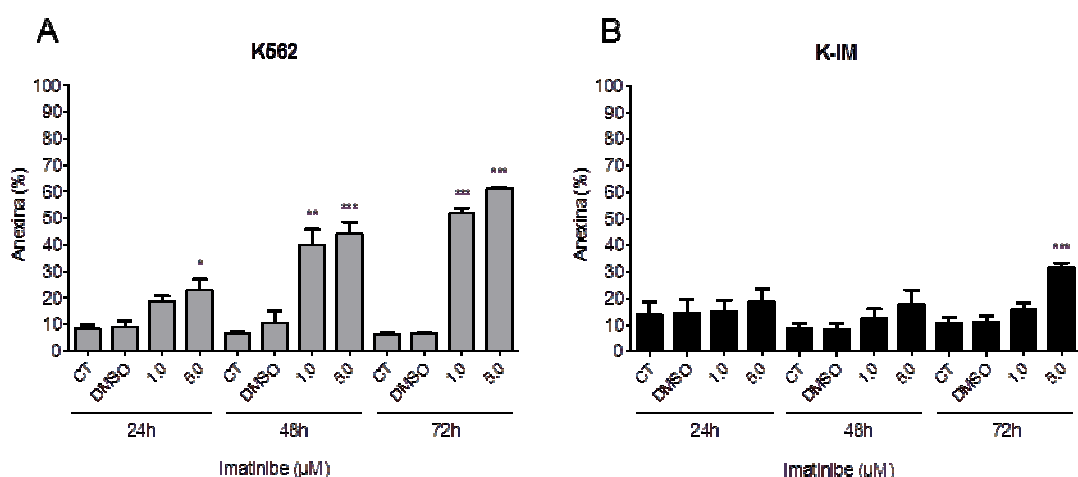


Figura 4.9: Análise da indução de morte celular pelo imatinibe. As células das linhagens K562 (A) e K-IM (B) foram tratadas com 1,0 ou 5,0 μM de imatinibe por 24, 48 e 72 horas e a indução de morte celular foi avaliada pela dupla marcação com anexina V/ iodeto de propídio (PI). A análise estatística foi feita usando o teste *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. * corresponde a $p < 0,05$; ** corresponde a $p < 0,01$ e *** corresponde a $p < 0,001$.

Avaliação de população sub-G0/G1 após tratamento com IM

Além da análise da morte celular pelo método anexina V/PI, a fragmentação de DNA através da quantificação de população com conteúdo de DNA inferior ao da população de células nas fases G0/G1 do ciclo celular (sub-G0/G1) foi analisada após tratamento com 1,0 e 5,0 μM de IM por 24 e 48 horas.

A linhagem K562 apresentou resposta tempo-dependente ao IM tendo cerca de 30% de fragmentação em 24 horas; cerca de 50% a 1,0 μM e 60% a 5,0 μM em 48 horas (Figura 4.10 A). O percentual de fragmentação no controle foi cerca de 10%. Na linhagem K-IM este percentual foi em torno de 20%. Diferentemente da linhagem K562, não houve indução de fragmentação de DNA na linhagem K-IM significativamente diferente do controle, independente do tempo ou da concentração avaliados (Figura 4.10 B).

O DMSO não induziu fragmentação significativa nas linhagens e tempos testados.

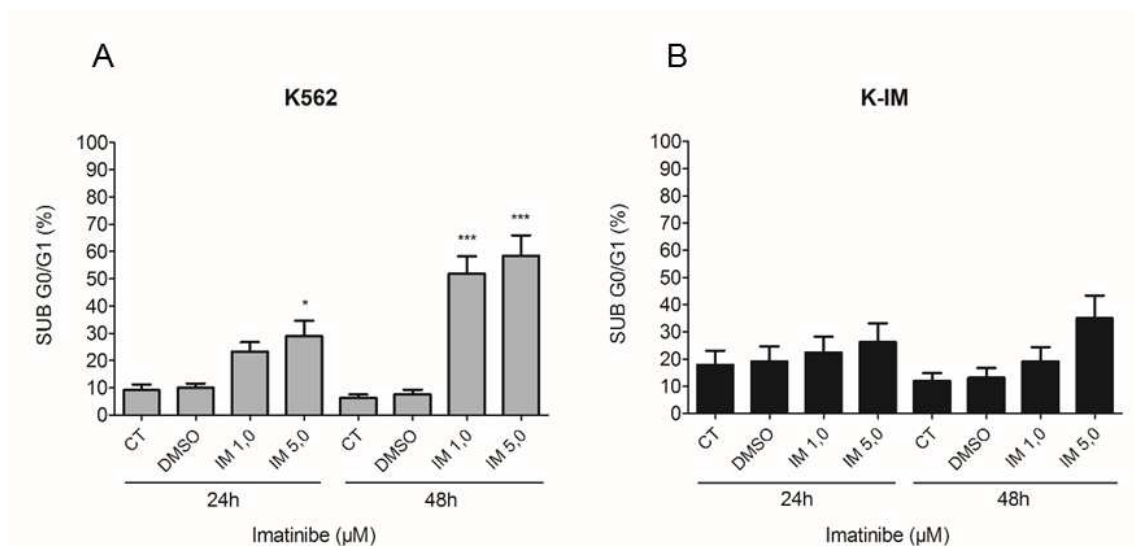


Figura 4.10: Fragmentação do DNA induzida pelo tratamento com imatinibe. As células das linhagens K562 (A) e K-IM (B) foram tratadas com 1,0 ou 5,0 μM de imatinibe e coradas com o fluorocromo iodeto de propídeo. A população de células com conteúdo de DNA inferior ao das células nas fases G0/G1 (sub-G0/G1) do ciclo celular foram contabilizadas como células com o DNA fragmentado. A análise estatística foi feita utilizando o teste one-way ANOVA com pós-teste de Dunnett. * corresponde a $p < 0,05$; ** corresponde a $p < 0,01$ e *** corresponde a $p < 0,001$.

Os resultados das análises de marcação com anexina V/PI e de fragmentação do DNA foram utilizados para análise comparativa da indução de morte pelo IM nas duas linhagens. Foi observado que a linhagem K-IM apresentou percentual de indução de morte significativamente menor do que a linhagem K562 (dados não mostrados).

4.3 Avaliação da proliferação celular após tratamento com o IM

4.3.1 Avaliação do efeito do tratamento com IM na distribuição das fases do ciclo celular

Uma vez visto que o tratamento com IM promove uma aparente redução na viabilidade que não é acompanhada por indução de morte celular, foi feita avaliação do impacto do tratamento com IM na distribuição das fases do ciclo celular. As células das linhagens K562 e K-IM foram tratadas com 1,0 e 5,0 μM de IM por 24 e 48 horas e foi realizada análise da distribuição das fases do ciclo celular por marcação do DNA pelo iodeto de propídeo (Figuras 4.11 e 4.12).

As células da linhagem K562 responderam ao tratamento de forma semelhante nos dois tempos testados. Houve acúmulo de células nas fases G0/G1 do ciclo celular após o

tratamento com IM nos dois tempos avaliados (Figura 4.11 A). Não houve diferença na porcentagem de células na fase S nos tratamentos em relação aos controles, mas houve redução na porcentagem de células nas fases G2/M.

A linhagem K-IM respondeu ao tratamento com IM de forma dose-dependente. Apresentou acúmulo de células nas fases G0/G1 e diminuição na fase S. Somente a concentração de 5,0 μ M em 48 horas houve redução na porcentagem de células nas fases G2/M. A linhagem K-IM apresentou um acúmulo em G1 e uma diminuição em S, porém a fase G2/M do ciclo não sofreu alterações em 1,0 μ M (Figura 4.11 B).

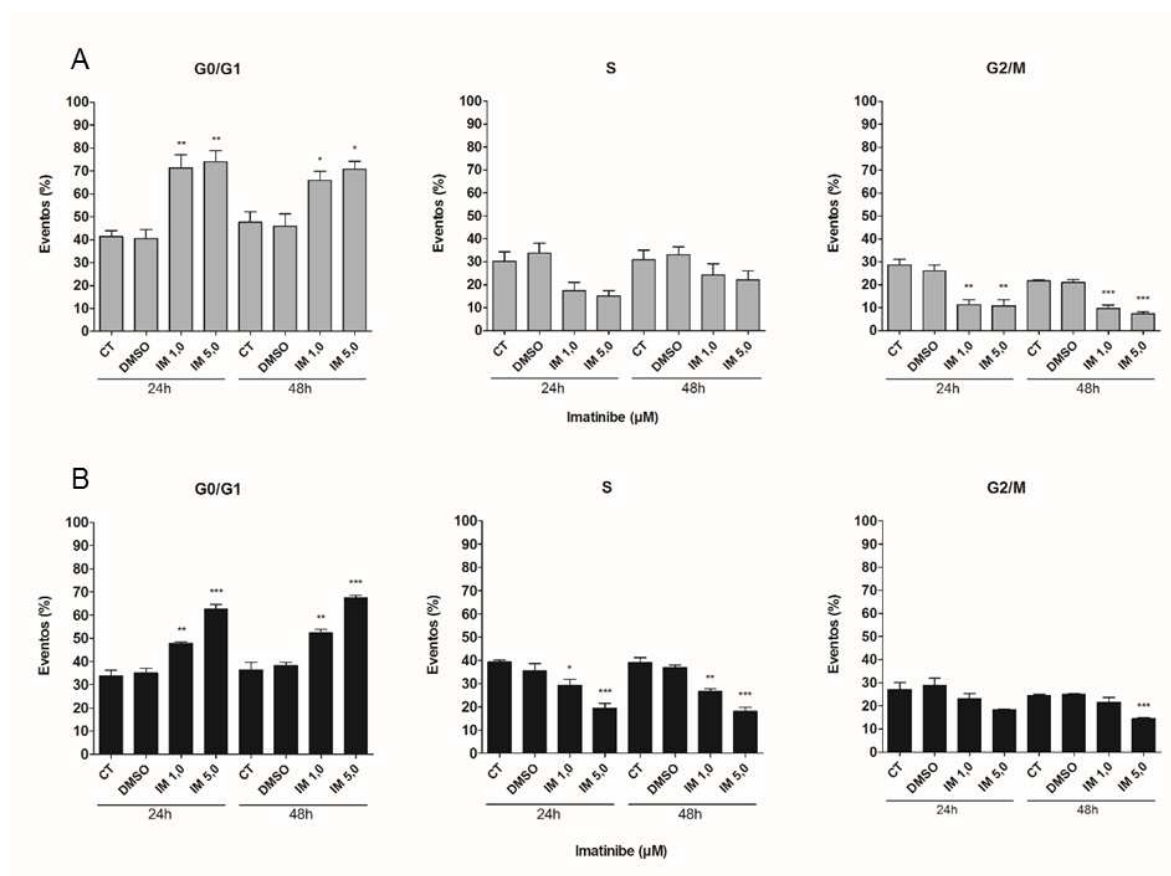


Figura 4.11: Efeito do imatinibe na distribuição das fases do ciclo celular. Células das linhagens K562 e K-IM foram tratadas com 1,0 ou 5,0 μ M de imatinibe e a distribuição das fases do ciclo celular foi avaliada por marcação com iodeto de propídio e posterior análise em citômetro de fluxo. A análise estatística foi feita usando o teste one-way ANOVA com pós-teste de Dunnett. * corresponde a $p < 0,05$; ** corresponde a $p < 0,01$ e *** corresponde a $p < 0,001$.

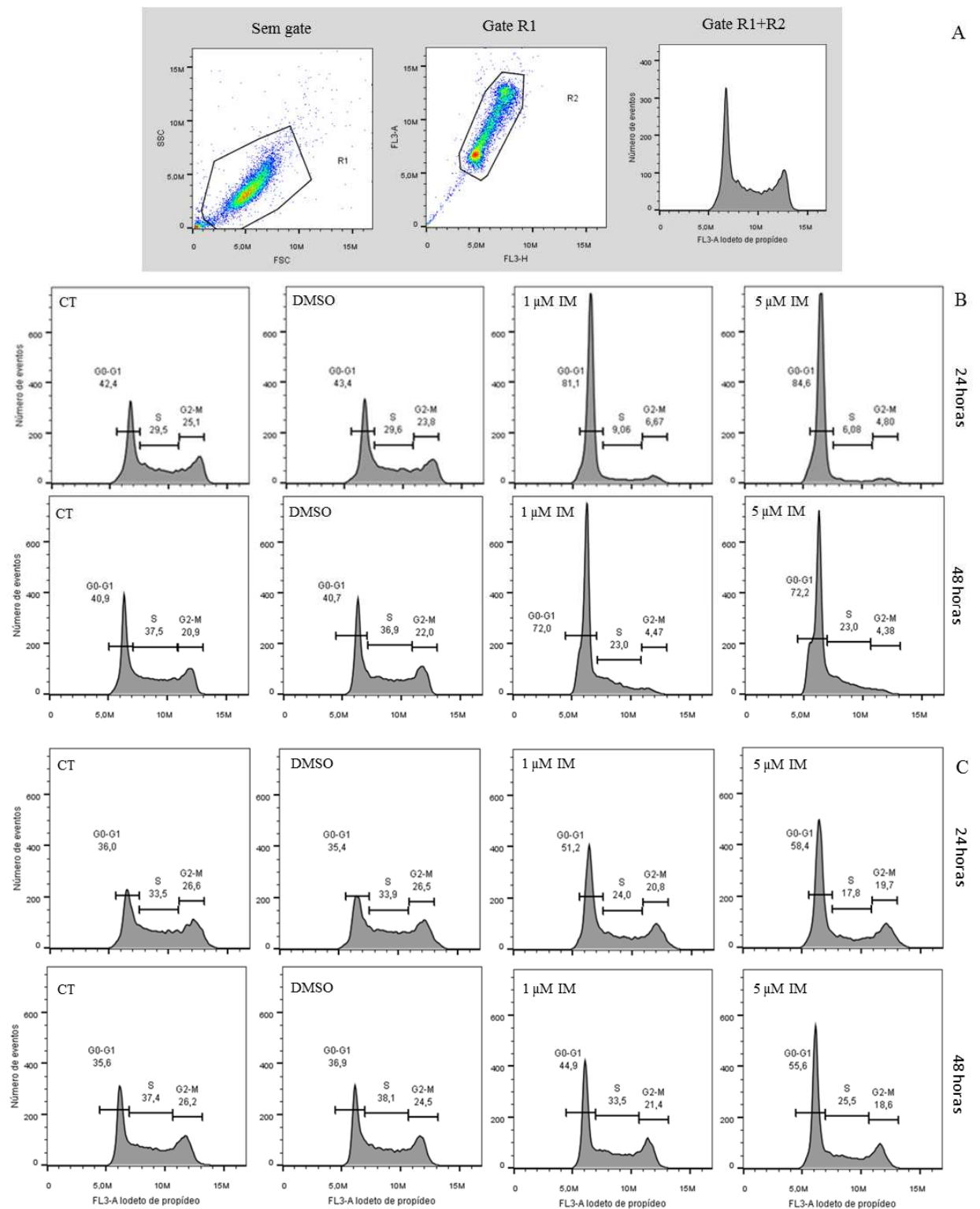


Figura 4.12: Análise do ciclo celular nas linhagens K562 e K-IM após incubação com o inibidor de tirosina quinase imatinibe. A) Exemplificação das estratégias de seleção das células a serem analisadas quanto à distribuição no ciclo celular por citometria de fluxo. B) Linhagem celular K562 e C) K-IM incubadas por 24 e 48 horas com 1 e 5 μM de imatinibe, com dimetilsulfóxido (DMSO) ou sem qualquer composto (CT). O percentual de células em cada fase do ciclo celular é indicado nos gráficos.

4.3.2 Avaliação da proliferação celular, por contagem de células, após tratamento com o IM

Para avaliar se o acúmulo de células em nas fases G0 ou G1 do ciclo celular resultaria na redução no número de células em cultura ao longo do tempo, foi realizada contagem de células viáveis por exclusão com azul de tripan. As células das linhagens K562 e K-IM foram plaqueadas em densidade celular igual a 5×10^4 células/ml, depois tratadas com 1,0 e 5,0 μM e contadas diariamente por um período de seis dias.

A K562 nas amostras controle e DMSO teve a densidade celular aumentada de 5 para 20×10^4 células/ml em 24 h, 70×10^4 células/ml em 48 h e 120×10^4 células/ml em 72 horas. Em 96 horas o número de células começou a decair para 50×10^4 células/ml; 10×10^4 células/ml em 120 h e não foram observadas células vivas em 144 h (Figura 4.13 A).

As amostras tratadas com 1,0 e 5,0 μM de IM se comportaram de forma semelhante. O valor de densidade celular dobrou em 24 h; reduziu para 2×10^4 células/ml em 48 horas; 1×10^4 células/ml em 72 h; $0,5 \times 10^4$ células/ml em 96 h e a partir de 120 h não foram observadas células vivas (Figura 4.13 A).

As células da linhagem K-IM, no controle, aumentaram de 5×10^4 células/ml para 15×10^4 células/ml em 24h; 30×10^4 células/ml em 48h; 60×10^4 células/ml em 72 h e 80×10^4 células/ml em 96 h. A partir de 120 h houve diminuição gradativa para 30×10^4 células/ml e 20×10^4 células/ml em 144 h. As células tratadas com DMSO se comportaram de forma semelhante ao controle até 48h. Em 72 h apresentaram 50×10^4 células/ml; 70×10^4 células/ml em 96 h. Foi observada diminuição na densidade celular a partir de 120 h, na qual foram observadas 40×10^4 células/ml; seguida por 20×10^4 células/ml em 144 h. As amostras tratadas com 1,0 μM aumentaram a densidade celular em 24 h semelhante ao controle, apresentaram 20×10^4 células/ml em 48 h; 30×10^4 células/ml em 72 h; 60×10^4 células/ml em 96 h; 50×10^4 células/ml em 120h e 30×10^4 células/ml em 144 h. As amostras tratadas com 5,0 μM apresentaram aumento da densidade celular como o controle em 24 h e a densidade celular se manteve entre $15\text{-}20 \times 10^4$ células/ml até o tempo de 96 h, a partir do qual a densidade se manteve 10×10^4 células/ml em 120 e 144 h (Figura 4.13 B).

Como observado, as células da linhagem K562 apresentam taxa de crescimento maior do que as células da linhagem K-IM em condições controle. No entanto, na linhagem K562, o tratamento com IM não só impediu o aumento da densidade celular, como induziu redução no número de células a partir de 48 h, corroborando os dados que mostram que há indução de

morte celular pelo tratamento com IM. Nas amostras de células da linhagem K-IM tratadas com 1,0 μM de IM houve aumento do número de células até o tempo 96 h, o que evidencia que, embora ocorra acúmulo de células nas fases G0/G1 do ciclo celular, isso não impede a proliferação celular dessa linhagem. Quando as células da linhagem K-IM foram tratadas com 5,0 μM , houve aumento da densidade celular no primeiro dia, a partir do qual a densidade celular foi mantida até o tempo de 96 h, a partir do qual se manteve num valor de densidade menor até 144 h, sugerindo que o tratamento com IM altere o perfil de crescimento e induza a morte de uma parcela dessa população de células.

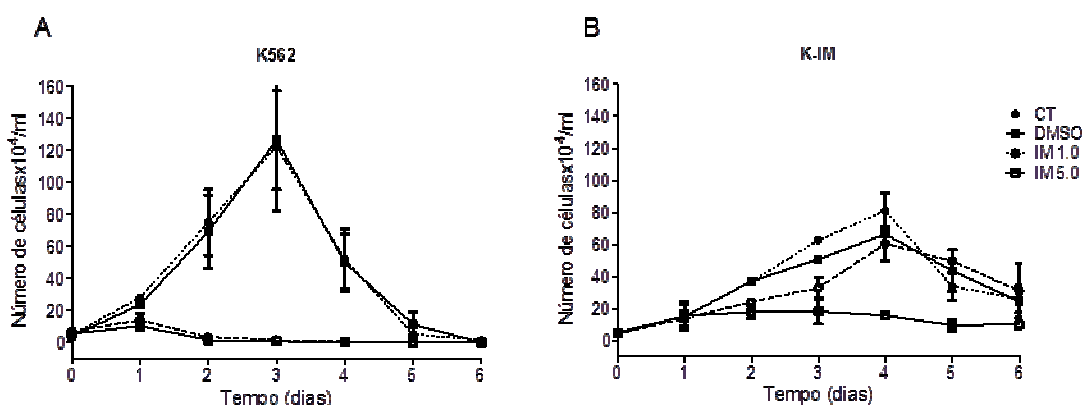


Figura 4.13: Avaliação do crescimento celular após tratamento com imatinibe. Células das linhagens K562 e K-IM foram tratadas com 1,0 ou 5,0 μM de imatinibe e o número de células viáveis foi quantificado diariamente pelo método de contagem de células não coradas pelo azul de tripan.

4.4 Avaliação do status de Bcr-Abl

Sendo Bcr-Abl a proteína responsável pela patogênese da LMC e alvo do IM, uma abordagem lógica para o estudo da linhagem K-IM é a avaliação de Bcr-Abl após o tempo de seleção da linhagem.

4.4.1 Análise de mutação no gene *BCR-ABL*

O mecanismo de resistência mais frequentemente observado na clínica e o mais estudado até então é a mutação no domínio tirosina-quinase da Bcr-Abl (YANG; FU, 2015). O sequenciamento dos exons 4 a 10, que codificam o domínio tirosina-quinase, do gene *BCR-ABL* na linhagem K-IM mostrou que não há mutação nessa linhagem. Esse achado

indica que outros mecanismos de resistência estão presentes na linhagem K-IM e conferem a ela sua resistência ao IM apesar de apresentar Bcr-Abl selvagem.

4.4.2 Análise dos níveis de RNA mensageiro de *BCR-ABL*

Como o aumento do número de moléculas de Bcr-Abl também é um mecanismo descrito de resistência ao IM (GORRE *et al.*, 2001), foram avaliados os níveis de RNA mensageiro de *BCR-ABL* pela técnica de RT-qPCR. A linhagem K-IM apresentou níveis cerca de seis vezes maiores de *BCR-ABL* em relação à linhagem K562 (Figura 4.14), sugerindo que exista superexpressão dessa proteína.

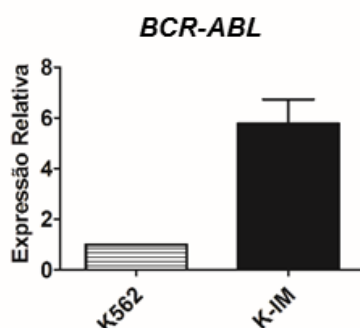


Figura 4.14: Níveis de RNA mensageiro de *BCR-ABL*. Os níveis de RNA mensageiro de *BCR-ABL* foram avaliados nas linhagens K562 e K-IM por RT-qPCR. A linhagem K562 foi usada como referência e o gene GUSB (β -glucuronidase) foi usado como controle endógeno.

4.4.3 Avaliação indireta da atividade da proteína Bcr-Abl

Uma forma de avaliar indiretamente a atividade tirosina quinase de Bcr-Abl é a análise dos níveis de fosforilação do seu principal alvo, a proteína CRKL. Os níveis de CRKL fosforilado são utilizados como fator preditivo de resposta no tratamento da LMC (WHITE *et al.*, 2007). A análise dos níveis de CRKL total e fosforilado na ausência de tratamento mostrou que a linhagem K-IM apresenta níveis semelhantes aos da linhagem parental da proteína total e de sua forma fosforilada, indicando que embora haja aumento nos níveis de RNAm de *BCR-ABL*, isso não se traduz em maior atividade tirosina-quinase na linhagem K-IM (Figura 4.15).

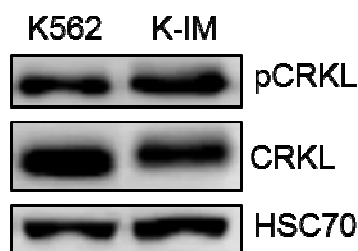


Figura 4.15: Avaliação indireta da atividade da proteína Bcr-Abl. Células das linhagens K562, K562-Lucena1 e K-IM foram avaliadas quanto aos níveis proteicos e de fosforilação da proteína CRKL por Western Blot. CRKL é o principal substrato de fosforilação da proteína Bcr-Abl e por isso seus níveis de fosforilação constituem uma medida indireta da atividade de Bcr-Abl. A proteína Hsc70 foi utilizada como controle de carregamento. Imagem representativa de três experimentos independentes.

4.4.4 Avaliação da atividade de Bcr-Abl após tratamento com IM

A fim de avaliar se apesar da resistência apresentada pela linhagem K-IM, Bcr-Abl seria inibido pelo tratamento com IM, os níveis de CRKL total e fosforilado foram avaliados nas linhagens K-IM após 24 horas de tratamento com 1,0 e 5,0 μ M de IM e os resultados foram comparados aos da sua linhagem parental K562.

Foi observada diminuição dos níveis de fosforilação de CRKL em ambas as linhagens, indicando que apesar da resistência da linhagem K-IM, a atividade de Bcr-Abl foi inibida pelo IM de forma semelhante à K562. Os níveis de CRKL total não foram alterados pelo tratamento (Figura 4.16).

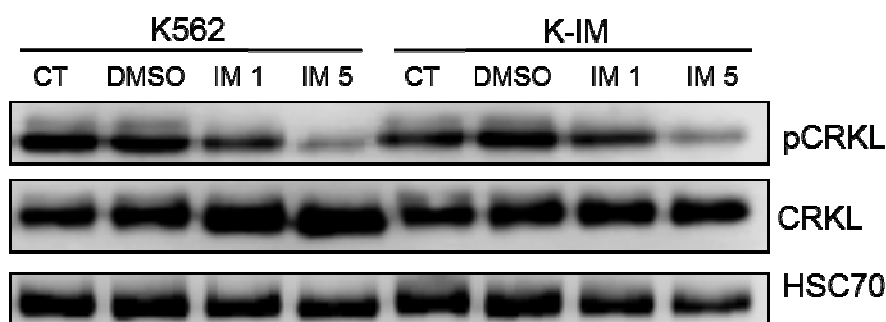


Figura 4.16: Avaliação da inibição de Bcr-Abl pelo IM. As células das linhagens K562 e K-IM foram tratadas com 1,0 μ M (IM1) ou 5,0 μ M (IM5) de IM e foram avaliadas quanto aos níveis de CRKL total e fosforilado (pCRKL). Os níveis de pCRKL e de CRKL nas células incubadas com IM foram comparados aos níveis destas proteínas na ausência de tratamento e/ou incubadas com o veículo dimetilsulfóxido (DMSO). A fosforilação de CRKL é uma medida indireta da atividade de Bcr-Abl por ser seu principal substrato de fosforilação. A proteína Hsc70 foi usada como controle de carregamento. CT = controle de células sem tratamento, DMSO = controle do veículo, IM 1 = células tratadas com 1,0 μ M de imatinibe e IM 5 = células tratadas com 5,0 μ M de imatinibe. Imagem representativa de três experimentos independentes.

4.5 Avaliação da expressão e atividade das proteínas transportadoras de efluxo

A linhagem K-IM não apresentou a mutação em *BCR-ABL* e, apesar de ter aumento nos níveis de RNAm o IM foi eficaz na inibição da atividade de Bcr-Abl. À despeito da inibição de Bcr-Abl, a linhagem K-IM mostrou-se resistente ao IM, como evidenciado nos ensaios de viabilidade e morte celular. Portanto, outros mecanismos não relacionados a Bcr-Abl devem estar atuando nesta linhagem para conferir essa resistência ao IM.

Os transportadores de efluxo da família ABC são os principais responsáveis pelo fenômeno de resistência a múltiplas drogas (MDR) e, dentre eles, a Pgp e a BCRP são os mais importantes na resistência aos TKIs porque têm como substrato o IM (EADIE; HUGHES; WHITE, 2014).

4.5.1 Avaliação da expressão de Pgp

As células das linhagens K562 e K-IM foram incubadas com anticorpo anti-Pgp conjugado a um fluorocromo e avaliadas ao citômetro de fluxo. A sobreposição dos picos de fluorescência no controle sem anticorpo e das células incubadas com anticorpo indicam que as células das linhagens K562 e K-IM não apresentaram expressão dessa proteína (Figura 4.17).

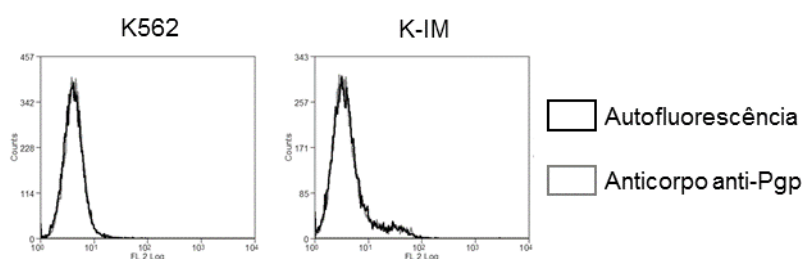


Figura 4.17: Expressão de glicoproteína-P (Pgp). Células das linhagens K562 e K-IM foram incubadas com anticorpo anti-Pgp conjugado à ficoeritrina e analisadas no citômetro de fluxo. Imagens representativas de três experimentos independentes.

4.5.2 Avaliação da atividade dos transportadores de efluxo

Células das linhagens K562 e K-IM foram avaliadas quanto à atividade dos transportadores de efluxo Pgp (Figura 4.18 A) e BCRP (Figura 4.18 B) com o uso de substratos fluorescentes e de moduladores. Um aumento na fluorescência das células incubadas com os fluorocromos, promovido pela adição dos agentes moduladores, é sugestivo

da presença de um transportador de efluxo ativo. Por outro lado, se a linhagem não apresentar atividade de um transportador de efluxo a intensidade de fluorescência será a mesma na presença ou ausência de um modulador. Nos dois ensaios realizados, os picos de intensidade de fluorescência das amostras com substrato fluorescente e modulador se sobrepuseram aos picos de intensidade de fluorescência das amostras somente com o substrato fluorescente, indicando que as células das linhagens K562 e K-IM não apresentam atividade das duas proteínas avaliadas (Figura 4.18 A e B).

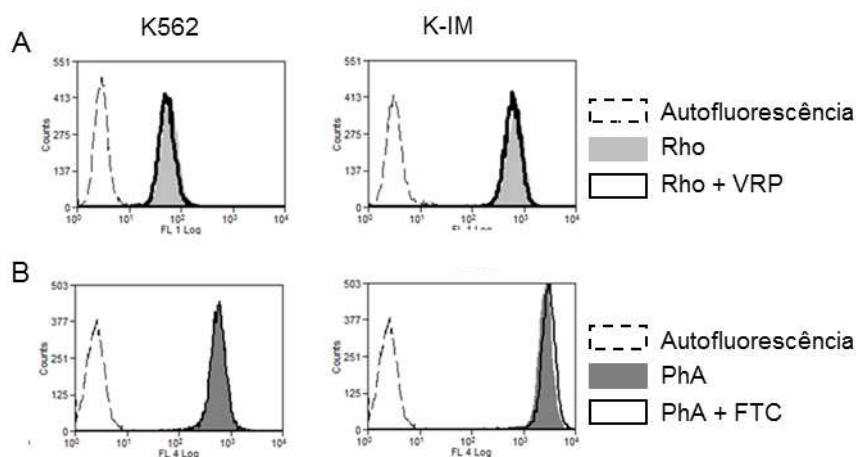


Figura 4.18: Avaliação da atividade das proteínas transportadoras de efluxo. Células das linhagens K562 e K-IM foram incubadas com o substrato fluorescente Rodamina 123 (Rho) na presença ou ausência do inibidor de glicoproteína-P (Pgp) verapamil (VRP) e analisadas no citômetro de fluxo para a avaliação da atividade da Pgp (A). As células foram incubadas com o substrato fluorescente Pheophorbide A (PhA) na presença ou ausência do inibidor da proteína de resistência do câncer de mama (BCRP) Fumitremorgin C (FTC) para a análise da atividade de BCRP (B). Imagens representativas de três experimentos independentes.

4.6 Avaliação das proteínas inibidoras da apoptose

A desregulação de vias relacionadas à apoptose representa um importante *hallmark* do câncer e está associada à resistência ao tratamento (HANAHAAN; WEINBERG, 2011). Nesse contexto, as proteínas inibidoras da apoptose, principalmente XIAP e survivina, têm sido estudadas como possíveis alvos terapêuticos (SINGH *et al.*, 2015; KASHKAR, 2010).

4.6.1 Análise dos níveis de RNA mensageiro de XIAP e survivina

Os níveis de RNAm de XIAP (*BIRC4*) e de survivina (*BIRC5*) foram avaliados por RT-qPCR na linhagem K-IM em comparação com a linhagem K562. O gene *GUSB* foi utilizado como controle endógeno e os valores relativos de RNAm foram calculados pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

As linhagens K562 e K-IM apresentaram níveis semelhantes de RNAm de *BIRC4* (Figura 4.19 A). Por outro lado, as linhagens diferiram nos níveis de RNAm de *BIRC5*. A linhagem K-IM apresentou níveis 2,5 vezes aumentados em relação à K562 (Figura 4.19 B), sugerindo que ela poderia ter participação na resistência da linhagem K-IM.

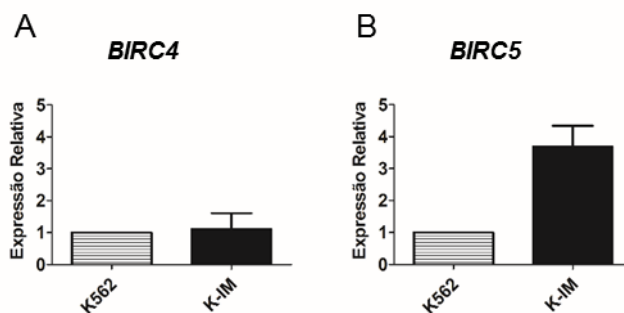


Figura 4.19: Avaliação dos níveis de RNA mensageiro das proteínas inibidoras da apoptose. As células das linhagens K562 e K-IM foram avaliadas quanto aos níveis de transcritos das proteínas inibidoras da apoptose XIAP (*BIRC4*) e survivina (*BIRC5*). O gene *GUSB* foi usado como controle endógeno e a expressão relativa foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

4.6.2 Avaliação dos níveis proteicos de survivina

Para avaliar se os maiores níveis de RNAm *BIRC5* na linhagem K-IM resultariam em aumento dos níveis proteicos de survivina, esses foram avaliados pelo ensaio de Western blot.

Os níveis proteicos de survivina na K-IM foram maiores do que os níveis apresentados pela linhagem K562, corroborando os dados do RT-qPCR que mostraram maiores níveis transcricionais de survivina na linhagem K-IM (Figura 4.20).

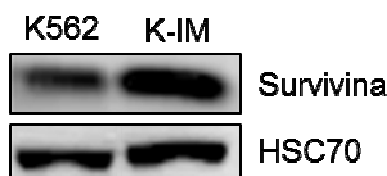


Figura 4.20: Avaliação da expressão de survivina. As células das linhagens K562 e K-IM foram avaliadas quanto ao conteúdo proteico de survivina. A proteína Hsc70 foi usada como controle de carregamento. Imagem representativa de três experimentos independentes.

4.7 Avaliação de desregulação de vias de sinalização

4.7.1 Avaliação da expressão e fosforilação de ERK1/2

A desregulação de vias de sinalização é um mecanismo descrito de resistência em LMC (EIDE; O'HARE, 2015). Quando uma proteína participante de uma via de sinalização é inibida, pode ocorrer uma compensação de vias de sinalização por expressão de uma variante da mesma proteína ou pela ativação compensatória de outras vias de sinalização que resultem em um fenômeno biológico em comum (proliferação ou resistência à apoptose) (ROYCHOWDHURY; TALPAZ, 2011). Uma desregulação de vias de sinalização poderia estar relacionada ao aumento da expressão da proteína survivina na linhagem K-IM, uma vez que vias de sinalização como as vias de MAPK/ERK, PI3K/Akt e JAK/STAT podem induzir a expressão de survivina em modelos de LMC (CARTER *et al.*, 2006; FANG *et al.*, 2009 ; STELLA *et al.*, 2013). Tendo como base esse conhecimento, foi avaliado se a via de MAPK/ERK estaria alterada na linhagem K-IM.

Os níveis de ERK1/2 totais e fosforiladas foram avaliados nas células das linhagens K562 e K-IM. Os níveis de ERK1/2 totais foram semelhantes nas duas linhagens, no entanto, os níveis de ERK1/2 fosforiladas foram maiores nas na linhagem K-IM do que na linhagem sensível (Figura 4.21).

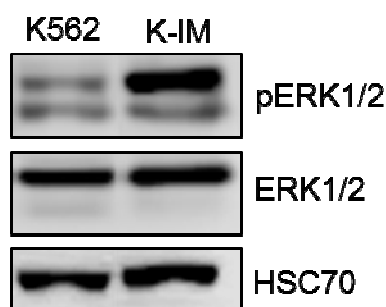


Figura 4.21: Avaliação do conteúdo proteico de ERK1/2. Células das linhagens K562 e K-IM foram avaliadas quanto aos níveis de ERK 1/2 total e fosforilado. A proteína Hsc70 foi utilizada como controle de carregamento. Imagem representativa de três experimentos independentes.

Apesar da via de MAPK/ERK ser ativada por Bcr-Abl, sua ativação independente de Bcr-Abl já foi descrita e associada à resistência ao IM (NAMBU *et al.*, 2010). A fim de averiguar se esse mecanismo estava presente na linhagem K-IM, as células das linhagens K562 e K-IM foram tratadas com 1,0 e 5,0 μ M de IM por 24 horas e depois os níveis de ERK1/2 total e fosforiladas foram avaliados.

Na linhagem K562 os níveis de ERK1/2 total não sofreram alterações significativas com o tratamento com IM, porém os níveis das proteínas fosforiladas diminuíram com o tratamento (Figura 4.22). Na linhagem K-IM os níveis totais de proteína não sofreram alteração significativa com o tratamento e os níveis de fosforilação de ERK1/2 também se mantiveram constantes apesar do tratamento com IM (Figura 4.22). Esses dados sugerem que a via de MAPK/ERK é ativada por uma via independente de Bcr-Abl na linhagem K-IM e pode estar envolvida no mecanismo de resistência da linhagem ao IM.

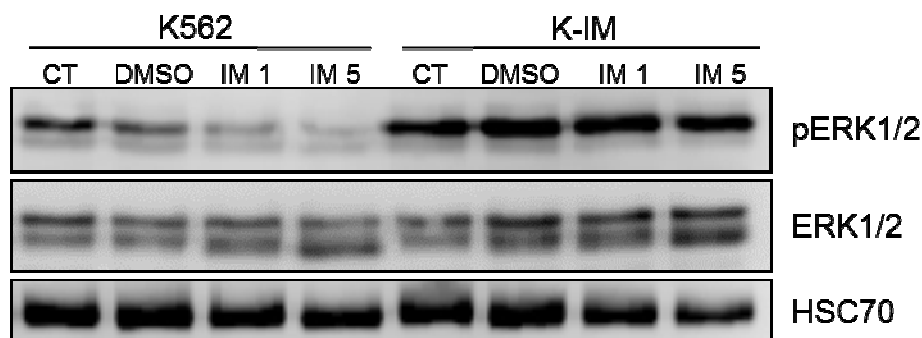


Figura 4.22: Avaliação das proteínas ERK1/2 após tratamento com IM. Células das linhagens K562 e K-IM foram tratadas com 1,0 ou 5,0 μM de IM por 24h. Então, os níveis totais e de fosforilação das proteínas ERK1/2. A proteína Hsc70 foi usada como controle de carregamento. CT = controle de células sem tratamento, DMSO = controle do veículo, IM 1 = células tratadas com 1,0 μM de imatinibe e IM 5 = células tratadas com 5,0 μM de imatinibe.

4.7.2 Avaliação dos níveis proteicos de survivina após tratamento com IM

Uma vez que a via de MAPK/ERK é ativada de forma independente da atividade de Bcr-Abl na linhagem K-IM, um dos mecanismos pelos quais ela poderia promover a resistência seria a ativação da expressão de survivina.

Células das linhagens K562 e K-IM foram incubadas com 1,0 ou 5,0 μM de IM por 24 horas e depois os níveis proteicos de survivina foram determinados como forma de avaliar se o tratamento com IM induziria alterações nos níveis proteicos de survivina e se as linhagens K-IM e K562 responderiam de forma diferente ao tratamento. Após tratamento com IM os níveis de survivina diminuíram nas duas linhagens, além disso, a diminuição de survivina foi maior na linhagem K-IM do que na linhagem K562 (Figura 4.23).

Os níveis de survivina na linhagem K-IM não se mantiveram constantes como os níveis de fosforilação de ERK1/2, sugerindo que a expressão de survivina é dependente da atividade de Bcr-Abl e não estaria sendo regulada de forma independente de Bcr-Abl pela via de MAPK/ERK.

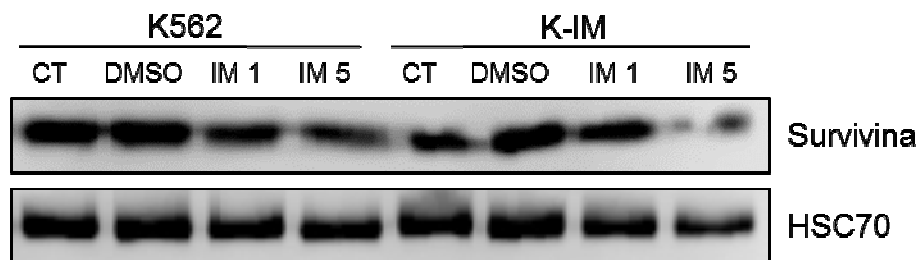


Figura 4.23: Avaliação da proteína survivina após tratamento com IM. Células das linhagens K562 e K-IM foram tratadas com 1,0 ou 5,0 μ M de IM por 24h e foi avaliado o conteúdo proteico de survivina. A proteína Hsc70 foi usada como controle de carregamento. CT = controle de células sem tratamento, DMSO = controle do veículo, IM 1 = células tratadas com 1,0 μ M de imatinibe e IM 5 = células tratadas com 5,0 μ M de imatinibe.

4.7.3 Avaliação da proteína fosfatase Shp2 na linhagem K-IM

Buscando elucidar os mecanismos de resistência presentes na linhagem de LMC resistente ao IM KCL22-R, Colavita e colaboradores fizeram um ensaio proteômico comparando a linhagem à sua parental KCL22-S (COLAVITA *et al.*, 2010). Dentre as proteínas superexpressas na linhagem resistente estava a fosfatase Shp2. Em um trabalho posterior, Esposito e colaboradores mostraram que o silenciamento de Shp2 na mesma linhagem resistente sensibilizada as células ao IM (ESPOSITO *et al.*, 2011). Shp2 pode ativar a via de MAPK/ERK através da sua interação com a proteína adaptadora Gab1. Por causa do seu papel na ativação na via de ERK1/2, a expressão de Shp2 foi avaliada na linhagem K-IM.

Para avaliar se Shp2 estaria envolvida no mecanismo de ativação da via MAPK/ERK de forma independente de Bcr-Abl, as células das linhagens K562 e K-IM foram incubadas com 1,0 ou 5,0 μ M por 24h e depois os níveis de Shp2 total e fosforilado foram analisados por Western blot.

Os níveis totais de Shp2 não alteraram significativamente na linhagem K562 após o tratamento com IM, no entanto, os níveis de Shp2 fosforilada foram reduzidos pelo tratamento. Na linhagem K-IM, os níveis de Shp2 total sofreram uma leve redução com 5,0 μ M de IM e os níveis de Shp2 fosforilada reduziram significativamente (Figura 4.24). Esses dados sugerem que a proteína Shp2 tem sua fosforilação regulada de forma dependente de Bcr-Abl, não estando relacionada à ativação da via de MAPK/ERK independente de Bcr-Abl na linhagem K-IM.

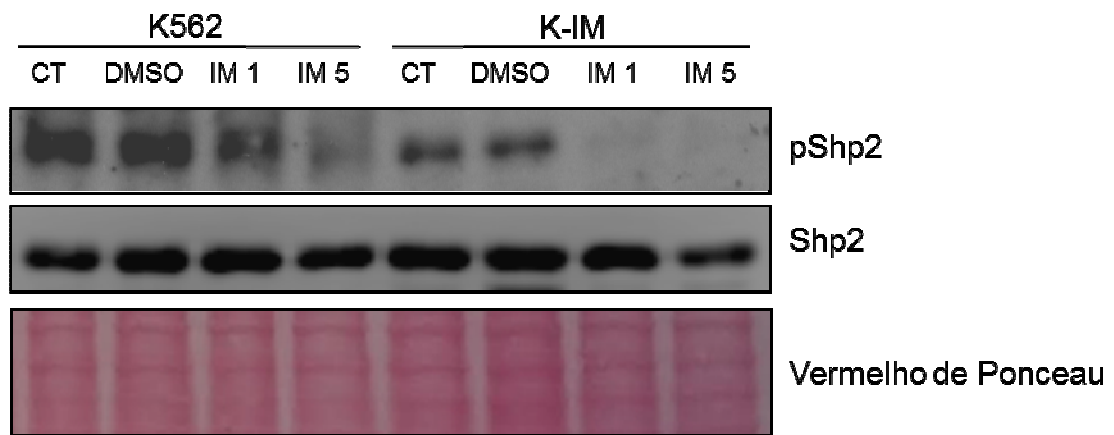


Figura 4.24: Avaliação nos níveis proteicos e de fosforilação de Shp2 após tratamento com IM. As células das linhagens K562 e K-IM foram tratadas com 1,0 ou 5,0 μM de imatinibe por 24 horas e então foram avaliados os níveis totais e de fosforilação de Shp2. CT = controle de células sem tratamento, DMSO = controle do veículo, IM 1 = células tratadas com 1,0 μM de imatinibe e IM 5 = células tratadas com 5,0 μM de imatinibe. A coloração com vermelho de ponceau foi utilizada como controle de carregamento.

5 DISCUSSÃO

O tratamento com TKIs é eficaz para o tratamento da maioria dos pacientes com LMC. Porém, cerca de 20-30% dos pacientes não responde de forma satisfatória ao tratamento de primeira linha com IM (EIDE; O'HARE, 2015). O mecanismo melhor estudado relacionado à resistência é a aquisição de mutações no domínio quinase da Bcr-Abl, promovendo resistência ao tratamento (SHAH; PARIKH; RAWAL, 2016). TKIs que inibem inclusive Bcr-Abl mutada são utilizados como segunda e terceira linha de tratamento, porém alguns pacientes apresentam resistência ao tratamento que não é explicada pela aquisição de mutações e por isso não respondem ao tratamento de segunda e terceira linhas. Dentre os mecanismos relacionados à aquisição de resistência está a ativação de forma independente de Bcr-Abl de vias de sinalização sabidamente reguladas por ela (EIDE; O'HARE, 2015).

Como modelo para o estudo dos diferentes mecanismos de resistência, linhagens celulares resistentes têm sido desenvolvidas (MAHON *et al.*, 2000; RUMJANEK *et al.*, 2001; TANG *et al.*, 2011; DAFLON-YUNES *et al.*, 2013; RUMJANEK; VIDAL; MAIA, 2013; KHORASHAD *et al.*, 2015; KO *et al.*, 2016). O processo de seleção de células resistentes através do cultivo com fármacos baseia-se em modificações estocásticas na célula e por isso um mesmo fármaco pode gerar uma gama de diferentes modelos de resistência (MAHON *et al.*, 2000). O processo de seleção utilizado para a linhagem K-IM, em nosso estudo, não seguiu o esquema rigoroso de aumentos gradativos a cada 10 dias como descrito em Mahon *et al.*, 2000. Nesse estudo, a concentração de IM foi aumentada em intervalos maiores quando havia redução muito grande da viabilidade ou quando a taxa de crescimento estava muito baixa. Uma abordagem semelhante já havia sido explorada por Tang e colaboradores (TANG *et al.*, 2011). Esses protocolos de seleção são utilizados até hoje (KHORASHAD *et al.*, 2015; KO *et al.*, 2016). Apesar da aleatoriedade do desenvolvimento de mecanismos de resistência observado na maioria das linhagens, protocolos foram propostos para o desenvolvimento de mecanismos específicos de resistência, como mutação (WANG; CHEN, 2016). No presente trabalho foram necessários cerca de seis meses, partindo de uma linhagem resistente à 0,2 μM IM, para que fosse estabelecida a linhagem resistente à 1,0 μM de IM, denominada K-IM.

Após o desenvolvimento da linhagem K-IM, ensaios de viabilidade celular, indução de morte, avaliação do ciclo celular e contagem de células foram realizados para caracterizar o perfil de resistência dessa linhagem. As células das linhagens K562 e K-IM responderam de forma tempo-dependente ao IM. O efeito tempo-dependente do IM já havia sido observado em linhagens de LMC (MAHON *et al.*, 2000; BERNARDO; REIS; MAIA, 2012; SILVA *et al.*, 2013). A linhagem K-IM se mostrou significativamente mais resistente ao IM do que a

linhagem K562. Apesar da maior resistência ao IM, a linhagem K-IM apresentou uma diminuição na viabilidade celular na concentração de 1,0 μ M de IM. Uma vez que essa concentração não inviabiliza a manutenção da linhagem em cultura, foi pensado se haveria indução à morte que se correlacionasse com o valor de redução na viabilidade.

A viabilidade também foi analisada após tratamento com o DAS, que é um TKI de segunda geração, mais potente do que o imatinibe com respeito à inibição de Bcr-Abl e que também é inibidor de Scr (SHAH *et al.*, 2004). DAS também exerceu efeito tempo-dependente nas linhagens de LMC. A linhagem K-IM também se mostrou mais resistente do que a linhagem K562 ao DAS, indicando que os mecanismos de resistência responsáveis pela resistência ao IM na K-IM também atuam conferindo resistência ao DAS. De forma semelhante, em modelos celulares resistentes selecionados em concentrações crescentes de um TKI já foi relatada a resistência cruzada para outros TKIs (EADIE; HUGHES; WHITE, 2016; TANG *et al.*, 2011).

O imatinibe, por inibir a Bcr-Abl, induz morte por apoptose (DEININGER *et al.*, 1997; MAHON *et al.*, 2000; BERNARDO; REIS; MAIA, 2012). Quando a indução de morte celular por IM foi avaliada nas linhagens, foram necessários tempo de incubação e concentração maiores de IM para que a linhagem K-IM fosse induzida à morte celular. A linhagem K-IM, na concentração em que é mantida, não causou indução de morte significativa em relação ao controle, mostrando que a aparente redução de viabilidade observada no ensaio de MTT não está relacionada à indução de morte nessa linhagem. Com base nesse resultado, foi proposto que o IM poderia induzir uma diminuição na taxa de proliferação na linhagem e por isso a análise viabilidade em relação ao controle sem IM resultaria em uma aparente diminuição na viabilidade celular.

Um dos efeitos descritos para o tratamento com IM é o acúmulo de células em G0/G1 que precede a indução de morte (KOMATSU *et al.*, 2003). Esse efeito foi observado nas linhagens K562 e K-IM, embora na K-IM não tenha havido indução à morte celular. Esse dado induziu o questionamento sobre se o IM alteraria o crescimento da linhagem. Esse efeito do IM é esperado uma vez que o Bcr-Abl induz a entrada no ciclo celular (GESBERT *et al.*, 2000). Logo, a sua inibição deve ter um efeito negativo na progressão do ciclo em células de LMC.

Para endereçar esse questionamento, as células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer pelo método de exclusão com azul de Tripán. As duas linhagens apresentam perfis discrepantes de crescimento em cultura. Já havia sido observado que as linhagens resistentes

geralmente apresentam crescimento mais lento que as parentais (MAHON *et al.*, 2000; DAFLON-YUNES *et al.*, 2013) e esse fenômeno é observado na linhagem K-IM em relação à K562. O tratamento com IM diminuiu o número de células viáveis da linhagem K562 em 48 horas, enquanto que na linhagem K-IM, incubada com 1,0 μ M de IM houve aumento gradativo no número de células dia após dia. O crescimento da linhagem K-IM na presença do IM foi mais lento do que na ausência, porém no quarto dia em cultura o número de células da amostra tratada foi semelhante ao da amostra sem o IM.

Uma vez caracterizado o perfil de resistência da linhagem K-IM, iniciou-se a busca para determinar os mecanismos de resistência presentes nessa linhagem. As mutações no gene BCR-ABL constituem o mecanismo de resistência mais frequentemente encontrado na clínica, representando cerca de 50% de todos os casos de resistência (BRANFORD *et al.*, 2003; SOVERINI *et al.*, 2006; HUGHES *et al.*, 2009; SHAH *et al.*, 2014). As mutações relacionadas à resistência ocorrem no domínio tirosina-quinase da proteína (SHAH *et al.*, 2002). No sequenciamento dos exons que codificam o domínio quinase da Bcr-Abl na linhagem K-IM não foram encontradas mutações, apontando que outros mecanismos são responsáveis pela resistência ao IM nessa linhagem.

Além da mutação, os níveis de RNAm de *BCR-ABL* têm valor prognóstico e são utilizados para o monitoramento da resposta ao tratamento (DEININGER, 2015). Foram observados maiores níveis de RNAm de *BCR-ABL* na linhagem K-IM em relação à K562, o que sugere que Bcr-Abl esteja envolvida nos mecanismos de resistência ao IM.

Uma vez determinados os maiores níveis de RNAm de *BCR-ABL* na linhagem K-IM, surgiu o interesse em saber se havia aumento na atividade da Bcr-Abl. Para quantificar de forma indireta a atividade dessa proteína, são utilizados os níveis de fosforilação do seu principal alvo, a proteína CRKL. Os níveis de fosforilação de CRKL são proporcionais à atividade de Bcr-Abl (NICHOLS *et al.*, 1994) e foram descritos como fator preditivo de resposta ao tratamento (WHITE *et al.*, 2007). Na linhagem K-IM, os níveis de CRKL total e fosforilado foram semelhantes aos da linhagem K562, indicando que, apesar do aumento nos níveis de RNAm de *BCR-ABL*, não houve aumento na atividade tirosina-quinase da proteína Bcr-Abl na linhagem K-IM. Além disso, houve redução na fosforilação de CRKL após o tratamento com IM tanto na linhagem K-IM quanto na K562, indicando que existam outros mecanismos de resistência na linhagem, que atuam de forma independente de Bcr-Abl.

A ausência de mutação no gene *BCR-ABL* e o fato de o aumento dos seus níveis de RNAm não se correlacionarem com um aumento na atividade da proteína Bcr-Abl indicaram

que talvez os mecanismos relacionados à Bcr-Abl não fossem os principais responsáveis pela resistência da linhagem K-IM. Sendo assim, foram avaliados os mecanismos classificados como independentes de Bcr-Abl. As proteínas transportadoras de efluxo da família ABC são importantes atores na resistência aos diversos quimioterápicos (KATHAWALA *et al.*, 2015). IM, DAS e nilotinibe podem ser extruídos pelas proteínas Pgp e BCRP (EADIE; HUGHES; WHITE, 2014) e algumas linhagens resistentes apresentam sua superexpressão como mecanismo de resistência (MAHON *et al.*, 2000; RUMJANEK *et al.*, 2001; DAFLON-YUNES *et al.*, 2013).

A expressão de Pgp pode ser um fenômeno inicial no desenvolvimento de resistência aos TKIs e uma característica que pode desaparecer com o passar do tempo e com o surgimento de outros mecanismos de resistência (EADIE; HUGHES; WHITE, 2016). Esse fenômeno não foi observado no curso de desenvolvimento de resistência da linhagem K-IM (dados não mostrados). Assim como a K562, a linhagem K-IM não apresentou expressão ou atividade de Pgp, e também não apresentou atividade da proteína BCRP.

Outra forma pela qual as células podem adquirir resistência aos quimioterápicos pela desregulação de proteínas relacionadas à morte celular programada (WILSON; JOHNSTON; LONGLEY, 2009). Nesse contexto, a proteína inibidora da apoptose survivina tem sido estudada como possível alvo terapêutico (SINGH *et al.*, 2015). A survivina encontra-se superexpressa na maioria dos cânceres humanos em contraste com os tecidos normais (SOLEIMANPUR; BABAEI, 2015). Em LMC foi observado que a inibição de survivina sensibilizava as células Bcr-Abl positivas ao tratamento com IM (CARTER *et al.*, 2006), relacionando-a com o a resistência ao IM. Além disso, foi demonstrada a relação entre survivina e Pgp para a promoção da resistência (SILVA *et al.*, 2013). Na linhagem K-IM foram observados níveis elevados de survivina tanto na forma de RNA quanto proteína, no entanto, a proteína foi reduzida pelo tratamento com IM. Isto indica que sua regulação na linhagem K-IM está sujeita à atividade de Bcr-Abl. A expressão de survivina pode ser ativada pelas vias de JAK2/PI3K/c-myc (FANG *et al.*, 2009), MAPK/ERK (CARTER *et al.*, 2006) e Jak2/STAT3 (STELLA *et al.*, 2013) e todas essas estão *downstream* a Bcr-Abl (DEININGER; GOLDMAN; MELO, 2000). A survivina atua não somente na resistência à apoptose, mas também é crucial para a progressão no ciclo celular (LENS; VADER; MEDEMA, 2006) e transição das células da fase G1 para S (TANG *et al.*, 2012). Também já foi descrito que a indução da apoptose pelo IM envolve a regulação da localização subcelular de survivina, levando a uma diminuição no citosol (BERNARDO; REIS; MAIA, 2012). Notadamente, houve acúmulo de células em G0/G1 após o tratamento com IM que

além de estar relacionado à inibição de Bcr-Abl, foi simultâneo à redução dos níveis de survivina.

A XIAP é outra IAP muito estudada como alvo terapêutico para o tratamento do câncer (SCHIMMER *et al.*, 2006), cuja superexpressão está associada a um pior prognóstico em diferentes neoplasias (TAMM *et al.*, 2004; RAMP *et al.*, 2004; MIZUTANI *et al.*, 2007). Apesar dos níveis de RNAm de *BIRC4* (XIAP) serem semelhantes entre as linhagens K-IM e K562, esse resultado não abole a possibilidade de participação da XIAP nos mecanismos de resistência da linhagem K-IM. Seca e cols. descreveram que XIAP participava da resistência ao IM em uma linhagem de LMC e, apesar da linhagem resistente apresentar níveis proteicos de XIAP similares aos da linhagem parental, sensível, XIAP participava de forma significativa para a sua resistência e exercia atividades concernentes à expressão de Pgp que não eram observadas na linhagem parental (SECA *et al.*, 2011).

Sendo MAPK/ERK uma das possíveis vias de ativação de survivina, os níveis de fosforilação de ERK1/2 foram avaliados. A linhagem K-IM apresentou níveis aumentados de fosforilação de ERK1/2 em relação à sua linhagem parental K562. Esse dado sugeriu ser promissor para indicar que a superativação de ERK1/2 estava associada à superexpressão de survivina. Porém, o tratamento com IM diminuiu os níveis de survivina enquanto que os níveis de fosforilação de ERK1/2 permaneceram inalterados. ERK1/2 já foi relacionada à resistência ao IM de forma independente de Bcr-Abl (NAMBU *et al.*, 2010). Sabe-se que a via de MAPK/ERK é crucial para a manutenção do status de “*oncogene addiction*” das células Bcr-Abl positivas (ASMUSSEN *et al.*, 2014). Os mecanismos específicos pelos quais ERK1/2 estaria promovendo essa resistência ainda não foram esclarecidos e persistem as dúvidas também sobre que via independente de Bcr-Abl seria responsável pela ativação de MAPK/ERK. Foi observado que ERK1/2 era ativado por PCK η , através da ativação de CRAF, em linhagens derivadas da K562 (MA *et al.*, 2014). Além disso, ERK poderia ser ativado por receptores tirosina quinase como EGFR, IGFR e VEGFR (STEELMAN *et al.*, 2011). Uma proteína importante na ativação da via de MAPK/ERK, a fosfatase Shp2, foi relacionada com o fenótipo resistente da linhagem de LMC KCL22-R num estudo que utilizou linhagens de LMC e amostras de pacientes (ESPOSITO *et al.*, 2011).

Uma análise proteômica comparativa entre a linhagem LMC resistente KCL22-R e sua parental KCL22-S mostrou um aumento na expressão da fosfatase Shp2 (COLAVITA *et al.*, 2010) na linhagem resistente. Um artigo posterior relacionou Shp2 à resistência dessa linhagem, uma vez que o silenciamento de Shp2 sensibilizou as células ao IM (ESPOSITO *et*

al., 2011). Sabidamente, a Shp2 ativa a via de MAPK/ERK através da sua interação com proteínas adaptadoras, levando a ativação de Ras (LI *et al.*, 1994; SHI *et al.*, 2000). Uma vez que essa via se encontra superativada na linhagem K-IM e permanece ativada apesar da inibição de Bcr-Abl, essa ativação poderia ocorrer através de Shp2, de forma independente de Bcr-Abl. A linhagem K-IM apresentou níveis de Shp2 semelhantes a K562 (dados não mostrados). Além disso, quando as células foram tratadas com IM, a fosforilação de Shp2 foi reduzida apesar da forma total não sofrer alteração em nenhuma das linhagens. Essa redução da fosforilação demonstra que o estímulo de ativação de Shp2 foi inibido pelo tratamento com IM. Além de poder ser regulada por Bcr-Abl e participar na leucemogênese (CHEN *et al.*, 2007) a Shp2 está abaixo do receptor PDGFR, EGFR e IRS1 (CASE *et al.*, 1994). Uma vez que o PDGFR também é inibido pelo IM (BUCHDUNGER *et al.*, 1996) uma dessas proteínas pode ser responsável pela ativação da Shp2 na linhagem K-IM. Juntos nossos dados sugerem que Shp2 não seja a responsável pela ativação independente de Bcr-Abl de ERK1/2.

O presente trabalho se propôs a avaliar diferentes facetas da resistência ao IM em única linhagem celular, a K-IM. Foram analisados tanto os mecanismos relacionados à Bcr-Abl (mutação, níveis transcricionais e atividade) quanto os não relacionados à Bcr-Abl (proteínas transportadoras de efluxo, proteínas inibidoras da apoptose e vias de sinalização). O conjunto de dados desse trabalho indica que a linhagem K-IM apresenta maior resistência ao IM do que a sua linhagem parental K562. Além disso, mecanismos não relacionados à Bcr-Abl parecem ser os principais responsáveis pela resistência da K-IM ao IM, uma vez que sua resistência é independente da inibição de Bcr-Abl pelo IM. Dentre as vias que podem participar da resistência ao IM, a via de MAPK/ERK parece ser importante para o fenótipo resistente da linhagem K-IM, pois os níveis de ativação dessa via são mantidos durante a inibição de Bcr-Abl. A proteína inibidora da apoptose survivina apesar de estar aumentada na linhagem K-IM, tem sua regulação dependente da atividade de Bcr-Abl, sugerindo que não atue no mecanismo de resistência independente de Bcr-Abl. A linhagem K-IM, resistente ao IM constitui um modelo relevante para o estudo de mecanismos de resistência que, por não envolverem diretamente a proteína Bcr-Abl, podem ser extrapolados para outras neoplasias e também constitui um modelo pertinente para o estudo de novas estratégias terapêuticas para os pacientes resistentes.

6 CONCLUSÕES

6.1 PARCIAIS

- A linhagem de LMC K-IM é mais resistente ao IM do que a sua linhagem parental K562
- A resistência da linhagem K-IM não está relacionada à presença de mutações no domínio quinase da Bcr-Abl
- Apesar do aumento nos níveis de RNAm de BCR-ABL, os níveis similares de CRKL fosforilado nas duas linhagens, sugerem que os níveis aumentados de Bcr-Abl não sejam os principais responsáveis pela resistência da linhagem K-IM
- A resistência da linhagem K-IM não é mediada pelos transportadores de efluxo Pgp e BCRP
- Um mecanismo de desregulação de vias de sinalização envolvendo ERK1/2, mas não survivina ou Shp2, está envolvido na resistência da linhagem K-IM

6.2 GERAL

A linhagem K-IM, resistente ao IM, apresenta mecanismos de resistência relacionados à superativação de ERK independente da atividade de Bcr-Abl. Os fatores responsáveis por essa ativação ainda precisam ser elucidados.

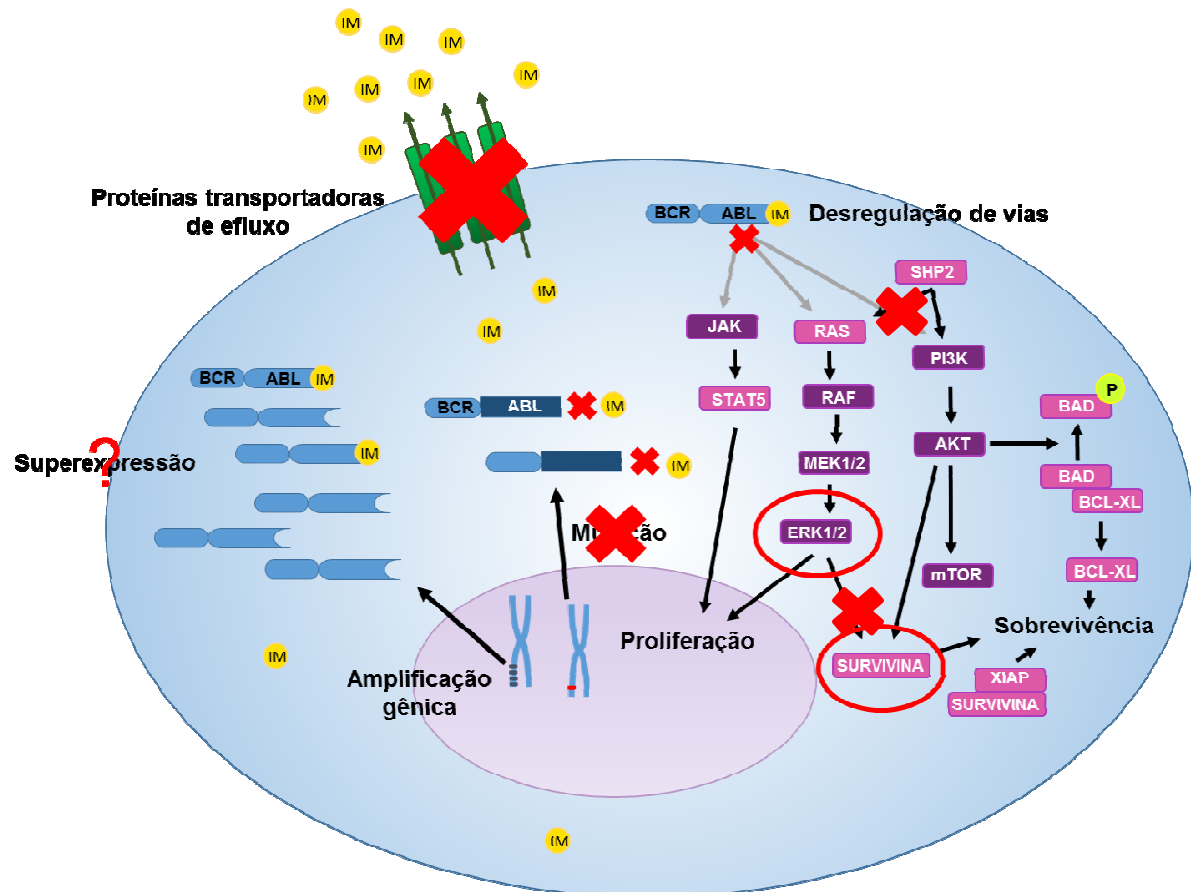


Figura 6.1: Mecanismos de resistência ao imatinibe. Diferentes mecanismos associados à resistência ao imatinibe (IM) foram analisados na linhagem celular K-IM. A linhagem K-IM não apresentou mutação no domínio quinase da Bcr-Abl e não apresentou atividade dos transportadores de efluxo Pgp e BCRP. Apesar do aumento nos níveis de RNAm de *BCR-ABL*, não houve aumento na atividade de Bcr-Abl. A linhagem K-IM apresentou níveis das proteínas ERK1/2 e survivina maiores do que a linhagem K562. A expressão de survivina é diminuída quando há inibição de Bcr-Abl, porém os níveis de fosforilação de ERK1/2 não se alteram com a inibição de Bcr-Abl.

7 PERSPECTIVAS

- Avaliar os níveis proteicos de Bcr-Abl.
- Analisar a taxa proliferativa da linhagem K-IM por ensaios específicos (BrdU, CFSE).
- Avaliar a importância da via de MAPK/ERK para a resistência da linhagem K-IM ao IM através da inibição farmacológica de proteínas dessa via.
- Avaliar possíveis vias de ativação de ERK independente de Bcr-Abl.
- Avaliar outras vias de sinalização que podem estar desreguladas na linhagem K-IM, como PI3K/Akt e JAK2/STAT5.
- Avaliar os níveis proteicos de XIAP e sua possível participação na resistência da linhagem K-IM.
- Estabelecer linhagens com maior resistência ao IM.
- Rastrear o surgimento dos mecanismos presentes na K-IM, utilizando as linhagens resistentes desenvolvidas durante o processo de desenvolvimento da K-IM.

8 REFERÊNCIAS

- AFAR DE, GOGA A, MCLAUGHLIN J, *et al.* **Differential complementation of Bcr-Abl point mutants with c-Myc.** *Science*. 1994 Apr 15;264(5157):424-6.
- AMBROSINI G, ADIDA C, ALTIERI DC. **A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma.** *Nat Med*. 1997 Aug;3(8):917-21.
- ANJUM R, BLENIS J. **The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling.** *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Oct;9(10):747-58.
- ASMUSSEN J, LASATER EA, TAJON C, *et al.* **MEK-dependent negative feedback underlies BCR-ABL-mediated oncogene addiction.** *Cancer Discov*. 2014 Feb;4(2):200-15.
- BACCARANI M, DEININGER MW, ROSTI G, *et al.* **European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013.** *Blood* 2013;122:872–884
- BENNETT AM, TANG TL, SUGIMOTO S, *et al.* **Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor receptor beta to Ras.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jul 19;91(15):7335-9.
- BERNARDO PS, REIS FR, MAIA RC. **Imatinib increases apoptosis index through modulation of survivin subcellular localization in the blast phase of CML cells.** *Leuk Res*. 2012 Dec;36(12):1510-6.
- BEWRY NN, NAIR RR, EMMONS MF, *et al.* **Stat3 contributes to resistance toward BCR-ABL inhibitors in a bone marrow microenvironment model of drug resistance.** *Mol Cancer Ther*. 2008 Oct;7(10):3169-75.
- BOULTON TG, GREGORY JS, COBB MH. **Purification and properties of extracellular signal-regulated kinase 1, an insulin-stimulated microtubule-associated protein 2 kinase.** *Biochemistry*. 1991a Jan 8;30(1):278-86.
- BOULTON TG, NYE SH, ROBBINS DJ, *et al.* **ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF.** *Cell*. 1991b May 17;65(4):663-75.

BRANFORD S, FLETCHER L, CROSS NC, *et al.* **Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials.** Blood. 2008 Oct 15;112(8):3330-8.

BRANFORD S, RUDZKI Z, WALSH S, *et al.* **Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis.** Blood. 2003 Jul 1;102(1):276-83.

BUCHDUNGER E, ZIMMERMANN J, METT H, *et al.* **Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative.** Cancer Res. 1996 Jan 1;56(1):100-4.

BURCHERT A, WANG Y, CAI D, *et al.* **Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development.** Leukemia. 2005 Oct;19(10):1774-82.

CALLAGHAN R. **Providing a molecular mechanism for P-glycoprotein; why would I bother?** Biochem Soc Trans. 2015 Oct;43(5):995-1002.

CARLESSO N, FRANK DA, GRIFFIN JD. **Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl.** J Exp Med. 1996 Mar 1;183(3):811-20.

CARTER BZ, MAK DH, SCHOBBER WD, *et al.* **Regulation of survivin expression through Bcr-Abl/MAPK cascade: targeting survivin overcomes imatinib resistance and increases imatinib sensitivity in imatinib-responsive CML cells.** Blood. 2006 Feb 15;107(4):1555-63.

CASE RD, PICCIONE E, WOLF G, *et al.* **SH-PTP2/Syp SH2 domain binding specificity is defined by direct interactions with platelet-derived growth factor beta-receptor, epidermal growth factor receptor, and insulin receptor substrate-1-derived phosphopeptides.** J Biol Chem. 1994 Apr 8;269(14):10467-74.

CHAI J, SHIOZAKI E, SRINIVASULA SM, *et al.* **Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP.** Cell. 2001 Mar 9;104(5):769-80. Erratum in: Cell 2001 Nov 2;107(3):409. Datta P [corrected to Datta P].

CHAN RJ, FENG GS. **PTPN11 is the first identified proto-oncogene that encodes a tyrosine phosphatase.** Blood. 2007 Feb 1;109(3):862-7.

CHEN J, YU WM, DAINO H, *et al.* **SHP-2 phosphatase is required for hematopoietic cell transformation by Bcr-Abl.** Blood. 2007 Jan 15;109(2):778-85.

CILLONI D, SAGLIO G. **Molecular pathways: BCR-ABL.** Clin Cancer Res. 2012 Feb 15;18(4):930-7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1613. Review.

COLAVITA I, ESPOSITO N, MARTINELLI R, *et al.* **Gaining insights into the Bcr-Abl activity-independent mechanisms of resistance to imatinib mesylate in KCL22 cells: a comparative proteomic approach.** Biochim Biophys Acta. 2010 Oct;1804(10):1974-87.

CONTE E, STAGNO F, GUGLIELMO P, *et al.* **Survivin expression in chronic myeloid leukemia.** Cancer Lett. 2005 Jul 8;225(1):105-10.

COPPO P, FLAMANT S, DE MAS V, *et al.* **BCR-ABL activates STAT3 via JAK and MEK pathways in human cells.** Br J Haematol. 2006 Jul;134(2):171-9.

CORTES JE, KANTARJIAN HM, BRÜMMENDORF TH, *et al.* **Safety and efficacy of bosutinib (SKI-606) in chronic phase Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib.** Blood. 2011 Oct 27;118(17):4567-76. doi: 10.1182/blood-2011-05-355594. Erratum in: Blood. 2013 Oct 3;122(14):2524.

CORTES JE, KANTARJIAN H, SHAH NP, *et al.* **Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias.** N Engl J Med. 2012 Nov 29;367(22):2075-88.

CORTES JE, KIM DW, PINILLA-IBARZ J, *et al.* **A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias.** N Engl J Med. 2013 Nov 7;369(19):1783-96.

CORTEZ D, REUTHER G, PENDERGAST AM. **The Bcr-Abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1-to-S phase transition in hematopoietic cells.** Oncogene. 1997 Nov 6;15(19):2333-42.

DAFLON-YUNES N, PINTO-SILVA FE, VIDAL RS, *et al.* **Characterization of a multidrug-resistant chronic myeloid leukemia cell line presenting multiple resistance mechanisms.** Mol Cell Biochem. 2013 Nov;383(1-2):123-35.

DE JONG R, TEN HOEVE J, HEISTERKAMP N, *et al.* **Crkl is complexed with tyrosine-phosphorylated Cbl in Ph-positive leukemia.** J Biol Chem. 1995 Sep 15;270(37):21468-71.

DEININGER MW, GOLDMAN JM, LYDON N, *et al.* **The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells.** Blood. 1997 Nov 1;90(9):3691-8.

DEININGER MW, GOLDMAN JM, MELO JV. **The molecular biology of chronic myeloid leukemia.** Blood. 2000 Nov 15;96(10):3343-56.

DEININGER MW. **Molecular monitoring in CML and the prospects for treatment-free remissions.** Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2015;2015:257-63.

DEVERAUX QL, ROY N, STENNICKE HR, *et al.* **IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases.** EMBO J. 1998 Apr 15;17(8):2215-23.

DEVERAUX QL, TAKAHASHI R, SALVESEN GS, *et al.* **X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases.** Nature. 1997 Jul 17;388(6639):300-4.

DONATO NJ, WU JY, STAPLEY J, *et al.* **BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571.** Blood. 2003 Jan 15;101(2):690-8.

DRUKER BJ, TALPAZ M, RESTA DJ, *et al.* **Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia.** N Engl J Med. 2001 Apr 5;344(14):1031-7.

DU C, FANG M, LI Y, *et al.* **Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition.** Cell. 2000 Jul 7;102(1):33-42.

EADIE LN, HUGHES TP, WHITE DL. **ABCB1 Overexpression Is a Key Initiator of Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in CML Cell Lines.** PLoS One. 2016 Aug 18;11(8):e0161470.

EADIE LN, HUGHES TP, WHITE DL. **Interaction of the efflux transporters ABCB1 and ABCG2 with imatinib, nilotinib, and dasatinib.** Clin Pharmacol Ther. 2014 Mar;95(3):294-306.

EFERL R, WAGNER EF. **AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis.** Nat Rev Cancer. 2003 Nov;3(11):859-68.

EIDE CA, O'HARE T. **Chronic myeloid leukemia: advances in understanding disease biology and mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors.** Curr Hematol Malig Rep. 2015 Jun;10(2):158-66.

ESPOSITO N, COLAVITA I, QUINTARELLI C, *et al.* **SHP-1 expression accounts for resistance to imatinib treatment in Philadelphia chromosome-positive cells derived from patients with chronic myeloid leukemia.** Blood. 2011 Sep 29;118(13):3634-44

FANG ZH, DONG CL, CHEN Z, *et al.* **Transcriptional regulation of survivin by c-Myc in BCR/ABL-transformed cells: implications in anti-leukaemic strategy.** J Cell Mol Med. 2009 Aug;13(8B):2039-52

FENG GS, HUI CC, PAWSON T. **SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases.** Science. 1993 Mar 12;259(5101):1607-11.

FRĄCZEK N, BRONISZ I, PIETRYKA M, *et al.* **An outline of main factors of drug resistance influencing cancer therapy.** J Chemother. 2016 Dec;28(6):457-464. Review.

GAO Z, TIAN Y, WANG J, *et al.* **A dimeric Smac/diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. Dynamic and cooperative regulation of XIAP by Smac/Diablo.** J Biol Chem. 2007 Oct 19;282(42):30718-27.

GESBERT F, SELLERS WR, SIGNORETTI S, *et al.* **BCR/ABL regulates expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 through the phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT pathway.** J Biol Chem. 2000 Dec 15;275(50):39223-30.

GIOIA R, LEROY C, DRULLION C, *et al.* **Quantitative phosphoproteomics revealed interplay between Syk and Lyn in the resistance to nilotinib in chronic myeloid leukemia cells.** Blood. 2011 Aug 25;118(8):2211-21.

GORRE ME, MOHAMMED M, ELLWOOD K, *et al.* **Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification.** Science. 2001 Aug 3;293(5531):876-80.

GOTTESMAN MM, FOJO T, BATES SE. **Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters.** Nat Rev Cancer. 2002 Jan;2(1):48-58.

- GYRD-HANSEN M, DARDING M, MIASARI M, *et al.* **IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis.** Nat Cell Biol. 2008 Nov;10(11):1309-17.
- HANAHAHAN D, WEINBERG RA. **Hallmarks of cancer: the next generation.** Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
- HANTSCHHEL O, SUPERTI-FURGA G. **Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2004 Jan;5(1):33-44. Review.
- HATANO N, MORI Y, OH-HORA M, *et al.* **Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development.** Genes Cells. 2003 Nov;8(11):847-56.
- HOCHHAUS A, O'BRIEN SG, GUILHOT F, *et al.* **Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia.** Leukemia. 2009 Jun;23(6):1054-61. doi: 10.1038/leu.2009.38. Erratum in: Leukemia. 2010 May;24(5):1102.
- HOLCIK M, YEH C, KORNELUK RG, *et al.* **Translational upregulation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) increases resistance to radiation induced cell death.** Oncogene. 2000 Aug 24;19(36):4174-7.
- HUANG Y, PARK YC, RICH RL, *et al.* **Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain.** Cell. 2001 Mar 9;104(5):781-90.
- HUGHES T, SAGLIO G, BRANFORD S, *et al.* **Impact of baseline BCR-ABL mutations on response to nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase.** J Clin Oncol. 2009 Sep 1;27(25):4204-10.
- JABBOUR E. **Chronic myeloid leukemia: First-line drug of choice.** Am J Hematol. 2016 Jan;91(1):59-66.
- JABBOUR E, KANTARJIAN H, JONES D, *et al.* **Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate.** Leukemia. 2006 Oct;20(10):1767-73.
- JAISWAL PK, GOEL A, MITTAL RD. **Survivin: A molecular biomarker in cancer.** Indian J Med Res. 2015 Apr;141(4):389-97.

JEYAPRAKASH AA, KLEIN UR, LINDNER D, *et al.* **Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together.** Cell. 2007 Oct 19;131(2):271-85.

KALEEM B, SHAHAB S, AHMED N, *et al.* **Chronic Myeloid Leukemia--Prognostic Value of Mutations.** Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(17):7415-23. Review.

KANTARJIAN HM, GILES F, GATTERMANN N, *et al.* **Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance.** Blood. 2007 Nov 15;110(10):3540-6.

KANTARJIAN HM, SHAN J, JONES D, *et al.* **Significance of increasing levels of minimal residual disease in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in complete cytogenetic response.** J Clin Oncol. 2009 Aug 1;27(22):3659-63.

KASHKAR H. **X-linked inhibitor of apoptosis: a chemoresistance factor or a hollow promise.** Clin Cancer Res. 2010 Sep 15;16(18):4496-502.

KATHAWALA RJ, GUPTA P, ASHBY CR JR, *et al.* **The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade.** Drug Resist Updat. 2015 Jan;18:1-17. doi: 10.1016/j.drug.2014.11.002.

KHORASHAD JS, EIRING AM, MASON CC, *et al.* **shRNA library screening identifies nucleocytoplasmic transport as a mediator of BCR-ABL1 kinase-independent resistance.** Blood. 2015 Mar 12;125(11):1772-81

KO TK, CHIN HS, CHUAH CT, *et al.* **The BIM deletion polymorphism: A paradigm of a permissive interaction between germline and acquired TKI resistance factors in chronic myeloid leukemia.** Oncotarget. 2016 Jan 19;7(3):2721-33.

KOMATSU N, WATANABE T, UCHIDA M, *et al.* **A member of Forkhead transcription factor FKHRL1 is a downstream effector of STI571-induced cell cycle arrest in BCR-ABL-expressing cells.** J Biol Chem. 2003 Feb 21;278(8):6411-9.

KUJAK C, KOLESAR JM. **Treatment of chronic myelogenous leukemia.** Am J Health Syst Pharm. 2016 Feb 1;73(3):113-20.

LAUBER K, BLUMENTHAL SG, WAIBEL M, *et al.* **Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses.** Mol Cell. 2004 May 7;14(3):277-87. Review.

- LEFLOCH R, POUYSSÉGUR J, LENORMAND P. **Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels.** Mol Cell Biol. 2008 Jan;28(1):511-27.
- LEFLOCH R, POUYSSÉGUR J, LENORMAND P. **Total ERK1/2 activity regulates cell proliferation.** Cell Cycle. 2009 Mar 1;8(5):705-11.
- LEMMON MA, SCHLESSINGER J. **Cell signaling by receptor tyrosine kinases.** Cell. 2010 Jun 25;141(7):1117-34.
- LENS SM, VADER G, MEDEMA RH. **The case for Survivin as mitotic regulator.** Curr Opin Cell Biol. 2006 Dec;18(6):616-22.
- LI F, AMBROSINI G, CHU EY, *et al.* **Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin.** Nature. 1998 Dec 10;396(6711):580-4.
- LI S, ILARIA RL JR, MILLION RP, *et al.* **The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity.** J Exp Med. 1999 May 3;189(9):1399-412.
- LI W, NISHIMURA R, KASHISHIAN A, *et al.* **A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking GRB2-Sos to a receptor tyrosine kinase.** Mol Cell Biol. 1994 Jan;14(1):509-17.
- LISTON P, ROY N, TAMAI K, *et al.* **Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes.** Nature. 1996 Jan 25;379(6563):349-53.
- LOZZIO CB, LOZZIO BB. **Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome.** Blood. 1975;45(3):321-334
- LU M, LIN SC, HUANG Y, *et al.* **XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization.** Mol Cell. 2007 Jun 8;26(5):689-702.
- LUGO TG, PENDERGAST AM, MULLER AJ, *et al.* **Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products.** Science. 1990 Mar 2;247(4946):1079-82.

MA L, SHAN Y, BAI R, *et al.* **A therapeutically targetable mechanism of BCR-ABL-independent imatinib resistance in chronic myeloid leukemia.** Sci Transl Med. 2014 Sep 3;6(252):252ra121.

MAHON FX, DEININGER MW, SCHULTHEIS B, *et al.* **Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance.** Blood. 2000 Aug 1;96(3):1070-9

MAO Q, UNADKAT JD. **Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport.** AAPS J. 2005 May 11;7(1):E118-33.

MARGOLIS B, BORG JP, STRAIGHT S, *et al.* **The function of PTB domain proteins.** Kidney Int. 1999 Oct;56(4):1230-7.

MARGOLIS B, SKOLNIK EY. **Activation of Ras by receptor tyrosine kinases.** J Am Soc Nephrol. 1994 Dec;5(6):1288-99.

MENCALHA AL, CORRÊA S, SALLES D, *et al.* **Inhibition of STAT3-interacting protein 1 (STATIP1) promotes STAT3 transcriptional up-regulation and imatinib mesylate resistance in the chronic myeloid leukemia.** BMC Cancer. 2014 Nov 23;14:866.

MIZUTANI Y, NAKANISHI H, LI YN, *et al.* **Overexpression of XIAP expression in renal cell carcinoma predicts a worse prognosis.** Int J Oncol. 2007 Apr;30(4):919-25.

MORIZANE Y, HONDA R, FUKAMI K, *et al.* **X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO.** J Biochem. 2005 Feb;137(2):125-32.

MOSMANN T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** J Immunol Methods. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

MÜLLER MC, CORTES JE, KIM DW, *et al.* **Dasatinib treatment of chronic-phase chronic myeloid leukemia: analysis of responses according to preexisting BCR-ABL mutations.** Blood. 2009 Dec 3;114(24):4944-53

NAMBU T, ARAKI N, NAKAGAWA A, *et al.* **Contribution of BCR-ABL-independent activation of ERK1/2 to acquired imatinib resistance in K562 chronic myeloid leukemia cells.** Cancer Sci. 2010 Jan;101(1):137-42

NESTAL DE MORAES G, SILVA KL, VASCONCELOS FC, *et al.* **Survivin overexpression correlates with an apoptosis-resistant phenotype in chronic myeloid leukemia cells.** Oncol Rep. 2011 Jun; 25(6):1613-9

NICHOLS GL, RAINES MA, VERA JC, *et al.* **Identification of CRKL as the constitutively phosphorylated 39-kD tyrosine phosphoprotein in chronic myelogenous leukemia cells.** Blood. 1994 Nov 1;84(9):2912-8.

NIGAM SK. **What do drug transporters really do?** Nat Rev Drug Discov. 2015 Jan;14(1):29-44. doi: 10.1038/nrd4461.

NOWELL PC. **The minute chromosome (Ph) in chronic granulocytic leukemia.** Blut. 1962 Apr;8:65-6.

O'HARE T, SHAKESPEARE WC, ZHU X, *et al.* **AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance.** Cancer Cell. 2009 Nov 6;16(5):401-12.

OWENS DM, KEYSE SM. **Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases.** Oncogene. 2007 May 14;26(22):3203-13.

PASTERNAK G, HOCHHAUS A, SCHULTHEIS B, *et al.* **Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects.** J Cancer Res Clin Oncol. 1998;124(12):643-60. Review.

PENDERGAST AM, QUILLIAM LA, CRIPE LD, *et al.* **BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein.** Cell. 1993 Oct 8;75(1):175-85.

POLILLO M, GALIMBERTI S, BARATÈ C, *et al.* **Pharmacogenetics of BCR/ABL Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia.** Int J Mol Sci. 2015 Sep 21;16(9):22811-29.

PUTTINI M, COLUCCIA AM, BOSCHELLI F, *et al.* **In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl⁺ neoplastic cells.** Cancer Res. 2006 Dec 1;66(23):11314-22.

QUINTÁS-CARDAMA A, QIU YH, POST SM, *et al.* **Reverse phase protein array profiling reveals distinct proteomic signatures associated with chronic myeloid leukemia progression and with chronic phase in the CD34-positive compartment.** Cancer. 2012 Nov 1;118(21):5283-92.

RABINDRAN SK, ROSS DD, DOYLE LA, *et al.* **Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein.** Cancer Res. 2000 Jan 1;60(1):47-50.

RAMP U, KRIEG T, CALISKAN E, *et al.* **XIAP expression is an independent prognostic marker in clear-cell renal carcinomas.** Hum Pathol. 2004 Aug;35(8):1022-8.

REIS FR, VASCONCELOS FC, PEREIRA DL, *et al.* **Survivin and P-glycoprotein are associated and highly expressed in late phase chronic myeloid leukemia.** Oncol Rep. 2011 Aug;26(2):471-8.

RIEDL SJ, RENATUS M, SCHWARZENBACHER R, *et al.* **Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP.** Cell. 2001 Mar 9;104(5):791-800.

RIEGER AM, NELSON KL, KONOWALCHUK JD, *et al.* **Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death.** J Vis Exp. 2011 Apr 24;(50). pii: 2597.

ROBEY RW, STEADMAN K, POLGAR O, *et al.* **Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition.** Cancer Res. 2004 Feb 15;64(4):1242-6.

ROHRBACHER M, HASFORD J. **Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML).** Best Pract Res Clin Haematol. 2009 Sep;22(3):295-302. doi: 10.1016/j.beha.2009.07.007. Review.

ROSKOSKI R JR. **MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation.** Biochem Biophys Res Commun. 2012 Jan 6;417(1):5-10.

ROSKOSKI R JR. **RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation.** Biochem Biophys Res Commun. 2010 Aug 27;399(3):313-7.

ROWLEY JD. **Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining.** Nature. 1973 Jun 1;243(5405):290-3.

ROYCHOWDHURY S, TALPAZ M. **Managing resistance in chronic myeloid leukemia.** Blood Rev. 2011 Nov;25(6):279-90.

- RUMJANEK VM, TRINDADE GS, WAGNER-SOUZA K, *et al.* **Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1.** An Acad Bras Cienc. 2001 Mar;73(1):57-69
- RUMJANEK VM, VIDAL RS, MAIA RC. **Multidrug resistance in chronic myeloid leukaemia: how much can we learn from MDR-CML cell lines?** Biosci Rep. 2013 Nov 25;33(6).
- SATTLER M, MOHI MG, PRIDE YB, *et al.* **Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL.** Cancer Cell. 2002 Jun;1(5):479-92.
- SAUNA ZE, SMITH MM, MÜLLER M, *et al.* **The mechanism of action of multidrug-resistance-linked P-glycoprotein.** J Bioenerg Biomembr. 2001 Dec;33(6):481-91.
- SAWYERS CL, CALLAHAN W, WITTE ON. **Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes.** Cell. 1992 Sep 18;70(6):901-10.
- SAWYERS CL, MCLAUGHLIN J, WITTE ON. **Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene.** J Exp Med. 1995 Jan 1;181(1):307-13.
- SCHIMMER AD, DALILI S, BATEY RA, *et al.* **Targeting XIAP for the treatment of malignancy.** Cell Death Differ. 2006 Feb;13(2):179-88.
- SCHINDLER T, BORNMANN W, PELLICENA P, *et al.* **Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase.** Science. 2000 Sep 15;289(5486):1938-42.
- SECA H, LIMA RT, GUIMARÃES JE, *et al.* **Simultaneous targeting of P-gp and XIAP with siRNAs increases sensitivity of P-gp overexpressing CML cells to imatinib.** Hematology. 2011 Mar;16(2):100-8.
- SHAH NP, GUILHOT F, CORTES JE, *et al.* **Long-term outcome with dasatinib after imatinib failure in chronic-phase chronic myeloid leukemia: follow-up of a phase 3 study.** Blood. 2014 Apr 10;123(15):2317-24.
- SHAH NP, NICOLL JM, NAGAR B, *et al.* **Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia.** Cancer Cell. 2002 Aug;2(2):117-25.

- SHAH K, PARIKH S, RAWAL R. **Tyrosine Kinase Inhibitors in Ph⁺ Chronic Myeloid Leukemia Therapy: a Review**. Asian Pac J Cancer Prev. 2016;17(7):3025-33. Review.
- SHAH NP, TRAN C, LEE FY, *et al*. **Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor**. Science. 2004 Jul 16;305(5682):399-401.
- SHARMA N, MAGISTRONI V, PIAZZA R, *et al*. **BCR/ABL1 and BCR are under the transcriptional control of the MYC oncogene**. Mol Cancer. 2015 Jul 16;14:132. doi: 10.1186/s12943-015-0407-0.
- SHI ZQ, YU DH, PARK M, *et al*. **Molecular mechanism for the Shp-2 tyrosine phosphatase function in promoting growth factor stimulation of ERK activity**. Mol Cell Biol. 2000 Mar;20(5):1526-36.
- SHUAI K, HALPERN J, TEN HOEVE J, *et al*. **Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia**. Oncogene. 1996 Jul 18;13(2):247-54.
- SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. **Cancer Statistics, 2017**. CA: A cancer journal for clinicians. 2017 January 67 (1); 7: 30.
- SILKE J, VUCIC D. **IAP family of cell death and signaling regulators**. Methods Enzymol. 2014;545:35-65.
- SILVA KL, DE SOUZA PS, NESTAL DE MORAES G, *et al*. **XIAP and P-glycoprotein co-expression is related to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia cells**. Leuk Res. 2013 Oct;37(10):1350-8.
- SILVA KL, VASCONCELLOS DV, CASTRO ED, *et al*. **Apoptotic effect of fludarabine is independent of expression of IAPs in B-cell chronic lymphocytic leukemia**. Apoptosis. 2006 Feb;11(2):277-85.
- SINGH N, KRISHNAKUMAR S, KANWAR RK, *et al*. **Clinical aspects for survivin: a crucial molecule for targeting drug-resistant cancers**. Drug Discov Today. 2015 May;20(5):578-87.
- SKORSKI T, KANAKARAJ P, NIEBOROWSKA-SKORSKA M, *et al*. **Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells**. Blood. 1995 Jul 15;86(2):726-36.

- SKOUFIAS DA, MOLLINARI C, LACROIX FB, *et al.* **Human survivin is a kinetochore-associated passenger protein.** J Cell Biol. 2000 Dec 25;151(7):1575-82.
- SOLEIMANPOUR E, BABAEI E. **Survivin as a Potential Target for Cancer Therapy.** Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(15):6187-91.
- SONG Z, YAO X, WU M. **Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis.** J Biol Chem. 2003 Jun 20;278(25):23130-40.
- SOUZA PS, VASCONCELOS FC, DE SOUZA REIS FR, *et al.* **P-glycoprotein and survivin simultaneously regulate vincristine-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells.** Int J Oncol. 2011 Oct;39(4):925-33.
- SOVERINI S, BRANFORD S, NICOLINI FE, *et al.* **Implications of BCR-ABL1 kinase domain-mediated resistance in chronic myeloid leukemia.** Leuk Res. 2014 Jan;38(1):10-20. doi: 10.1016/j.leukres.2013.09.011.
- SOVERINI S, COLAROSSO S, GNANI A, *et al.* **Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia.** Clin Cancer Res. 2006 Dec 15;12(24):7374-9.
- SOVERINI S, HOCHHAUS A, NICOLINI FE, *et al.* **BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet.** Blood. 2011 Aug 4;118(5):1208-15.
- SRINIVASULA SM, HEGDE R, SALEH A, *et al.* **A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis.** Nature. 2001 Mar 1;410(6824):112-6. Erratum in: Nature 2001 Jun 28;411(6841):1081.
- STEELMAN LS, CHAPPELL WH, ABRAMS SL, *et al.* **Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging.** Aging (Albany NY). 2011 Mar;3(3):192-222.
- STELLA S, TIRRO' E, CONTE E, *et al.* **Suppression of survivin induced by a BCR-ABL/JAK2/STAT3 pathway sensitizes imatinib-resistant CML cells to different cytotoxic drugs.** Mol Cancer Ther. 2013 Jun;12(6):1085-98.

STRHAKOVA L, BUJALKOVA MG, HOJSIKOVA I, *et al.* **Use of direct sequencing for detection of mutations in the BCR-ABL kinase domain in Slovak patients with chronic myeloid leukemia.** Neoplasma. 2011;58(6):548-53.

STROBER W. **Trypan blue exclusion test of cell viability.** Curr Protoc Immunol. 2001 May;Appendix 3:Appendix 3B.

SUZUKI Y, IMAI Y, NAKAYAMA H, *et al.* **A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death.** Mol Cell. 2001 Sep;8(3):613-21.

SUZUKI Y, NAKABAYASHI Y, TAKAHASHI R. **Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jul 17;98(15):8662-7.

TAKAHASHI R, DEVERAUX Q, TAMM I, *et al.* **A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases.** J Biol Chem. 1998 Apr 3;273(14):7787-90.

TAMM I, RICHTER S, OLTERS DORF D, *et al.* **High expression levels of x-linked inhibitor of apoptosis protein and survivin correlate with poor overall survival in childhood de novo acute myeloid leukemia.** Clin Cancer Res. 2004 Jun 1;10(11):3737-44.

TANG L, LING X, LIU W, *et al.* **Transcriptional inhibition of p21WAF1/CIP1 gene (CDKN1) expression by survivin is at least partially p53-dependent: evidence for survivin acting as a transcription factor or co-factor.** Biochem Biophys Res Commun. 2012 May 4;421(2):249-54.

TANG C, SCHAFRANEK L, WATKINS DB, *et al.* **Tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia cell lines: investigating resistance pathways.** Leuk Lymphoma. 2011 Nov;52(11):2139-47.

TARTAGLIA M, GELB BD. **Noonan syndrome and related disorders: genetics and pathogenesis.** Annu Rev Genomics Hum Genet. 2005;6:45-68.

TEN HOEVE J, ARLINGHAUS RB, GUO JQ, *et al.* **Tyrosine phosphorylation of CRKL in Philadelphia+ leukemia.** Blood. 1994 Sep 15;84(6):1731-6.

TESTONI N, MARZOCCHI G, LUATTI S, *et al.* **Chronic myeloid leukemia: a prospective comparison of interphase fluorescence in situ hybridization and chromosome banding**

analysis for the definition of complete cytogenetic response: a study of the GIMEMA CML WP. Blood. 2009 Dec 3;114(24):4939-43. doi: 10.1182/blood-2009-07-229864.

THOMPSON PA, KANTARJIAN HM, CORTES JE. **Diagnosis and Treatment of Chronic Myeloid Leukemia in 2015.** Mayo Clin Proc. 2015 Oct;90(10):1440-54.

VAN ENGELAND M, NIELAND LJ, RAMAEKERS FC, *et al.* **Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure.** Cytometry. 1998 Jan 1;31(1):1-9. Review.

VASCONCELOS FC, NESTAL DE MORAES G, MOELLMANN-COELHO A, *et al.* **Phosphorylated Crkl reduction levels are associated with the lowest P-glycoprotein activity levels in cells from chronic myeloid leukemia patients.** Leuk Res. 2013 Dec;37(12):1711-8.

VASCONCELOS FC, SILVA KL, SOUZA PS, *et al.* **Variation of MDR proteins expression and activity levels according to clinical status and evolution of CML patients.** Cytometry B Clin Cytom. 2011 May;80(3):158-66.

VAUX DL, SILKE J. **Mammalian mitochondrial IAP binding proteins.** Biochem Biophys Res Commun. 2003 May 9;304(3):499-504. Review.

VERHAGEN AM, EKERT PG, PAKUSCH M, *et al.* **Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins.** Cell. 2000 Jul 7;102(1):43-53.

VUCIC D, FAIRBROTHER WJ. **The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer.** Clin Cancer Res. 2007 Oct 15;13(20):5995-6000. Review.

WANG Y, CAI D, BRENDDEL C, *et al.* **Adaptive secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) mediates imatinib and nilotinib resistance in BCR/ABL+ progenitors via JAK-2/STAT-5 pathway activation.** Blood. 2007 Mar 1;109(5):2147-55.

WANG Z, CHEN W. **A Convenient Cell Culture Model for CML Acquired Resistance Through BCR-ABL Mutations.** Methods Mol Biol. 2016;1465:149-57.

WEISBERG E, MANLEY PW, BREITENSTEIN W, *et al.* **Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl.** Cancer Cell. 2005 Feb;7(2):129-41.

Erratum in: Cancer Cell. 2005 Apr;7(4):399. Mohammed, Azam [corrected to Azam, Mohammad].

WHITE D, SAUNDERS V, GRIGG A, *et al.* **Measurement of in vivo BCR-ABL kinase inhibition to monitor imatinib-induced target blockade and predict response in chronic myeloid leukemia.** J Clin Oncol. 2007 Oct 1;25(28):4445-51.

WILSON TR, JOHNSTON PG, LONGLEY DB. **Anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in cancer.** Curr Cancer Drug Targets. 2009 May;9(3):307-19. Review.

WÖHRLE FU, HALBACH S, AUMANN K, *et al.* **Gab2 signaling in chronic myeloid leukemia cells confers resistance to multiple Bcr-Abl inhibitors.** Leukemia. 2013 Jan;27(1):118-29.

WORTZEL I, SEGER R. **The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles.** Genes Cancer. 2011 Mar;2(3):195-209.

YANG K, FU LW. **Mechanisms of resistance to BCR-ABL TKIs and the therapeutic strategies: A review.** Crit Rev Oncol Hematol. 2015 Mar;93(3):277-92.

YOON S, SEGER R. **The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions.** Growth Factors. 2006 Mar;24(1):21-44.

ZHANG X, SUBRAHMANYAM R, WONG R, *et al.* **The NH(2)-terminal coiled-coil domain and tyrosine 177 play important roles in induction of a myeloproliferative disease in mice by Bcr-Abl.** Mol Cell Biol. 2001 Feb;21(3):840-53.