



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Vânia Patrícia Nunes da Silva**

**Contributo para o estudo dos  
mecanismos de resistência ao Imatinib  
em Leucemia Mielóide Crónica**

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre*

*em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade*

*Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

**Orientador:**

Prof. Doutor António Sebastião Rodrigues (FCM/UNL)

**Co-orientadores:**

Engenheira Joana Ricardo Dinis (FCM/UNL)

Prof. Doutor António José Cabrita Lucas Lares (FCT/UNL)

**Júri:**

**Arguente:** Doutor Peter Jordan (INSA)

**Vogal:** Prof Doutor António Sebastião Rodrigues (FCMT/UNL)

LISBOA

Fevereiro de 2011





FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Vânia Patrícia Nunes da Silva**

**Contributo para o estudo dos  
mecanismos de resistência ao Imatinib  
em Leucemia Mielóide Crónica**

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre*

*em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade*

*Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

**Orientador:**

Prof. Doutor António Sebastião Rodrigues (FCM/UNL)

**Co-orientadores:**

Engenheira Joana Ricardo Dinis (FCM/UNL)

Prof. Doutor António José Cabrita Lucas Lares (FCT/UNL)

**Júri:**

**Arguente:** Doutor Peter Jordan (INSA)

**Vogal:** Prof Doutor António Sebastião Rodrigues (FCMT/UNL)

LISBOA

Fevereiro de 2011



## **Contributo para o estudo dos mecanismos de resistência ao Imatinib em Leucemia Mielóide Crónica**

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## **Agradecimentos**

A realização desta Dissertação só foi possível graças ao contributo, de forma directa ou indirecta, de várias pessoas e instituições, às quais gostaria de dedicar algumas palavras de agradecimento pela oportunidade de aprendizagem que me foi proporcionada.

Ao Professor António Sebastião Rodrigues, em primeiro lugar pela sua incansável orientação científica e pelo apoio constante no desenvolvimento deste trabalho. Por todos os ensinamentos, discussões de ideias e correcções, fundamentais para a realização desta dissertação, e pela sua disponibilidade total para me ajudar a melhorar.

À Engenheira Joana Dinis por todos os ensinamentos, teóricos e práticos, sem os quais esta dissertação não teria sido possível. Por todo o apoio e ajuda no decorrer do trabalho, pela sua amizade, e por partilhar comigo todas as dificuldades.

Ao Professor António Lares pelas suas crítica construtivas ao trabalho, por me ajudar a questionar e por todas as discussões e ideias que muito contribuíram para o enriquecimento da Dissertação.

Ao Centro de Investigação de Genética Molecular Humana, no nome do Director Professor Doutor José Rueff, por me receber neste estágio tão enriquecedor e tornar possível a realização deste trabalho.

À Engenheira Célia Martins pelo apoio e pela sua disponibilidade constante para me ensinar e ajudar a ultrapassar os obstáculos que surgiram no decurso do trabalho.

À Doutora Marta Gromicho, pelas discussões e ideias para o melhoramento do trabalho e pela informação disponibilizada relativamente às amostras dos doentes.

Ao Doutor Michel Kranendonk pela sua disponibilidade de me ensinar as bases teóricas e práticas do ensaio Western Blot e também pelo seu incentivo no decurso do trabalho.

A todos os colegas e colaboradores do CIGMH pela forma acolhedora como me receberam desde do primeiro dia, pela sua amizade, e por terem contribuído para esta experiência tão enriquecedora de aprendizagem.

À Dra. Catarina Martins do Departamento de Imunologia da Universidade Nova de Lisboa por disponibilizar a sua ajuda no delineamento, concretização e análise dos ensaios de citometria de fluxo.

Ao Centro de Genética Clínica (CGC), no nome da Professora Doutora Purificação Tavares, da Dra. Paula Rendeira e da Dra. Fátima Torres, pela disponibilização das amostras de doentes com Leucemia Mielóide Crónica utilizadas neste trabalho.

Agradeço aos meus Pais, sem o apoio dos quais esta dissertação nunca teria sido possível, por todo o incentivo, carinho e confiança que sempre me deram ao longo de todo o meu percurso académico. A toda a minha família, em especial aos manos por todo o apoio e ajuda.

Ao Gonçalo, por estar sempre presente e por ser que é.

Um agradecimento muito especial a todos os amigos que me apoiaram em todo este processo. Ao António, à Ani, ao Ricardo e à Rita por para além da sua amizade terem contribuído directamente para o melhoramento deste trabalho.

À Doutora Ilda Lourenço, por ser um apoio incondicional.

Ao Doutor Vitor Pedro, por ao longo de todos estes anos ter vindo a ser um apoio constante na minha vida.

## Sumário

A Leucemia Mielóide Crónica é uma neoplasia mieloproliferativa resultante da expressão da tirosina quinase BCR-ABL. O uso do inibidor Imatinib (IM) alterou significativamente a sobrevida dos doentes, no entanto, mais de 30% adquire resistência ao fármaco, tornando-se fundamental identificar as suas causas.

Como modelo, estabeleceu-se uma linha de células leucémicas K562 resistente ao IM. Inicialmente verificou-se que nenhum dos mecanismos de resistência previamente descritos está activo nestas células e que a resistência é independente da actividade da quinase. Posteriormente o nosso objectivo foi tentar identificar os mecanismos de resistência nestas células e, quando possível, avaliar a sua relevância em doentes resistentes ao IM.

Foram analisados vários parâmetros de sobrevivência celular, incluindo a expressão de genes e proteínas anti- e pró-apoptóticas, genes de regulação do ciclo celular e de resposta a lesões no DNA e indicadores de instabilidade genómica.

Observou-se sobre-expressão da proteína anti-apoptótica SURVIVINA, a sub-expressão do gene supressor *GADD45 $\gamma$*  e alterações na expressão de genes da via de sinalização p38. Verificou-se também um aumento da expressão de genes de reparação por excisão de bases, que resultam na diminuição da sensibilidade destas células a um agente oxidante.

Nos parâmetros estudados em doentes sensíveis e resistentes não se observaram diferenças.



## Abreviaturas

<b>BER</b>	Reparação por excisão de bases ( <i>Base Excision Repair</i> )
<b>CB</b>	Crise Blástica
<b>CCR</b>	Resposta citogenética completa ( <i>Complete Cytogenetic Response</i> )
<b>CHR</b>	Resposta hematológica completa ( <i>Complete Hemayologic Response</i> )
<b>CMR</b>	Resposta molecular complete ( <i>Complete Molecular Response</i> )
<b>DR</b>	Doentes resistentes ao IM sem mutação no domínio tirosina quinase do gene BCR-ABL
<b>DS</b>	Doentes sensíveis ao IM
<b>FA</b>	Fase Acelerada
<b>FC</b>	Fase Crónica
<b>HR</b>	Reparação Homóloga ( <i>Homologous Repair</i> )
<b>ID</b>	Identificação codificada da amostra
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	Interferão- $\alpha$
<b>IAP</b>	<i>Inhibitor of apoptosis</i>
<b>IM</b>	Imatinib
<b>IP</b>	Iodeto de Propídio
<b>I.R.I.S.</b>	International Randomized <i>Study</i> of Interferon Versus STI571
<b>JAK/STAT</b>	<i>Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
<b>K562-R</b>	Linha K562 resistente a 5 $\mu$ M de Imatinib
<b>K562-WT</b>	Linha K562 parental
<b>LMC</b>	Leucemia Mielóide Crónica
<b>MAPK</b>	<i>Mitogenic Activated Protein Kinase</i>
<b>M-bcr</b>	Major breakpoint cluster region
<b>m-bcr</b>	Minor breakpoint cluster region
<b>MMR</b>	Reparação de emparelhamentos erróneos de nucleótidos ( <i>Mismatch Repair</i> )
<b>NER</b>	Reparação por excisão de nucleótidos ( <i>Nucleotide Excision Repair</i> )
<b>NHEJ</b>	Reparação não homóloga ( <i>Non-Homologous End Joining Repair</i> )
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
<b>Ph</b>	Cromossoma Filadélfia ( <i>Philadelphia Chromosome</i> )
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PI3K</b>	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>

<b>RAS</b>	<i>Rat Sarcoma</i>
<b>ROS</b>	Espécies reactivas de oxigénio ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>RT-PCR</b>	<i>Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction</i>
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
<b>u.r.f.</b>	Unidades relativas de fluorescência
<b>μ-bcr</b>	<i>Micro breakpoint cluster region</i>

# Índice

1. Introdução .....	1
1.1. Leucemia Mielóide Crónica .....	1
1.1.1. Cromossoma <i>Philadelphia</i> .....	2
1.1.2. Proteína Quimérica BCR-ABL .....	4
1.1.3. Vias de sinalização alteradas pela BCR-ABL .....	6
1.1.4. Expressão de BCR-ABL e instabilidade genómica .....	9
1.2. Terapêutica .....	11
1.2.1- Imatinib .....	12
1.2.2. Resistência ao Imatinib .....	15
1.2.2.1. Mutações no domínio quinase da proteína BCR-ABL. ....	16
1.2.2.2. Amplificação genética e sobre-expressão de <i>BCR-ABL</i> . ....	17
1.2.2.3. Alteração da expressão de proteínas transmembranares de influxo e de efluxo. ....	18
1.2.2.4. Alterações na regulação de mecanismos de transdução de sinal.....	19
1.2.2.5. Expansão clonal .....	20
1.3. Objectivos.....	20
2. Materiais e Métodos .....	23
2.1. Reagentes, material suplementar e equipamento .....	23
2.2. Amostras .....	23
2.2.1. Linha Celular K562.....	23
2.2.2. Linha Celular K562 Resistente a 5µM de Imatinib .....	24
2.2.3. Amostras de doentes .....	25
2.3. Manuseamento e processamento de amostras.....	26
2.3.1. Cultura de células .....	26
2.3.2. Contagem de células .....	26
2.3.3. Extracção de proteínas totais.....	26
2.3.4. Quantificação de proteínas .....	26
2.3.5. Extracção de RNA .....	27
2.3.6. Quantificação de RNA.....	27
2.3.7. Síntese de cDNA .....	27
2.4. PCR em Tempo Real .....	28
2.5. <i>RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array</i> .....	30

2.6. Western Blot.....	31
2.6.1. Electroforese <i>SDS-Page</i> .....	31
2.6.2. Transferência .....	31
2.6.3. Imunodeteccção de Proteínas.....	31
2.7. Teste de viabilidade celular – <i>MTS assay</i> .....	33
2.8. Quantificação da Morte Celular .....	33
2.9. Análise do Conteúdo de DNA .....	34
2.10. Determinação da produção endógena de espécies reactivas de oxigénio .....	34
2.11. Análise estatística .....	34
3. Resultados .....	37
3.1- Resistência ao IM .....	37
3.2. Avaliação dos mecanismos de resistência ao IM descritos .....	39
3.2.1. BCR-ABL .....	39
3.2.1.1. Sequenciação do domínio tirosina quinase do gene <i>BCR-ABL</i> .....	39
3.2.1.2. Expressão de transcritos do gene <i>BCR-ABL</i> .....	39
3.2.1.3. Expressão de proteína BCR-ABL .....	39
3.2.1.4. Actividade da proteína BCR-ABL.....	40
3.2.2. Expressão de LYN quinase .....	43
3.3. Análise de parâmetros de sobrevivência celular.....	46
3.3.1. Quantificação da morte basal .....	46
3.3.2. Expressão de genes e proteínas envolvidos na apoptose .....	47
3.3.3. Estudo da expressão dos genes <i>BCL2</i> e <i>BCL-XL</i> em doentes .....	52
3.3.4. Análise do conteúdo de DNA.....	54
3.3.5. Expressão de proteína MYC.....	55
3.3.6. Expressão de genes envolvidos na regulação do ciclo celular .....	55
3.3.7. Estudo da expressão dos genes <i>MAP2K6</i> , <i>GADD45G</i> e <i>DDIT3</i> em doentes .....	58
3.4. Instabilidade genómica.....	60
3.4.1. ROS endógeno .....	60
3.4.2. Expressão de genes das vias de reparação de DNA .....	61
3.4.2.1. Expressão da proteína MBD4 .....	63
3.4.2.2. Sobrevivência na presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	63
3.4.3. Expressão dos genes <i>NTHL1</i> e <i>MBD4</i> em doentes .....	64
4. Discussão .....	67

5. Considerações finais e perspectivas futuras .....	77
6. Bibliografia .....	79



# 1. Introdução

## 1.1. Leucemia Mielóide Crónica

A Leucemia Mielóide Crónica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa clonal das células estaminais hematopoiéticas (Dameshek, 1951, Fialkow *et al.*, 1978). Descrita pela primeira vez em 1845 pelos patologistas Bennet, Craigie e Virchow (Wong e Witte, 2004), a LMC foi a primeira doença neoplásica a ser associada a uma mutação cromossómica adquirida, o cromossoma *Philadelphia* (Ph) (Nowell e Hungerford, 1960). Este cromossoma resulta de uma translocação balanceada recíproca entre o cromossoma 9 e o cromossoma 22 t(9;22) (q34;q11) (Rowley, 1973) e dá origem ao oncogene de fusão *BCR-ABL*. O produto de expressão do oncogene é a proteína BCR-ABL, uma tirosina quinase com actividade constitutiva, que mais tarde se mostrou ser o princípio patogénico da LMC (Daley *et al.*, 1990).

Com base nas características clínicas a LMC pode ser dividida em 3 fases distintas que se sucedem. A primeira fase, denominada Fase Crónica (FC), é caracterizada por uma expansão massiva de células diferenciadas da linhagem mielóide e pelo aparecimento de blastos indiferenciados na medula óssea (menos de 10% das células) (Kantarjian *et al.*, 2006). Cerca de 90% dos casos de LMC são diagnosticados nesta fase da doença no entanto, o diagnóstico é muitas vezes ocasional, resultado de um aumento da contagem de glóbulos brancos em análises hematológicas de rotina, uma vez que a FC é um período assintomático ou com sintomas tão inespecíficos como fadiga, perda de peso e desconforto abdominal (Quintas-Cardama e Cortes, 2006). Em doentes sem tratamento a FC tem uma duração média de 3 a 5 anos, ao fim dos quais a doença progride inevitavelmente para a Fase Acelerada (FA). Esta é uma fase de transição que dura aproximadamente 6-9 meses e em que ocorre o aumento do número de blastos indiferenciados na medula óssea, entre 10% a 30% das células, e o aparecimento de uma sintomatologia progressivamente mais agressiva, como esplenomegália e trombocitopénia (Frazer *et al.*, 2007). Por fim, a doença culmina na Crise Blástica (CB), terceira e última fase da doença. O tempo médio de sobrevivência em CB é de 2-4 meses e o fenótipo patológico nesta fase da doença é muito semelhante ao da Leucemia Mielóide Aguda. Mais de 30% das células do sangue e da medula óssea são blastos indiferenciados, o que resulta numa sintomatologia muito agressiva (aumento da esplenomegália e trombocitopénia, dificuldades respiratórias e elevada susceptibilidade a infecções) (Hoffman, 2000).

Os mecanismos moleculares responsáveis pela progressão da doença da FC até à CB não estão ainda totalmente esclarecidos. Sabe-se que as células em CB apresentam caracteristicamente um cariótipo bastante alterado com diversas mutações cromossómicas, quer numéricas, quer estruturais (Shet *et al.*, 2002, Perrotti *et al.*, 2010). Trabalhos anteriores estabeleceram uma relação directa entre a actividade de BCR-ABL e o aumento de instabilidade genómica nas células leucémicas, tanto devido ao aumento de *stress* oxidativo, como a alterações nos mecanismos de reparação das células (Nowicki *et al.*, 2004, Cramer *et al.*, 2007, Sallmyr *et al.*, 2008, Fernandes *et al.*, 2009). Assim, uma hipótese plausível para explicar a progressão da doença da FC até à CB é a acumulação de mutações e alterações epigenéticas em genes críticos envolvidos na proliferação, sobrevivência e diferenciação celular, que resultam na desregulação constante de vias de transdução de sinal da célula e, em última análise, conferem um novo fenótipo patológico à doença. (Calabretta e Perrotti, 2004, Perrotti *et al.*, 2010).

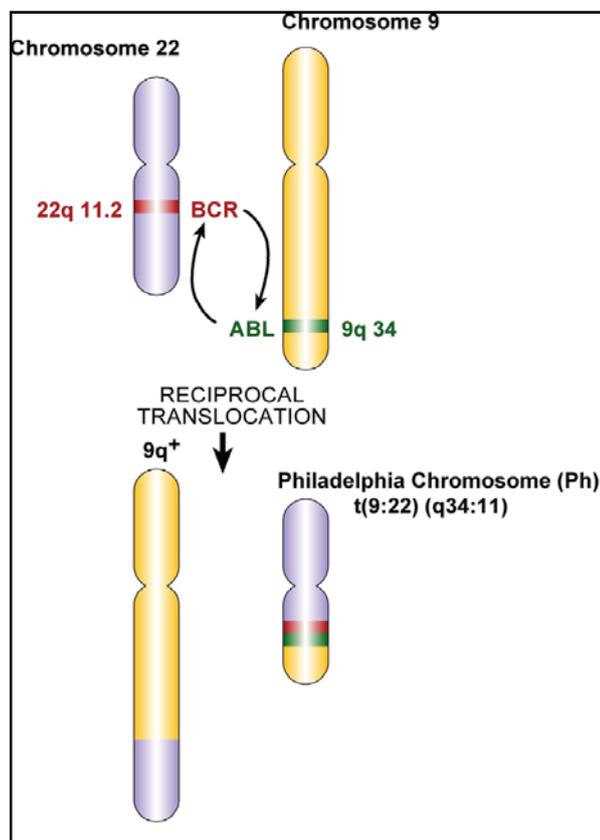
Considerada uma doença rara, a LMC tem uma incidência mundial de 1-2 novos casos por 100 000 habitantes por ano, verificando-se uma ligeira preponderância no sexo masculino. Esta forma de leucemia representa cerca de 20% das leucemias diagnosticadas em adultos (Frazer *et al.*, 2007). Embora a doença atinja todas as faixas etárias, a idade média de diagnóstico varia entre os 45 e os 60 anos de idade (Rohrbacher e Hasford, 2009).

### **1.1.1. Cromossoma *Philadelphia***

A descoberta do cromossoma Ph por Nowell e Hungerford em 1960 permitiu estabelecer a primeira relação causal entre uma mutação cromossómica específica e uma neoplasia (Nowell e Hungerford, 1960). Este marco tornou a LMC um modelo de estudo para o cancro e foi impulsor para a identificação e associação de inúmeras aberrações cromossómicas com neoplasias.

Actualmente sabe-se que o cromossoma Ph está presente em cerca de 90% dos doentes com LMC e por isso, é considerado o marcador citogenético da doença (Wong e Witte, 2004). Através da marcação com quinacrina fluorescente demonstrou-se que este cromossoma é resultado de uma translocação cromossómica recíproca entre o braço longo do cromossoma 9 e o braço longo do cromossoma 22  $t(9;22)(q34;q11)$ , no entanto, o mecanismo que despoleta a translocação entre os dois cromossomas permanece ainda desconhecido (Rowley, 1973) (Figura 1). A consequência molecular desta mutação cromossómica é a justaposição da sequência 3' do proto-oncogene *ABL* (*Abelson*) com a sequência 5' do gene *BCR* (*Breakpoint*

*Cluster Region*) que origina o oncogene de fusão *BCR-ABL* (Bartram *et al.*, 1983, Groffen *et al.*, 1984). O produto de expressão do oncogene é a proteína quimérica BCR-ABL com actividade tirosina quinase constitutiva (Benneriah *et al.*, 1986).



**Figura 1** – Formação do cromossoma *Philadelphia* em resultado da translocação recíproca entre o braço longo do cromossoma 9 e o braço longo do cromossoma 22  $t(9:22)(q34;q11)$ . Adaptado de Frazer *et al.*, 2007.

Apesar da expansão desregulada da linhagem mielóide ser o fenótipo patológico característico da LMC, estudos citogenéticos demonstram que cerca de 20% dos doentes em CB apresentam também um fenótipo linfoblástico (Perrotti *et al.*, 2010). Esta observação corrobora a origem estaminal clonal da LMC, confirmando que a transformação neoplásica que dá origem ao cromossoma Ph ocorre nas células primitivas estaminais hematopoiéticas que ainda não se encontram comprometidas, quer com a diferenciação mielóide, quer com a linfóide.

### 1.1.2. Proteína Quimérica BCR-ABL

A LMC é uma doença invulgar em que o produto de um único oncogene é responsável pela transformação maligna central à patologia. Trabalhos experimentais com diferentes modelos demonstraram esta relação causal (Wong e Witte, 2004). Destaca-se um estudo em que ratinhos transplantados com células hematopoiéticas que expressavam a proteína quimérica BCR-ABL desenvolveram um síndrome mieloproliferativo com características muito semelhantes à FC da LMC (Daley et al., 1990). Posteriormente, verificou-se que os ratinhos não desenvolviam a patologia quando expressavam uma isoforma inactiva da quinase BCR-ABL contendo uma mutação no domínio de ligação ao ATP (Zhang e Ren, 1998). Deste modo, foi possível estabelecer especificamente a actividade da tirosina quinase da proteína de fusão como o princípio transformante da LMC.

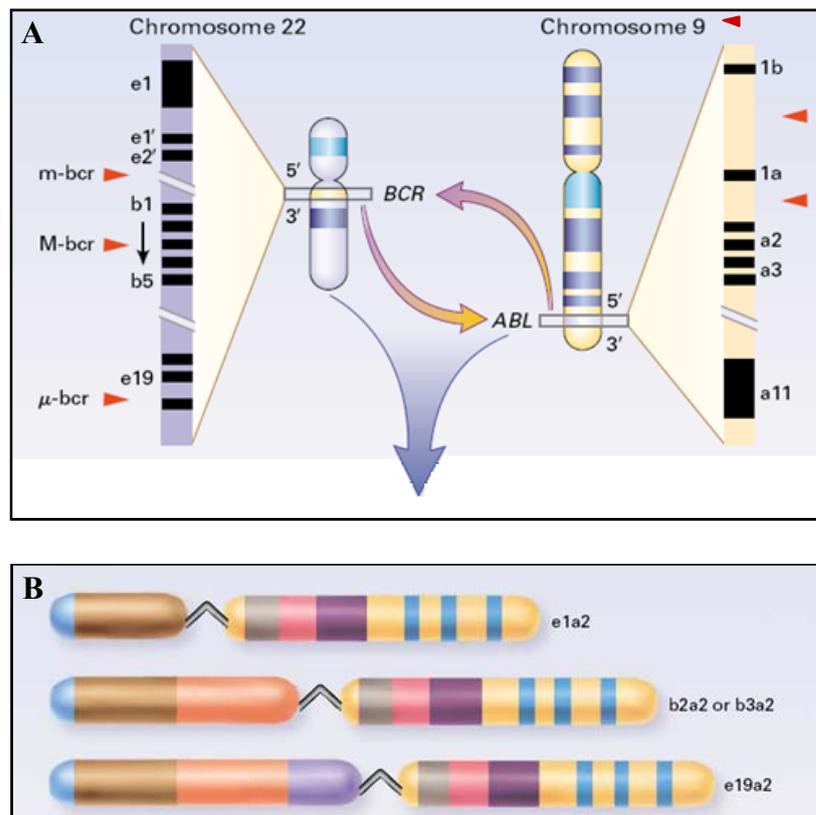
Consoante os pontos de quebra dentro dos genes *ABL* e *BCR*, a proteína BCR-ABL pode ter diferentes pesos moleculares e estar associada a diferentes formas de leucemia.

O gene *ABL* codifica uma tirosina quinase ubiquamente expressa que se encontra envolvida em vários mecanismos de regulação da homeostase celular (resposta a *stress* genotóxico, diferenciação celular, regulação do ciclo celular, adesão, etc.) (Sawyers *et al.*, 1994, Lewis e Schwartz, 1998, Shaul e Ben-Yehoyada, 2005, Li *et al.*, 2009). Os pontos de quebra dentro do gene *ABL* podem ocorrer na extremidade 5' a montante do 1º exão alternativo Ib, a jusante do 2º exão alternativo Ia ou, mais frequentemente, entre os dois exões (Figura 2A) (Deininger *et al.*, 2000). Independentemente do local de quebra dentro do gene, após o *splicing* do transcrito primário, os exões de ligação à sequência BCR são o a2 (na maioria dos casos) ou o a3. O motivo pelo qual os primeiros exões do gene *ABL* não integram o oncogene de fusão ainda não foi descrito.

O proteína resultante do gene *BCR* possui actividade serina/treonina quinase, mas ainda pouco se sabe sobre as funções desempenhadas por esta proteína. Dentro do gene *BCR* os pontos de quebra podem ocorrer na *major breakpoint cluster region* (M-*bcr*), na *minor breakpoint cluster region* (m-*bcr*) e na *micro breakpoint cluster region* ( $\mu$ -*bcr*) (Figura 2A). É o local de quebra dentro do gene *BCR* que determina o tipo de transcrito *BCR-ABL*. Quando a quebra ocorre na M-*bcr* a sequência do transcrito *BCR-ABL* resultante pode ser tanto b2a2 como b3a2, em resultado do *splicing* alternativo (Figura 2B). Ambos os transcritos são traduzidos na proteína quimérica BCR-ABL com peso molecular de 210kDa, que é a forma mais comum da proteína em LMC (Deininger *et al.*, 2000). Quando o ponto de quebra ocorre na m-*bcr* ou na  $\mu$ -*bcr*, os transcritos resultantes são o e1a2 e o e19a2, respectivamente (Figura

2B). O transcrito e1a2 é traduzido na proteína BCR-ABL com 190kDa, enquanto que o transcrito e19a2 origina a mesma proteína mas com peso molecular de 230kDa (Deininger *et al.*, 2000).

Apesar de alguns estudos estabelecerem uma relação entre as variantes do transcrito BCR-ABL e a resposta ao tratamento com Imatinib (IM; Novartis), actualmente a primeira linha terapêutica para LMC, os resultados obtidos por diferentes grupos não são concordantes (Polampalli *et al.*, 2008, Sharma *et al.*, 2009).



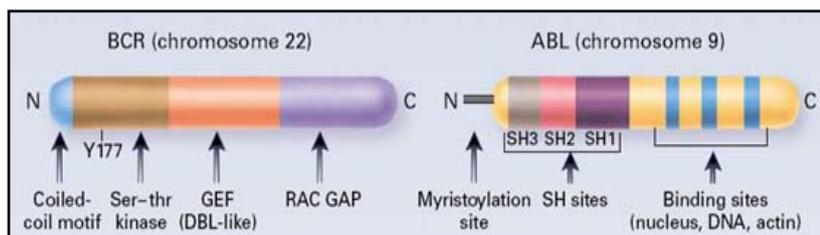
**Figura 2** - Formação do oncogene quimérico *BCR-ABL* pela translocação t(9q;22q). Em A são demonstrados os pontos de quebra dentro do gene *BCR* e do gene *ABL* (setas). Adaptado de Faderl *et al.*, 2007. Em B encontram-se representados os transcritos de fusão resultantes da translocação t(9;22)(q34;q11) que dão origem aos diferentes fenótipos de LMC. Adaptado de Faderl *et al.*, 1999.

A proteína quimérica BCR-ABL resultante da justaposição dos dois genes acima descritos é composta por diversos domínios estruturais (Figura 3). O domínio tirosina quinase, responsável pela transformação neoplásica da LMC, corresponde ao domínio SH1 (*Src-homology-1*) da porção ABL da proteína. Em condições fisiológicas esta quinase é rigorosamente regulada pelo domínio SH3 que a mantém constitutivamente inactiva (Wong e Witte, 2004). No entanto, a fusão da sequência *BCR* com a sequência *ABL* interfere com a

estrutura do domínio SH3, o que resulta na activação constitutiva da BCR-ABL (Faderl *et al.*, 1999).

O domínio SH2 da proteína ABL encontra-se envolvido nas interacções proteína-proteína e na modulação da activação de vias de transdução de sinal (Marcucci *et al.*, 2003). Alterações na integridade funcional do domínio SH2 resultam numa menor afinidade para a ligação às proteínas alvo da tirosina quinase e, conseqüentemente, reduzem a capacidade transformante da proteína BCR-ABL (Pendergast *et al.*, 1991). Assim, também o domínio SH2 desempenha um papel importante na transformação neoplásica.

Alguns dos domínios contidos na porção BCR da proteína de fusão são essenciais para a ligação de proteínas adaptadoras que são também substrato da quinase BCR-ABL, tais como a GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*), a CRKL (*CRK-oncogene-like protein*) e a SHC (*SRC homology 2-containing protein*) (Faderl *et al.*, 1999).



**Figura 3** –Esquemática dos domínios das proteínas BCR e ABL. Adaptado de Faderl *et al.*, 1999.

Após a identificação da actividade constitutiva da tirosina quinase BCR-ABL como o mecanismo etiológico da LMC vários estudos foram efectuados para identificar tanto os substratos da quinase, como as vias de transdução de sinal em que esta interfere (Naldini *et al.*, 1986, Patel *et al.*, 2006, Brehme *et al.*, 2009).

### 1.1.3. Vias de sinalização alteradas pela BCR-ABL

Uma ampla gama de proteínas envolvidas nos mecanismos de sinalização celular são reguladas directa ou indirectamente pela actividade da proteína BCR-ABL (Sattler *et al.*, 1996, Sattler *et al.*, 2002, Wong e Witte, 2004) (Tabela 1). Assim, a actividade constitutiva tirosina quinase desta proteína altera a regulação fisiológica destas moléculas, sendo responsável pelas alterações nas vias de transdução de sinal que conferem o fenótipo patológico da LMC.

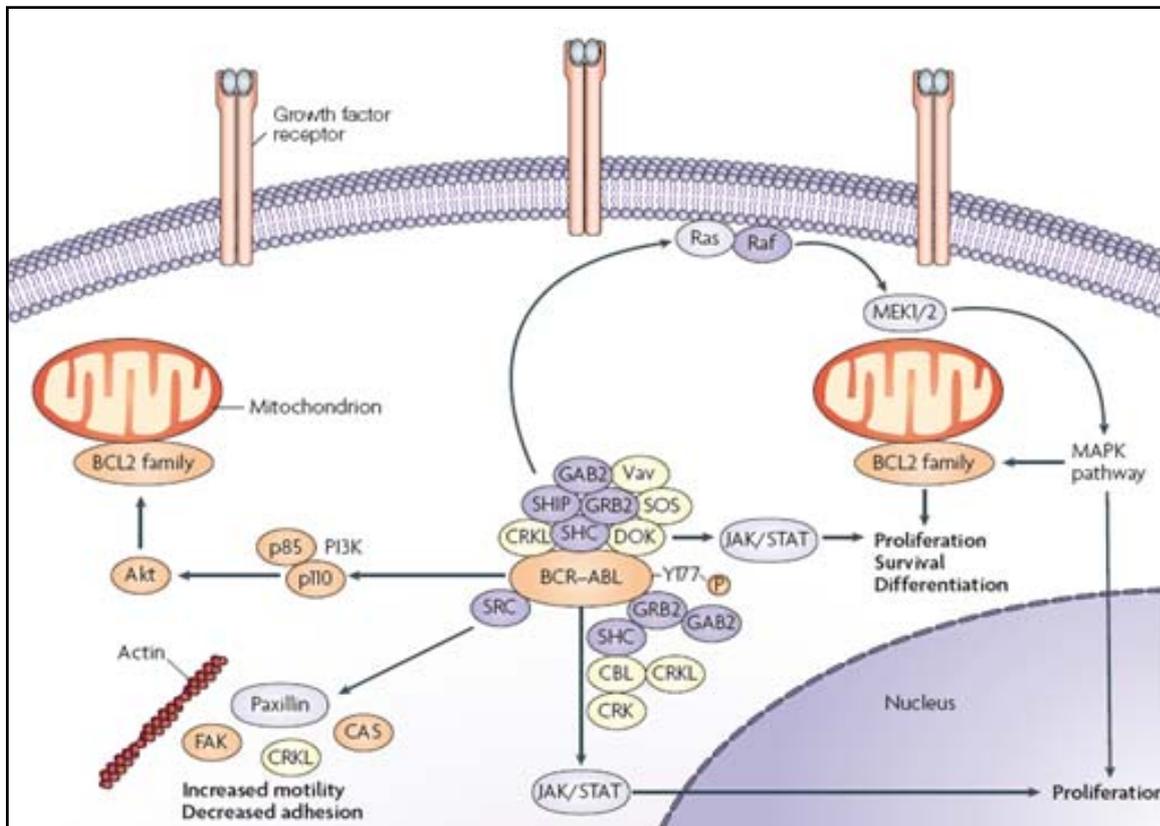
**Tabela 1** – Moléculas sinalizadoras reguladas positiva ou negativamente pela proteína BCR-ABL. Adaptado de Wong and White, 2004.

Apoptose	Mitogenios	Ciclo Celular	Factores Hematopoiéticos	Reparação de DNA	Proteínas Adaptadoras	Outras
PI3K	RAS	p27KIP	IL-3	BRCA1	CRKL	ABL-1
AKT	ERK1	G2A	IL-3R $\beta$ c	DNA-PK	GRB2	ABL-2
JNK	ERK2	CYCLIN D2	GM-CSF	DNA POL $\beta$	GRB4	LYN
p38MAPK	c-MYC		VEGF	RAD51	GAB2	HCK
STAT5	RINI		BACHS	XPB	SHC	FPS/FES
NF $\kappa$ B	RAC		C/EBP $\alpha$	CRKL	p62DOK	GCKR
c-MYC			C/EBP $\beta$		c-CBL	CK2 $\alpha$
BCL-XL						PKC
BCL2						JAK2
BAD						VAV
TRAIL						p53
AATYK						MDM2

Entre as vias de sinalização afectadas pela actividade quinase da proteína BCR-ABL destacam-se a via RAS (*Rat Sarcoma*), a via PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*), a via MAPK (*Mitogenic activated protein kinase*) e a via JAK/STAT (*Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*) (Kantarjian *et al.*, 2006) (Figura 4). Em células hematopoiéticas normais estas vias de sinalização são activadas por sinais extracelulares, incluindo citocinas, factores de crescimento e factores de *stress* celular (ex. agentes genotóxicos) que regulam a sobrevivência, crescimento e diferenciação destas células através da integração de sinais. No entanto, em células leucémicas, a desregulação destas vias de sinalização traduz-se no aumento da proliferação de formas indiferenciadas das células da linhagem mielóide, na perda da capacidade de adesão destas células ao estroma da medula óssea e no aumento da capacidade de sobrevivência celular (Steelman *et al.*, 2004, Kantarjian *et al.*, 2007).

A via de sinalização RAS medeia a transmissão de sinais dos receptores de superficie membranar para os factores de transcrição presentes no núcleo (Steelman *et al.*, 2004), estando envolvida na regulação da progressão do ciclo celular, da diferenciação celular e da apoptose (Kantarjian *et al.*, 2007). Em células hematopoiéticas com expressão da proteína de fusão BCR-ABL foi possível estabelecer uma relação entre a actividade quinásica desta proteína e a activação constitutiva da glicoproteína RAS, uma vez que diversos substratos da proteína BCR-ABL, tais como o GRB2, o SHC e o CRKL, são moléculas adaptadoras que activam esta glicoproteína (Puil *et al.*, 1994). A activação constitutiva de RAS em células

leucémicas activa a cascata das MAPK quinases, o que resulta na desregulação de factores de transcrição envolvidos na proliferação, crescimento e diferenciação celular (Raitano *et al.*, 1995, Steelman *et al.*, 2004).



**Figura 4** – Esquematização simplificada das principais vias de transdução de sinal e moléculas sinalizadoras desreguladas pela actividade constitutiva da tirosina quinase BCR-ABL. Adaptado de (Weisberg *et al.*, 2007).

Por sua vez, a via de sinalização PI3K/AKT encontra-se normalmente envolvida na sobrevivência celular e no processo mitótico (Katso *et al.*, 2001). Em células normais, a quinase PI3K é activada pela formação de complexos mediados por proteínas adaptadoras activadas, como por exemplo a GAB2. Como descrito anteriormente, estas moléculas adaptadoras são um substrato directo da proteína BCR-ABL, pelo que a activação constitutiva destas proteínas resulta na activação constitutiva da quinase PIK3 (Stelman *et al.*, 2004). O resultado da sobre-activação desta via de transdução de sinal nas células leucémicas é a inibição de moléculas envolvidas na sinalização pró-apoptótica e o aumento da activação de proteínas da via de sinalização anti-apoptótica. O exemplo mais descrito é a fosforilação da

proteína pró-apoptótica BAD, pela quinase AKT, que desta forma fica inactiva (Steelman *et al.*, 2004).

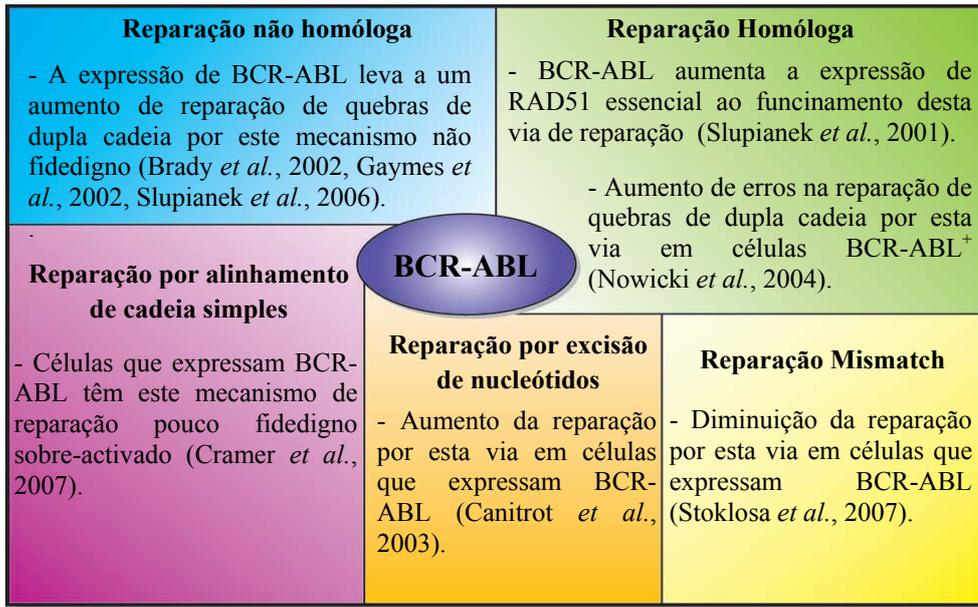
A via de sinalização JAK/STAT é activada por receptores de citoquinas e desempenha um papel importante na regulação da proliferação, divisão e sobrevivência celular (Coffer *et al.*, 2000, Steelman *et al.*, 2004). Em patologias mielóides foi ainda demonstrado que as proteínas da família STAT estão envolvidas na suspensão da maturação celular e, principalmente, na inibição da apoptose (Coffer *et al.*, 2000). Uma vez que a proteína STAT5 é um substrato directo da proteína de fusão BCR-ABL, a actividade constitutiva da proteína BCR-ABL resulta na activação constante deste factor de transcrição (Ilaria e VanEtten, 1996). A consequência descrita como mais relevante desta activação constante do factor de transcrição STAT5 nas células leucémicas é a sobre-expressão do gene anti-apoptótico BCL-XL (Horita *et al.*, 2000).

#### **1.1.4. Expressão de BCR-ABL e instabilidade genómica**

A relação directa entre a actividade constitutiva da proteína BCR-ABL e o aumento da produção endógena de espécies reactivas de oxigénio (ROS, *Reactive oxygen species*) foi previamente descrita na literatura (Sattler *et al.*, 2000). Trabalhos posteriores demonstraram que o aumento de ROS nas células leucémicas resulta no aumento de lesões no DNA (Koptyra *et al.*, 2006, Skorski, 2007).

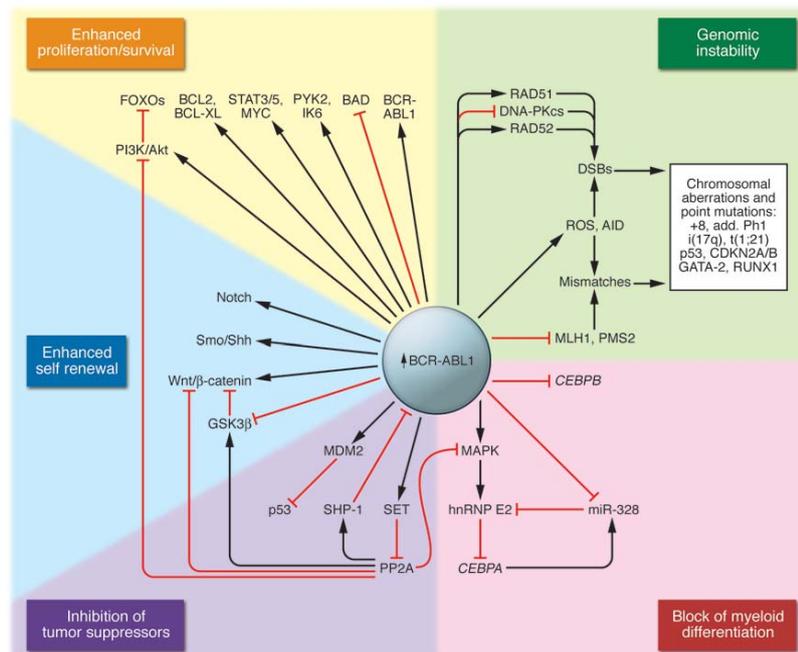
Paralelamente, foi demonstrado que em células com expressão de BCR-ABL há uma sobre-activação de vias de reparação de DNA pouco fidedignas em resultado da interacção da quinase BCR-ABL com moléculas essenciais ao reconhecimento e reparação das lesões (Nowicki *et al.*, 2004, Sallmyr *et al.*, 2008, Skorski, 2008) (Figura 5). O funcionamento adequado dos mecanismos de reparação de DNA é fundamental para a manutenção da homeostase celular, e por isso, alterações nestas vias levam à acumulação de mutações no DNA que podem activar oncogenes e vias alternativas de sinalização celular ou inactivar genes supressores de tumores.

Assim, foi proposto que a instabilidade genómica observada nas células que expressam BCR-ABL seja resultado do aumento da produção de ROS endógeno associado à perda de capacidade de reparação fidedigna, devido à actividade tirosina quinase BCR-ABL.



**Figura 5.** Alterações nas vias de reparação em células que expressam a proteína BCR-ABL. Adaptado de (Burke e Carroll, 2010).

A instabilidade genómica das células BCR-ABL foi também o mecanismo proposto para explicar a progressão da doença da FC até à CB. Assim, a acumulação de alterações genéticas ou epigenéticas em genes críticos para a regulação das vias de sinalização das células, associado à desregulação de diversas vias de sinalização resultante da actividade constitutiva da proteína BCR-ABL, podem conferir um novo fenótipo patológico à doença (Perrotti *et al.*, 2010) (Figura 6).



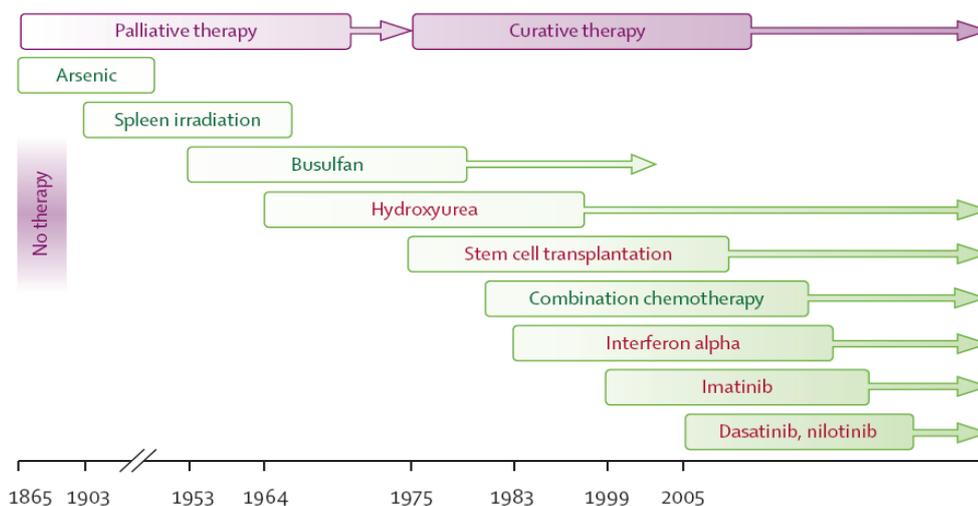
**Figura 6** – Principais mecanismos envolvidos no processo de transformação maligna e progressão da LMC dependentes da actividade de BCR-ABL. Adaptado de Perrotti, 2010.

## 1.2. Terapêutica

Desde a descoberta da LMC que várias terapêuticas progressivamente mais efectivas têm vindo a ser desenvolvidas para o tratamento da doença (Figura 7). A cura em LMC é atingida quando ocorre simultaneamente resposta molecular completa (*CMR-Complete Molecular Response*), ou seja, ausência de transcritos de *BCR-ABL*, resposta hematológica completa (*CHR-Complete Hemayologic Response*), isto é, uma normalização da contagem de células do sangue e resposta citogenética completa (*CCR-Complete Cytogenetic Response*), ou seja, a erradicação das células da medula que contêm o cromossoma Ph (Kantarjian *et al.*, 2008). A monitorização de doentes com LMC permitiu estabelecer uma relação directa entre a resposta citogenética e o aumento da sobrevivência dos doentes pelo que, atingir esta resposta, tornou-se o principal objectivo para os doentes.

As terapêuticas disponíveis inicialmente para o tratamento da LMC tinham um papel apenas paliativo. Apesar do tratamento com *Busulfan* e Hidroxiureia resultarem em *CHR* em 50-80% dos doentes, não se observava qualquer resposta citogenética e, por isso, este tipo de tratamento apenas proporcionava alguns benefícios clínicos aos doentes mas não alterava o percurso natural de progressão da doença (Pavlovsky *et al.*, 2009).

O transplante celular alogénico de células estaminais precedido de mieloablação por quimioterapia ou radioterapia é uma intervenção invasiva com muitos riscos associados e, por isso, apenas disponível para uma pequena percentagem de doentes. No entanto, apesar dos esforços no sentido de desenvolver novas estratégias terapêuticas, este continua a ser o tratamento mais efectivo na cura da LMC (Apperley, 2007).



**Figura 7:** Terapêuticas disponíveis para a LMC ao longo do tempo. Os tratamentos escritos a vermelho são os mais frequentemente utilizados na FC da LMC. Adaptado de Hehlmann *et al.*, 2007.

O interferão- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) foi o primeiro agente terapêutico a induzir resposta citogenética em grande parte dos doentes com LMC submetidos a este tratamento. Num estudo com 512 doentes Ph<sup>+</sup> verificou-se que 27% atingiram CCR com uma taxa de sobrevivência ao fim de 10 anos de 78% (Kantarjian *et al.*, 2003). Assim, a introdução desta terapêutica traduziu-se num aumento do tempo de sobrevivência dos doentes. No entanto, uma elevada percentagem de doentes era intolerante ao tratamento com IFN- $\alpha$  devido aos seus elevados níveis de toxicidade.

O desenvolvimento do inibidor de tirosina quinase IM, descrito em seguida, representou o início de uma nova fase no tratamento da LMC. A utilização deste fármaco permite atingir taxas de resposta molecular, hematológica e citogenética nunca antes possível com qualquer outra terapêutica. O sucesso terapêutico do IM tornou-o a primeira linha de tratamento para LMC.

Actualmente já se encontram disponíveis na clínica novos inibidores de tirosina quinase de segunda geração como o Dasatinib (Bristol Myers Squibb) e o Nilotinib (Novartis). O mecanismo de acção deste fármacos é idêntico ao do IM no entanto, estas moléculas são mais potentes na inibição da tirosina quinase BCR-ABL.

Um constante em todas as formas de terapêutica utilizadas em LMC é a resposta transitória ou mesmo inexistente dos doentes em CB. Nesta fase da doença a grande maioria dos doentes é refractária aos tratamentos actualmente disponíveis.

### **1.2.1- Imatinib**

A identificação da actividade tirosina quinase da proteína BCR-ABL como o princípio patogénico da LMC tornou esta proteína um alvo atractivo para intervenção terapêutica. Além disso, esta abordagem terapêutica permite a eliminação selectiva das células neoplásicas, uma vez que a proteína BCR-ABL está presente em células leucémicas e ausente nas células normais.

O estudo da estrutura tridimensional da proteína quinase ABL permitiu desenvolver o IM, uma 2-fenilaminopirimidina com a capacidade de inibir todas as formas da tirosina quinase ABL (Druker *et al.*, 1996, Deininger *et al.*, 1997).

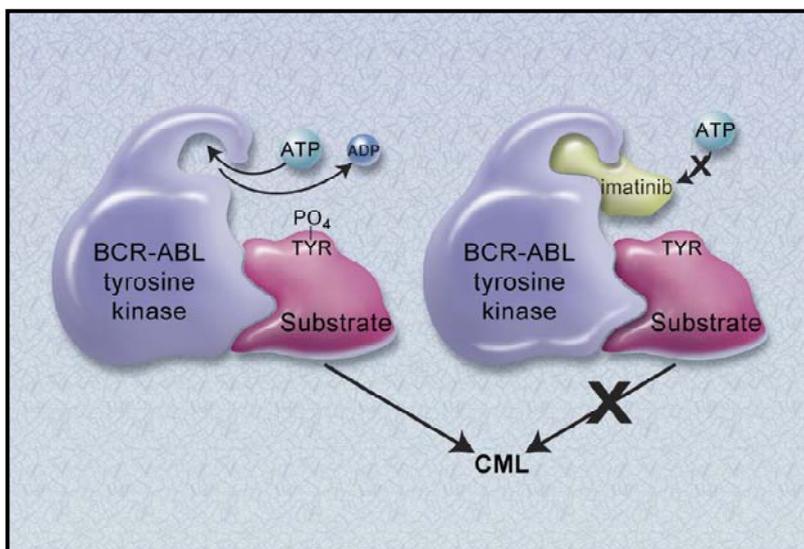
A base do mecanismo de acção do IM é a elevada afinidade desta pequena molécula para se ligar ao local de ligação do ATP, no domínio tirosina quinase da proteína BCR-ABL (Figura 8). Deste modo, o IM impede a ligação do ATP e estabiliza a proteína na sua

conformação inactiva. A tirosina quinase inibida perde a capacidade de fosforilar os seus substratos e de se auto-fosforilar, o que resulta no bloqueio da sobre-activação das vias de transdução de sinal alvo da BCR-ABL (Schindler *et al.*, 2000, Druker, 2008).

A actividade anti-proliferativa do IM foi inicialmente testada em linhas celulares com expressão da proteína BCR-ABL e em modelos animais transplantados com células hematopoiéticas transformadas (Deininger *et al.*, 2005). Os resultados obtidos com ambos os modelos indicaram uma elevada eficácia do fármaco.

Em linhas celulares com expressão de BCR-ABL o tratamento com IM não só inibia a proliferação celular como em alguns casos levava também à morte celular por apoptose (Druker *et al.*, 1996, Oetzel *et al.*, 2000).

Assim, apesar do cepticismo inicial quanto à eficácia terapêutica dos inibidores de tirosina quinase na LMC, os resultados pré-clínicos obtidos com os modelos *in vitro* e *in vivo* levaram à rápida transição do IM para a fase de ensaios clínicos.



**Figura 8:** Mecanismo de acção do inibidor de tirosina quinase IM. O fármaco liga-se ao local de ligação do ATP no domínio tirosina quinase da proteína BCR-ABL e impede a ligação do ATP. Imagem de A. Y. Chen em (Druker, 2008).

Na fase I dos ensaios clínicos foi administrado IM oralmente (25 a 1000mg/dia) a 83 doentes em FC resistentes ou intolerantes ao tratamento com o IFN- $\alpha$ . Dos 54 doentes tratados com doses iguais ou superiores a 300mg/dias, 53 atingiram *CHR*. Ainda neste grupo de doentes, 7 atingiram *CCR* e 17 atingiram uma resposta citogenética *major* (0-35% de células em metafase positivas para Ph). Os resultados deste estudo indicaram não só uma

elevada eficácia do tratamento com IM, mas também a ausência de efeitos secundários impeditivos da continuidade do tratamento (Druker *et al.*, 2001).

Na fase II dos ensaios clínicos foi realizado um estudo com 454 doentes em FC tardia sem resposta ao tratamento com IFN- $\alpha$ . Estes doentes foram tratados com 400mg/dia de IM por toma oral. Após 18 meses de tratamento observou-se que 60% dos doentes atingiram resposta citogenética *major* e que 90% obteve *CHR* com uma taxa de sobrevivência livre de progressão da doença para FA ou CB de 89% (Kantarjian *et al.*, 2002).

Um estudo com doentes em FA ou em CB demonstrou que com uma dose terapêutica de 400 a 600mg/dia, 52% dos doentes apresentaram resposta hematológica e 16% uma resposta citogenética *major*. No entanto, a característica refractária dos doentes nestas fases da doença leva a que, quando há resposta ao tratamento com IM, esta seja uma resposta transitória e de curta duração (Sawyers *et al.*, 2002).

A fase III de ensaios clínicos, denominada I.R.I.S. (*International Randomized Study of Interferon Versus STI571*), baseou-se num estudo aleatório com 1106 doentes em FC inicial sem qualquer tratamento prévio para a LMC. Neste estudo fez-se a análise comparativa da eficácia do tratamento com 400mg/dia de IM (553 doentes) e com a combinação terapêutica INF- $\alpha$ /Citarabina (553 doentes) (O'Brien *et al.*, 2003). A percentagem de doentes que atingiu *CCR* ao fim de 18 meses foi 76,2% nos doentes tratados com IM e 14,5% nos doentes tratados com INF- $\alpha$ /citarabina. Também a percentagem de doentes que atingiu *CHR* foi mais elevada nos doentes tratados com IM (96,8%) do que nos doentes tratados com INF- $\alpha$ /citarabina (69%). É ainda de destacar que as respostas no grupo de doentes sujeito ao tratamento com IM foram atingidas mais rapidamente e que a taxa de progressão da doença para CB foi bastante inferior neste grupo de doentes (O'Brien *et al.*, 2003).

O acompanhamento farmacoterapêutico durante 5 anos do grupo de doentes que integrou o estudo I.R.I.S. mostrou que 87% dos doentes do grupo tratado com IM atingiu *CCR* (Druker *et al.*, 2006). Resultados mais recentes, após 6 anos de acompanhamento, indicam que a taxa de resposta citogenética completa neste grupo é agora 82% (Hochhaus *et al.*, 2009). A percentagem de sobrevivência dos doentes tratados com IM ao fim de 6 anos é cerca de 83% e a taxa de doentes livres de progressão para FA ou CB é de 93%.(Hochhaus *et al.*, 2009)

Com base na eficácia terapêutica do IM demonstrada nos resultados obtidos nos estudos anteriores, o fármaco não só foi introduzido na prática clínica como também foi

estabelecido como a primeira linha de tratamento em LMC. A dose diária recomendada de IM é 400mg para doentes em FC e 600mg para doentes em FA ou CB por toma oral.

### **1.2.2. Resistência ao Imatinib**

Apesar dos promissores resultados obtidos no início da utilização do IM como terapêutica para a LMC, a emergência de casos de resistência e a presença de quantidades residuais de células que expressam BCR-ABL em doentes que respondem à terapia evidenciaram que o IM é, na maioria dos casos, uma terapia de supressão temporária da doença e não uma terapia de cura. No ensaio clínico I.R.I.S. verificou-se que 5 anos após o início do tratamento com IM, 13% dos doentes não atingiram resposta citogenética completa, aproximadamente 7% dos doentes deixaram de responder ao tratamento após os 3 primeiros anos e 5% foram forçados a desistir da terapêutica devido aos efeitos adversos do fármaco (Druker *et al.*, 2006).

Além disso, estudos recentes alertam para o facto dos resultados obtidos na prática clínica não retratarem os resultados obtidos durante os ensaios clínicos (de Lavallade *et al.*, 2008). Lucas *et al.* mostraram que numa população de 68 doentes tratados com IM desde o diagnóstico 49% dos doentes tornaram-se resistentes ou intolerantes ao IM ao fim de 24 meses (Lucas *et al.*, 2008).

Uma vez que o IM é actualmente a primeira linha de terapia para a LMC, a emergência de resistência ao inibidor da tirosina quinase BCR-ABL tornou-se um problema terapêutico significativo e por isso, o estudo e caracterização dos mecanismos moleculares por detrás da resistência é neste momento fundamental.

Uma pequena percentagem dos doentes com LMC é à partida resistente ao IM aquando do início do tratamento. Este fenómeno foi designado por resistência primária. O processo de aquisição de resistência após uma resposta inicial ao tratamento foi designado por resistência secundária.

Os mecanismos de resistência têm sido estudados tanto em modelos laboratoriais, *in vitro* e *in vivo*, como directamente em amostras de doentes resistentes ao tratamento com o fármaco (Mahon *et al.*, 2000, Quintas-Cardama *et al.*, 2009).

### 1.2.2.1. Mutações no domínio quinase da proteína BCR-ABL.

A aquisição de mutações pontuais no domínio tirosina quinase da proteína BCR-ABL representa cerca de 40% dos casos de resistência ao IM em doentes (Druker, 2008). As mutações resultam na substituição de aminoácidos na proteína quimérica que impedem a ligação normal do IM ao local de ligação ao ATP.

As mutações pontuais ocorrem fundamentalmente em três zonas distintas do domínio tirosina quinase do gene *BCR-ABL*: directamente no local de ligação do ATP, no *loop* de activação da quinase ou, ainda, no próprio domínio catalítico da quinase (Melo e Chuah, 2007) (Tabela 2). O impedimento da ligação do IM à proteína mutada resulta fundamentalmente ou da substituição de aminoácidos críticos à ligação do IM ou da substituição de aminoácidos essenciais para a estrutura conformacional da quinase, que ao ser alterada, impede a ligação do IM (Quintas-Cardama e Cortes, 2006).

As diferentes mutações pontuais não têm todas o mesmo significado clínico. Mutações no *P-loop* tendem a conferir níveis de resistência mais elevados, enquanto que outras apenas diminuem a sensibilidade ao IM o que, em alguns casos, pode ser ultrapassado com um aumento da dose do fármaco (Hochhaus *et al.*, 2009).

**Tabela 2.** Lista de diferentes mutações pontuais que ocorrem no domínio tirosina quinase da BCR-ABL responsáveis pela aquisição de resistência ao IM em doentes. n.d.= não definido. Adaptado de (Volpe *et al.*, 2009).

Local da mutação	Mutações BCR-ABL	IC <sub>50</sub> μM, Imatinib	Local da mutação	Mutações BCR-ABL	IC <sub>50</sub> μM, Imatinib
P-loop	Wild-type	260–500	Domínio Catalítico	Wild-type	260–500
	M244V	2000		M351T	930
	L248V	1500		M351V	n.d.
	G250E	3900		E355D	n.d.
	Q252H	1200–2800		E355G	400
	Y253F	3475		F359V	1200
	Y253H	>10,000		Loop de Activação	V379I
	E255K	4400–8400	A380T		2450
	E255V	>5000	F382L		n.d.
	D276G	1500	L387M		1000
	T277A	n.d.	L387F		1100
	F311I	n.d.	H396P		850–4200
	F311L	480	H396R		1750
	<b>T315I</b>	<b>&gt;10,000</b>	S417Y	n.d.	
F317L	810–1500	E459K	n.d.		
M343T	n.d.	F486S	2800		

A mutação T315I, substituição de uma treonina por uma isoleucina no aminoácido 315 da quinase, foi a primeira mutação descrita em doentes (Gorre *et al.*, 2001). Esta substituição aminoacídica impede efectivamente a ligação do IM à proteína BCR-ABL pelo que, até hoje, é a única mutação descrita que torna as células leucémicas totalmente insensíveis ao fármaco (Melo e Chuah, 2007). Esta mutação confere resistência também ao tratamento com os inibidores de tirosina quinase de segunda geração Nilotinib e Dasatinib.

Estudos recentes com doentes acompanhados ao longo do tempo têm mostrado que o perfil mutacional é dinâmico, isto é, o mesmo doente pode ter mais que uma mutação e a percentagem de clones com cada mutação pode variar ao longo do tempo (Cortes *et al.*, 2007, Grant *et al.*, 2010).

As mutações pontuais não são induzidas pela actividade inibitória do IM, no entanto, a presença do IM após a aquisição da mutação actua como um mecanismo de selecção dos clones insensíveis ao tratamento que, por expansão clonal, levam progressivamente à ineficácia terapêutica do IM (Melo e Chuah, 2007).

#### **1.2.2.2. Amplificação genética e sobre-expressão de *BCR-ABL*.**

A amplificação do gene *BCR-ABL* e a sua sobre-expressão como mecanismo de resistência ao IM foi descrita inicialmente em linhas celulares resistentes ao fármaco (Mahon *et al.*, 2000). Posteriormente, num estudo com 9 doentes sem resposta ao tratamento com IM observou-se que em 3 casos havia amplificação do gene *BCR-ABL* (le Coutre *et al.*, 2000, Gorre *et al.*, 2001).

O aumento da expressão do gene *BCR-ABL* pode resultar da duplicação do cromossoma Ph, da ocorrência de múltiplas cópias do gene *BCR-ABL* dentro do mesmo cromossoma, de ambos os fenómenos ou ainda da desregulação transcricional do gene (Gorre *et al.*, 2001). A resistência em doentes surge quando o aumento de transcritos de *BCR-ABL* se traduz num aumento da quantidade de proteína. Assim, as concentrações terapêuticas de IM deixam de ser suficientes para inibir toda a proteína BCR-ABL existente nas células (Hochhaus *et al.*, 2002). Em alguns casos, o aumento da dosagem diária de IM pode superar este mecanismo de resistência. No entanto, os efeitos secundários graves, e por vezes intoleráveis, a doses elevadas do fármaco são uma limitação a esta abordagem (An *et al.*, 2010).

No entanto este mecanismo de resistência tem sido raramente considerado efectivo em doentes. Em alguns casos a sobre-expressão de *BCR-ABL* não está directamente associada a fenómenos de resistência (Milojkovic e Apperley, 2009).

Outros mecanismos envolvidos na resistência ao IM são considerados independentes da proteína BCR-ABL e estão envolvidos maioritariamente em casos de resistência secundária.

### **1.2.2.3. Alteração da expressão de proteínas transmembranares de influxo e de efluxo.**

Uma questão crítica do tratamento com IM é a variação da concentração do fármaco no interior das células alvo dos doentes. Num estudo com 68 doentes com LMC, Picard *et al.* mostraram que nos 50 doentes tratados com 400mg/dia de IM a concentração plasmática do fármaco variou entre 181 e 2947 ng/mL. Além disso, este trabalho demonstrou que os 56 doentes que atingiram resposta citogenética completa com o tratamento com IM apresentavam uma concentração plasmática do fármaco superior à que se observava no grupo de 12 doentes que não atingiram esta resposta (56 doentes [1123± 617 ng/mL] *versus* 12 doentes [694 ± 556 ng/mL]) (Picard *et al.*, 2007).

A resistência a múltiplos fármacos mediada pelo produto do gene *MDR1*, uma proteína transmembranar que regula o efluxo de diversos fármacos, é um mecanismo bastante descrito em diversas patologias (Gottesman *et al.*, 2002).

Deste modo, colocou-se a hipótese de existir uma sobre-expressão dos transportadores de efluxo em doentes resistentes ao IM, o que resultaria no aumento da extrusão do fármaco, a ponto das concentrações intracelulares não serem suficientes para a inibição da proteína BCR-ABL. Em trabalhos experimentais realizados com algumas linhas celulares resistentes ao IM foi possível detectar um aumento da expressão de *MDR1* (Mahon *et al.*, 2000). No entanto, até hoje não foi possível comprovar esta relação entre o aumento da expressão do transportador e a resistência ao IM em doentes (Melo e Chuah, 2007). Além disso, é de salientar a presença de dados contraditórios na literatura, relativamente à interacção do IM com os transportadores membranares. Por exemplo, no caso do transportador ABCG2, alguns estudos classificam o IM como um substrato do transportador enquanto que outros o classificam como um inibidor (Houghton *et al.*, 2004, Quintas-Cardama *et al.*, 2009, An *et al.*, 2010).

A diminuição da actividade do transportador de influxo hOCT1 nos doentes resistentes foi também um mecanismo proposto para a regulação da concentração intracelular de IM

(Thomas *et al.*, 2004). Num estudo realizado com doentes recentemente diagnosticados em FC, sujeitos ao tratamento com IM numa dosagem de 600mg/dia, foi demonstrado que o grupo de doentes com maior actividade do transportador de influxo hOCT1 apresentava maior resposta molecular ao fármaco, e um IC<sub>50</sub> mais baixo, do que se verificava no grupo de doentes com baixa actividade deste transportador membranar (White *et al.*, 2007). Este resultado acresce relevância à hipótese de que a actividade deste transportador pode ter um papel na resistência ao IM.

#### **1.2.2.4. Alterações na regulação de mecanismos de transdução de sinal.**

Verifica-se que em alguns doentes resistentes ao IM o mecanismo de resistência tem por base alterações em vias de sinalização intracelulares independentes de BCR-ABL.

Vários resultados obtidos em modelos *in vitro* resistentes ao IM e em amostras clínicas de doentes têm demonstrado que a família de quinases SRC está estreitamente envolvida em algumas formas de resistência independentes de BCR-ABL (Pene-Dumitrescu e Smithgall, 2010).

A sobre-expressão da proteína LYN foi inicialmente identificada num modelo celular resistente ao IM (Donato *et al.*, 2003). Ainda neste trabalho demonstrou-se que a inactivação da actividade desta quinase, com um inibidor específico, levou à supressão da proliferação celular e à morte das células resistentes por apoptose. Desta forma, foi demonstrada pela primeira vez a importância da LYN quinase na resistência ao IM independente de BCR-ABL. Estudos realizados em amostras de doentes resistentes ao IM demonstraram, mais uma vez, a relação entre as SRC quinases e a resistência independente da actividade da proteína BCR-ABL (Donato *et al.*, 2004).

Posteriormente, vários trabalhos foram publicados que não só confirmam o envolvimento da sobre-expressão das SRC quinases na resistência ao IM, como também tentam explicar quais as vias mediadas pela activação destas quinases que permitem a sobrevivência das células na presença do fármaco (Ptasznik *et al.*, 2004, O'Hare *et al.*, 2008, Wu *et al.*, 2008, Samanta *et al.*, 2009). Além disso, a activação de outras vias alternativas independentes da activação da proteína BCR-ABL têm sido propostas como determinantes para a resistência (Agarwal *et al.*, 2008, Aceves-Luquero *et al.*, 2009).

Dada a relevância clínica deste mecanismo de resistência ao IM algumas moléculas que inibem simultaneamente a quinase BCR-ABL e as quinases SRC, como o Dasatinib, o

Bosutinib (SKI-606) e o NS-187 (INNO-146), encontram-se neste momento na fase de ensaios clínicos (Shah *et al.*, 2004, Puttini *et al.*, 2006, Niwa *et al.*, 2007).

#### **1.2.2.5. Expansão clonal**

A expansão clonal de células estaminais hematopoiéticas refractárias ao tratamento com IM foi também proposta como um mecanismo de resistência independente da proteína BCR-ABL (Graham *et al.*, 2002, An *et al.*, 2010). Em cerca de 95% dos doentes que respondem ao tratamento com IM é possível detectar uma quantidade residual de células BCR-ABL positivas (Apperley, 2007). A presença destas células é o resultado da característica refractária das células estaminais hematopoiéticas BCR-ABL<sup>+</sup> ao IM (Savona e Talpaz, 2008). Entre outros, os mecanismos propostos para explicar a resistência intrínseca destas células ao IM foram o seu carácter quiescente, a sobreexpressão de BCR-ABL ou a alteração da expressão de proteínas transmembranares que medeiam o influxo e efluxo do fármaco (Volpe *et al.*, 2009). Como descrito anteriormente, a actividade quinásica desregulada da proteína BCR-ABL provoca instabilidade genómica e, conseqüentemente, pode levar à acumulação de mutações em diversos genes envolvidos nos mecanismos de sobrevivência celular (Sallmyr *et al.*, 2008). Deste modo, com o passar do tempo, as células estaminais hematopoiéticas BCR-ABL positivas residuais podem acumular mutações em genes determinantes para a sobrevivência celular o que, pela selecção destes clones pela presença de IM, confere resistência ao fármaco e permite a progressão da doença.

### **1.3. Objectivos**

Apesar dos promissores resultados obtidos durante os ensaios clínicos no tratamento da LMC com IM, o aumento da percentagem de doentes que adquire resistência no decurso do tratamento tornou-se um grave problema terapêutico. Assim, tornou-se fundamental a caracterização dos mecanismos moleculares que conferem resistência ao fármaco.

Com o objectivo de estudar potenciais mecanismos de resistência ao IM foi estabelecido no laboratório um modelo de células humanas leucémicas K562 resistentes à concentração 5 $\mu$ M do fármaco. Numa primeira fase, o objectivo do trabalho foi determinar se o mecanismo pelo qual estas células eram resistentes ao IM era algum dos mecanismos previamente descritos na literatura. Após a análise dos resultados obtidos foi delineado um estudo exploratório com o objectivo de identificar alterações em algumas vias de transdução

de sinal potencialmente envolvidas na aquisição de resistência ao IM nas células resistentes ao fármaco. Assim, foram seleccionadas moléculas alvo envolvidas nos mecanismos de apoptose e proliferação celular que pudessem indicar alterações responsáveis pela sobrevivência destas células na presença de IM. Foram feitos ensaios celulares, quantificação da expressão de genes e quantificação de proteínas. Posteriormente, com o objectivo de determinar se havia um aumento da instabilidade genómica nas células resistentes ao IM, foi estudada a produção endógena de espécies reactivas de oxigénio e alterações nos mecanismos de reparação de DNA.

A validação de resultados obtidos com o modelo *in vitro* foi posteriormente, e quando possível, efectuada em amostras de doentes sensíveis ao tratamento com IM e em amostras de doentes que, no decurso da terapêutica, adquiriram resistência ao fármaco.

Pretende-se que este trabalho seja o ponto de partida para um estudo mais aprofundado do papel das vias de sinalização na resistência ao IM.



## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Reagentes, material suplementar e equipamento

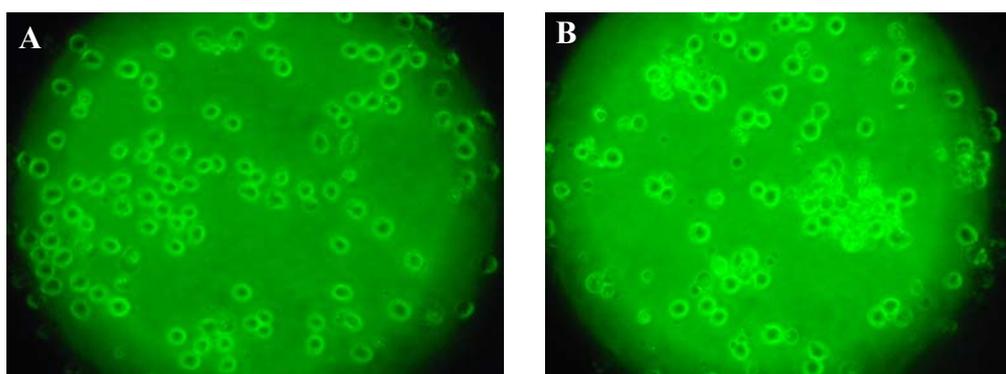
Os reagentes, materiais e equipamentos utilizados no decurso do trabalho encontram-se discriminados no Anexo I.

### 2.2. Amostras

#### 2.2.1. Linha Celular K562

Para a realização deste trabalho foi utilizada a linha celular humana K562 (DSMZ, Alemanha), aqui designada como *Wild Type* (K562-WT). A linha K562 foi estabelecida a partir da efusão pleural de uma doente de 53 anos com LMC em CB (Lozzio e Lozzio, 1975). O cariótipo das células K562 apresenta alguma complexidade, com várias alterações cromossómicas quer numéricas, quer estruturais<sup>1</sup>. Estas células possuem a translocação t(9;22) (q34;q11) que origina o cromossoma Ph, e por isso, expressam naturalmente o transcrito de fusão *BCR-ABL* (b3a2) que pode ser detectado por PCR em Tempo Real.

Morfologicamente as células K562 possuem uma forma arredondada e podem ter um tamanho variável (Figura 9A). Em cultura encontram-se individualmente em suspensão e o tempo de duplicação varia entre 30 a 40 horas. A maioria destas células são blastos indiferenciados mononucleados que podem adquirir características semelhantes às de células nas fases iniciais da diferenciação mielóide.



**Figura 9** - **A.** Fotografia das células K562-WT em cultura captada com um microscópio de inversão de fases (TMS, Nixon) com ampliação 200x. **B.** Fotografia das células K562-R em cultura captada com um microscópio de inversão de fases (TMS, Nixon) com ampliação 200x.

---

<sup>1</sup> [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)

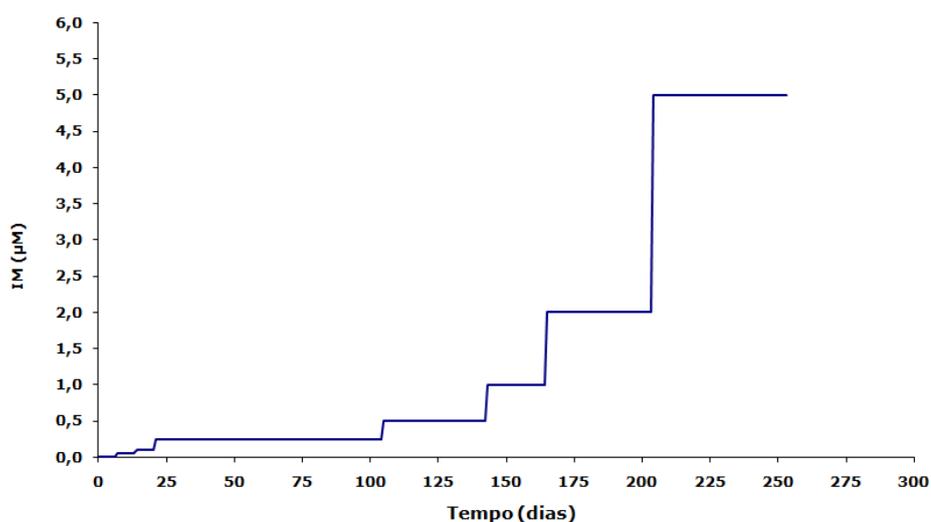
### 2.2.2. Linha Celular K562 Resistente a 5 $\mu$ M de Imatinib

Com o objectivo de estudar os mecanismos de resistência ao IM, antes do início deste trabalho foi seleccionada no laboratório uma subpopulação de células K562 resistentes a 5 $\mu$ M de IM (K562-R).

Sucintamente, esta linha foi estabelecida em resultado da exposição crónica a concentrações crescentes de IM, desde 0,05 $\mu$ M até à concentração de 5 $\mu$ M (Figura 10). Determinou-se que as células atingiam resistência a uma determinada concentração de IM quando a taxa de divisão celular na presença dessa concentração era idêntica à taxa de divisão das células parentais não tratadas com o fármaco. Quando atingida a resistência a uma dada concentração de IM, uma parte da população de células dava início a uma nova subcultura com uma concentração mais elevada do fármaco. Desta forma, estabeleceu-se a linha K562 resistente a 5 $\mu$ M IM, utilizada neste trabalho como modelo de células leucémicas resistentes.

Morfologicamente as células K562-R apresentam uma forma irregular e um tamanho bastante variável (Figura 9B). Em cultura estas células encontram-se em suspensão mas, ao contrário das células K562-WT, observa-se uma tendência para a formação de agregados.

A sequenciação do domínio tirosina quinase do gene BCR-ABL foi feita antes do início deste trabalho de acordo com o procedimento descrito no artigo (Branford e Hughes, 2006).



**Figura 10.** Cronologia da selecção da linha K562 resistente ao IM. As células foram incubadas com concentrações crescentes de IM começando com 0,05 $\mu$ M até 5 $\mu$ M.

### 2.2.3. Amostras de doentes

As amostras de doentes estudadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pelo Centro de Genética Clínica (CGC) do Porto. Este estudo foi submetido e aprovado pelo conselho de ética do CGC e, de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo conselho com base na Declaração de Helsínquia, foi previamente obtido o consentimento informado de todos os doentes que integram o estudo. O anonimato foi garantido pela codificação das amostras dos dadores.

Neste trabalho foram incluídos 22 doentes com LMC Ph<sup>+</sup>, 11 sensíveis ao tratamento com IM (DS) e 11 resistentes sem mutação no domínio quinase do gene *BCR-ABL* nos quais o mecanismo de resistência ao IM é desconhecido (DR). Na tabela 3 encontra-se a informação dos doentes relativamente ao género, idade de diagnóstico, transcrito de fusão e percentagem de BCR-ABL. Todos os doentes cujas amostras foram seleccionadas encontravam-se na FC da doença aquando da colheita.

**Tabela 3** - Características dos doentes com LMC usados como amostra neste estudo. ID - Identificação codificada da amostra; DS - doentes sensíveis ao tratamento com IM; DR - doentes resistentes ao tratamento com IM sem mutação no domínio tirosina quinase do gene *BCR-ABL*.

ID	Género	Idade de diagnóstico	Transcrito de fusão	% BCR-ABL
DS-1	♀	62	b3a2	0
DS-2	♀	46	b2a2; e1a2	2,6
DS-5	♂	65	b3a2	0
DS-8	♀	30	b2a2	4,8
DS-10	♂	37	b2a2	0,62
DS-12	♂	71	b3a2	0,86
DS-14	♂	65	b3a2	0
DS-15	♀	68	b3a2	0,17
DS-17	♂	74	b2a2	0
DS-18	♂	41	b3a2; e1a2	0
DS-20	♀	75	b2a2	0
DR-1	♂	76	b2a2	100
DR-2	♀	44	b3a2	26
DR-3	♂	77	b3a2	72,61
DR-4	♀	67	b3a2	21,85
DR-5	♀	59	b2a2	100
DR-6	♂	50	b3a2	100
DR-7	♂	48	b2a2	89,20
DR-9	♀	?	p210	54,35
DR-11	♂	?	p210	100
DR-12	♂	?	p210	18,07
DR-14	♂	59	p210	100

## **2.3. Manuseamento e processamento de amostras**

### **2.3.1. Cultura de células**

As células K562-WT e K562-R foram mantidas em cultura com meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de penicilina/estreptomicina, numa atmosfera com 5% CO<sub>2</sub>, a 37°C. Às células K562-R adicionou-se IM numa concentração final de 5µM. O meio foi substituído por meio fresco, duas vezes por semana, e a cultura celular foi diluída para uma densidade de aproximadamente 0,1-0,5x10<sup>6</sup> células/ml.

### **2.3.2. Contagem de células**

Após uma centrifugação a 400xg (Centric 322, Technica), as células foram ressuspendidas em 1ml de meio a partir do qual se prepararam duas diluições independentes com a mesma taxa de diluição. As contagens foram feitas com um hematocítmetro manual (Câmara de Neubauer), por dois operadores distintos, no microscópio óptico Dialux 20-Leitz com uma ampliação de 500 vezes.

O número de células contadas na câmara do hematocítmetro foi multiplicado pela taxa de diluição e posteriormente, sabendo que o volume da câmara é 1x10<sup>-4</sup> cm<sup>3</sup>, calculou-se o número de células presentes em 1ml de suspensão.

### **2.3.3. Extração de proteínas totais**

As células foram lavadas 2 vezes com PBS (*Phosphate buffered saline*) a 4°C e posteriormente foi-lhes adicionado a solução tampão de lise (Anexo II) numa proporção de 500µl por cada 1x10<sup>7</sup> células e ressuspendeu-se. Incubou-se em gelo durante 20 minutos e, após uma centrifugação a 10600xg (Centrifuge 5417R, Eppendorf), voltou-se a incubar durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas em suspensão foi recolhido e acondicionado a -80°C.

### **2.3.4. Quantificação de proteínas**

A quantificação de proteínas totais foi feita pelo método de Bradford, com o corante *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad), segundo o protocolo *Microassay procedure* do fabricante. Foi utilizada como referência uma curva padrão preparada a partir de uma solução *stock* de BSA (*Bovine serum albumin*) (10mg/ml).

Resumidamente, adicionou-se o corante *Bio-Rad Protein Assay* a cada amostra numa proporção de 1:5. Após uma incubação durante 15 minutos à temperatura ambiente foi lida a absorvância no *Nanodrop ND 1000* (Thermo Scientific) a 595nm. Cada amostra foi quantificada 5 vezes.

### **2.3.5. Extracção de RNA**

Para a extracção de RNA de todas as amostras utilizou-se o *AllPrep RNA/DNA/Protein Mini Kit* (Qiagen). Inicialmente as células foram lisadas com a solução tampão RLT disponibilizada no *kit*, à qual se adicionou 1% de  $\beta$ -Mercaptoetanol, numa proporção de 350 $\mu$ l por cada  $5 \times 10^6$  células. A extracção prosseguiu rigorosamente de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, cada amostra foi passada sequencialmente pelas diferentes colunas com as respectivas soluções tampão disponibilizadas no *kit*. O RNA em solução foi acondicionado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3.6. Quantificação de RNA**

O RNA foi quantificado por espectrofotometria a 260nm no *Nanodrop ND 1000* com o *software Nanodrop 1000 v3.7.1*. Para calcular a pureza da amostra foi também lida a absorvância a 280nm. Os cálculos da concentração de RNA bem como da pureza da amostra foram efectuados automaticamente pelo *software*.

### **2.3.7. Síntese de cDNA**

A conversão quantitativa de mRNA total para cDNA de cadeia simples foi feita com o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), de acordo com o protocolo do fabricante.

Para cada reacção de síntese preparou-se uma *mix* contendo 2 $\mu$ g de RNA (no caso das células K562) ou 500ng de RNA (no caso das amostras de doentes) num volume final de 10 $\mu$ l que se fez com água *RNase free*. A *Master Mix* contendo *RT Buffer*, *RT Random Primers*, *dNTP's*, a enzima *MultiScribe Reverse Transcriptase*, o inibidor de *RNases* e a água *RNase free* foi preparada num volume final de 10 $\mu$ l. Por último, adicionou-se aos 10 $\mu$ l da *mix* de RNA os 10 $\mu$ l da *Master mix* (volume reaccional de 20 $\mu$ l) e fez-se a reacção de síntese no termociclador *GeneAmp®PCR System 9700* (Applied Biosystems) com as condições discriminadas na tabela 4.

O cDNA contido nos 20µl de solução resultante da reacção de *Reverse Transcriptase-PCR* (RT-PCR) foi acondicionado a -20°C.

Para cada reacção de síntese preparou-se um controlo negativo sem RNA e um controlo sem a enzima *MultiScribe Reverse Transcriptase*, de modo a detectar contaminações ou falsos positivos.

**Tabela 4** - Condições do RT-PCR para a síntese de cDNA.

Nº Ciclos	Reacção	T (°C)	t (min)
1	Activação da enzima transcriptase reversa <i>MultiScribe Reverse Transcriptase</i>	25	10
1	Síntese de cDNA	37	120
1	Inactivação da enzima <i>MultiScribe Reverse Transcriptase</i>	85	5
1	Final da reacção	4	∞

## 2.4. PCR em Tempo Real

A caracterização do perfil de expressão de vários genes, discriminados na tabela 5.1, foi feita por PCR em Tempo Real com a tecnologia *TaqMan*<sup>®</sup> *Chemistry*. Este método tem por base, a actividade exonuclease 5'-3' da Taq DNA polimerase. Utiliza-se uma sonda de oligonucleótidos *TaqMan*, que híbrida com parte da sequência do gene de interesse, e *primers* específicos para o cDNA alvo. A sonda está marcada com um fluorocromo repórter na extremidade 5' cuja fluorescência é absorvida devido à proximidade espacial com um *quencher* na extremidade 3'. Durante a extensão dos primers a Taq DNA polimerase cliva a sonda libertando o fluorocromo e o *quencher*. O resultado é um aumento da fluorescência proporcional ao produto de PCR formado, o que permite a sua quantificação em tempo real.

O procedimento foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. Em resumo, inicialmente optimizou-se a quantidade de cDNA apropriada para cada *Gene Expression Assay* com base na taxa de eficiência de amplificação obtida a partir de uma curva de calibração. Para cada reacção preparou-se uma *mix* de cDNA e água autoclavada num volume final de 9µl por amostra. A 10µl de *TaqMan Gene Expression Master Mix* adicionou-se 1µl do *TaqMan Gene Expression Assay*, num volume final de 11µl. As duas *mix* foram adicionadas a cada poço de uma placa de 96 poços (o volume reaccional por poço de 20µl). A reacção de PCR foi feita no ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems) com as condições discriminadas na tabela 5.2.

**Tabela 5.1** - Lista dos *TaqMan Gene Expression Assay* e das suas características essenciais.

Gene	Assay ID	Proteína Codificada	Marcação	Ampliação (pb)
<i>MAP2K6</i>	Hs00992389_m1	Mitogen-activated protein kinase kinase 6	FAM	68
<i>GADD45G</i>	Hs00198672_m1	Growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	FAM	62
<i>DDIT3</i>	Hs01090850_m1	DNA-damage-inducible transcript 3	FAM	78
<i>BCL2</i>	Hs00608023_m1	B-cell CLL/lymphoma2	FAM	81
<i>BCL2L1</i>	Hs00236329_m1	BCL2-like 1	FAM	65
<i>BAX</i>	Hs99999001_m1	BCL2-associated X protein	FAM	85
<i>BCR-ABL1</i>	Hs03024541_ft	BCR-ABL	FAM	154
<i>MBD4</i>	Hs00187498_m1	Methyl-CpG binding domain protein 4	FAM	55
<i>NTH1</i>	Hs00959764_m1	Nth endonuclease III-like 1	FAM	62
<i>GusB</i>	4326320E	Beta-glucuronidase	VIC	81
<i>GAPDH</i>	4352934E	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	FAM	122

**Tabela 5.2** - Condições do PCR em Tempo Real para quantificação relativa da expressão de genes.

Ciclos	Reacção	T °C	tempo
1	Activação da enzima <i>Taq</i> polimerase	50	2min
1	Desnaturação	95	10min
40	Desnaturação	95	15seg
	<i>Annealing</i> e extensão	60	1min

A quantificação da expressão relativa foi feita pelo método de comparação dos  $C_T$ 's utilizando a fórmula aritmética:  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . Em resumo, fez-se a normalização da média dos valores de  $C_T$  do gene em estudo em função de um gene *housekeeping* ( $\Delta C_T$ ). De seguida, fez-se a normalização dos valores de  $\Delta C_T$  das amostras em estudo relativamente aos valores de

uma amostra calibradora de células K562 em P<sub>5</sub> ( $\Delta\Delta C_T$ ). Por fim, calculou-se o valor de  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  para cada amostra.

Para cada uma das amostras foram feitas 3 experiências independentes com três replicados em cada uma. Foi sempre feita a reacção de PCR para o controlo negativo e para o controlo sem enzima resultantes da reacção de síntese de cDNA.

## 2.5. RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array

Caracterizou-se o perfil de expressão de diferentes genes com a placa *Human DNA Damage Signaling RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array* (Qiagen) (a lista dos genes encontra-se no Anexo III). Esta tecnologia tem por base uma reacção de PCR em Tempo Real e permite estudar a expressão de 84 genes de interesse, 5 genes *housekeeping* e de 7 genes controlo para verificar a qualidade da reacção de síntese de cDNA e de PCR em Tempo Real. O protocolo foi seguido de acordo com as recomendações do fabricante.

A síntese de cDNA foi feita com 1,5µg de RNA, num volume reaccional de 20µl, com o *RT<sup>2</sup> First-Stand cDNA Synthesis Kit* (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. Após a reacção de síntese adicionou-se 91µl de água ao volume final.

Preparou-se a *mix* para adicionar à placa *RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array* com os reagentes discriminados na tabela 6.1.

**Tabela 6.1** – Reagentes da reacção de PCR em Tempo Real com a placa *Human DNA Damage Signaling RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array*.

Reagente	Volume (µl)
<i>2x SABiosciences RT<sup>2</sup> qPCR Master Mix</i>	1275
cDNA diluído	102
H <sub>2</sub> O	1173
<b>Volume total</b>	<b>2550</b>

Adicionou-se 25µl da *mix* a cada poço da placa e colocou-se a mesma no ABI PRISM 7300 com o programa discriminado na tabela 6.2. Para cada amostra foram feitos 3 replicados.

**Tabela 6.2** - Condições de tempo e temperatura utilizadas na reacção de PCR em Tempo Real.

Ciclos	Reacção	T (°C)	tempo
1	Desnaturação	95	10min
40	Desnaturação	95	15 seg
	<i>Annealing</i> e extensão	60	1min

Por fim, os resultados obtidos foram analisados no *software RT<sup>2</sup> PCR Data Analysis*, disponibilizado *online* pela Qiagen. A significância estatística é calculada automaticamente pelo *software* com o teste t de *Student*. Para efeitos de análise estatística considerou-se como amostra controlo, a linha K562-WT e como amostra de teste, a linha K562-R.

## 2.6. Western Blot

### 2.6.1. Electroforese SDS-Page

Após a adição do *Sample Loading Buffer* (Anexo II) as proteínas foram desnaturadas durante 5 minutos a 95°C. A quantidade de proteína por poço variou entre 30µg e 80µg consoante a proteína alvo. Para a electroforese foram utilizados géis de acrilamida *pre-cast* (*Mini-Protean TGX Precast gels*, Bio-Rad) com gradiente de concentração de 4-15% ou de 4-20%, consoante o mais adequado para a proteína em estudo. A electroforese foi efectuada a 200 volts com a solução tampão de electroforese 1x (Anexo II), durante o tempo necessário à separação das proteínas (20 a 40 minutos).

### 2.6.2. Transferência

Após a electroforese as proteínas foram transferidas do gel de acrilamida para uma membrana de PVDF (Millipore), previamente activada com metanol. A transferência foi feita durante 1 hora a 100 volts com a solução tampão de transferência 1x (Anexo II).

### 2.6.3. Imunodeteção de Proteínas.

A imunodeteção das proteínas foi feita com o *kit WesternDot™ 625 Goat Anti-Mouse Western Blot* da Invitrogen (quando o anticorpo primário a detectar era de rato) ou com o *kit WesternDot™ 625 Goat Anti-Rabbit Western Blot* da Invitrogen (quando o anticorpo primário era de coelho). Com excepção dos anticorpos primários todos os reagentes utilizados

neste passo são disponibilizados no *kit*. As lavagens foram feitas à temperatura ambiente, com agitação orbital, durante 5 minutos com a solução tampão de lavagem.

Imediatamente após a transferência a membrana de PVDF foi incubada com o agente bloqueador (adicionou-se 5% de *Amersham ECL Blocking Agent* da GE Healthcare quando o anticorpo primário era policlonal). De seguida, incubou-se com o anticorpo primário (Tabela 7). Lavou-se 3 vezes com a solução tampão de lavagem. Fez-se a incubação com o anticorpo secundário acoplado a biotina numa diluição de 1:2000. Lavou-se 3 vezes. Incubou-se com estreptavidina, numa diluição de 1:2000, que se encontra acoplada com um *Q-Dot* que emite fluorescência na presença de luz ultra violeta (UV). As membranas de PVDF foram irradiadas com radiação UV no transiluminador *Fluo.Link* da Vilber Lourmat, e fotografadas com a máquina fotográfica Fujifilm 55000 usando um filtro de UV *Jessop* de 55 milímetros.

**Tabela 7** - Lista dos anticorpos primários, e das suas características essenciais, utilizados na técnica *Western Blot*. A incubação com os anticorpos primários foi feita durante uma hora à temperatura ambiente com agitação orbital.

Anticorpo Primário	Peso molecular (kDa)	Diluição	Origem	Fabricante
<b>p-Crkl (Tyr207): 05-1058</b>	~39	1:1000	Coelho Monoclonal	MILLIPORE®
<b>β-Actin (C4): sc-47778</b>	~43	1:1000	Ratinho monoclonal	Santa Cruz Biotechnology®
<b>c-Abl (24-11): sc-23</b>	120 (c-Abl)	1:250	Ratinho monoclonal	Santa Cruz Biotechnology®
	210 (Bcr-Abl)			
<b>c-Myc (9E10): sc-40</b>	~67	1:1000	Ratinho monoclonal	Santa Cruz Biotechnology®
<b>PARP (H-250): sc-7150</b>	~116 (Intacta)	1:1000	Coelho Policlonal	Santa Cruz Biotechnology®
	~85 (Clivada)			
<b>SURVIVIN (D8): sc-17779</b>	~16,5	1:500	Ratinho monoclonal	Santa Cruz Biotechnology®
<b>MBD4 (H-300): sc-10753</b>	~64	1:1000	Coelho Policlonal	Santa Cruz Biotechnology®
<b>BCL2 (C-2): sc-7382</b>	~26	1:500	Ratinho monoclonal	Santa Cruz Biotechnology®
<b>BCL-XL (H-5): sc-8392</b>	~32	1:500	Ratinho monoclonal	Santa Cruz Biotechnology®
<b>BAX (2D2): sc-20067</b>	~21	1:500	Ratinho monoclonal	Santa Cruz Biotechnology®

## 2.7. Teste de viabilidade celular – MTS assay

A viabilidade celular foi determinada com o *CellTiter96<sup>®</sup>AQ<sub>ueous</sub> One Solution Cell Proliferation Assay* da Promega de acordo com o protocolo para micro-placas.

Resumidamente, colocou-se  $1 \times 10^4$  células em 95µl de meio por poço. De seguida, incubou-se cada poço com 5µl das respectivas concentrações dos químicos a testar, durante 48 horas, a 37°C, numa atmosfera húmida e com 5% de CO<sub>2</sub>. Para cada placa foi feito um controlo negativo e um controlo com a concentração do solvente DMSO.

No fim da incubação, aos 100µl de suspensão de células, adicionou-se 20µl de *CellTiter96<sup>®</sup>AQ<sub>ueous</sub> One Solution Cell Proliferation Assay* e fez-se uma nova incubação durante 3 horas, nas condições anteriores. A absorvância foi lida a 490nm no leitor de micro-placas de 96 poços ZENYTH 3100 da Anthos. Os valores de absorvância obtidos são directamente proporcionais ao número de células viáveis. Esta experiência foi repetida três vezes e de forma independente para cada amostra.

## 2.8. Quantificação da Morte Celular

A quantificação da percentagem de células em apoptose ou em necrose em cada uma das linhas celulares foi quantificada pela marcação simultânea com Anexina-FITC e Iodeto de Propídio (IP).

Após a contagem transferiu-se  $1 \times 10^6$  células para um novo tubo e lavou-se duas vezes com PBS a 4°C. Ressuspendeu-se o *pellet* em 1ml de solução tampão de ligação 1x (Anexo II). De seguida transferiu-se 200µl de cada uma das suspensões para novos tubos, aos quais se adicionou 10µl de Anexina V FITC (BD Pharmingen) e 4µl de IP de uma solução *stock* de 250µg/ml (Millipore). Após uma incubação de 15 minutos, no escuro e à temperatura ambiente, adicionou-se mais 200µl de solução tampão de ligação 1x. Fez-se uma nova incubação nas condições anteriores, agora durante 45 minutos. Por fim, as amostras foram lidas no citómetro de fluxo *BD FACSCalibur* (BD Biosciences) utilizando um laser de Árgon 15mW 488nm, com um filtro de emissão de 530/30nm (FL1) para a Anexina V-FITC e de 585/42nm (FL2) para o IP. A aquisição dos resultados foi feita com o *software CellQuest* e a análise no *software WinMDI*. Para cada amostra foram feitas duas experiências independentes.

## 2.9. Análise do Conteúdo de DNA

A análise do conteúdo de DNA foi efectuada com recurso ao citómetro de fluxo após marcação com IP. Após a contagem de células transferiu-se o volume equivalente a  $1 \times 10^7$  células para um novo tubo e lavou-se duas vezes com PBS a 4°C. A fixação e permeabilização das células foi feita com etanol a 70% (v/v) em PBS a 4°C, seguida de uma incubação de 1 hora à mesma temperatura. As células foram centrifugadas e adicionou-se a solução de IP ao *pellet* (Anexo II). Após a incubação fez-se a aquisição dos valores de fluorescência com o citómetro de fluxo *BD FACSCalibur*. Foram adquiridos cerca de 20000 eventos por amostra. Utilizou-se um laser de Árgon 15mW 488nm com um filtro de emissão de 585/42nm (FL2). A aquisição e análise dos resultados foram feitas com o programa *ModFit*. Para cada amostra foram feitas 6 experiências independentes.

## 2.10. Determinação da produção endógena de espécies reactivas de oxigénio

A produção endógena de espécies reactivas de oxigénio nas células K562-WT e K562-R foi determinada com o diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>-DA) da Molecular Probes.

Inicialmente as células foram lavadas 2 vezes e ressuspendidas em PBS aquecido a 37°C ao qual se adicionou-se DCFH<sub>2</sub>-DA numa concentração final de 10µM. As células foram incubadas durante 15 minutos, a 37°C, no escuro. Fez-se uma nova lavagem e o *pellet* foi ressuspendido novamente em PBS a 37°C e incubado a esta temperatura durante 35 minutos. A aquisição dos valores de fluorescência foi feita com o citómetro de fluxo *BD FACSCalibur* usando um laser de Árgon 15mW 488nm e um filtro de emissão de 530/30nm (FL1). Foram adquiridos cerca de 20000 eventos utilizando o *software CellQuest*. Os resultados foram posteriormente analisados com o *software WinMDI*. A fluorescência emitida pela molécula DCF é um indicador da quantidade de espécies reactivas de oxigénio intracelular. Neste ensaio foram feitas 4 experiências independentes para cada amostra.

## 2.11. Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios de expressão de genes, conteúdo de DNA e ROS foi efectuada recorrendo ao teste t de *Student*, comparando médias dos valores da linha K562-R e da linha K562-WT e assumindo uma distribuição Normal.

Nos ensaios de viabilidade celular (MTS) os valores foram tratados recorrendo a um modelo de *fit* não linear (Graphpad), calculando para cada linha celular o IC50 dos químicos utilizados e o *p value* pelo teste de F. Além disso foi aplicado o teste t de *Student* para comparar o valor médio da percentagem de sobrevivência de cada linha perante cada uma das concentrações em estudo.



### **3. Resultados**

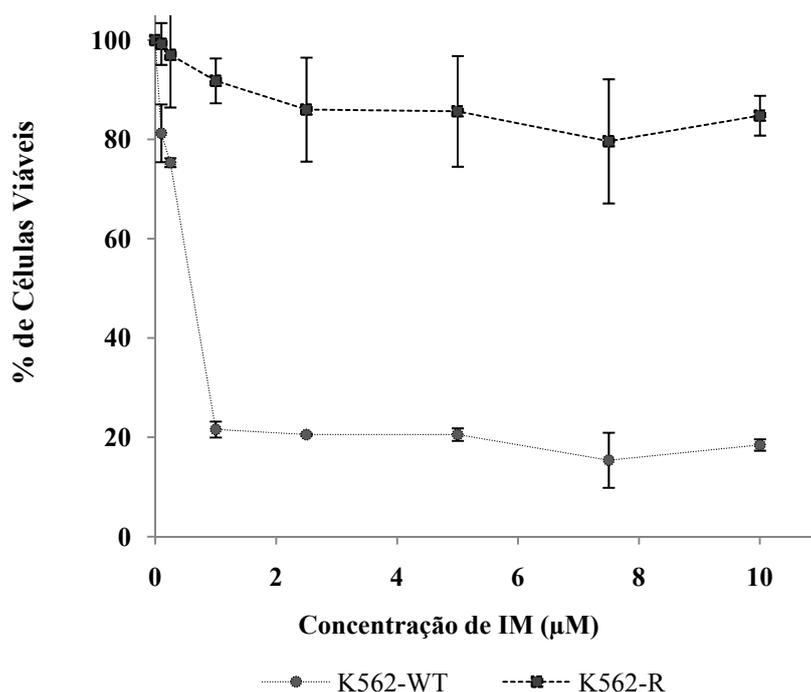
Com o objectivo de estudar potenciais mecanismos de resistência ao IM foi utilizada uma abordagem comparativa entre as células K562-WT e K562-R. Pretendeu-se, assim, encontrar diferenças entre as duas linhas que fossem indicativas dos potenciais mecanismos de resistência nas células K562-R. Os mecanismos sugeridos pelas diferenças entre as duas linhas foram posteriormente, quando possível, testados em amostras de doentes sensíveis e resistentes ao tratamento com IM.

Excepto quando mencionado, as células K562-R foram testadas após exposição crónica a 5µM de IM, uma vez que é neste contexto que surge a aquisição de resistência em doentes submetidos à terapêutica com o fármaco.

#### **3.1- Resistência ao Imatinib**

Para confirmar a aquisição de resistência ao IM nas células K562-R e aferir o nível de sensibilidade das células K562-WT ao fármaco foram estudadas as respostas das duas linhas celulares a diferentes concentrações de IM.

Os resultados mostram que baixas concentrações de IM levam à morte das células K562-WT ( $IC_{50}=0,59\mu M$ ), enquanto que a linha K562-R é resistente a concentrações até 10µM do fármaco (Figura 11). Na tabela 8 encontra-se o valor médio e respectivo desvio padrão da percentagem de sobrevivência das células K562-WT e K562-R a cada concentração de IM. A diferença entre a resposta de cada linha celular é estatisticamente significativa para todas as concentrações testadas. Curiosamente, apesar das células K562-R terem sido estabelecidas com uma concentração máxima em cultura de 5µM de IM, mantêm a resistência a concentrações até duas vezes superiores do fármaco (7,5µM e 10µM). Estes resultados indicam que a linha K562-R é resistente ao IM.



**Figura 11** - Percentagem de sobrevivência das células K562-WT e K562-R após a incubação durante 48 horas com diferentes concentrações de IM. As curvas de resposta das duas linhas celulares são estatisticamente diferentes ( $P < 0,0001$ , Teste F).

**Tabela 8** - Média, desvio padrão e significância estatística da percentagem de sobrevivência das células K562-WT e K562-R após 48 horas de incubação com diferentes concentrações de IM.

Concentração de IM (µM)	K562-WT (Média ± DP)	K562-R (Média ± DP)	<i>P value</i> (teste t de Student)
0	100 ± 0	100 ± 0	-
0,1	81,24 ± 5,81	99,24 ± 4,22	< 0,05
0,25	71,64 ± 0,89	97,03 ± 10,60	< 0,05
1	21,58 ± 1,61	91,81 ± 4,52	< 0,0005
2,5	20,55 ± 0,22	86,01 ± 10,47	< 0,005
5	20,56 ± 1,27	85,66 ± 11,14	< 0,005
7,5	15,39 ± 5,54	79,62 ± 12,51	< 0,01
10	18,47 ± 1,15	84,79 ± 15,21	< 0,0005

Após confirmação da aquisição de resistência na linha K562-R estudou-se a hipótese de algum dos mecanismos já descritos na literatura estarem presentes nesta linha celular.

## 3.2. Avaliação dos mecanismos de resistência ao IM descritos

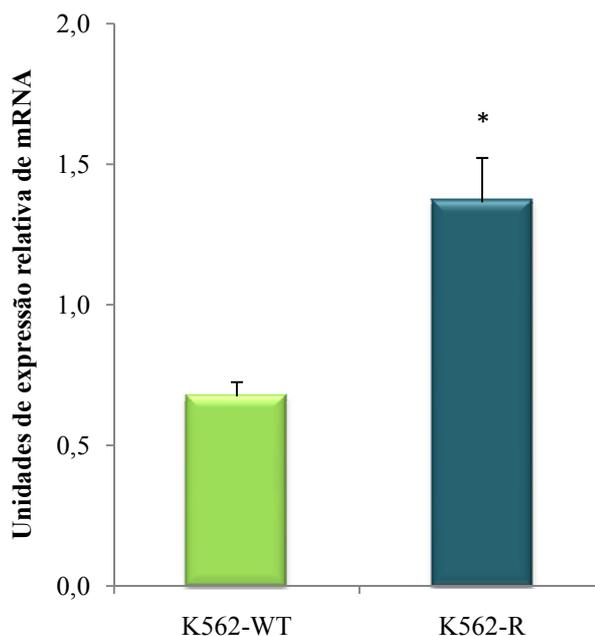
### 3.2.1. BCR-ABL

#### 3.2.1.1. Sequenciação do domínio tirosina quinase do gene *BCR-ABL*

A pesquisa de mutações pontuais após a sequenciação do domínio tirosina quinase do gene *BCR-ABL* mostrou não existir qualquer mutação neste domínio nas células K562-R.

#### 3.2.1.2. Expressão de transcritos do gene *BCR-ABL*

Os resultados obtidos por PCR em Tempo Real mostraram uma expressão duas vezes superior do gene *BCR-ABL* nas células K562-R comparadas com as células K562-WT ( $P < 0,005$ ) (Figura 12).



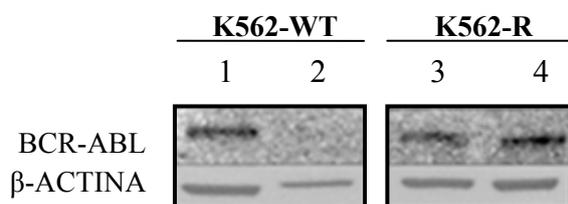
**Figura 12** – Valores da quantificação relativa de mRNA do gene *BCR-ABL* nas células K562-WT ( $0,7 \pm 0,05$ ) e K562-R ( $1,4 \pm 0,16$ ). \*  $P < 0,005$ , teste t de *Student* comparando K562-R com K562-WT.

#### 3.2.1.3. Expressão de proteína BCR-ABL

Para confirmar que a sobre-expressão de transcritos do BCR-ABL se traduzia numa sobre-expressão da proteína BCR-ABL, fez-se uma análise por Western Blot dos extractos

proteicos das duas linhas celulares. Observou-se que a quantidade de proteína BCR-ABL nas células K562-WT e K562-R é semelhante (Figura 13 – linha 1 e 3).

Para estudar o efeito do IM na expressão da proteína as células K562-WT foram incubadas com 1 $\mu$ M do fármaco e as células K562-R cultivadas na ausência do mesmo. A incubação das células parentais com IM levou a que não fosse possível observar BCR-ABL nesta amostra (Figura 13 – linha 2) enquanto que nas células K562-R cultivadas na ausência de IM, se observou um ligeiro aumento na quantidade de BCR-ABL (Figura 13 – linha 4).



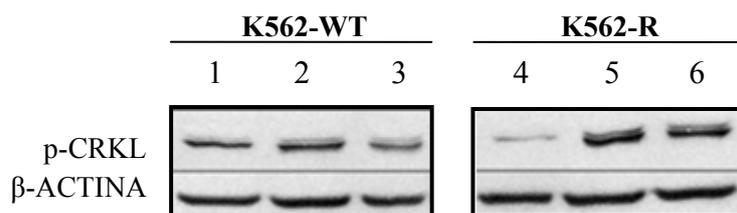
**Figura 13** – Análise por Western Blot da proteína BCR-ABL em 80 $\mu$ g de lisados totais das células K562-WT (1) e K562-R (3). O efeito do IM nas células K562-WT foi estudado incubando estas células com 1 $\mu$ M de IM durante 48 horas (2). O efeito da ausência de IM na cultura de células K562-R foi estudado ao retirar o fármaco por um período 48h (4). A marcação da  $\beta$ -ACTINA foi utilizada como controlo da quantidade de proteína.

#### 3.2.1.4. Actividade da proteína BCR-ABL

O estudo da actividade da proteína BCR-ABL em ambas as linhas celulares foi feito indirectamente pela análise da fosforilação da proteína CRKL, um substrato da tirosina quinase.

Observou-se que as células K562-R, expostas de forma crónica à presença de IM, possuíam uma quantidade acentuadamente mais baixa da proteína CRKL fosforilada quando comparadas com as células da linha parental (Figura 14 – linha 4 e 1, respectivamente).

Colocou-se a hipótese de que a diminuição de p-CRKL observada na linha resistente seria resultado do efeito inibitório do IM presente no meio de cultura destas células. Assim, as células K562-R foram incubadas na ausência do fármaco durante 6 e 48 horas. Os resultados corroboram a hipótese anteriormente colocada, uma vez que na ausência de IM se observou um aumento acentuado da quantidade de proteína p-CRKL (Figura 14 – linhas 5 e 6, respectivamente). Tal como previamente descrito, a incubação das células parentais com IM resultou na diminuição de p-CRKL em consequência da inibição da actividade da BCR-ABL (Figura 14 – linha 3).

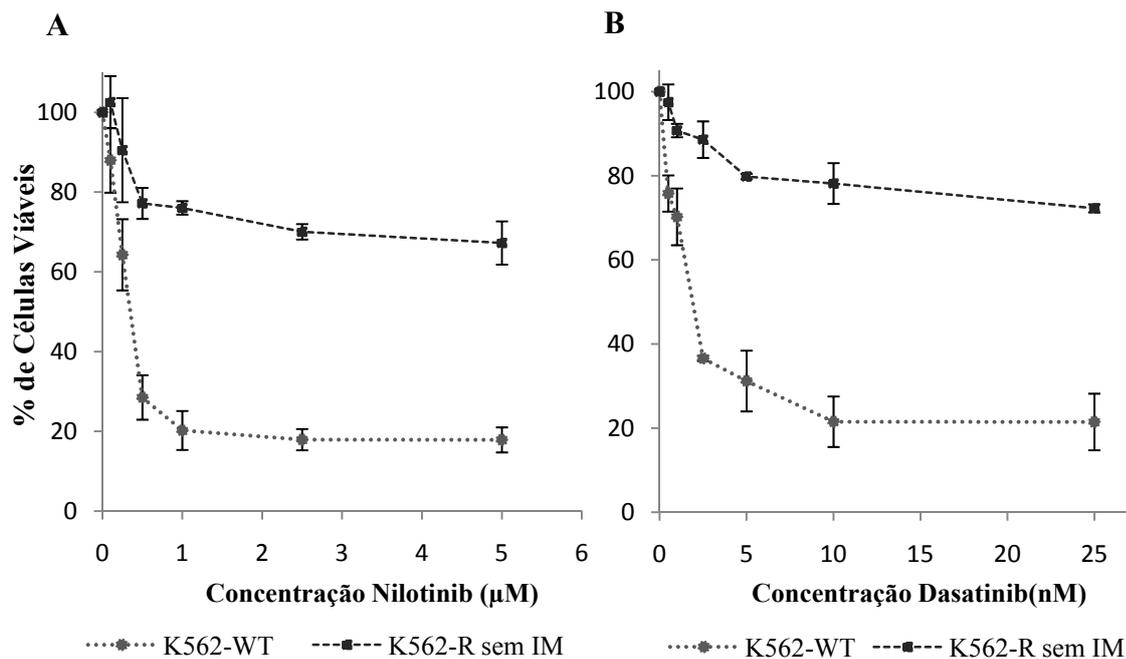


**Figura 14** – Análise por Western Blot da proteína CRKL fosforilada em 30µg de lisados totais das células K562-WT (1) e K562-R (4). O efeito do IM nas células K562-WT foi estudado incubando estas células com 1µM de IM durante 6 horas (2) e 48 horas (3). O efeito da ausência de IM na cultura de células K562-R foi estudado ao retirar o fármaco por um período de 6h (5) e 48h (6). A marcação da proteína β-ACTINA foi utilizada como controlo.

O conjunto de resultados anteriores sugeriu estarmos perante um mecanismo de resistência independente da actividade de BCR-ABL. Para testar esta hipótese foram realizados ensaios celulares em que as duas linhas foram incubadas com inibidores de tirosina quinase de segunda geração, o Nilotinib e o Dasatinib. Durante o período de incubação com Nilotinib ou com Dasatinib foi retirado o IM às células K562-R, a fim de evitar a competição para os locais de ligação ao domínio catalítico da proteína.

A incubação com baixas concentrações quer de Nilotinib (Figura 15A) quer de Dasatinib (Figura 15B) resultou numa diminuição acentuada da sobrevivência das células K562-WT ( $IC_{50}=0,41\mu M$  e  $IC_{50}=2nM$ , respectivamente). Pelo contrário, observou-se resistência aos dois fármacos nas células K562-R sem IM, onde a percentagem de sobrevivência não desceu além dos 70%, mesmo perante concentrações já consideradas tóxicas para as células.

A comparação dos valores de sobrevivência de cada linha, para cada concentração dos fármacos, é na grande maioria dos casos, estatisticamente significativa (Tabela 9 – Nilotinib; Tabela 10 – Dasatinib).



**Figura 15- A:** Percentagem de sobrevivência celular perante diferentes concentrações de Nilotinib nas células K562-R e K562-R 48h sem IM. As curvas de resposta das duas linhas celulares são estatisticamente diferentes ( $P < 0,0001$ , Teste F). **B:** Percentagem de sobrevivência celular perante diferentes concentrações de Dasatinib nas células K562-R e K562-R 48h sem IM. As diferenças entre as duas curvas de resposta são estatisticamente significativas ( $P < 0,0001$ , Teste F).

**Tabela 9-** Média e desvio padrão da percentagem de sobrevivência das células K562-WT e K562-R sem IM após a incubação com concentrações crescentes de Nilotinib.

Concentração de Nilotinib (µM)	K562-WT (Média ± DP)	K562-R sem IM (Média ± DP)	<i>P</i> value (teste t de Student)
0	100	100	-
0,1	87,94 ± 8,1	102,55 ± 6,5	> 0,05
0,25	64,26 ± 8,9	90,50 ± 13,1	> 0,05
0,5	28,49 ± 5,6	77,16 ± 3,9	< 0,01
1	20,21 ± 4,9	76,03 ± 1,7	< 0,0005
2,5	17,92 ± 2,7	70,04 ± 1,9	< 0,0001
5	17,86 ± 3,1	67,23 ± 5,4	< 0,01

**Tabela 10-** Média e desvio padrão da percentagem de sobrevivência das células K562-WT e K562-R sem IM após a incubação com concentrações crescentes de Dasatinib.

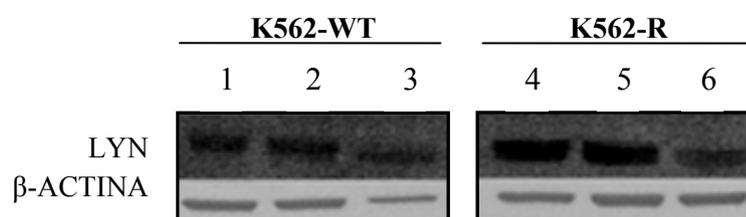
Concentração de Dasatinib (nM)	K562-WT (Média ± DP)	K562-R sem IM (Média ± DP)	P value (teste t de Student)
0	100	100	-
0,5	75,77 ± 4,3	97,48 ± 4,2	< 0,05
1	70,22 ± 6,7	90,74 ± 1,6	< 0,05
2,5	36,59 ± 0,6	88,57 ± 4,2	< 0,005
5	31,20 ± 7,2	79,81 ± 1,2	< 0,01
10	21,52 ± 6	78,16 ± 4,8	< 0,01
25	21,47 ± 6,7	72,24 ± 1	< 0,001

### 3.2.2. Expressão de LYN quinase

Os resultados anteriores confirmam a existência de um mecanismo de resistência ao IM independente do BCR-ABL nas células K562-R. Uma vez que a sobre-expressão de LYN quinase em células resistentes ao IM é um dos mecanismos de resistência independente de BCR-ABL mais descrito, fomos avaliar a sua expressão nas duas linhas.

O estudo por Western Blot desta proteína mostrou que as células K562-R expressam mais LYN quinase que o controlo (Figura 16 – linha 4 e 1, respectivamente).

Similarmente ao observado com a proteína BCR-ABL, a incubação das células K562-WT com 1µM de IM durante 48 horas leva à diminuição da proteína LYN (Figura 16 – linha 3). No entanto, ao contrário do descrito em trabalhos anteriores (Donato *et al.*, 2003), no nosso modelo a remoção do IM do meio de cultura das células K562-R resulta também na diminuição de LYN quinase (Figura 16 – linha 6).

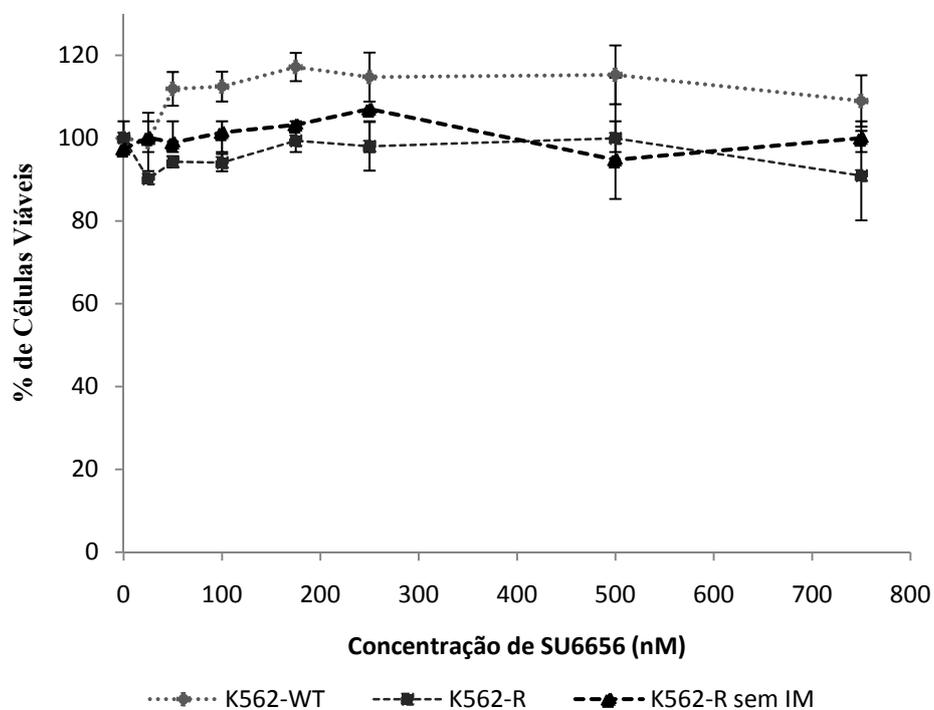


**Figura 16** – Análise por Western Blot da proteína LYN em 80µg de lisados totais das células K562-WT (1) e K562-R (4). O efeito do IM nas células K562-WT foi estudado incubando estas células com 1µM de IM durante 6 horas (2) e 48 horas (3). O efeito da ausência de IM na cultura de células K562-R foi estudado ao retirar o fármaco por um período de 6h (5) e 48h (6). A marcação da β-ACTINA foi utilizada como controlo da quantidade de proteína.

Para testar se o aumento de LYN quinase é determinante para a sobrevivência das células K562-R na presença de IM, as células foram incubadas com diferentes concentrações do inibidor de SRC quinases SU6656 (Figura 17). Apesar do IC50 do SU6656 para a LYN quinase ser 170nM, concentrações até 800nM do inibidor não alteraram a sobrevivência das células de ambas as linhas celulares.

As células K562-R sem IM foram também estudadas para avaliar se a diminuição da quantidade de LYN quinase observada por Western Blot teria efeito ao nível da sobrevivência. Apesar das diferenças acentuadas na quantidade de proteína LYN entre estas células e as K562-R na presença de IM, a percentagem de sobrevivência entre as duas amostras foi muito semelhante (Figura 17).

Na tabela 11, encontram-se os valores médios e desvio padrão da percentagem de sobrevivência das células K562-WT e K562-R para cada concentração de SU6656. Salvo para uma concentração não se observam diferenças estatisticamente significativas. O mesmo acontece quando se comparam as respostas das células K562-R e K562-R sem IM (Tabela 12).



**Figura 17-** Percentagem de sobrevivência das células K562-WT, K562-R e K562-R sem IM após 48 horas de incubação com diferentes concentrações de SU6656.

**Tabela 11-** Média e desvio padrão da percentagem de sobrevivência das células K562-WT e K562-R perante concentrações crescentes de SU6656.

<b>Concentração de SU6656 (nM)</b>	<b>K562-WT (Média ± DP)</b>	<b>K562-R (Média ± DP)</b>	<b><i>P value</i> (teste t de Student)</b>
0	100,00	100,00	-
25	99,08 ± 7	90,12 ± 6,5	> 0,05
50	111,90 ± 4,1	94,28 ± 4,3	> 0,05
100	112,45 ± 3,6	94,09 ± 2,5	< 0,05
175	117,17 ± 3,4	99,36 ± 7	> 0,05
250	114,74 ± 5,9	98,02 ± 8,8	> 0,05
500	115,29 ± 7,1	99,95 ± 9,6	> 0,05
750	108,98 ± 6,2	90,94 ± 17,7	> 0,05

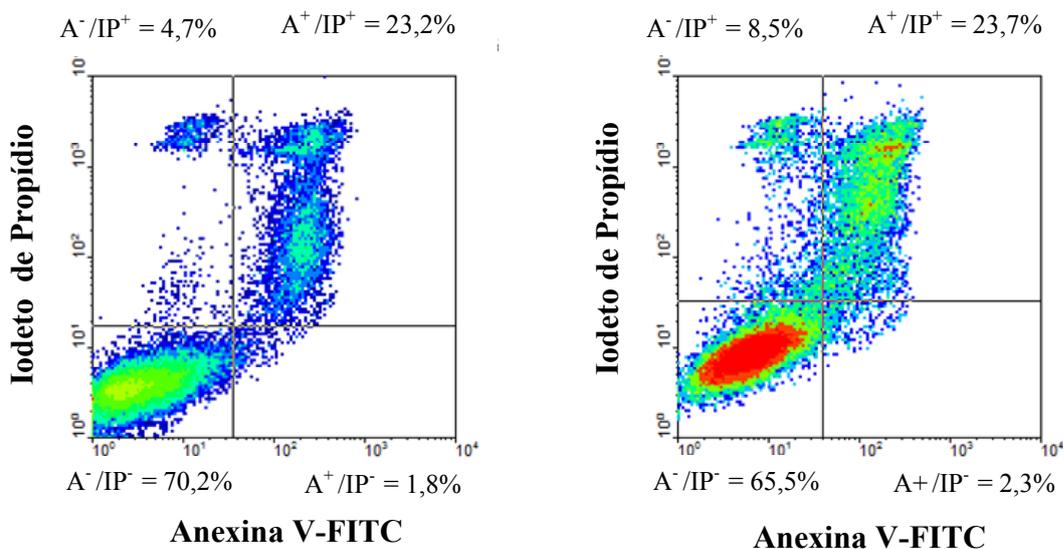
**Tabela 12-** Média e desvio padrão da percentagem de sobrevivência das células K562-R e K562-R sem IM durante 48 horas, perante concentrações crescentes de SU6656.

<b>Concentração de SU6656 (nM)</b>	<b>K562-R (Média ± DP)</b>	<b>K562-R 48h sem IM (Média ± DP)</b>	<b><i>P value</i> (teste t de Student)</b>
0	100	100	-
25	90,12 ± 6,5	97,39 ± 0,2	> 0,05
50	94,28 ± 4,3	100,18 ± 1,4	> 0,05
100	94,09 ± 2,5	98,88 ± 2,1	> 0,05
175	99,36 ± 7	101,36 ± 0,2	> 0,05
250	98,02 ± 8,8	103,22 ± 5,9	> 0,05
500	99,95 ± 9,6	107,02 ± 14,6	> 0,05
750	90,94 ± 17,7	94,76 ± 10,8	> 0,05

### 3.3. Análise de parâmetros de sobrevivência celular

#### 3.3.1. Quantificação da morte basal

A percentagem basal de morte, por apoptose e por necrose, de cada uma das linhas celulares em estudo foi quantificada por citometria de fluxo pela marcação com Anexina V FITC e IP. A figura 18 é representativa de três experiências independentes. Nas células K562-R o índice de morte, somando células apoptóticas e necróticas, é aproximadamente  $5 \pm 0,5\%$  superior às K562-WT.

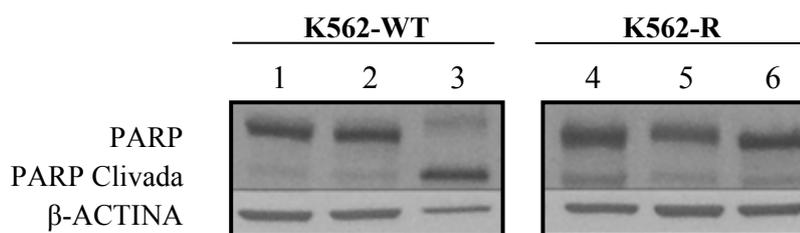


**Figura 18** - Marcação das células K562-WT e K562-R com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio.

A<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>-Células em apoptose tardia marcadas com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio; A<sup>-</sup>/IP<sup>+</sup>-Células necróticas sem marcação com Anexina V-FITC e com marcação de Iodeto de Propídio; A<sup>-</sup>/IP<sup>-</sup>- Células viáveis sem marcação com Anexina V-FITC nem Iodeto de Propídio; A<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup>- Células numa fase inicial da apoptose marcadas com Anexina V-FITC e sem marcação com Iodeto de Propídio.

Para estudar o efeito apoptótico associado à adição ou remoção de IM nas duas linhas celulares foi feita a análise por Western Blot da forma intacta e clivada da proteína PARP1 (Figura 19).

Observou-se um ténue aumento da quantidade de proteína PARP1 clivada nas células K562-R comparativamente com o controlo (Figura 19 – linhas 4 e 1, respectivamente) o que corrobora os resultados obtidos por citometria. A incubação das células parentais com IM induz apoptose, o que se traduz no acentuado aumento de proteína PARP clivada (Figura 19 – linha 3). Na linha K562-R sem IM houve um ligeiro decréscimo de proteína PARP clivada em relação às células resistentes incubadas de forma crónica com IM (Figura 19 – linhas 5 e 6).



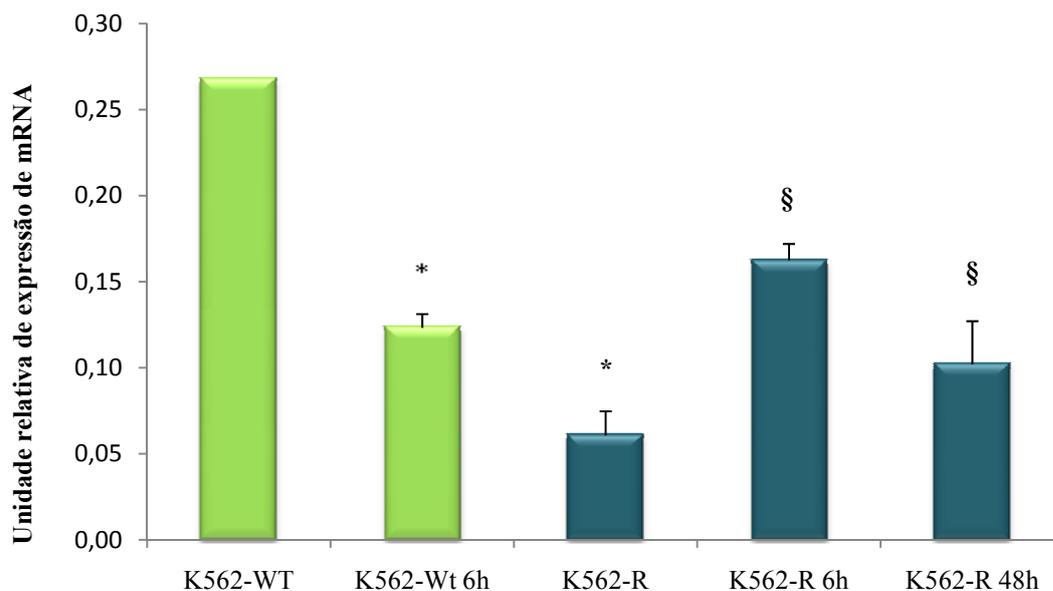
**Figura 19** – Análise por Western Blot da proteína PARP intacta e clivada em 80µg de lisados totais das células K562-WT (1) e K562-R (4). O efeito do IM nas células K562-WT foi estudado incubando estas células com 1µM de IM durante 6 horas (2) e 48 horas (3). O efeito da ausência de IM na cultura de células K562-R foi estudado ao retirar o fármaco por um período de 6h (5) e 48h (6). A marcação da proteína β-ACTINA foi utilizada como controlo.

### 3.3.2. Expressão de genes e proteínas envolvidos na apoptose

Dado que a incubação das células K562-WT com IM resulta em elevados níveis de apoptose, e que o mesmo não acontece nas células K562-R expostas de forma crónica ao fármaco, colocou-se a hipótese de existirem alterações na sinalização anti- e pró-apoptótica destas células que fossem responsáveis pela resistência ao IM.

O estudo da expressão do gene anti-apoptótico *BCL2* mostrou que a expressão de transcritos deste gene é aproximadamente 4,5 vezes inferior nas células K562-R comparativamente com a linha parental ( $P < 0,0001$ ) (Figura 20).

Com o objectivo de avaliar se a diminuição da expressão deste gene nas células resistentes era consequência da inibição da actividade quinase da proteína BCR-ABL, as células K562-WT foram incubadas com IM e as células resistentes privadas do contacto com o fármaco. Nas células K562-WT incubadas com 1µM de IM observou-se uma diminuição da expressão do gene de 2,3 vezes ( $P < 0,0001$ ). Por outro lado, quando o IM é removido do meio de cultura das células K562-R durante 6 e 48 horas, observa-se um aumento de expressão de 2,7 vezes ( $P < 0,05$ ) e 1,7 vezes ( $P < 0,05$ ), respectivamente, quando se compara com as células K562-R expostas ao IM de forma crónica.



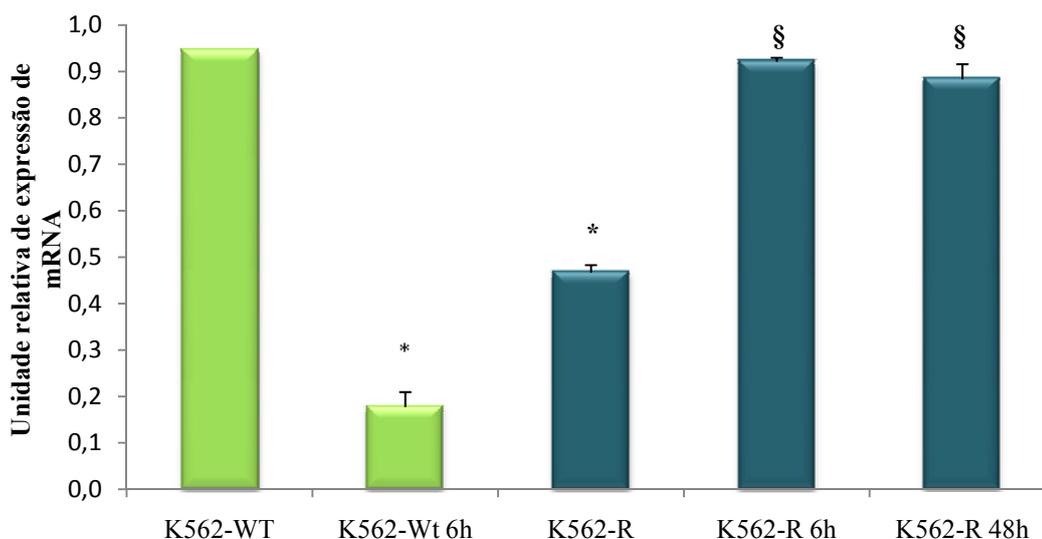
**Figura 20** – Valores da quantificação relativa da expressão de mRNA do gene *BCL2* nas células K562-WT (0,27±0,01), K562-WT incubadas 6 horas com 1µM de IM (0,12±0,01), K562-R (0,06±0,01), K562-R incubadas na ausência de IM durante um período de 6 horas (0,16±0,03) e 48 horas (0,10±0,01). \* P<0,0001, teste t de *Student* comparando K562-WT 6h e K562-R com K562-WT. § P<0,05, teste t de *Student* comparando K562-R 6h e K562-R 48h com K562-R.

O estudo da proteína BCL2 por Western Blot mostrou que as tendências observadas com as quantidades de mRNA eram na maioria dos casos semelhantes para as quantidades de proteína. Tal como os resultados anteriores sugeriram, as células K562-R possuem quantidades inferiores de proteína BCL2 comparativamente às células K562-WT (Figura 23A – linha 3 e 1, respectivamente). A remoção do IM do meio de cultura das células K562-R resulta no aumento da quantidade de proteína BCL2 quer ao fim de 6 horas, onde esta diferença é mais intensa (Figura 23A – linha 5), quer ao fim de 48 horas (Figura 23A – linha 6). No entanto, ao contrário do indicado pelos níveis de mRNA, observou-se que as células K562-WT com 1µM de IM possuem maior quantidade de proteína BCL2 do que o controlo K562-WT (Figura 23A – linha 1 e 3, respectivamente).

No que diz respeito ao gene anti-apoptótico *BCL-XL*, comparativamente com as células parentais, a expressão deste gene foi aproximadamente 2 vezes inferior na linha K562-R (P<0,0001) (Figura 21).

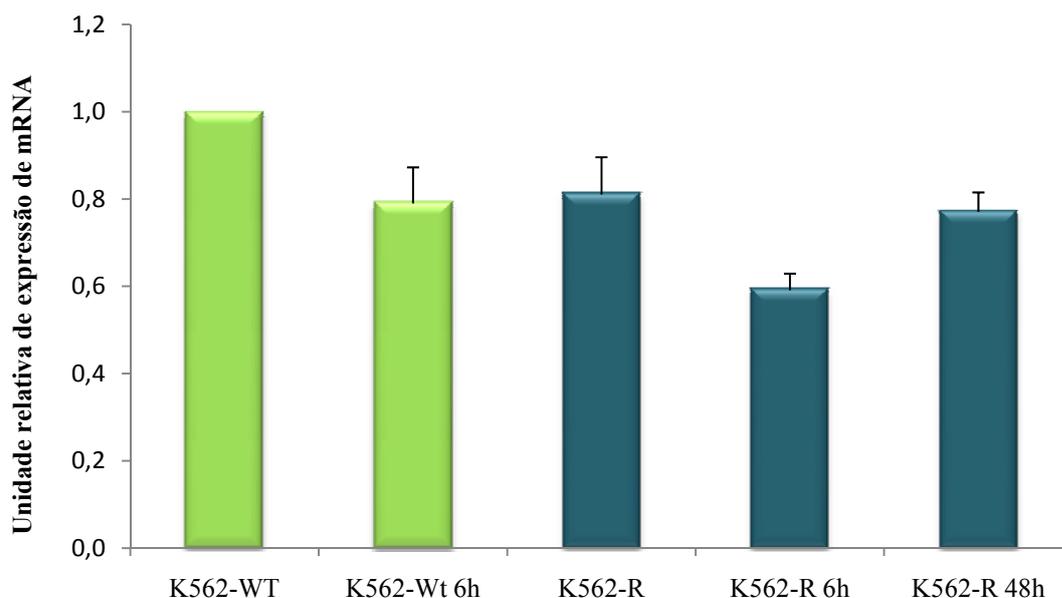
A incubação das células K562-WT com IM resultou numa diminuição da expressão de *BCL-XL* de cerca de 5 vezes ( $P<0,0001$ ) enquanto que, ao remover o IM do meio de cultura das células K562-R, o resultado foi um aumento de expressão do gene *BCL-XL* de aproximadamente 2 vezes ( $P<0,001$ ) para valores de expressão idênticos aos das células parentais.

A quantidade de proteína BCL-XL detectada nas amostras em estudo é, em parte, concordante com os resultados da expressão do gene. Os níveis de proteína BCL-XL são acentuadamente mais baixos nas células K562-R do que nas células K562-WT (Figura 23B – linha 3 e 1, respectivamente). Nas células resistentes ao IM cultivadas durante 6 horas na ausência do fármaco não é possível observar alterações na quantidade de proteína (Figura 23B – linha 5), no entanto, tal como acontece ao nível do mRNA, ao fim de 48 horas de incubação a quantidade de proteína BCL-XL aumenta comparativamente com as células resistentes expostas de forma crónica ao IM (Figura 23B – linha 6).



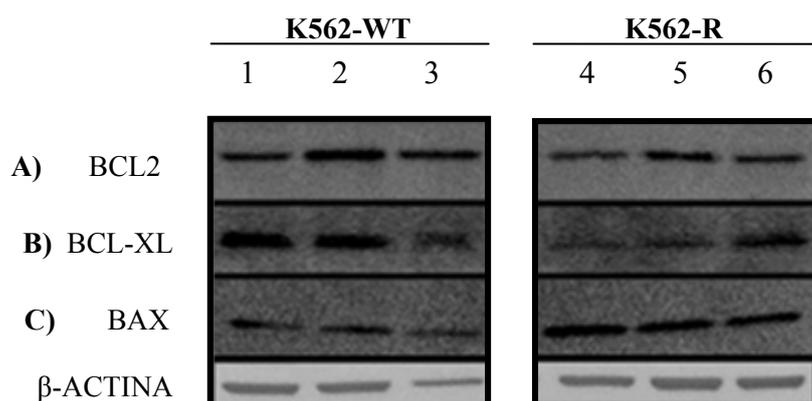
**Figura 21** – Valores da quantificação relativa da expressão de mRNA do gene *BCL-XL* nas células K562-WT ( $0,94\pm0,03$ ), K562-WT incubadas 6 horas com  $1\mu\text{M}$  de IM ( $0,18\pm0,02$ ), K562-R ( $0,47\pm0,01$ ), K562-R incubadas na ausência de IM durante um período de 6 horas ( $0,92\pm0,03$ ) e 48 horas ( $0,88\pm0,1$ ). \*  $P<0,0001$ , teste t de Student comparando K562-WT 6h e K562-R com K562-WT. §  $P<0,005$ , teste t de Student comparando K562-R 6h e K562-R 48h com K562-R.

Após a caracterização do perfil de expressão dos genes anti-apoptóticos *BCL2* e *BCL-XL* procedeu-se à quantificação relativa da expressão do gene pró-apoptótico *BAX* (Figura 22). A expressão deste gene não apresenta variações maiores ou iguais a duas vezes entre as diferentes amostras em estudo pelo que se considera não existirem variações significativas na sua expressão.



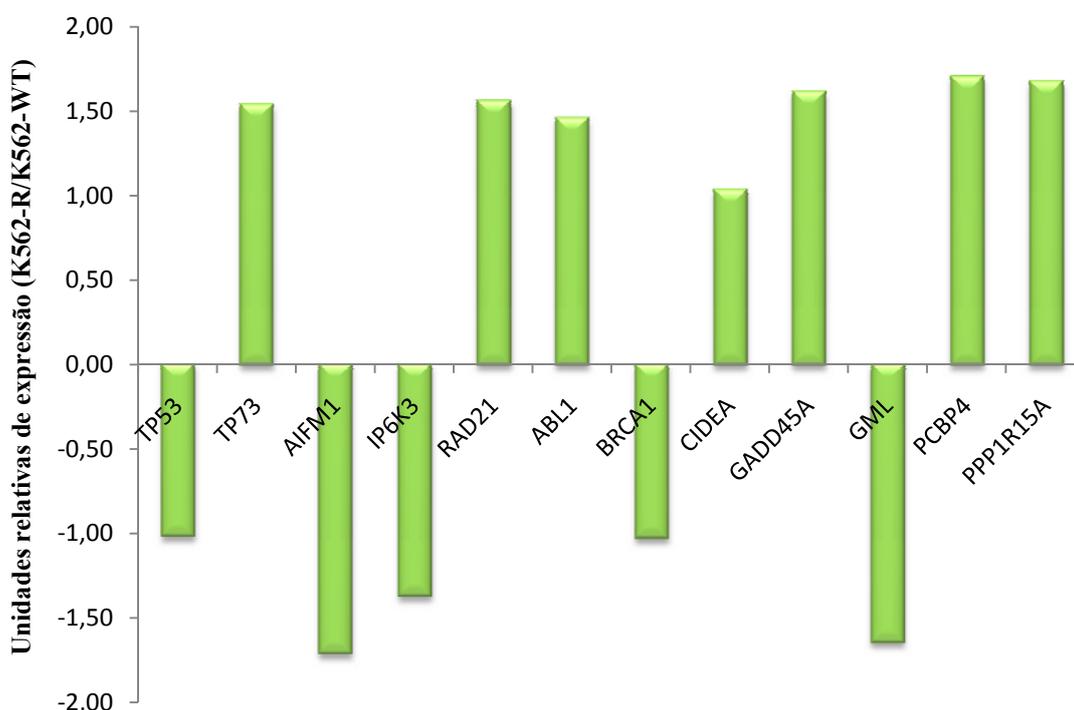
**Figura 22** – Valores da quantificação relativa da expressão de mRNA do gene *BAX* nas células K562-WT ( $1 \pm 0,08$ ), K562-WT incubadas 6 horas com  $1 \mu\text{M}$  de IM ( $0,79 \pm 0,09$ ), K562-R ( $0,81 \pm 0,04$ ), K562-R incubadas na ausência de IM durante um período de 6 horas ( $0,59 \pm 0,04$ ) e 48 horas ( $0,77 \pm 0,06$ ).

Independentemente da presença ou não de IM no meio de cultura das células K562-R, a quantidade de proteína BAX é acentuadamente maior nestas células do que nas células K562-WT (Figura 23C). Este resultado não reflecte o que acontece ao nível do mRNA onde as variações entre as duas populações de células não são significativas.



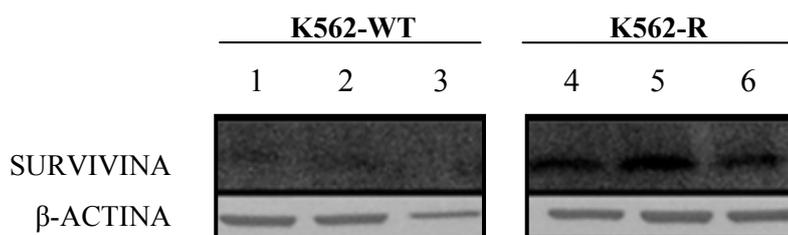
**Figura 23** – Análise por Western Blot das proteínas BCL2 (A), BCL-XL (B) e BAX (C) em  $80 \mu\text{g}$  de lisados totais das células K562-WT (1) e K562-R (4). O efeito do IM nas células K562-WT foi estudado incubando estas células com  $1 \mu\text{M}$  de IM durante 6 horas (2) e 48 horas (3). O efeito da ausência de IM na cultura de células K562-R foi estudado ao retirar o fármaco por um período de 6h (5) e 48h (6). A marcação da proteína  $\beta$ -ACTINA foi utilizada como controlo.

O estudo da regulação do mecanismo apoptótico nas células K562-R foi complementado com a avaliação da expressão de outros genes envolvidos na sinalização apoptótica (Figura 24). Apesar de vários dos 13 genes estudados apresentarem diferenças de expressão estatisticamente significativas entre a linha K562-WT e K562-R, apenas os genes com diferenças de expressão iguais ou superiores a duas vezes foram considerados relevantes neste trabalho. Assim, perante esta condição, nenhum dos genes estudados apresenta diferenças de expressão entre as duas populações de células.



**Figura 24** – Diferenças de expressão de mRNA nas células K562-R relativamente às K562-WT em diferentes genes envolvidos na morte celular por apoptose.

A expressão da proteína SURVIVINA da família das IAP's (*Inhibitor of Apoptosis*), cuja função é inibir a activação das CASPASES funcionando assim como um regulador negativo da apoptose, foi estudada por Western Blot. Os resultados apresentados na figura 25 mostram uma quantidade elevada de proteína SURVIVINA nas células resistentes ao IM comparativamente com as quantidades observadas nas células parentais. O condicionamento das linhas celulares com IM não altera a quantidade desta proteína o que sugere que a quantidade de SURVIVINA em cada linha celular é independente da presença ou ausência de IM.



**Figura 25** – Análise por Western Blot da proteína SURVIVINA em 80µg de lisados totais das células K562-WT (1) e K562-R (4). O efeito do IM nas células K562-WT foi estudado incubando estas células com 1µM de IM durante 6 horas (2) e 48 horas (3). O efeito da ausência de IM na cultura de células K562-R foi estudado ao retirar o fármaco por um período de 6h (5) e 48h (6). A marcação da proteína β-ACTINA foi utilizada como controle.

### 3.3.3. Estudo da expressão dos genes *BCL2* e *BCL-XL* em doentes

O envolvimento de proteínas anti-apoptóticas nos mecanismos de resistência a fármacos já foi descrito na literatura. Dado que os resultados obtidos *in vitro* com os modelos de células leucémicas sensíveis e resistentes ao IM indicaram diferenças significativas na expressão dos genes *BCL2* e *BCL-XL*, a expressão destes genes foi quantificada em amostras de doentes sensíveis ao fármaco e resistentes sem mutação no domínio tirosina quinase do gene *BCR-ABL*.

Os resultados da quantificação da expressão do gene *BCL2* em doentes estão representados na figura 26 onde a linha horizontal indica o valor da mediana e os pontos a distribuição dos valores individuais de expressão de cada doente. Apesar de, como indicaram os resultados *in vitro*, o valor da mediana ser mais elevado nos DS ao fármaco (mediana=6,2) do que nos DR (mediana=4,2), as diferenças entre os dois grupos não são estatisticamente significativas. O padrão de distribuição dos valores individuais dos doentes mostra que dentro de cada grupo de estudo os níveis de expressão do gene são muito variáveis.

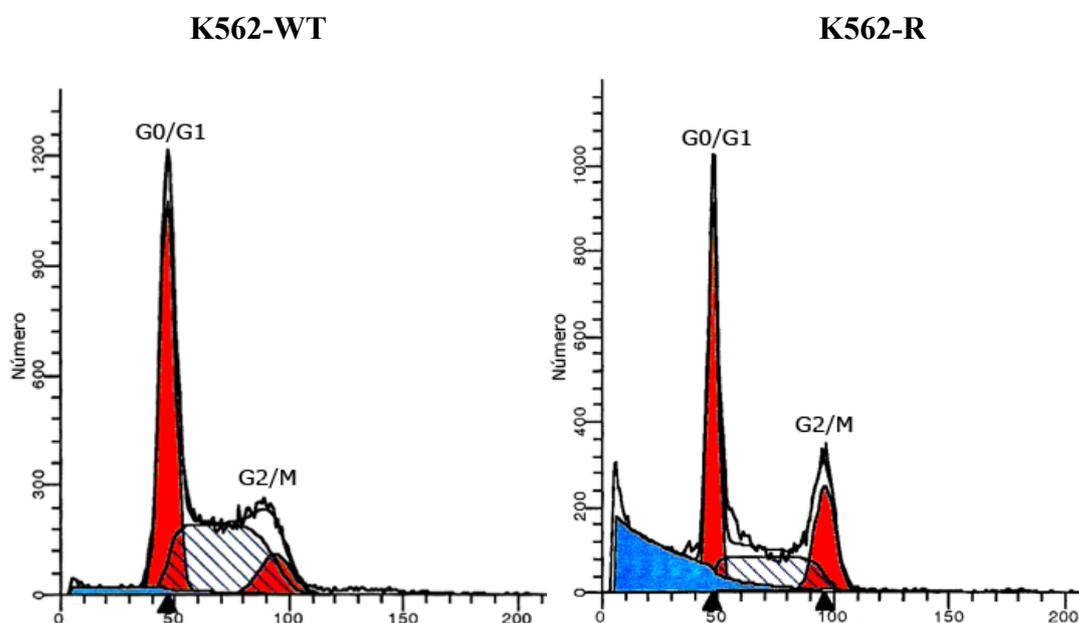


### 3.3.4. Análise do conteúdo de DNA

Dado o ligeiro aumento do índice de morte basal nas células da linha K562-R, e pelo facto da monitorização da densidade celular nos frascos de cultura não indicar uma diminuição do número de células, levantou-se a hipótese das células resistentes terem uma taxa de proliferação aumentada, o que compensaria a morte observada.

Inicialmente foi realizada a análise do conteúdo de DNA nas células K562-WT e K562-R por citometria de fluxo, após a marcação com IP. A figura 28 mostra dois histogramas representativos da distribuição de ambas as amostras de células pelas fases do ciclo celular. Nas células K562-R observa-se uma diminuição da percentagem de células nas fases G0-G1 e um aumento de células nas fases S e G2-M.

O valor médio, desvio padrão e respectiva significância estatística da percentagem de células em cada fase do ciclo celular encontram-se indicados na tabela 13. Este resultado sugere que as células K562-R podem efectivamente possuir uma capacidade proliferativa aumentada comparando com as células parentais.



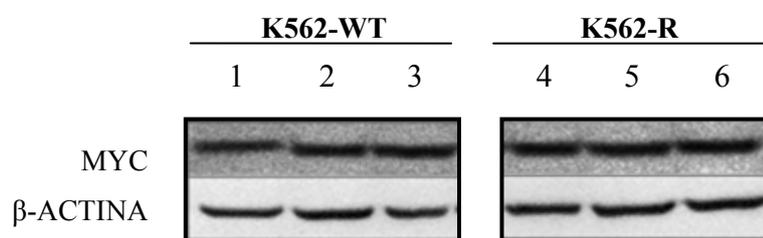
**Figura 28** – Histogramas representativos da distribuição de células K562-WT e K562-R, pelas diferentes fases do ciclo celular. As análises foram repetidas em 6 experiências independentes e em cada experiência foram captados aproximadamente 20000 eventos por amostra no citómetro de fluxo.

**Tabela 13:** Valor médio e respectivo desvio padrão da percentagem de células em cada uma das fases do ciclo celular. P=significância estatística, teste t de *Student*.

Fases do Ciclo Celular	K562-WT (%)	K562-R (%)	P
G0/G1	47,89 ± 4,09	40,86 ± 3,00	< 0,01
S	40,95 ± 5,52	44,78 ± 8,51	> 0,05
G2/M	9,63 ± 1,86	14,37 ± 6.24	> 0,05

### 3.3.5. Expressão de proteína MYC

Sendo a sobre-expressão da proteína c-MYC um indicador da capacidade proliferativa das células, foi feita a análise da quantidade desta proteína por Western Blot. Não se observaram alterações na expressão da proteína MYC entre as linhas K562-WT e K562-R (Figura 29 – linhas 1 e 4). O condicionamento das células K562-WT e K562-R com IM, de acordo com o descrito anteriormente, também não afecta os níveis de expressão da proteína (Figura 29 – linhas 2, 3, 5 e 6).

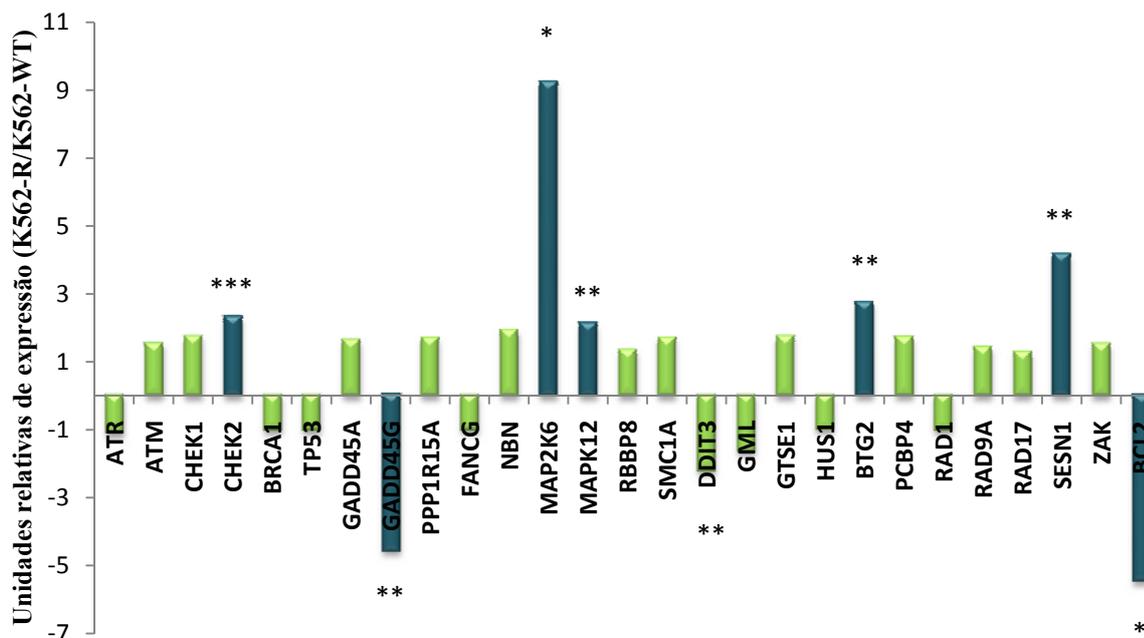


**Figura 29** – Análise por Western Blot da proteína MYC em 30μg de lisados totais das células K562-WT (1) e K562-R (4). O efeito do IM nas células K562-WT foi estudado incubando estas células com 1μM de IM durante 6 horas (2) e 48 horas (3). O efeito da ausência de IM na cultura de células K562-R foi estudado ao retirar o fármaco por um período de 6h (5) e 48h (6). A marcação da proteína β-ACTINA foi utilizada como controlo.

### 3.3.6. Expressão de genes envolvidos na regulação do ciclo celular

De modo a complementar o estudo da capacidade proliferativa das células resistentes foi quantificada a expressão de genes envolvidos na regulação do ciclo celular (Figura 30). Alguns dos genes discriminados já foram anteriormente referidos, uma vez que a sua função é transversal a mais do que uma das vias em estudo neste trabalho.

Os genes *CHEK2*, *MAP2K6*, *MAPK12*, *BTG2* e *SESNI* encontram-se significativamente sobre-expressos nas células K562-R comparativamente com as células K562-WT. A expressão do gene *CHEK2* nas células K562-R é 2,3 vezes superior ( $P < 0,0005$ ) à expressão nas células K562-WT. No gene *MAP2K6* verifica-se um aumento de 9,22 vezes ( $P < 0,05$ ), no gene *MAPK12* de 2,10 vezes ( $P < 0,005$ ), no gene *BTG2* de 2,73 vezes ( $P < 0,005$ ) e no gene *SESNI* de 4,15 vezes ( $P < 0,005$ ). Os genes *GADD45G*, *DDIT3* e *BCL2* estão sub-expressos nas células K562-R. O gene *GADD45G* apresenta um decréscimo de expressão de 4,58 vezes ( $P < 0,005$ ), o gene *DDIT3* de 2,22 vezes ( $P < 0,005$ ) e o gene *BCL2*, como referido anteriormente, tem a sua expressão reduzida 5,45 vezes ( $P < 0,05$ ) nas células K562-R. Todos os outros genes analisados não apresentam alterações de expressão maiores ou menores que duas vezes.



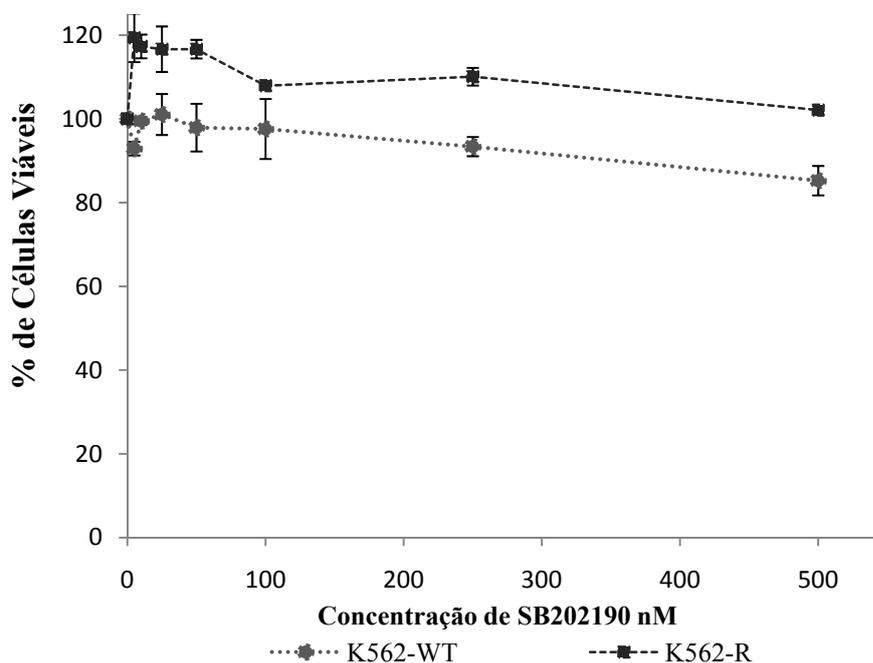
**Figura 30** – Diferenças na expressão de mRNA nas células K562-R relativamente às K562-WT em diversos genes envolvidos nos *checkpoints* e paragem do ciclo celular. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,005$ ; \*\*\*  $P < 0,0005$ , teste t de Student.

A análise do gráfico anterior mostra que parte dos genes com valores de expressão significativamente diferentes nas células K562-R se encontram envolvidos na via das MAP quinases, mais propriamente na via de transdução de sinal p38. As proteínas desta via funcionam como um ponto de integração de múltiplos sinais e estão envolvidas numa ampla variedade de processos celulares como proliferação, diferenciação e regulação da transcrição.

Assim, colocou-se a hipótese de nas células K562-R a activação da via p38 estar envolvida no mecanismo de aquisição de resistência ao IM.

Para testar esta hipótese as células K562-WT e K562-R foram incubadas com diferentes concentrações do inibidor da via p38 SB202190 (Figura 31). Apesar do IC<sub>50</sub> para a proteína p38 ser 30nM observou-se que concentrações até 500nM não afectam a sobrevivência das células K562-R, onde a percentagem de células viáveis expostas ao inibidor aumenta comparativamente com o controlo. A incubação das células K562-WT com o inibidor resulta numa ligeira diminuição da sobrevivência.

O valor médio e respectivo desvio padrão da percentagem de células sobreviventes em resposta à incubação com diferentes concentrações de SB202190 encontra-se na tabela 14. A análise estatística dos resultados mostra que, na maior parte dos casos, as diferenças na resposta das duas linhas celulares são estatisticamente significativas.



**Figura 31-** Percentagem de sobrevivência das células K562-WT e K562-R após 48 horas de incubação com diferentes concentrações de SB202190.

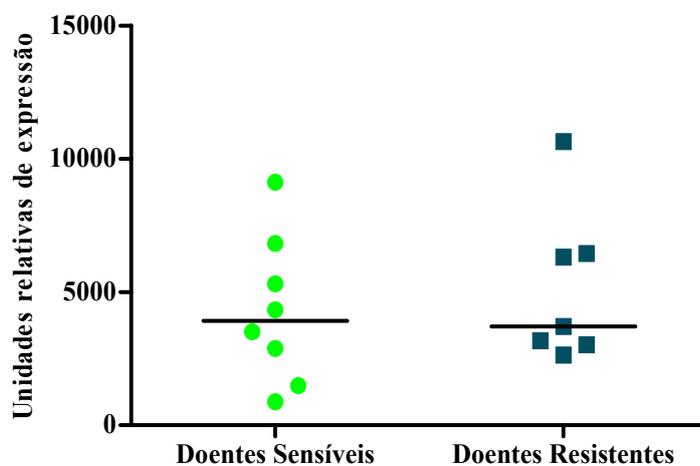
**Tabela 14-** Média e desvio padrão da percentagem de sobrevivência das células K562-WT e K562-R perante concentrações crescentes de SB202190.

Concentração de SB202190 (nM)	K562-WT (Média ± DP)	K562-R (Média ± DP)	<i>P</i> value (teste t de Student)
0	100,00	100,00	-
5	92,89 ± 1,64	119,35 ± 5,8	< 0,05
10	99,48 ± 0,94	117,30 ± 2,8	< 0,05
25	101,04 ± 4,91	116,64 ± 5,44	> 0,05
50	97,90 ± 5,70	116,64 ± 2,22	< 0,05
100	97,58 ± 7,17	107,92 ± 0,18	< 0,05
250	93,37 ± 2,29	110,07 ± 2,12	< 0,05
500	85,23 ± 3,52	102,09 ± 0,95	< 0,05

### 3.3.7. Estudo da expressão dos genes *MAP2K6*, *GADD45G* e *DDIT3* em doentes

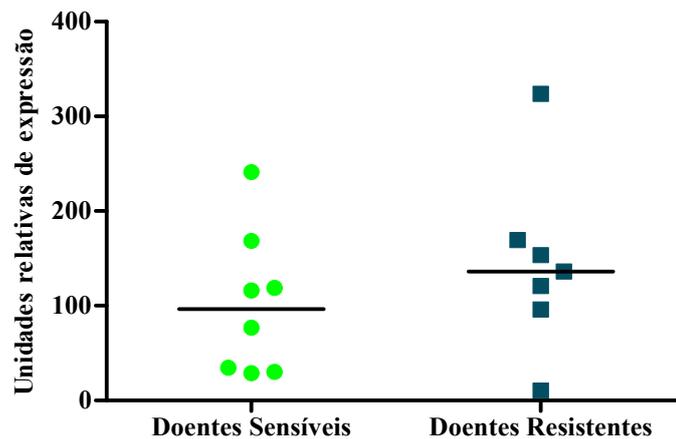
Com base nas diferenças observadas *in vitro* com os modelos de células leucémicas sensíveis e resistentes ao IM foi quantificada a expressão dos genes *MAP2K6*, *GADD45G* e *DDIT3* em amostras de doentes sensíveis ao fármaco e resistentes sem mutação no domínio tirosina quinase do gene *BCR-ABL*.

O estudo da expressão do gene *MAP2K6* por PCR em Tempo Real mostrou que existe uma grande variação nos valores individuais de expressão dentro de cada grupo de doentes estudado (Figura 32). Os valores da mediana nos DS (mediana=3920) e nos DR (mediana=3704) são muito semelhantes.



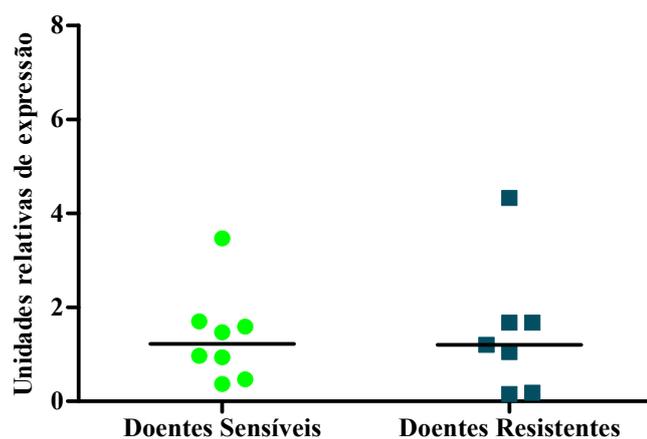
**Figura 32-** Quantificação da expressão relativa do gene *MAP2K6* num grupo de doentes sensível ao tratamento com IM e num grupo de doentes resistentes ao tratamento sem mutação no domínio tirosina quinase do gene *BCR-ABL*. A figura assinala o valor médio de expressão em cada grupo de doentes (linha) e a distribuição dos valores individuais de expressão de cada doente (pontos).

Ao contrário do que indicaram os resultados *in vitro* verifica-se um ligeiro aumento da expressão do gene *GADD45G* nos DR ao IM comparativamente aos DS (Figura 33). Mais uma vez as diferenças de expressão deste gene nos dois grupos não são estatisticamente significativas devido à variação individual de expressão observada dentro de cada grupo.



**Figura 33-** Quantificação da expressão relativa do gene *GADD45G* num grupo de doentes sensível ao tratamento com IM e num grupo de doentes resistentes ao tratamento sem mutação no domínio tirosina quinase do gene *BCR-ABL*. A figura assinala o valor médio de expressão em cada grupo de doentes (linha) e a distribuição dos valores individuais de expressão de cada doente (pontos).

A expressão de transcritos do gene *DDIT3* é idêntica no grupo de DS (mediana=1,22) e DR (mediana=1,2) ao IM (Figura 34).



**Figura 34-** Quantificação da expressão relativa do gene *DDIT3* num grupo de doentes sensível ao tratamento com IM e num grupo de doentes resistentes ao tratamento sem mutação no domínio tirosina quinase do gene *BCR-ABL*. A figura assinala o valor médio de expressão em cada grupo de doentes (linha) e a distribuição dos valores individuais de expressão de cada doente (pontos).

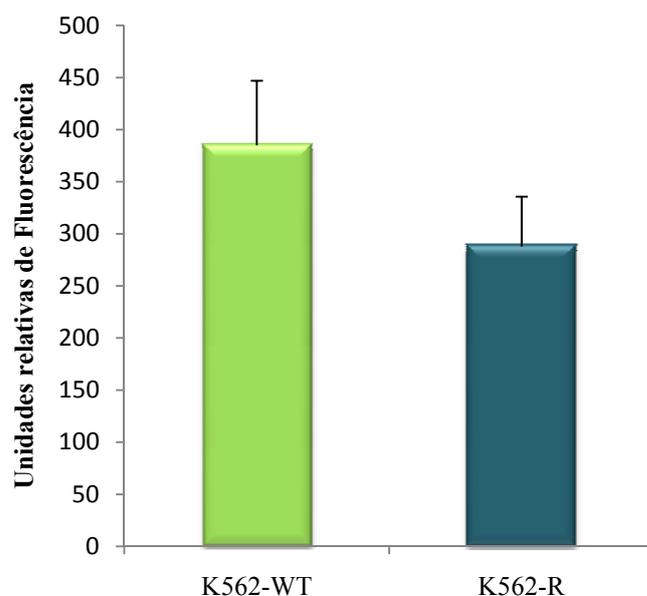
### 3.4. Instabilidade genómica

A aquisição de mutações em genes críticos potencialmente envolvidos na progressão da LMC e na resistência ao IM foi associada ao aumento de instabilidade genómica nas células. Por este motivo, colocou-se a hipótese de haver um aumento da produção de ROS endógeno ou alterações nos mecanismos de reparação das células K562-R que possa ter resultado na aquisição de mutações e, conseqüentemente, na aquisição de resistência.

#### 3.4.1. ROS endógeno

Resultados publicados indicam que células que expressam o gene *BCR-ABL* apresentam um aumento de produção de ROS. O aumento de *stress* oxidativo nas células pode levar à acumulação de mutações no DNA e conseqüentemente a um aumento da instabilidade genómica associada à progressão da doença e aquisição de resistência ao IM.

Para avaliar se as células K562-R apresentam variações na produção de ROS, relativamente às células K562-WT, quantificou-se a produção endógena de ROS nas duas linhas celulares. Os resultados, apresentados em unidades relativas de fluorescência (u.r.f.), mostram que a produção endógena de espécies reactivas de oxigénio é mais elevada nas células K562-WT ( $384,9 \pm 35,78$  u.r.f.) do que nas células K562-R ( $287,8 \pm 23,94$  u.r.f.) (Figura 35). No entanto, esta diferença não é estatisticamente significativa.



**Figura 35** – Quantificação relativa da produção de espécies reactivas de oxigénio nas células K562-WT e K562-R ( $P > 0,05$ , teste t de Student).

### 3.4.2. Expressão de genes das vias de reparação de DNA

Para estudar alterações nos mecanismos de reparação de DNA fez-se um *screening* inicial da expressão de genes envolvidos nas diferentes vias de reparação que pudesse indicar diferenças entre as duas linhas. Os resultados da expressão dos genes nas células K562-R, relativamente às células K562-WT, estão indicados na tabela 15.

Dos 10 genes envolvidos na via de reparação por excisão de bases (*Base Excision Repair* - BER), verificou-se que 2 apresentam um aumento de expressão nas células K562-R. O gene *MBD4*, que está sobre-expresso 2,18 vezes ( $P < 0,005$ ), e o gene *NTHL1* que se encontra sobre-expresso 3,50 vezes ( $P < 0,0001$ ). Os outros genes não apresentam diferenças de expressão superiores ou inferiores a duas vezes.

O gene *XRCC6*, envolvido na reparação homóloga (*Homologous Repair* - HR) e não homóloga (*Non-Homologous End Joining Repair* - NHEJ) de quebras de dupla cadeia, tem a sua expressão aumentada 2,28 vezes nas células K562-R comparativamente com as células K562-WT ( $P < 0,001$ ). Nos outros genes em estudo envolvidos nestas duas vias de reparação não foram detectadas diferenças de expressão relevantes (Tabela 15).

Dos 13 genes estudados envolvidos na via de Reparação de Emparelhamentos Erróneos de Nucleótidos (*Mismatch Repair* - MMR), apenas um apresenta alterações de expressão nas células K562-R, o gene *MLH3*, que se encontra sub-expresso 2,05 vezes ( $P < 0,001$ ) nestas células.

Por fim, na via de Reparação por Excisão de Nucleótidos (*Nucleotide Excision Repair* - NER), identificou-se uma sobre-expressão de 2,26 vezes ( $P < 0,001$ ) do gene *DDB1* nas K562-R. Os outros genes não apresentam diferenças significativas de expressão entre as duas linhas celulares em estudo.

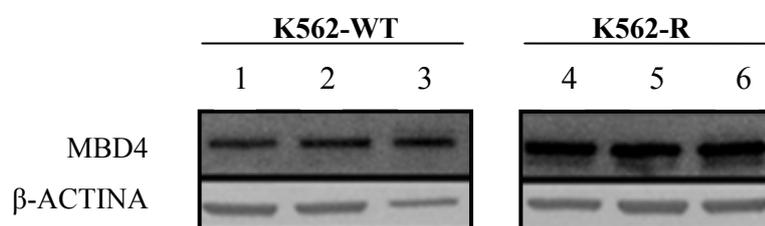
**Tabela 15** – Valores de expressão de genes envolvidos em diferentes vias de reparação de DNA, nas células K562-R relativamente às K562-WT.

Via de Reparação	Símbolo do Gene	Razão (R/ WT)	P value	Via de Reparação	Símbolo do Gene	Razão (R/ WT)	P value	
HR	<i>XRCC6BP1</i>	-1,9	0,0002	BER	<i>OGGI</i>	-1,44	0,0528	
	<i>CIB1</i>	-1,85	0,0014		<i>MUTYH<sup>1</sup></i>	-1,07	0,3841	
	<i>RAD51L1</i>	-1,54	0,0049		<i>MPG</i>	1,06	0,5436	
	<i>DMC1</i>	-1,4	0,1761		<i>UNG</i>	1,17	0,1063	
	<i>XRCC2</i>	-1,06	0,5893		<i>XRCC1</i>	1,21	0,0431	
	<i>PRKDC<sup>3</sup></i>	-1,04	0,7772		<i>APEX1</i>	1,5	0,0056	
	<i>BRCA1</i>	-1,03	0,8846		<i>PNKP</i>	1,57	0,0083	
	<i>FANCG</i>	-1,01	0,8519		<i>FEN1<sup>2</sup></i>	1,59	0,0136	
	<i>MRE11A</i>	1,02	0,8567		<i>MBD4</i>	2,18	0,0031	
	<i>RAD50</i>	1,24	0,1384		<i>NTHL1</i>	3,5	0,00004	
	<i>ERCC1<sup>4</sup></i>	1,24	0,1985		MMR	<i>MLH3</i>	-2,05	0,0007
	<i>RAD51</i>	1,49	0,0063			<i>PMS2L3</i>	-1,7	0,0007
	<i>XRCC3</i>	1,52	0,0256			<i>TREX1</i>	-1,59	0,0016
	<i>RAD21</i>	1,56	0,0073			<i>N4BP2</i>	-1,33	0,0046
<i>NBN</i>	1,91	0,0043	<i>ANKRD17</i>	-1,08		0,5322		
<i>XRCC6<sup>3</sup></i>	2,38	0,0007	<i>MSH2</i>	1,19		0,2805		
NER	<i>ERCC2</i>	-16,39	0,3583	<i>MSH3</i>		1,22	0,0973	
	<i>XPC</i>	-1,51	0,0168	<i>EXO1</i>		1,22	0,08	
	<i>CCNH</i>	-1,41	0,0213	<i>PMS1</i>		1,32	0,009	
	<i>XPA</i>	1	0,9343	<i>PMS2</i>		1,45	0,0052	
	<i>RAD18</i>	1,28	0,1068	<i>MLH1</i>		1,46	0,0158	
	<i>CDK7</i>	1,3	0,0172	<i>ABL1</i>		1,46	0,044	
	<i>LIG1</i>	1,47	0,0081	<i>TP73</i>		1,54	0,1543	
	<i>DDB1</i>	2,26	0,0004					

**Legenda:** A expressão dos genes é marcada com um gradiente de cor vermelho (sub-expressão) a verde (sobre-expressão) proporcional ao número de vezes que a expressão do gene varia nas células K562-R relativamente às células K562-WT. <sup>1</sup> - Indica genes cuja função se encontra também envolvida na via MMR; <sup>2</sup> - Indica genes cuja função se encontra também envolvida na via HR; <sup>3</sup> - Indica genes cuja função se encontra também envolvida na via NHEJ; <sup>4</sup> - Indica genes cuja função se encontra também envolvida na via NER. P = significância estatística, teste t de Student.

### 3.4.2.1. Expressão da proteína MBD4

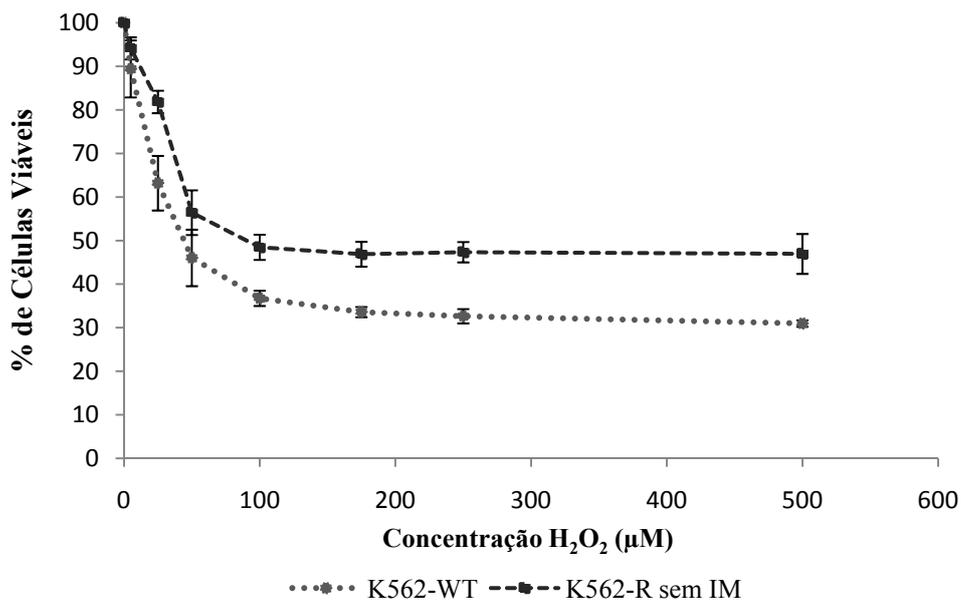
A análise dos resultados anteriores indicou um aumento significativo na expressão de dois genes envolvidos na via de reparação BER. Para determinar se os níveis de mRNA eram consistentes com os níveis de proteína foi feita a imunodeteção das proteínas NTHL1 e MBD4 por Western Blot. Não foi possível detectar a proteína NTHL1. O resultado para a proteína MBD4 mostra que existe consistentemente uma quantidade maior de MBD4 nas células resistentes ao IM quando comparando com as células K562-WT, independentemente da presença ou ausência do IM em cultura (Figura 36).



**Figura 36** – Análise por Western Blot da proteína MBD4 em 80µg de lisados totais das células K562-WT (1) e K562-R (4). O efeito do IM nas células K562-WT foi estudado incubando estas células com 1µM de IM durante 6 horas (2) e 48 horas (3). O efeito da ausência de IM na cultura de células K562-R foi estudado ao retirar o fármaco por um período de 6h (5) e 48h (6). A marcação da proteína β-ACTINA foi utilizada como controlo.

### 3.4.2.2. Sobrevivência na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Para confirmar se o aumento de reparação por BER diminuía a sensibilidade das células resistentes ao *stress* oxidativo foi determinada a percentagem de sobrevivência das células K562-WT e K562-R sem IM, após a incubação com diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Observou-se que as células K562-WT têm maior sensibilidade à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (IC<sub>50</sub>=71,31µM) do que as células K562-R sem IM (IC<sub>50</sub>=215 µM) ( $P<0,0001$ ) (Figura 37). Os valores médios e desvio padrão da percentagem de sobrevivência perante cada concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> encontram-se discriminados na tabela 16.



**Figura 37** - Percentagem de sobrevivência celular perante diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células K562-WT e K562-R sem IM. As curvas de resposta das duas linhas celulares a diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são estatisticamente significativas. P<0,0001, teste F.

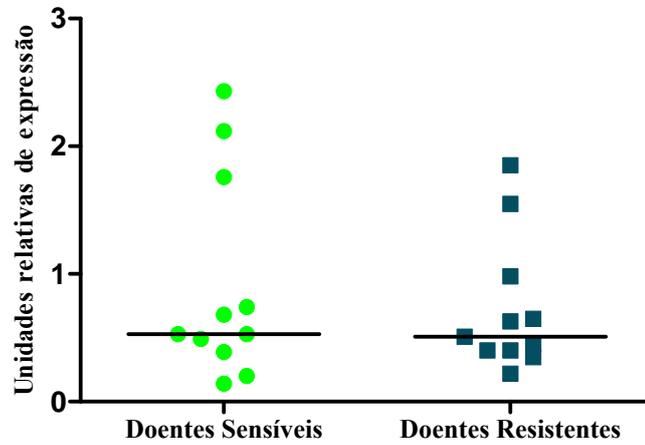
**Tabela 16**- Média e desvio padrão da percentagem de sobrevivência das células K562-WT e K562-R sem IM perante concentrações crescentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (µM)	K562-WT (Média ± DP)	K562-R sem IM (Média ± DP)	<i>P value</i> (teste t de Student)
0	100,00	100,00	-
5	89,42 ± 6,5	94,15 ± 2,5	> 0,05
25	63,19 ± 6,3	81,84 ± 2,6	< 0,01
50	46,03 ± 6,5	56,42 ± 5,1	> 0,05
100	36,75 ± 1,7	48,47 ± 2,9	< 0,005
175	33,59 ± 1,2	46,87 ± 2,9	< 0,005
250	32,65 ± 1,6	47,34 ± 2,3	< 0,0005
500	30,97 ± 0,8	46,95 ± 4,6	< 0,005

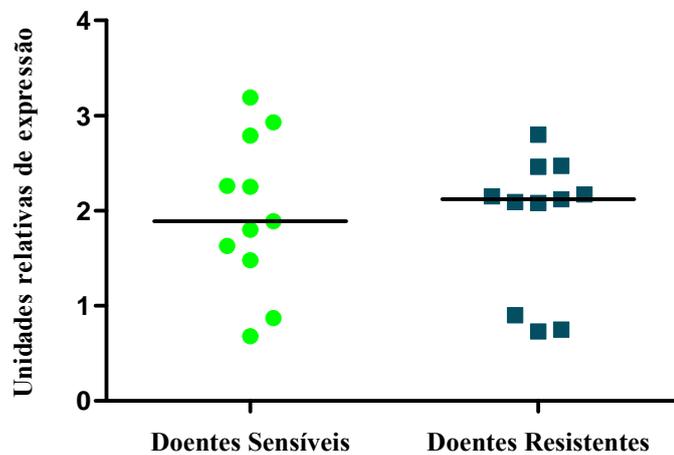
### 3.4.3. Expressão dos genes *NTHL1* e *MBD4* em doentes

Com base nas diferenças observadas *in vitro* com os modelos de células leucémicas sensíveis e resistentes ao IM foi quantificada a expressão dos genes *MBD4* e *NTHL1* em amostras de doentes sensíveis ao fármaco e resistentes sem mutação no domínio tirosina quinase do gene *BCR-ABL*.

Não se observaram diferenças na expressão do gene *NTHL1* nem do *MBD4* entre os DS e DR (Figura 38 e 39, respectivamente).



**Figura 38-** Quantificação da expressão relativa do gene *NTHL1* num grupo de doentes sensível ao tratamento com IM e num grupo de doentes resistentes ao tratamento sem mutação no domínio tirosina quinase do gene *BCR-ABL*. A figura assinala o valor médio de expressão em cada grupo de doentes (linha) e a distribuição dos valores individuais de expressão de cada doente (pontos).



**Figura 39-** Quantificação da expressão relativa do gene *MBD4* num grupo de doentes sensível ao tratamento com IM e num grupo de doentes resistentes ao tratamento sem mutação no domínio tirosina quinase do gene *BCR-ABL*. A figura assinala o valor médio de expressão em cada grupo de doentes (linha) e a distribuição dos valores individuais de expressão de cada doente (pontos).



## 4. Discussão

O IM foi o primeiro inibidor de tirosina quinase utilizado na prática clínica e rapidamente se tornou a primeira linha de tratamento para LMC (Druker *et al.*, 2001, Hochhaus *et al.*, 2009). No entanto, uma parte dos doentes é à partida resistente ao fármaco e outra parte acaba por adquirir resistência no decurso do tratamento (Quintas-Cardama *et al.*, 2009). Assim, apesar do inicialmente previsto, o IM não é um tratamento efectivo para a cura da LMC, tornando-se por isso, fundamental o estudo e compreensão dos mecanismos responsáveis pela resistência.

A aquisição de resistência ao IM foi, inicialmente, associada ao restabelecimento da actividade quinase BCR-ABL por intermédio de mecanismos que impediam a ligação do IM à proteína (Gambacorti-Passerini *et al.*, 2003). Nesta fase foram descritos como mecanismos de resistência a aquisição de mutações pontuais no domínio quinase da BCR-ABL (Gorre *et al.*, 2001), a sobre-expressão de transportadores membranares e a sobre-expressão de *BCR-ABL* (Mahon *et al.*, 2000). Só mais tarde surgiram evidências de que a resistência pode ocorrer não só em consequência da recuperação da actividade quinase da proteína, mas também, pela expansão clonal de células que possuem alterações em vias de transdução de sinal, que lhes permitem sobreviver independentemente da actividade da quinase BCR-ABL.

Muitos dos mecanismos de resistência encontrados em doentes foram inicialmente identificados em modelos de linhas celulares resistentes ao IM estabelecidas *in vitro*. Neste sentido, para estudar potenciais mecanismos de resistência ao IM, estabeleceu-se no nosso laboratório um modelo de células leucémicas que adquiriram resistência ao fármaco em resultado da exposição crónica. Assim, o primeiro objectivo deste estudo foi determinar se o mecanismo pelo qual as células adquiriram resistência ao IM era algum dos mecanismos já descritos.

A análise da sequência do domínio tirosina quinase do gene *BCR-ABL* das células resistentes excluiu a hipótese da resistência ao IM ser resultado da aquisição de mutações pontuais, o mecanismo mais recorrente de resistência.

Posteriormente, foi avaliado se a resistência seria resultado da sobre-expressão de *BCR-ABL*. Apesar de terem sido detectadas diferenças na quantidade de transcritos do gene entre as duas linhas (Figura 11), estas diferenças não foram observadas ao nível da proteína (Figura 12), que na realidade se mantém semelhante. Diversos trabalhos anteriores associam a sobre-expressão do gene *BCR-ABL* à resistência ao IM, assumindo à partida que existe uma relação directa entre a sobre-expressão do mRNA e da proteína. Os resultados obtidos

mostram que esta associação pode não ser tão linear como se pensava, possivelmente devido à activação de mecanismos de regulação pós-transcricional nas células resistentes, realçando assim a importância do estudo paralelo dos níveis de expressão, tanto dos transcritos como da proteína, em casos de resistência. Assim, apesar de haver sobre-expressão de *BCR-ABL* nas células resistentes ao IM, esta sobre-expressão não é responsável pela resistência, uma vez que não se traduz no aumento da quantidade de proteína.

A proteína CRKL é um substrato directo da proteína BCR-ABL e é também a principal fosfo-tirosina detectada no sangue periférico de doentes com LMC (Oda *et al.*, 1994, Tenhove *et al.*, 1994). Dado que esta proteína é constitutivamente fosforilada pela BCR-ABL, a detecção da sua forma fosforilada (p-CRKL) tornou-se o parâmetro mais frequentemente utilizado para medir indirectamente a actividade da BCR-ABL (Nichols *et al.*, 1994, Hamilton *et al.*, 2009).

No presente trabalho, o estudo de p-CRKL por Western Blot mostrou que os níveis de actividade de BCR-ABL são muito baixos nas células K562-R comparativamente ao observado nas células parentais (Figura 13). No entanto, ao contrário do que acontece nas células K562-WT expostas ao IM, a diminuição de actividade da proteína BCR-ABL nas células K562-R não resulta na morte destas células por apoptose (Figura 18). É ainda de acrescentar que quando o IM é retirado do meio de cultura das células resistentes a actividade da quinase é restituída. O conjunto destes resultados confirma que a reduzida actividade de BCR-ABL nas células resistentes expostas ao IM não resulta da diminuição da quantidade de proteína, como se mostrou anteriormente, mas sim do facto do IM estar a exercer o seu efeito inibitório sobre a quinase.

A capacidade das células resistentes sobreviverem na presença de IM estando o fármaco a actuar efectivamente como um inibidor da BCR-ABL mostrou que, no modelo celular em estudo, a resistência é independente da actividade quinase da proteína. Deste modo, é também possível explicar o porquê das células K562-R serem resistentes a concentrações de IM até duas vezes superiores aquela a que foram estabelecidas em cultura (Figura 10). Sendo a resistência independente da actividade, a concentração de IM não influencia a sobrevivência das células.

O facto das células K562-R serem também resistentes aos inibidores de tirosina quinase de segunda geração Nilotinib e Dasatinib, o que não acontece nas células parentais, constitui mais uma evidência de que estas células não dependem da actividade tirosina

quinase da BCR-ABL para sobreviver (Figura 14). Isto porque estes dois inibidores estão descritos como sendo mais potentes e mais efectivos na inibição da quinase BCR-ABL.

Estudos anteriores mostraram que em muitos casos de doentes resistentes ao IM, a substituição terapêutica para Nilotinib ou Dasatinib permitia atingir resposta citogenética *major* ou mesmo *CCR* (Shah *et al.*, 2004, Talpaz *et al.*, 2006, le Coutre *et al.*, 2008). Esta resposta terapêutica ocorre essencialmente em casos de resistência resultantes da aquisição de mutações pontuais no domínio quinase da proteína BCR-ABL ou em casos de sobre-expressão do gene (Talpaz *et al.*, 2006, le Coutre *et al.*, 2008). O facto das células K562-R não responderem a estes inibidores é mais um indicador de que, tal como se mostrou, estes não são os mecanismos responsáveis pela resistência nestas células.

Como referido anteriormente, a remoção do IM do meio de cultura das células K562-R leva à restituição da actividade quinase da proteína BCR-ABL, o que mostra que o IM está a cumprir a sua função inibitória nas células K562-R. Desta forma, este resultado permitiu-nos excluir também a actividade dos transportadores de influxo e efluxo como mecanismo responsável pela aquisição de resistência. Caso a actividade dos transportadores fosse importante para a resistência das células K562-R, não seria expectável observarem-se diferenças acentuadas na actividade da proteína quando o IM é removido, uma vez que estes estariam a impedir a entrada e/ou permanência do IM nas células, impedindo que este inibisse a quinase. Quer nas células K562-WT, quer nas células K562-R, a adição ou remoção de IM tem o resultado esperado ao nível da actividade da proteína BCR-ABL.

Outra evidência de que o papel dos transportadores não é relevante para a resistência nestas células é baseada no facto de, ao contrário do que acontece com o IM e o Dasatinib, o transporte membranar de Nilotinib não depender do transportador de influxo hOCT1, nem dos transportadores de efluxo ABCB1, ABCC1 e ABCG2 (Hiwase *et al.*, 2008, Davies *et al.*, 2009). No entanto, o padrão de resposta das células K562-R aos dois inibidores é idêntico, o que reforça que alterações na expressão dos transportadores membranares não estão envolvidas na resistência.

Ainda pouco se sabe sobre os fenómenos de resistência ao IM independentes da actividade da proteína BCR-ABL. Pensa-se que estes ocorram na sequência do estabelecimento de vias de sinalização alternativas que permitem a sobrevivência das células na presença dos inibidores de BCR-ABL. Tal como acontece com a progressão da LMC, hipotetizou-se que estas vias alternativas se estabeleçam em resultado de mutações em genes

críticos, que acabam por ser seleccionadas e ganhar representatividade na população de células leucémicas por expansão clonal.

O aumento da expressão de LYN quinase, em células e doentes com resistência ao IM independente da actividade da BCR-ABL, é um fenómeno já descrito (Donato *et al.*, 2003, Donato *et al.*, 2004, Wu *et al.*, 2008, Wu *et al.*, 2008, Pene-Dumitrescu e Smithgall, 2010). No nosso modelo de células resistentes observou-se um aumento da expressão desta proteína, quando as células estavam expostas ao IM (Figura 15). No entanto, com base nos resultados obtidos em estudos de viabilidade com o inibidor de SRC quinases SU6656, esta sobre-expressão de LYN não parece ser determinante para a sobrevivência das células (Figura 16). Tanto nas células K562-WT como nas K562-R expostas ao IM, a incubação com doses elevadas de SU6656, não afectou a sobrevivência celular. O facto das células K562-R privadas de IM sofrerem uma diminuição acentuada de LYN também não seria expectável se esta via fosse determinante para a resistência (Figura 15). Além disso, apesar das diferenças acentuadas na quantidade de LYN quinase, a percentagem de sobrevivência na presença de SU6656 é idêntica nas células K562-R e K562-R sem IM (Figura 16).

Uma evidência adicional de que a sobre-expressão de LYN quinase não é fundamental para a resistência das células K562-R, tem por base o facto do Dasatinib inibir simultaneamente a proteína BCR-ABL e proteínas da família das SRC quinases (Konig *et al.*, 2008). Se a actividade da LYN quinase fosse determinante para a sobrevivência das células K562-R, a resposta das células resistentes não teria sido idêntica com este inibidor e com o Nilotinib, que inibe apenas BCR-ABL.

Curiosamente, nas células K562-WT os valores de sobrevivência na presença de SU6656 ultrapassam os valores do controlo. Este fenómeno pode ser explicado pelo facto do ensaio MTS não ter capacidade discriminativa entre sobrevivência e proliferação celular. Assim, este resultado sugere que a incubação com SU6656 pode estimular a proliferação das células K562-WT, no entanto, estudos mais aprofundados teriam de ser realizados para que se pudessem tirar conclusões definitivas.

Neste ponto do trabalho sabia-se apenas que o mecanismo de resistência nas células K562-R não era nenhum dos previamente descritos e que estas sobreviviam independentemente da inibição ou não da actividade tirosina quinase da BCR-ABL. Deste modo, o mecanismo de resistência ao IM deste modelo de células leucémicas é um mecanismo desconhecido. Assim, delineou-se uma nova estratégia de trabalho para identificar

diferenças entre as células K562-WT e K562-R que possam indicar vias potencialmente envolvidas na resistência, a fim de direccionar trabalhos futuros.

Foi consistentemente descrito na literatura que a actividade da BCR-ABL aumenta a sinalização de sobrevivência e a proliferação das células leucémicas (Deininger *et al.*, 2000, Quintas-Cardama e Cortes, 2009). Uma vez que se demonstrou que as células resistentes expostas ao IM têm uma diminuição acentuada da actividade BCR-ABL, era fundamental estudar se existiam alterações nestas vias de sinalização, independentes da actividade quinase da BCR-ABL, que fossem indicativas do mecanismo pelo qual as células resistentes sobrevivem na presença de IM.

Numa primeira fase desta abordagem era fundamental determinar se existiam diferenças ao nível da morte basal entre as duas linhas celulares. Os resultados mostraram que a percentagem de morte é apenas 5% mais elevada nas células resistentes expostas ao IM, o que não representa uma diferença acentuada (Figura 17).

Fang *et al.* descreveram que a incubação de células leucémicas com IM induz a entrada das células em apoptose (Fang *et al.*, 2000). O mesmo aconteceu nas células da linha K562-WT. Quando incubadas com IM as células entram em apoptose como se observou pelo aumento da clivagem de PARP1, aqui utilizada como marcador apoptótico (Figura 18). Como esperado, observou-se que apenas uma quantidade residual de células resistentes incubadas cronicamente com IM entrou em apoptose (Figura 18).

Os resultados anteriores levaram a que fossem estudadas algumas moléculas-chave da sinalização anti- e pró-apoptótica para verificar se existiam alterações nas células resistentes que fossem indicativas da resistência destas células à apoptose.

Vários autores descreveram que o efeito anti-apoptótico da expressão de BCR-ABL resulta do bloqueio da libertação mitocondrial de citocromo-c, um passo crucial para a activação da apoptose (McGahon *et al.*, 1994, Amarante-Mendes *et al.*, 1998, Sonoyama *et al.*, 2002). Este bloqueio é em parte consequência da sobre-expressão das proteínas anti-apoptóticas BCL2 e BCL-XL, que resulta da activação constitutiva das vias RAS e STAT5 pela BCR-ABL, respectivamente (Sanchezgarcia e Grutz, 1995, Amarante-Mendes *et al.*, 1998, Cirinna *et al.*, 2000, de Groot *et al.*, 2000).

Nas células resistentes expostas de forma crónica ao IM observou-se uma diminuição da expressão de transcritos e de proteína BCL2 e de BCL-XL (Figuras 19, 20, 22). Estes resultados são mais uma evidência de que nestas células o IM está a inibir a actividade quinase da BCR-ABL, uma vez que actividade desta proteína regula a sobre-expressão BCL2

e BCL-XL em células leucémicas. Mais uma evidência de que a sub-expressão de BCL2 e BCL-XL resulta da inibição da actividade da BCR-ABL é o facto de, quando o IM é retirado do meio de cultura das células resistentes, se observar, paralelamente à restituição da actividade de BCR-ABL, um aumento da expressão de transcritos e de proteína BCL2 e BCL-XL. No caso da proteína BCL-XL, enquanto que o aumento de expressão do gene é visível ao fim de 6 horas, só se observa um aumento da proteína ao fim de 48 horas.

A morte das células sensíveis ao IM por apoptose foi descrita como uma consequência do bloqueio da activação constitutiva da via que leva à sobre-expressão da proteína anti-apoptótica BCL-XL (Horita *et al.*, 2000). Com efeito, nas células parentais incubadas com IM observou-se, concomitantemente com aumento da clivagem de PARP1, uma diminuição da expressão dos transcritos e da proteína BCL-XL.

O conjunto destes resultados levou-nos a concluir que as proteínas anti-apoptóticas BCL2 e BCL-XL são reguladas nas células resistentes pela expressão de BCR-ABL e, por isso, não são determinantes para a sobrevivência destas células, na presença de IM. Apenas com base nestes resultados seria expectável que a exposição destas células ao IM resultasse na morte das células por apoptose, uma vez que, os níveis de proteínas anti-apoptóticas, são muito semelhantes nas células resistentes e nas células parentais expostas ao IM.

Até à data da realização deste trabalho não foram encontrados trabalhos anteriores que relacionassem a expressão de BCR-ABL com a regulação de BAX. Curiosamente, apesar de não terem sido encontradas diferenças ao nível da expressão deste gene, observou-se uma quantidade de proteína consistentemente mais elevada nas células resistentes do que nas parentais. Este resultado é mais um indicador do aumento da sinalização apoptótica nestas células.

A SURVIVINA é uma proteína pertencente à família das IAP's (*Inhibitor of Apoptosis*) que se demonstrou estar envolvida tanto na inibição da morte celular por apoptose como na indução da proliferação celular (Ambrosini *et al.*, 1998, Li *et al.*, 1998, Tamm *et al.*, 1998, Li *et al.*, 1999, Carter *et al.*, 2003). Esta IAP é pouco expressa nos tecidos normais de adultos, no entanto, a sua sobre-expressão é frequentemente descrita como importante em diversas neoplasias (Mori *et al.*, 2002, Oto *et al.*, 2007), e por isso, cada vez mais tem vindo a ser proposta como um alvo terapêutico (Langemeijer *et al.*, 2008, Ryan *et al.*, 2009).

No modelo de células resistentes ao IM estudado verificou-se uma sobre-expressão constitutiva de SURVIVINA, comparativamente com o que acontece nas células parentais, onde não foi possível detectar esta proteína (Figura 24). Assim, a expressão de SURVIVINA

parece ser independente da actividade de BCR-ABL, uma vez que esta quinase não está activa nas células K562-R expostas ao IM onde a sobre-expressão de SURVIVINA é bastante elevada. A remoção do IM do meio de cultura das células K562-R, o que envolve o restabelecimento da actividade da BCR-ABL, também não parece afectar a expressão de SURVIVINA. Por fim, nas células parentais com actividade constitutiva de BCR-ABL não foi possível detectar expressão da proteína. O conjunto destes resultados mostra que a sobre-expressão de SURVIVINA nas células resistentes é independente de BCR-ABL.

Um dado curioso é o facto da sobre-expressão de SURVIVINA em LMC ser descrita principalmente em doentes em FA e CB (Badran *et al.*, 2003, Conte *et al.*, 2005, Hernandez-Boluda *et al.*, 2005). Diversos estudos demonstraram precisamente que doentes em fases avançadas da doença são, à partida, resistentes ao IM ou têm respostas apenas de curta duração, pelo que, de futuro, seria interessante tentar determinar se existe alguma relação entre a condição refractária de doentes em CB e a sobre-expressão de SURVIVINA. O aumento da expressão da proteína anti-apoptótica SURVIVINA nas células resistentes ao IM pode, deste modo, estar envolvido na capacidade das células sobreviverem na presença do fármaco.

Apesar da sub-expressão das proteínas anti-apoptóticas BCL2 e BCL-XL, e da sobre-expressão da proteína pró-apoptótica BAX, as células K562-R não entram em apoptose, o que pode ser explicado pelo facto da SURVIVINA estar a inibir a activação das CASPASES. No entanto, para que se possam tirar conclusões sobre a importância da SURVIVINA na resistência ao IM, mais ensaios terão de ser realizados.

Pelo facto de não se observarem diferenças na densidade populacional entre as células K562-WT e K562-R, apesar da taxa de morte basal ser 5% mais elevada nas células K562-R, colocou-se a hipótese de haver um aumento da capacidade proliferativa nas células resistentes ao IM, o que acabaria por compensar a morte.

A primeira abordagem para testar esta hipótese foi determinar o conteúdo de DNA de cada uma das linhas (Figura 28). Observou-se um decréscimo da quantidade de células nas fases G0/G1 do ciclo celular (DNA=2n) na linha resistente ao IM. Uma vez que este decréscimo de células em G0/G1 se reflectiu num aumento do número de células, tanto na fase S (onde ocorre a síntese de DNA) como nas fases G2/M (onde se dá a mitose), e não apenas em G2/M sugerindo que estaria a haver paragem do ciclo celular nesta fase, este resultado indica que pode efectivamente haver um aumento do número de células em divisão nesta linha.

Como descrito acima, para além do seu efeito anti-apoptótico a SURVIVINA também induz a proliferação celular. Deste modo, a sobre-expressão desta proteína nas células K562-R pode também traduzir-se num aumento da capacidade proliferativa destas células, contribuindo, deste modo, para a resistência.

Por outro lado, para além ter função anti-apoptótica, a proteína BCL2 tem também um efeito anti-proliferativo, uma vez que inibe a passagem das células de G0 para G1 e induz a paragem do ciclo celular (Janumyan *et al.*, 2003). Assim, o facto de haver sub-expressão de BCL2 nas células resistentes, pode também contribuir para o aumento da proliferação celular.

A proteína c-MYC é codificada por um oncogene frequentemente sobre-expresso em diversos tipos tumorais. Entre outros efeitos, o aumento da sobre-expressão de *c-MYC* está intimamente relacionado com o aumento da capacidade proliferativa das células. No entanto, não foram observadas diferenças na expressão desta proteína nas duas linhas celulares (Figura 29). Além disso, observou-se um ligeiro aumento da expressão do gene *BCTG2*, que codifica uma proteína com efeito anti-proliferativo, nas células (Rouault *et al.*, 1996) (Figura 30).

Apesar da análise da densidade populacional e do estudo do conteúdo de DNA das células sugerir um aumento da capacidade proliferativa das células K562-R, estes resultados não são conclusivos. A confirmar-se o aumento da capacidade proliferativa nas células resistentes, mais estudos terão de ser feitos no sentido de determinar quais os mecanismos moleculares responsáveis pelo aumento.

O estudo da expressão de genes envolvidos na regulação do ciclo celular mostrou que as alterações significativas de expressão ocorreram maioritariamente em genes que codificam proteínas relacionadas com a via p38 (*GADD45γ*, *MAP2K6*, *MAPK12* e *DDIT3*) (Figura 30). Esta é uma via de sinalização celular complexa que se encontra envolvida em diversos processos celulares como diferenciação, resposta imune, proliferação celular e apoptose (Ono e Han, 2000, Cuadrado e Nebreda, 2010). As consequências celulares da activação da via p38 dependem da integração de vários sinais bioquímicos e do tipo de tecido, uma vez que, a expressão das diferentes isoformas da p38 não é igual em todas as células. Alguns trabalhos já tentaram estabelecer o papel da via p38 na LMC e na resistência ao IM, mas os resultados obtidos são, em alguns casos, contraditórios (Kambhampati, 2009).

Uma vez que os níveis de transcritos dos genes podem não corresponder linearmente aos níveis de proteína, tentou-se quantificar a expressão das proteínas por Western Blot. No entanto, possivelmente devido aos baixos níveis de expressão, não se detectaram as proteínas acima referidas nem nas células K562-WT, nem nas K562-R.

Para avaliar se a activação desta via era determinante para o mecanismo de resistência utilizou-se o inibidor da via p38 SB202190 (Figura 31). Os resultados mostram que a inibição desta via não afecta a sobrevivência de nenhuma das linhas celulares sugerindo que a via não é importante para a resistência das células ao IM. No entanto, este ensaio deve ser repetido com outros inibidores uma vez que o SB202190 não inibe a isoforma p38 $\gamma$  (MAPK12) cujo gene se encontra sobre-expresso nestas células.

Como referido anteriormente, a aquisição de formas de resistência independentes da actividade da quinase BCR-ABL, têm vindo a ser associadas à aquisição de mutações em genes críticos, que podem estabelecer a activação constitutiva de vias alternativas, permitindo a sobrevivência das células. Por este motivo, foram estudadas as duas principais origens de instabilidade genómica descritas em LMC: o aumento da produção endógena de ROS e alterações nos mecanismos de reparação de DNA.

Curiosamente, observou-se uma ligeira diminuição dos níveis de ROS nas células K562-R, o que pode ser explicado pela diminuição da actividade quinase da proteína BCR-ABL (Figura 35).

O estudo da expressão de genes envolvidos nas principais vias de reparação do DNA não mostrou diferenças, entre as duas linhas celulares, que indicassem alterações na capacidade de reparação que pudessem predispor a linha resistente para a aquisição de mutações. Normalmente, o aumento da taxa de mutação encontra-se associado à sobre-activação de vias de reparação menos fidedignas, o que não se verifica neste caso (Figura 36).

O conjunto destes resultados levanta a hipótese de algumas células da linha K562 já possuírem à partida mutações que podem ser responsáveis pela resistência ao IM, e que foram seleccionadas na linha K562-R pela exposição crónica ao fármaco.

Apesar do aumento da capacidade das células K562-R para reparar lesões por BER não ser relevante para a aquisição de mutações, uma vez que esta é uma via de reparação bastante fidedigna, observa-se que estas células perdem sensibilidade a agentes genotóxicos oxidantes, o que em última análise, pode ter implicações a nível terapêutico.

Os resultados obtidos com os modelos celulares sugeriam a possibilidade de algumas das variações ocorrerem em doentes resistentes ao IM. Assim, foram seleccionados doentes sensíveis ao IM, com níveis de expressão de *BCR-ABL* muito reduzidos ou mesmo nulos, e doentes resistentes ao IM, mas sem mutação no domínio quinase da BCR-ABL e com níveis de expressão de *BCR-ABL* entre 18,7 e 100% (Tabela 3).

Devido a limitações de material biológico, apenas foi possível testar alterações ao nível da expressão de genes em doentes, uma vez que não havia quantidade suficiente de proteína para testar por Western Blot.

Curiosamente, os padrões de expressão dos genes em estudo são muito semelhantes entre doentes sensíveis, sem transcritos *BCR-ABL*, e em doentes resistentes, com elevada expressão de *BCR-ABL*. Isto acontece mesmo em genes como o *BCL2* e o *BCL-XL* cuja expressão é descrita na literatura, e demonstrou-se no presente trabalho, como sendo regulada pela actividade da proteína BCR-ABL. Uma informação essencial, da qual não dispomos, é a medicação que os doentes resistentes sem mutação faziam à data da recolha da amostra, pois caso ainda estivessem a fazer tratamento crónico com um dos inibidores de tirosina quinase, uma hipótese plausível seria estar-se perante casos de resistência independentes da actividade de BCR-ABL, o que explicaria os níveis de expressão dos genes estudados serem tão semelhantes. No entanto, com os dados que possuímos, e com uma amostra tão reduzida de doentes, não nos é possível tirar qualquer conclusão destes resultados.

## 5. Considerações finais e perspectivas futuras

Os resultados obtidos com este trabalho permitem concluir que o mecanismo que torna as células leucémicas K562-R resistentes ao IM, não é nenhum dos previamente descritos na literatura. Trata-se de um modelo de células em que a resistência é independente da actividade da proteína BCR-ABL, no entanto, o mecanismo que permite às células sobreviverem na presença de IM, não é ainda conhecido.

Identificou-se um aumento da expressão da proteína SURVIVINA nas células resistentes ao IM que pode estar envolvido na resistência das células. No entanto, para determinar a importância da SURVIVINA na resistência, mais ensaios terão de ser realizados. Uma vez que esta proteína inibe a activação das CASPASES, inicialmente é necessário estudar se nas células resistentes o IM leva à libertação do citocromo c da mitocôndria. Se tal se confirmar, posteriormente será necessário verificar se nestas células ocorre, ou não, a activação das CASPASES e se poderá haver o envolvimento de outras IAP's. Paralelamente, terá de se inibir a actividade da SURVIVINA nas células, tanto com inibidores, como pelo silenciamento do gene. Este conjunto de resultados dá nos uma perspectiva mais clara da importância da sobre-expressão de SURVIVINA na resistência.

Para confirmar o aumento da capacidade proliferativa das células será inicialmente utilizada a marcação com diacetato de carboxifluoresceína. Caso este aumento se confirme, devem ser estudados novos alvos moleculares uma vez que, nos nossos resultados, as alterações na expressão de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, não são significativas.

Além disso, apesar de não se terem detectado diferenças na expressão do supressor de tumor *GADD45 $\gamma$*  entre doentes sensíveis e resistentes ao IM, deve ser aprofundado se a sub-expressão deste gene nas células K562-R está envolvido na resistência.

Para esclarecer o potencial envolvimento da via p38 na resistência ao IM deverão ser realizados ensaios com novos inibidores e feito o silenciamento da via.

Em conclusão, este estudo é um contributo para o estudo dos mecanismos de resistência ao IM independentes da actividade da quinase BCR-ABL. Uma vez que pouco se sabe sobre esta forma de resistência, tentou-se com este trabalho encontrar indicadores de vias alteradas no modelo de células resistentes, que pudessem servir de base para trabalhos futuros.



## 6. Bibliografia

- Aceves-Luquero, C. I., Agarwal, A., Callejas-Valera, J. L., Arias-Gonzalez, L., Esparis-Ogando, A., Ovalle, L. D., Bellon-Echeverria, I., de la Cruz-Morcillo, M. A., Moya, E. M. G., Gimeno, I. M., Gomez, J. C., Deininger, M. W., Pandiella, A. e Prieto, R. S. 2009. Erk2, but Not Erk1, Mediates Acquired And "De Novo" Resistance to Imatinib Mesylate: Implication for Cml Therapy. *Plos One*. 4. 10.
- Agarwal, A., Eide, C. A., Harlow, A., Corbin, A. S., Mauro, M. J., Druker, B. J., Corless, C. L., Heinrich, M. C. e Deininger, M. W. 2008. An Activating Kras Mutation in Imatinib-Resistant Chronic Myeloid Leukemia. *Leukemia*. 22. 2269-2272.
- Amarante-Mendes, G. P., Kim, C. N., Liu, L., Huang, Y., Perkins, C. L., Green, D. R. e Bhalla, K. 1998. Bcr-Abl Exerts Its Antiapoptotic Effect against Diverse Apoptotic Stimuli through Blockage of Mitochondrial Release of Cytochrome C and Activation of Caspase-3. *Blood*. 91. 1700-1705.
- Amarante-Mendes, G. P., McGahon, A. J., Nishioka, W. K., Afar, D. E. H., Witte, O. N. e Green, D. R. 1998. Bcl-2-Independent Bcr-Abl-Mediated Resistance to Apoptosis: Protection Is Correlated with up Regulation of Bcl-X(L). *Oncogene*. 16. 1383-1390.
- Ambrosini, G., Adida, C., Sirugo, G. e Altieri, D. C. 1998. Induction of Apoptosis and Inhibition of Cell Proliferation by Survivin Gene Targeting. *Journal of Biological Chemistry*. 273. 11177-11182.
- An, X., Tiwari, A. K., Sun, Y., Ding, P.-R., Ashby, C. R., Jr. e Chen, Z.-S. 2010. Bcr-Abl Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Philadelphia Chromosome Positive Chronic Myeloid Leukemia: A Review. *Leuk Res*. 34. 1255-1268.
- Apperley, J. F. 2007. Part I: Mechanisms of Resistance to Imatinib in Chronic Myeloid Leukaemia. *Lancet Oncology*. 8. 1018-1029.
- Badran, A., Yoshida, A., Yujiwano, Imamura, S., Kawai, Y., Tsutani, H., Inuzuka, M. e Ueda, T. 2003. Expression of the Antiapoptotic Gene Survivin in Chronic Myeloid Leukemia. *Anticancer Research*. 23. 589-592.
- Bartram, C. R., Deklein, A., Hagemeijer, A., Vanagthoven, T., Vankessel, A. G., Bootsma, D., Grosveld, G., Fergusonsmith, M. A., Davies, T., Stone, M., Heisterkamp, N., Stephenson, J. R. e Groffen, J. 1983. Translocation of C-Abl Oncogene Correlates with the Presence of a Philadelphia-Chromosome in Chronic Myelocytic-Leukemia. *Nature*. 306. 277-280.
- Benneriah, Y., Daley, G. Q., Mesmasson, A. M., Witte, O. N. e Baltimore, D. 1986. The Chronic Myelogenous Leukemia Specific P210-Protein Is the Product of the Bcr/Abl Hybrid Gene. *Science*. 233. 212-214.
- Brady, N., Gaymes, T. J., Cheung, M., Mufti, G. J. e Rassool, F. V. 2002. Increased Nhej Activity in Myeloid Leukemias Is Associated with Ongoing or Induced DNA Damage at Sites That Recruit Key Nhej Proteins. *Blood*. 100. 4253.
- Branford, S. e Hughes, T. 2006. Detection of Bcr-Abl Mutations and Resistance to Imatinib Mesylate. *Myeloid Leukemia: Methods and Protocols*. 125. 93-106.

- Brehme, M., Hantschel, O., Colinge, J., Kaupe, I., Planyavsky, M., Kocher, T., Mechtler, K., Bennett, K. L. e Superti-Furga, G. 2009. Charting the Molecular Network of the Drug Target Bcr-Abl. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106. 7414-7419.
- Burke, B. A. e Carroll, M. 2010. Bcr-Abl: A Multi-Faceted Promoter of DNA Mutation in Chronic Myelogenous Leukemia. *Leukemia*. 24. 1105-1112.
- Calabretta, B. e Perrotti, D. 2004. The Biology of Cml Blast Crisis. *Blood*. 103. 4010-4022.
- Canitrot, Y., Falinski, R., Louat, T., Laurent, G., Cazaux, C., Hoffmann, J. S., Lautier, D. e Skorski, T. 2003. P210 Bcr/Abl Kinase Regulates Nucleotide Excision Repair (Ner) and Resistance to Uv Radiation. *Blood*. 102. 2632-2637.
- Carter, B. Z., Wang, R.-Y., Schober, W. D., Milella, M., Chism, D. e Andreeff, M. 2003. Targeting Survivin Expression Induces Cell Proliferation Defect and Subsequent Cell Death Involving Mitochondrial Pathway in Myeloid Leukemic Cells. *Cell Cycle*. 2. 488-493.
- Cirinna, M., Trotta, R., Salomoni, P., Kossev, P., Wasik, M., Perrotti, D. e Calabretta, B. 2000. Bcl-2 Expression Restores the Leukemogenic Potential of a Bcr/Abl Mutant Defective in Transformation. *Blood*. 96. 3915-3921.
- Coffer, P. J., Koenderman, L. e de Groot, R. P. 2000. The Role of Stats in Myeloid Differentiation and Leukemia. *Oncogene*. 19. 2511-2522.
- Conte, E., Stagno, F., Guglielmo, P., Scuto, A., Consoli, C. e Messina, A. 2005. Survivin Expression in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer Letters*. 225. 105-110.
- Cortes, J., Jabbour, E., Kantarjian, H., Yin, C. C., Shan, J., O'Brien, S., Garcia-Manero, G., Giles, F., Breeden, M., Reeves, N., Wierda, W. G. e Jones, D. 2007. Dynamics of Bcr-Abl Kinase Domain Mutations in Chronic Myeloid Leukemia after Sequential Treatment with Multiple Tyrosine Kinase Inhibitors. *Blood*. 110. 4005-4011.
- Cramer, K., Penserga, E. T., Reddy, A., Wosen, J. e Skorski, T. 2007. Bcr/Abl and Other Oncogenic Fusion Tyrosine Kinases (Ftks) Stimulate Single Strand Annealing (Ssa), the Rare and Extremely Unfaithful DNA Double-Strand Break Repair Pathway to Facilitate Genomic Instability in Hematologic Malignancies. *Blood*. 110. 998.
- Cuadrado, A. e Nebreda, A. R. 2010. Mechanisms and Functions of P38 Mapk Signalling. *Biochemical Journal*. 429. 403-417.
- Daley, G. Q., Vanetten, R. A. e Baltimore, D. 1990. Induction of Chronic Myelogenous Leukemia in Mice by the P210bcr/Abl Gene of the Philadelphia-Chromosome. *Science*. 247. 824-830.
- Dameshek, W. 1951. Some Speculations on the Myeloproliferative Syndromes. *Blood*. 6. 372-375.
- Davies, A., Jordanides, N. E., Giannoudis, A., Lucas, C. M., Hatziieremia, S., Harris, R. J., Jorgensen, H. G., Holyoake, T. L., Pirmohamed, M., Clark, R. E. e Mountford, J. C. 2009. Nilotinib Concentration in Cell Lines and Primary Cd34(+) Chronic Myeloid Leukemia Cells Is Not Mediated by Active Uptake or Efflux by Major Drug Transporters. *Leukemia*. 23. 1999-2006.

- de Groot, R. P., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W. e Koenderman, L. 2000. Stat5-Dependent Cyclind1 and Bcl-XI Expression in Bcr-Abl-Transformed Cells. *Mol Cell Biol Res Commun.* 3. 299-305.
- de Lavallade, H., Apperley, J. F., Khorashad, J. S., Milojkovic, D., Reid, A. G., Bua, M., Szydlo, R., Olavarria, E., Kaeda, J., Goldman, J. M. e Marin, D. 2008. Imatinib for Newly Diagnosed Patients with Chronic Myeloid Leukemia: Incidence of Sustained Responses in an Intention-to-Treat Analysis. *Journal of Clinical Oncology.* 26. 3358-3363.
- Deininger, M., Buchdunger, E. e Druker, B. J. 2005. The Development of Imatinib as a Therapeutic Agent for Chronic Myeloid Leukemia. *Blood.* 105. 2640-2653.
- Deininger, M. W. N., Goldman, J. M., Lydon, N. e Melo, J. V. 1997. The Tyrosine Kinase Inhibitor Cgp57148b Selectively Inhibits the Growth of Bcr-Abl-Positive Cells. *Blood.* 90. 3691-3698.
- Deininger, M. W. N., Goldman, J. M. e Melo, J. V. 2000. The Molecular Biology of Chronic Myeloid Leukemia. *Blood.* 96. 3343-3356.
- Donato, N. J., Wu, J. Y., Stapley, J., Gallick, G., Lin, H., Arlinghaus, R. e Talpaz, M. 2003. Bcr-Abl Independence and Lyn Kinase Overexpression in Chronic Myelogenous Leukemia Cells Selected for Resistance to Sti571. *Blood.* 101. 690-698.
- Donato, N. J., Wu, J. Y., Stapley, J., Lin, H., Arlinghaus, R., Aggarwal, B., Shishodin, S., Albitar, M., Hayes, K., Kantarjian, H. e Talpaz, M. 2004. Imatinib Mesylate Resistance through Bcr-Abl Independence in Chronic Myelogenous Leukemia. *Cancer Research.* 64. 672-677.
- Druker, B. J. 2008. Translation of the Philadelphia Chromosome into Therapy for Cml. *Blood.* 112. 4808-4817.
- Druker, B. J., Guilhot, F., O'Brien, S. G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M. W. N., Silver, R. T., Goldman, J. M., Stone, R. M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B. L., Gabrilove, J. L., Rousselot, P., Reiffers, J., Cornelissen, J. J., Hughes, T., Agis, H., Fischer, T., Verhoef, G., Shepherd, J., Saglio, G., Gratwohl, A., Nielsen, J. L., Radich, J. P., Simonsson, B., Taylor, K., Baccarani, M., So, C., Letvak, L., Larson, R. A. e Investigators, I. 2006. Five-Year Follow-up of Patients Receiving Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine.* 355. 2408-2417.
- Druker, B. J., Talpaz, M., Resta, D. J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J. M., Lydon, N. B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S. e Sawyers, C. L. 2001. Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the Bcr-Abl Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine.* 344. 1031-1037.
- Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., Zimmermann, J. e Lydon, N. B. 1996. Effects of a Selective Inhibitor of the Abl Tyrosine Kinase on the Growth of Bcr-Abl Positive Cells. *Nature Medicine.* 2. 561-566.
- Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R. e Kantarjian, H. M. 1999. Mechanisms of Disease - the Biology of Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine.* 341. 164-172.

- Fang, G. F., Kim, C. N., Perkins, C. L., Ramadevi, N., Winton, E., Wittmann, S. e Bhalla, K. N. 2000. Cgp57148b (Sti-571) Induces Differentiation and Apoptosis and Sensitizes Bcr-Abl-Positive Human Leukemia Cells to Apoptosis Due to Antileukemic Drugs. *Blood*. 96. 2246-2253.
- Fernandes, M. S., Reddy, M. M., Gonneville, J. R., Deroo, S. C., Podar, K., Griffin, J. D., Weinstock, D. M. e Sattler, M. 2009. Bcr-Abl Promotes the Frequency of Mutagenic Single-Strand Annealing DNA Repair. *Blood*. 114. 1813-1819.
- Fialkow, P. J., Denman, A. M., Jacobson, R. J. e Lowenthal, M. N. 1978. Chronic Myelocytic-Leukemia - Origin of Some Lymphocytes from Leukemic Stem-Cells. *Journal of Clinical Investigation*. 62. 815-823.
- Frazer, R., Irvine, A. E. e McMullin, M. F. 2007. Chronic Myeloid Leukaemia in the 21st Century. *The Ulster Medical Journal*. 76. 8-17.
- Gambacorti-Passerini, C. B., Gunby, R. H., Piazza, R., Galietta, A., Rostagno, R. e Scapozza, L. 2003. Molecular Mechanisms of Resistance to Imatinib in Philadelphia-Chromosome-Positive Leukaemias. *Lancet Oncology*. 4. 75-85.
- Gaymes, T. J., Mufti, G. J. e Rassool, F. V. 2002. Myeloid Leukemias Have Increased Activity of the Nonhomologous End-Joining Pathway and Concomitant DNA Misrepair That Is Dependent on the Ku70/86 Heterodimer. *Cancer Research*. 62. 2791-2797.
- Gorre, M. E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P. N. e Sawyers, C. L. 2001. Clinical Resistance to Sti-571 Cancer Therapy Caused by Bcr-Abl Gene Mutation or Amplification. *Science*. 293. 876-880.
- Gottesman, M. M., Fojo, T. e Bates, S. E. 2002. Multidrug Resistance in Cancer: Role of Atp-Dependent Transporters. *Nature Reviews Cancer*. 2. 48-58.
- Graham, S. M., Jorgensen, H. G., Allan, E., Pearson, C., Alcorn, M. J., Richmond, L. e Holyoake, T. L. 2002. Primitive, Quiescent, Philadelphia-Positive Stem Cells from Patients with Chronic Myeloid Leukemia Are Insensitive to Sti571 in Vitro. *Blood*. 99. 319-325.
- Grant, H., Jiang, X., Stebbing, J., Foroni, L., Craddock, C., Griffiths, M., Clark, R. E., O'Brien, S., Khorashad, J. S., Gerrard, G., Wang, L., Irving, J. A. E., Wang, M., Karran, L., Dyer, M. J. S., Forrest, D., Page, K., Eaves, C. J. e Woolfson, A. 2010. Analysis of Bcr-Abl1 Tyrosine Kinase Domain Mutational Spectra in Primitive Chronic Myeloid Leukemia Cells Suggests a Unique Mutator Phenotype. *Leukemia*. 24. 1817-1821.
- Groffen, J., Stephenson, J. R., Heisterkamp, N., Deklein, A., Bartram, C. R. e Grosveld, G. 1984. Philadelphia Chromosomal Breakpoints Are Clustered within a Limited Region, Bcr, on Chromosome-22. *Cell*. 36. 93-99.
- Hamilton, A., Alhashimi, F., Myssina, S., Jorgensen, H. G. e Holyoake, T. L. 2009. Optimization of Methods for the Detection of Bcr-Abl Activity in Philadelphia-Positive Cells. *Experimental Hematology*. 37. 395-401.
- Hernandez-Boluda, J. C., Bellosillo, B., Vela, M. C., Colomer, D., Alvarez-Larran, A. e Cervantes, F. 2005. Survivin Expression in the Progression of Chronic Myeloid Leukemia: A Sequential Study in 16 Patients. *Leukemia & Lymphoma*. 46. 717-722.

- Hiwase, D. K., Saunders, V., Hewett, D., Frede, A., Zrim, S., Dang, P., Eadie, L., To, L. B., Melo, J., Kumar, S., Hughes, T. P. e White, D. L. 2008. Dasatinib Cellular Uptake and Efflux in Chronic Myeloid Leukemia Cells: Therapeutic Implications. *Clinical Cancer Research*. 14. 3881-3888.
- Hochhaus, A., Kreil, S., Corbin, A. S., La Rosee, P., Muller, M. C., Lahaye, T., Hanfstein, B., Schoch, C., Cross, N., Berger, U., Gschaidmeier, H., Druker, B. J. e Hehlmann, R. 2002. Molecular and Chromosomal Mechanisms of Resistance to Imatinib (St1571) Therapy. *Leukemia*. 16. 2190-2196.
- Hochhaus, A., O'Brien, S. G., Guilhot, F., Druker, B. J., Branford, S., Feroni, L., Goldman, J. M., Muller, M. C., Radich, J. P., Rudoltz, M., Mone, M., Gathmann, I., Hughes, T. P., Larson, R. A. e Investigators, I. 2009. Six-Year Follow-up of Patients Receiving Imatinib for the First-Line Treatment of Chronic Myeloid Leukemia. *Leukemia*. 23. 1054-1061.
- Hochhaus, A., Schenk, T., Erben, P., Ernst, T., La Rosee, P. e Muller, M. C. 2009. Cause and Management of Therapy Resistance. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 22. 367-379.
- Horita, M., Andreu, E. J., Benito, A., Arbona, C., Sanz, C., Benet, I., Prosper, F. e Fernandez-Luna, J. L. 2000. Blockade of the Bcr-Abl Kinase Activity Induces Apoptosis of Chronic Myelogenous Leukemia Cells by Suppressing Signal Transducer and Activator of Transcription 5-Dependent Expression of Bcl-(XI). *Journal of Experimental Medicine*. 191. 977-984.
- Houghton, P. J., Germain, G. S., Harwood, F. C., Schuetz, J. D., Stewart, C. F., Buchdunger, E. e Traxler, P. 2004. Imatinib Mesylate Is a Potent Inhibitor of the Abcg2 (Bcrp) Transporter and Reverses Resistance to Topotecan and Sn-38 in Vitro. *Cancer Research*. 64. 2333-2337.
- Ilaria, R. L. e VanEtten, R. A. 1996. P210 and P190(Bcr/Abl) Induce the Tyrosine Phosphorylation and DNA Binding Activity of Multiple Specific Stat Family Members. *Journal of Biological Chemistry*. 271. 31704-31710.
- Janumyan, Y. M., Sansam, C. G., Chattopadhyay, A., Cheng, N. L., Soucie, E. L., Penn, L. Z., Andrews, D., Knudson, C. M. e Yang, E. 2003. Bcl-X(L)/Bcl-2 Coordinately Regulates Apoptosis, Cell Cycle Arrest and Cell Cycle Entry. *Embo Journal*. 22. 5459-5470.
- Kambhampati, S. 2009. P38 in Chronic Myelogenous Leukemia: A Target and a Possible Biomarker. *Leukemia & Lymphoma*. 50. 1909-1910.
- Kantarjian, H., Sawyers, C., Hochhaus, A., Guilhot, F., Schiffer, C., Gambacorti-Passerini, C., Niederwieser, D., Resta, D., Capdeville, R., Zoellner, U., Talpaz, M., Druker, B. e Int, S. T. I. C. M. L. S. G. 2002. Hematologic and Cytogenetic Responses to Imatinib Mesylate in Chronic Myelogenous Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 346. 645-652.
- Kantarjian, H., Schiffer, C., Jones, D. e Cortes, J. 2008. Monitoring the Response and Course of Chronic Myeloid Leukemia in the Modern Era of Bcr-Abl Tyrosine Kinase Inhibitors: Practical Advice on the Use and Interpretation of Monitoring Methods. *Blood*. 111. 1774-1780.
- Kantarjian, H. M., Giles, F., Quintas-Cardama, A. e Cortes, J. 2007. Important Therapeutic Targets in Chronic Myelogenous Leukemia. *Clinical Cancer Research*. 13. 1089-1097.

Kantarjian, H. M., O'Brien, S., Cortes, J. E., Shan, J. Q., Giles, F. J., Rios, M. B., Faderl, S. H., Wierda, W. G., Ferrajoli, A., Verstovsek, S., Keating, M. J., Freireich, E. J. e Talpaz, M. 2003. Complete Cytogenetic and Molecular Responses to Interferon-Alpha-Based Therapy for Chronic Myelogenous Leukemia Are Associated with Excellent Long-Term Prognosis. *Cancer*. 97. 1033-1041.

Kantarjian, H. M., Talpaz, M., Giles, F., O'Brien, S. e Cortes, J. 2006. New Insights into the Pathophysiology of Chronic Myeloid Leukemia and Imatinib Resistance. *Annals of Internal Medicine*. 145. 913-923.

Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J. e Waterfield, M. D. 2001. Cellular Function of Phosphoinositide 3-Kinases: Implications for Development, Immunity, Homeostasis, and Cancer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 17. 615-675.

Konig, H., Copland, M., Chu, S., Jove, R., Holyoake, T. L. e Bhatia, R. 2008. Effects of Dasatinib on Src Kinase Activity and Downstream Intracellular Signaling in Primitive Chronic Myelogenous Leukemia Hematopoietic Cells. *Cancer Research*. 68. 9624-9633.

Koptyra, M., Falinski, R., Nowicki, M. O., Stoklosa, T., Majsterek, I., Nieborowska-Skorska, M., Blasiak, J. e Skorski, T. 2006. Bcr/Abl Kinase Induces Self-Mutagenesis Via Reactive Oxygen Species to Encode Imatinib Resistance. *Blood*. 108. 319-327.

Langemeijer, S. M. C., de Graaf, A. O. e Jansen, J. H. 2008. Iaps as Therapeutic Targets in Haematological Malignancies. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 12. 981-993.

le Coutre, P., Ottmann, O. G., Giles, F., Kim, D. W., Cortes, J., Gattermann, N., Apperley, J. F., Larson, R. A., Abruzzese, E., O'Brien, S. G., Kuliczowski, K., Hochhaus, A., Mahon, F. X., Saglio, G., Gobbi, M., Kwong, Y. L., Baccarani, M., Hughes, T., Martinelli, G., Radich, J. P., Zheng, M., Shou, Y. e Kantarjian, H. 2008. Nilotinib (Formerly Amn107), a Highly Selective Bcr-Abl Tyrosine Kinase Inhibitor, Is Active in Patients with Imatinib-Resistant or -Intolerant Accelerated-Phase Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood*. 111. 1834-1839.

le Coutre, P., Tassi, E., Varella-Garcia, M., Barni, R., Mologni, L., Cabrita, G., Marchesi, E., Supino, R. e Gambacorti-Passerini, C. 2000. Induction of Resistance to the Abelson Inhibitor St1571 in Human Leukemic Cells through Gene Amplification. *Blood*. 95. 1758-1766.

Lewis, J. M. e Schwartz, M. A. 1998. Integrins Regulate the Association and Phosphorylation of Paxillin by C-Abl. *Journal of Biological Chemistry*. 273. 14225-14230.

Li, F. Z., Ackermann, E. J., Bennett, C. F., Rothermel, A. L., Plescia, J., Tognin, S., Villa, A., Marchisio, P. C. e Altieri, D. C. 1999. Pleiotropic Cell-Division Defects and Apoptosis Induced by Interference with Survivin Function. *Nature Cell Biology*. 1. 461-466.

Li, F. Z., Ambrosini, G., Chu, E. Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P. C. e Altieri, D. C. 1998. Control of Apoptosis and Mitotic Spindle Checkpoint by Survivin. *Nature*. 396. 580-584.

Li, X. R., Liu, X., Wang, G. F., Zhu, X. H., Qu, X. H., Li, X. M., Yang, Y., Peng, L., Li, C. F., Li, P., Huang, W., Ma, Q. J. e Cao, C. 2009. Non-Receptor Tyrosine Kinases C-Abl and Arg Regulate the Activity of C/Ebp Beta. *Journal of Molecular Biology*. 391. 729-743.

- Lozzio, C. B. e Lozzio, B. B. 1975. Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell-Line with Positive Philadelphia Chromosome. *Blood*. 45. 321-334.
- Lucas, C. M., Wang, L., Austin, G. M., Knight, K., Watmough, S. J., Shwe, K. H., Dasgupta, R., Butt, N. M., Galvani, D., Hoyle, C. F., Seale, J. R. C. e Clark, R. E. 2008. A Population Study of Imatinib in Chronic Myeloid Leukaemia Demonstrates Lower Efficacy Than in Clinical Trials. *Leukemia*. 22. 1963-1966.
- Mahon, F. X., Deininger, M. W. N., Schultheis, B., Chabrol, J., Reiffers, J., Goldman, J. M. e Melo, J. V. 2000. Selection and Characterization of Bcr-Abl Positive Cell Lines with Differential Sensitivity to the Tyrosine Kinase Inhibitor Sti571: Diverse Mechanisms of Resistance. *Blood*. 96. 1070-1079.
- Marcucci, G., Perrotti, D. e Caligiuri, M. A. 2003. Understanding the Molecular Basis of Imatinib Mesylate Therapy in Chronic Myelogenous Leukemia and the Related Mechanisms of Resistance. *Clinical Cancer Research*. 9. 1248-1252.
- McGahon, A., Bissonnette, R., Schmitt, M., Cotter, K. M., Green, D. R. e Cotter, T. G. 1994. Bcr-Abl Maintains Resistance of Chronic Myelogenous Leukemia-Cells to Apoptotic Cell-Death. *Blood*. 83. 1179-1187.
- Melo, J. V. e Chuah, C. 2007. Resistance to Imatinib Mesylate in Chronic Myeloid Leukaemia. *Cancer Letters*. 249. 121-132.
- Milojkovic, D. e Apperley, J. 2009. Mechanisms of Resistance to Imatinib and Second-Generation Tyrosine Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research*. 15. 7519-7527.
- Mori, A., Wada, H., Nishimura, Y., Okamoto, T., Takemoto, Y. e Kakishita, E. 2002. Expression of the Antiapoptosis Gene Survivin in Human Leukemia. *International Journal of Hematology*. 75. 161-165.
- Naldini, L., Stacchini, A., Cirillo, D. M., Aglietta, M., Gavosto, F. e Comoglio, P. M. 1986. Phosphotyrosine Antibodies Identify the P210c-Abl Tyrosine Kinase and Proteins Phosphorylated on Tyrosine in Human Chronic Myelogenous Leukemia-Cells. *Molecular and Cellular Biology*. 6. 1803-1811.
- Nichols, G. L., Raines, M. A., Vera, J. C., Lacomis, L., Tempst, P. e Golde, D. W. 1994. Identification of Crkl as the Constitutively Phosphorylated 39-Kd Tyrosine Phosphoprotein in Chronic Myelogenous Leukemia-Cells. *Blood*. 84. 2912-2918.
- Niwa, T., Asaki, T. e Kimura, S. 2007. Ns-187 (Inno-406), a Bcr-Abl/Lyn Dual Tyrosine Kinase Inhibitor. *Anal Chem Insights*. 2. 93-106.
- Nowell, P. C. e Hungerford, D. A. 1960. Minute Chromosome in Human Chronic Granulocytic Leukemia. *Science*. 132. 1497-1497.
- Nowicki, M. O., Falinski, R., Koptyra, M., Slupianek, A., Stoklosa, T., Gloc, E., Nieborowska-Skorska, M., Blasiak, J. e Skorski, T. 2004. Bcr/Abl Oncogenic Kinase Promotes Unfaithful Repair of the Reactive Oxygen Species-Dependent DNA Double-Strand Breaks. *Blood*. 104. 3746-3753.
- O'Brien, S. G., Guilhot, F., Larson, R. A., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., Cornelissen, J. J., Fischer, T., Hochhaus, A., Hughes, T., Lechner, K., Nielsen, J. L., Rousselot, P., Reiffers, J., Saglio, G., Shepherd, J., Simonsson, B., Gratwohl, A., Goldman, J. M., Kantarjian, H., Taylor, K., Verhoef, G., Bolton, A. E., Capdeville,

R., Druker, B. J., Durrant, S., Schwarzer, A., Joske, D., Seymour, J., Grigg, A., Ma, D., Arthur, C., Bradstock, K., Joshua, D., Louwagie, A., Martiat, P., Straetmans, N., Bosly, A., Shustik, C., Lipton, J., Forrest, D., Walker, I., Roy, D. C., Rubinger, M., Bence-Bruckler, I., Kovacs, M., Turner, A. R., Birgens, H., Bjerrum, O., Facon, T., Harousseau, J. L., Tulliez, M., Guerci, A., Blaise, D., Maloisel, F., Michallet, M., Hossfeld, D., Mertelsmann, R., Andreesen, R., Nerl, C., Freund, M., Gattermann, N., Hoeffken, K., Ehninger, G., Deininger, M., Ottmann, O., Peschel, C., Fruehauf, S., Neubauer, A., Le Coutre, P., Aulitzky, W., Fanin, R., Rosti, G., Mandelli, F., Morra, E., Carella, A., Lazzarino, M., Petrini, M., Ferrini, P. R., Nobile, F., Liso, V., Ferrara, F., Rizzoli, V., Fioritoni, G., Martinelli, G., Ossenkoppele, G., Browett, P., Gedde-Dahl, T., Tangen, J. M., Dahl, I., Odriozola, J., Boluda, J. C. H., Steegmann, J. L., Canizo, C., Sureda, A., Diaz, J., Granena, A., Fernandez, M. N., Stenke, L., Paul, C., Bjoreman, M., Malm, C., Wadenvik, H., Nilsson, P. G., Turesson, I., Hess, U., Solenthaler, M., Russel, N., Mufti, G., Cavenagh, J., Clark, R. E., Green, A. R., Holyoake, T. L., Lucas, G. S., Smith, G., Milligan, D. W., Rule, S. J., Burnett, A. K., Moroosse, R., Wetzler, M., Bearden, J., Brown, R., Lobell, M., Cataland, S., Rabinowitz, I., Meisenberg, B., Gabilove, J., Thompson, K., Graziano, S., Emanuel, P., Gross, H., Cobb, P., Bhatia, R., Dakhil, S., Irwin, D., Issell, B., Pavletic, S., Kuebler, P., Layhe, E., Butera, P., Glass, J., Moore, J., Grant, B., Niell, H., Herzig, R., Burris, H., Peterson, B., Powell, B., Kalaycio, M., Stirewalt, D., Samlowski, W., Berman, E., Limentani, S., Seay, T., Shea, T., Akard, L., Becker, P., DeVine, S., Hart, R., Veith, R., Wade, J., Brunvand, M., Silver, R., Kalman, L., Strickland, D., Shurafa, M., Bashey, A., Shaddock, R., Cooper, S., Safah, H., Rubenstein, M., Collins, R., Keller, A., Stone, R., Tallman, M., Stevens, D., Pecora, A., Agha, M., Holmes, H., Rowe, J., Schiffer, C. A., Buyse, M., Cornelissen, J. e Investigators, I. 2003. Imatinib Compared with Interferon and Low-Dose Cytarabine for Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 348. 994-1004.

O'Hare, T., Eide, C. A. e Deininger, M. W. 2008. Persistent Lyn Signaling in Imatinib-Resistant, Bcr-Abl-Independent Chronic Myelogenous Leukemia. *Journal of the National Cancer Institute*. 100. 908-909.

Oda, T., Heaney, C., Hagopian, J. R., Okuda, K., Griffin, J. D. e Druker, B. J. 1994. Crkl Is the Major Tyrosine-Phosphorylated Protein in Neutrophils from Patients with Chronic Myelogenous Leukemia. *Journal of Biological Chemistry*. 269. 22925-22928.

Oetzel, C., Jonuleit, T., Gotz, A., van der Kuip, H., Michels, H., Duyster, J., Hallek, M. e Aulitzky, W. E. 2000. The Tyrosine Kinase Inhibitor Cgp 57148 (Stl 571) Induces Apoptosis in Bcr-Abl-Positive Cells by Down-Regulating Bcl-X. *Clinical Cancer Research*. 6. 1958-1968.

Ono, K. e Han, J. H. 2000. The P38 Signal Transduction Pathway - Activation and Function. *Cellular Signalling*. 12. 1-13.

Oto, O. A., Paydas, S., Tanriverdi, K., Seydaoglu, G., Yavuz, S. e Disel, U. 2007. Survivin and Epr-1 Expression in Acute Leukemias: Prognostic Significance and Review of the Literature. *Leukemia Research*. 31. 1495-1501.

Patel, H., Marley, S. B. e Gordon, M. Y. 2006. Detection in Primary Chronic Myeloid Leukaemia Cells of P210bcr-Abl1 in Complexes with Adaptor Proteins Cbl, Crkl, and Grb2. *Genes Chromosomes & Cancer*. 45. 1121-1129.

- Pavlovsky, C., Kantarjian, H. e Cortes, J. E. 2009. First-Line Therapy for Chronic Myeloid Leukemia: Past, Present, and Future. *American Journal of Hematology*. 84. 287-293.
- Pendergast, A. M., Muller, A. J., Havlik, M. H., Maru, Y. e Witte, O. N. 1991. Bcr Sequences Essential for Transformation by the Bcr-Abl Oncogene Bind to the Abl-Sh2 Regulatory Domain in a Non-Phosphotyrosine-Dependent Manner. *Cell*. 66. 161-171.
- Pene-Dumitrescu, T. e Smithgall, T. E. 2010. Expression of a Src Family Kinase in Chronic Myelogenous Leukemia Cells Induces Resistance to Imatinib in a Kinase-Dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry*. 285. 21446-21457.
- Perrotti, D., Jamieson, C., Goldman, J. e Skorski, T. 2010. Chronic Myeloid Leukemia: Mechanisms of Blastic Transformation. *Journal of Clinical Investigation*. 120. 2254-2264.
- Picard, S., Titier, K., Etienne, G., Teilhet, E., Ducint, D., Bernard, M. A., Lassalle, R., Marit, G., Reiffers, J., Begaud, B., Moore, N., Molimard, M. e Mahon, F. X. 2007. Trough Imatinib Plasma Levels Are Associated with Both Cytogenetic and Molecular Responses to Standard-Dose Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia. *Blood*. 109. 3496-3499.
- Polampalli, S., Choughule, A., Negi, N., Shinde, S., Baisane, C., Amre, P., Subramanian, P. G., Gujral, S., Prabhash, K. e Parikh, P. 2008. Analysis and Comparison of Clinicohematological Parameters and Molecular and Cytogenetic Response of Two Bcr/Abl Fusion Transcripts. *Genetics and Molecular Research*. 7. 1138-1149.
- Ptasznik, A., Nakata, Y., Kalota, A., Emerson, S. G. e Gewirtz, A. M. 2004. Short Interfering Rna (Sirna) Targeting the Lyn Kinase Induces Apoptosis in Primary, and Drug-Resistant, Bcr-Abl1(+) Leukemia Cells. *Nature Medicine*. 10. 1187-1189.
- Puil, L., Liu, J. X., Gish, G., Mbamalu, G., Bowtell, D., Pelicci, P. G., Arlinghaus, R. e Pawson, T. 1994. Bcr-Abl Oncoproteins Bind Directly to Activators of the Ras Signaling Pathway. *Embo Journal*. 13. 764-773.
- Puttini, M., Coluccia, A. M. L., Boschelli, F., Cleris, L., Marchesi, E., Donella-Deana, A., Ahmed, S., Redaelli, S., Piazza, R., Magistrini, V., Andreoni, F., Scapozza, L., Formelli, F. e Gambacorti-Passerini, C. 2006. In Vitro and in Vivo Activity of Ski-606, a Novel Src-Abl Inhibitor, against Imatinib-Resistant Bcr-Abl(+) Neoplastic Cells. *Cancer Research*. 66. 11314-11322.
- Quintas-Cardama, A. e Cortes, J. 2009. Molecular Biology of Bcr-Abl1-Positive Chronic Myeloid Leukemia. *Blood*. 113. 1619-1630.
- Quintas-Cardama, A. e Cortes, J. E. 2006. Chronic Myeloid Leukemia: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*. 81. 973-988.
- Quintas-Cardama, A., Kantarjian, H. M. e Cortes, J. E. 2009. Mechanisms of Primary and Secondary Resistance to Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer Control*. 16. 122-131.
- Raitano, A. B., Halpern, J. R., Hambuch, T. M. e Sawyers, C. L. 1995. The Bcr-Abl Leukemia Oncogene Activates Jun Kinase and Requires Jun for Transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92. 11746-11750.

- Rohrbacher, M. e Hasford, J. 2009. Epidemiology of Chronic Myeloid Leukaemia (Cml). *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 22. 295-302.
- Rouault, J. P., Falette, N., Guehenneux, F., Guillot, C., Rimokh, R., Wang, Q., Berthet, C., MoyretLalle, C., Savatier, P., Pain, B., Shaw, P., Berger, R., Samarut, J., Magaud, J. P., Ozturk, M., Samarut, C. e Puisieux, A. 1996. Identification of Btg2, an Antiproliferative P53-Dependent Component of the DNA Damage Cellular Response Pathway. *Nature Genetics*. 14. 482-486.
- Rowley, J. D. 1973. New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukemia Identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature*. 243. 290-293.
- Ryan, B. M., O'Donovan, N. e Duffy, M. J. 2009. Survivin: A New Target for Anti-Cancer Therapy. *Cancer Treatment Reviews*. 35. 553-562.
- Sallmyr, A., Fan, J. e Rassool, F. V. 2008. Genomic Instability in Myeloid Malignancies: Increased Reactive Oxygen Species (Ros), DNA Double Strand Breaks (Dsbs) and Error-Prone Repair. *Cancer Letters*. 270. 1-9.
- Samanta, A. K., Chakraborty, S. N., Wang, Y., Kantarjian, H., Sun, X., Hood, J., Perrotti, D. e Arlinghaus, R. B. 2009. Jak2 Inhibition Deactivates Lyn Kinase through the Set-Pp2a-Shp1 Pathway, Causing Apoptosis in Drug-Resistant Cells from Chronic Myelogenous Leukemia Patients. *Oncogene*. 28. 1669-1681.
- Sanchezgarcia, I. e Grutz, G. 1995. Tumorigenic Activity of the Bcr-Abl Oncogenes Is Mediated by Bcl2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92. 5287-5291.
- Sattler, M., Mohi, M. G., Pride, Y. B., Quinnan, L. R., Malouf, N. A., Podar, K., Gesbert, F., Iwasaki, H., Li, S. G., Van Etten, R. A., Gu, H. H., Griffin, J. D. e Neel, B. G. 2002. Critical Role for Gab2 in Transformation by Bcr/Abl. *Cancer Cell*. 1. 479-492.
- Sattler, M., Salgia, R., Okuda, K., Uemura, N., Durstin, M. A., Pisick, E., Xu, G., Li, J. L., Prasad, K. V. e Griffin, J. D. 1996. The Proto-Oncogene Product P120(Cbl) and the Adaptor Proteins Crkl and C-Crk Link C-Abl, P190(Bcr/Abl) and P210(Bcr/Abl) to the Phosphatidylinositol-3' Kinase Pathway. *Oncogene*. 12. 839-846.
- Sattler, M., Verma, S., Shrikhande, G., Byrne, C. H., Pride, Y. B., Winkler, T., Greenfield, E. A., Salgia, R. e Griffin, J. D. 2000. The Bcr/Abl Tyrosine Kinase Induces Production of Reactive Oxygen Species in Hematopoietic Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 275. 24273-24278.
- Savona, M. e Talpaz, M. 2008. Getting to the Stem of Chronic Myeloid Leukaemia. *Nature Reviews Cancer*. 8. 341-350.
- Sawyers, C. L., Hochhaus, A., Feldman, E., Goldman, J. M., Miller, C. B., Ottmann, O. G., Schiffer, C. A., Talpaz, M., Guilhot, F., Deininger, M. W. N., Fischer, T., O'Brien, S. G., Stone, R. M., Gambacorti-Passerini, C. B., Russell, N. H., Reiffers, J. J., Shea, T. C., Chapuis, B., Coutre, S., Tura, S., Morra, E., Larson, R. A., Saven, A., Peschel, C., Gratwohl, A., Mandelli, F., Ben-Am, M., Gathmann, I., Capdeville, R., Paquette, R. L. e Druker, B. J. 2002. Imatinib Induces Hematologic and Cytogenetic Responses in Patients with Chronic Myelogenous Leukemia in Myeloid Blast Crisis: Results of a Phase Ii Study. *Blood*. 99. 3530-3539.

- Sawyers, C. L., McLaughlin, J., Goga, A., Havlik, M. e Witte, O. 1994. The Nuclear Tyrosine Kinase C-Abl Negatively Regulates Cell-Growth. *Cell*. 77. 121-131.
- Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W. T., Clarkson, B. e Kuriyan, J. 2000. Structural Mechanism for Sti-571 Inhibition of Abelson Tyrosine Kinase. *Science*. 289. 1938-1942.
- Shah, N. P., Tran, C., Lee, F. Y., Chen, P., Norris, D. e Sawyers, C. L. 2004. Overriding Imatinib Resistance with a Novel Abl Kinase Inhibitor. *Science*. 305. 399-401.
- Sharma, P., Kumar, L., Mohanty, S. e Kochupillai, V. 2009. Response to Imatinib Mesylate in Chronic Myeloid Leukemia Patients with Variant Bcr-Abl Fusion Transcripts. *Annals of Hematology*. 89. 241-247.
- Shaul, Y. e Ben-Yehoyada, M. 2005. Role of C-Abl in the DNA Damage Stress Response. *Cell Research*. 15. 33-35.
- Shet, A. S., Jahagirdar, B. N. e Verfaillie, C. M. 2002. Chronic Myelogenous Leukemia: Mechanisms Underlying Disease Progression. *Leukemia*. 16. 1402-1411.
- Skorski, T. 2007. Genomic Instability: The Cause and Effect of Bcr/Abl Tyrosine Kinase. *Curr Hematol Malig Rep*. 2. 69-74.
- Skorski, T. 2008. Bcr/Abl, DNA Damage and DNA Repair: Implications for New Treatment Concepts. *Leukemia & Lymphoma*. 49. 610-614.
- Slupianek, A., Nowicki, M. O., Koptyra, M. e Skorski, T. 2006. Bcr/Abl Modifies the Kinetics and Fidelity of DNA Double-Strand Breaks Repair in Hematopoietic Cells. *DNA Repair*. 5. 243-250.
- Slupianek, A., Schmutte, C., Tomblin, G., Nieborowska-Skorska, M., Hoser, G., Nowicki, M. O., Pierce, A. J., Fishel, R. e Skorski, T. 2001. Bcr/Abl Regulates Mammalian RecA Homologs, Resulting in Drug Resistance. *Molecular Cell*. 8. 795-806.
- Sonoyama, J., Matsumura, I., Ezoe, S., Satoh, Y., Zhang, X., Kataoka, Y., Takai, E., Mizuki, M., Machii, T., Wakao, H. e Kanakura, Y. 2002. Functional Cooperation among Ras, Stat5, and Phosphatidylinositol 3-Kinase Is Required for Full Oncogenic Activities of Bcr/Abl in K562 Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 277. 8076-8082.
- Steelman, L. S., Pohnert, S. C., Shelton, J. G., Franklin, R. A., Bertrand, F. E. e McCubrey, J. A. 2004. Jak/Stat, Raf/Mek/Erk, Pi3k/Akt and Bcr-Abl in Cell Cycle Progression and Leukemogenesis. *Leukemia*. 18. 189-218.
- Stoklosa, T., Poplawski, T., Blasiak, G., Slupianek, A., Blasiak, J., Seferynska, I. e Skorski, T. 2007. Bcr/Abl Kinase Inhibits Mismatch Repair to Reduce Apoptosis and Induce Point Mutations. *Blood*. 110. 32.
- Talpaz, M., Shah, N. P., Kantarjian, H., Donato, N., Nicoll, J., Paquette, R., Cortes, J., O'Brien, S., Nicaise, C., Bleickardt, E., Blackwood-Chirchir, M. A., Iyer, V., Chen, T. T., Huang, F., Decillis, A. P. e Sawyers, C. L. 2006. Dasatinib in Imatinib-Resistant Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias. *New England Journal of Medicine*. 354. 2531-2541.

Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D. A., Vigna, N., Oltersdorf, T. e Reed, J. C. 1998. Iap-Family Protein Survivin Inhibits Caspase Activity and Apoptosis Induced by Fas (Cd95), Bax, Caspases, and Anticancer Drugs. *Cancer Research*. 58. 5315-5320.

Tenhoeve, J., Arlinghaus, R. B., Guo, J. Q., Heisterkamp, N. e Groffen, J. 1994. Tyrosine Phosphorylation of Crkl in Philadelphia(+) Leukemia. *Blood*. 84. 1731-1736.

Thomas, J., Wang, L. H., Clark, R. E. e Pirmohamed, M. 2004. Active Transport of Imatinib into and out of Cells: Implications for Drug Resistance. *Blood*. 104. 3739-3745.

Volpe, G., Panuzzo, C., Ulisciani, S. e Cilloni, D. 2009. Imatinib Resistance in Cml. *Cancer Letters*. 274. 1-9.

Weisberg, E., Manley, P. W., Cowan-Jacob, S. W., Hochhaus, A. e Griffin, J. D. 2007. Second Generation Inhibitors of Bcr-Abl for the Treatment of Imatinib-Resistant Chronic Myeloid Leukaemia. *Nature Reviews Cancer*. 7. 345-U345.

White, D. L., Saunders, V. A., Dang, P., Engler, J., Venables, A., Zrim, S., Zannettino, A., Lynch, K., Manley, P. W. e Hughes, T. 2007. Most Cml Patients Who Have a Suboptimal Response to Imatinib Have Low Oct-1 Activity: Higher Doses of Imatinib May Overcome the Negative Impact of Low Oct-1 Activity. *Blood*. 110. 4064-4072.

Wong, S. e Witte, O. N. 2004. The Bcr-Abl Story: Bench to Bedside and Back. *Annual Review of Immunology*. 22. 247-306.

Wu, J., Meng, F., Kong, L. Y., Peng, Z. H., Ying, Y. M., Bornmann, W. G., Darnay, B. G., Lamothe, B., Sun, H. S., Talpaz, M. e Donato, N. J. 2008. Association between Imatinib-Resistant Bcr-Abl Mutation-Negative Leukemia and Persistent Activation of Lyn Kinase. *Journal of the National Cancer Institute*. 100. 926-939.

Wu, J., Meng, F., Lu, H., Kong, L., Bornmann, W., Peng, Z. H., Talpaz, M. e Donato, N. J. 2008. Lyn Regulates Bcr-Abl and Gab2 Tyrosine Phosphorylation and C-Cbl Protein Stability in Imatinib-Resistant Chronic Myelogenous Leukemia Cells. *Blood*. 111. 3821-3829.

Zhang, X. W. e Ren, R. B. 1998. Bcr-Abl Efficiently Induces a Myeloproliferative Disease and Production of Excess Interleukin-3 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Mice: A Novel Model for Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood*. 92. 3829-3840.

## Anexos

### Anexo I. Reagentes, Material suplementar e Equipamento

**Tabela I** – Lista de reagentes e material complementar utilizados no decurso do trabalho.

<b>Reagentes e Material Complementar</b>	<b>Fabricante</b>
2',7'- Diclodihidrofluoresceína	Molecular probes
Ácido Clorídrico	Merck
Albumina de soro bovino 10mg/ml	Bio-Rad
AllPrep_DNA_RNA_Protein Mini Kit	Quiagen
Anexina V FITC	BD Pharmingen
Amersham ECL Blocking Agent	GE Healthcare
Ar contendo 5% CO <sub>2</sub>	AIR LIQUID
Azul de Bromofenol	Difco
BD FACSTFlow Sheath Fluid	BD Biosciences
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad
CellTiter96Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega
Cloreto de Cálcio	Merck
Cloreto de Sódio	Merck
Dasatinib	Toronto Research Chemicals, Inc
DMSO	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
Etanol	Merck
Frascos de Cultura	Sarstedt
Glicerol (87%)	Merck
Glicina (97%)	Sigma-Aldrich
Hematocítómetro	Optik Labor

Hepes	Sigma-Aldrich
Hidróxido de Sódio	Merck
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
Human DNA Damage Signaling RT <sup>2</sup> Profiler™ PCR Array	Quiagen
Imatinib	Santa Cruz Biotechnology
Inibidor de Protease	Roche
Iodeto de Propídio (250µg/ml)	MILLIPORE
Meio RPMI 1640	Sigma-Aldrich
Membrana de PVDF	MILLIPORE
Metanol	Merck
Microplacas de 96 poços para PCR em tempo real	Applied Biosystems
MINI- PROTEAN TGX,4-15% (4561083) Precast Gels	Bio-Rad
MINI- PROTEAN TGX,4-20% (4561093) Precast Gels	Bio-Rad
Nilotinb	Toronto Research Chemicals,Inc
N-laurosilsarcosina	Sigma-Aldrich
Nonidet P-40	USB Corporation
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
PBS	Sigma-Aldrich
Peróxido de hidrogénio	Sigma-Aldrich
Placas de cultura de 96 poços	Costar
RNase A	Roche
RT <sup>2</sup> First-Stand cDNA Synthesis Kit	Quiagen
SDS	Bio-Rad
Solução de Estreptomocina/Penicilina	Sigma-Aldrich
Soro Fetal Bovino	Sigma-Aldrich
Tampas adesivas para Microplacas	Applied Biosystems

TaqMan Gene Expression Assay	Applied Biosystems
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems
Trizma Base	Sigma-Aldrich
Trizma HCL	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
WesternDo 625 Goat Anti-Mouse Western Blot Kit	Invitrogen
WesternDo 625 Goat Anti-Rabbit Western Blot Kit	Invitrogen
$\beta$ -Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich

**Tabela II** – Lista de equipamento utilizado no decurso do trabalho.

<b>Equipamento</b>	<b>Fabricante</b>
Agitador orbital	New Brunswick G25 Shaker Incubator, Global Medical Instrumentation, Inc
Aparelho PCR em tempo real	ABI PRISM 7300, Applied Biosystems
Banho seco	Grant
Câmara de Fluxo Laminar	BIOAIR
Centrifuga	Centric 322, Technica
Centrifuga (extração de proteínas)	Centrifuge 5417R, Eppendorf
Citómetro de Fluxo	BD FACSCalibur™, BD Biosciences
Leitor de Micro-placas	ZENYTH 3100, Anthos
Máquina Fotográfica	Fujifilm 55000, Fujifilm
Microscópio Óptico	Dialux 20, Leitz
Microscópio de Inversão de Fases	TMS, Nixon
Nanodrop ND 1000	Thermo Scientific
Sistema Western Blot	Mini-PROTEAN , Bio-Rad
Termociclador	GeneAmpPCR Sustum 9700 Thermal Cycler, Applied Biosystems

Transiluminador	Fluo.Link, Vilber Lourmat
Tubos Citometria Fluxo	BD Biosciences

## Anexo II. Soluções

**Tabela III** - Composição da Solução de Lise utilizada na extração de proteínas totais. Tanto o Nonidet P-40, como o Inibidor de Protease, são adicionados ao tampão imediatamente antes da sua utilização. O tampão tem pH=8 e é armazenado a 4°C.

<b>Tampão de Lise</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Concentração</b>
Trizma Base	50mM
NaCl	150mM
EDTA	5mM
Nonidet P-40	1% (v/v)
Inibidor de Protease	1% (v/v)
PMSF	1mM

**Tabela IV** - Composição do *Sample Loading Buffer* utilizado para desnaturar e carregar as amostras de proteínas totais no gel de electroforese. O tampão tem pH=8 e é armazenado a -20°C para evitar a evaporação do  $\beta$ -Mercaptoetanol.

<b>Sample Loading Buffer (4ml)</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Volume (<math>\mu</math>l)</b>
H <sub>2</sub> O	1940
Solução Trizma 1M (pH8)	250
Solução SDS 10%	800
$\beta$ -Mercaptoetanol	200
Solução Azul de Bomofenol 1%	200

**Tabela V** - Composição da solução tampão de electroforese<sup>1</sup> utilizado na electroforese *SDS Page*, na técnica *Western Blot*. O tampão tem pH=8,3 e é armazenado a 4°C.

<b>Tampão de Electroforese 5x (1L)</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Massa (g)</b>
SDS	5
Trizma Base	15,14
Glicina	93,84

Perfazer com água nanopura para um volume de 1L.

**Tabela VI** - Composição do tampão de transferência utilizado na transferência das proteínas do gel de acrilamida para a membrana de PVDF na técnica *Western Blot*. O tampão tem pH=8,3 e é armazenado a 4°C.

<b>Tampão de Transferência 5x (1L)</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Massa (g)</b>
SDS	1,85
Trizma Base	29,25
Glicina	14,6

Adicionar 500ml de água nanopura e 500ml de Metanol

**Tabela VII** - Composição do tampão de ligação utilizado na marcação com anexina para leitura por citometria de fluxo. O tampão tem pH=7,4 e é armazenado a 4°.

<b>Tampão de Ligação 10x</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Concentração</b>
Hepes	0,1 M
NaCl	1,4 M
CaCl <sub>2</sub>	25mM

**Tabela VIII** - Composição da solução de iodeto de propídio utilizada na marcação do conteúdo de DNA para leitura por citometria de fluxo. Esta solução é preparada imediatamente antes de utilizar.

<b>Solução de Iodeto de Propídio</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Concentração (mg/ml)</b>
RNase A	0,02
Iodeto de Propídio	0,05

### Anexo III. Lista dos genes estudados com a placa *Human DNA Damage Signaling RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array*

Tabela IX – Lista dos genes, e respectiva função, cujo perfil de expressão de mRNA foi estudado com a placa *Human DNA Damage Signaling RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array*.

<b>Simbolo do Gene</b>	<b>Função</b>
ABL1	Apoptose; MMR
BRCA1	Apoptose; <i>Checkpoint</i> celular; HR
CIDEA	Apoptose
GADD45A	Apoptose; Paragem do ciclo celular
GADD45G	Apoptose
GML	Apoptose; Paragem do ciclo celular
IP6K3	Apoptose
PCBP4	Apoptose; Paragem do ciclo celular
AIFM1	Apoptose
PPP1R15A	Apoptose; Paragem do ciclo celular
RAD21	Apoptose; HR
TP53	Apoptose; <i>Checkpoint</i> celular
TP73	Apoptose; MMR
CHEK1	Paragem do Ciclo Celular
CHEK2	Paragem do Ciclo Celular
DDIT3	Paragem do Ciclo Celular
GTSE1	Paragem do Ciclo Celular
HUS1	Paragem do Ciclo Celular
MAP2K6	Paragem do Ciclo Celular
MAPK12	Paragem do Ciclo Celular
RAD17	Paragem do Ciclo Celular
RAD9A	Paragem do Ciclo Celular
SESN1	Paragem do Ciclo Celular
BTG2	Paragem do Ciclo Celular
ZAK	Paragem do Ciclo Celular
ATR	<i>Checkpoint</i> celular
ATM	<i>Checkpoint</i> celular
FANCG	<i>Checkpoint</i> celular; HR
NBN	<i>Checkpoint</i> celular; HR
RAD1	<i>Checkpoint</i> celular
RBBP8	<i>Checkpoint</i> celular
SMC1A	<i>Checkpoint</i> celular
MBD4	BER
MPG	BER
MUTYH	BER; MMR

NTHL1	BER
OGG1	BER
UNG	BER
XRCC1	BER
APEX1	BER
PNKP	BER
FEN1	BER; HR
CIB1	HR
XRCC6	HR; NHEJ
XRCC6BP1	HR
MRE11A	HR
PRKDC	HR; NHEJ
RAD50	HR
XRCC3	HR
XRCC2	HR
RAD51L1	HR
RAD51	HR
ERCC1	HR; NER
DMC1	HR
ANKRD17	MMR
EXO1	MMR
MLH1	MMR
MLH3	MMR
MSH2	MMR
MSH3	MMR
N4BP2	MMR
PMS1	MMR
PMS2	MMR
PMS2L3	MMR
TREX1	MMR
CCNH	NER
CDK7	NER
DDB1	NER
ERCC2	NER
LIG1	NER
RAD18	NER
XPA	NER
XPC	NER

**Legenda:** MMR - Reparação de Emparelhamentos de Nucleotídeos Errados; HR – Reparação Homóloga; BER – Reparação por Excisão de Bases; NHEJ – Reparação não Homóloga; NER – Reparação por Excisão de Nucleotídeos.