ANA ELISA BARREIROS BUENO DA SILVA

**ASPECTOS MOLECULARES
DA TRANSFORMAÇÃO CELULAR
INDUZIDA POR BCR-ABL**

**Tese de Doutorado apresentada ao Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo para a obtenção do Título de
Doutor em Ciências (Imunologia)**

São Paulo

2008

ANA ELISA BARREIROS BUENO DA SILVA

**ASPECTOS MOLECULARES
DA TRANSFORMAÇÃO CELULAR
INDUZIDA POR BCR-ABL**

**Tese de Doutorado apresentada ao Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo para a obtenção do Título de
Doutor em Ciências (Imunologia)**

Orientador: Prof. Dr. Gustavo P. Amarante-Mendes

São Paulo

2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Bueno da Silva, Ana Elisa Barreiros.

Aspectos moleculares da transformação celular induzida por Bcr-Abl
/ Ana Elisa Barreiros Bueno da Silva. -- São Paulo, 2007.

Orientador: João Gustavo Pessini Amarante Mendes.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Controle molecular da apoptose pela tirosina-quinase Bcr-Abl.

Versão do título para o inglês: Molecular aspects of Bcr-Abl-induced cell transformation.

Descritores: 1. Bcr-Abl 2. Transformação celular 3. Leucemia mielóide crônica 4. Tirosina-quinase 5. Apoptose 6. Proteoma I. Mendes, João Gustavo Pessini Amarante II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB013/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ana Elisa Barreiros Bueno da Silva.

Título da Tese: Aspectos moleculares da transformação celular induzida por Bcr-Abl .

Orientador(a): João Gustavo Pessini Amarante Mendes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Aos meus pais, Maria José e Luiz Carlos,
pessoas maravilhosas, a quem admiro
profundamente e adoro estar ao lado

Aos meus irmãos, Gui e Alê, cada dia me sinto mais orgulhosa dos
homens que vocês se tornaram! E à minha irmã Fernandinha, a mais
especial das criaturas e o melhor abraço do mundo!

Ao Felipe, meu grande amigo e amor,
companheiro de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gustavo P. Amarante-Mendes, uma pessoa apaixonada pela vida e pela Ciência. Muito obrigada pela orientação, amizade e ótima convivência pessoal e científica. É muito bom fazer parte do seu grupo de pesquisa.

À FAPESP, pela bolsa de doutorado e auxílio à pesquisa concedidos.

À CAPES, pela bolsa de doutorado-sanduíche (PDDE) concedida.

À Dra Junia V. Melo (Imperial College, Londres) que me recebeu em seu laboratório em Londres durante o doutorado sanduíche. Obrigada pela oportunidade única de aprendizado e amadurecimento profissional.

Aos Professores Dra. Alicia J. Kowaltowski, Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto e Dr. Roger Chammas, obrigada pelas sugestões e análise crítica deste trabalho durante o exame de Qualificação (passagem de mestrado para doutorado).

Aos Professores Dr. Edecio Cunha-Neto, Dr. Kald Ali Abdallah e Dr. Luiz Fernando Lima Reis, agradeço pelas sugestões e análise crítica deste trabalho durante o exame de Qualificação (doutorado).

Ao Prof. Dr. Edecio Cunha-Neto por disponibilizar seu laboratório para a realização dos experimentos de proteômica e pela valiosa colaboração científica.

À Priscila Camilo Teixeira e à Andréia Kuramoto, minhas colaboradoras e amigas, muito obrigada pela enorme ajuda.

À Profa Dra. Ana Campa e às Dras. Alziana Pedrosa e Sueli Silva, obrigada pelas colaborações científicas.

À Dra Mahasti S. Macedo, que junto com o Dr. Gustavo, foi minha orientadora durante a Iniciação Científica.

Aos docentes do Departamento de Imunologia, em especial aos Professores Dra. Ises Abrahamsohn, Dra. Lourdes Isaac, Dra. Regina D'Império Lima, Dr. Momtchilo Russo e Dr. Luiz Vicente Rizzo.

Aos meus amigos do Laboratório: Claudinha, sempre muito divertida, adoro as suas piadas e neuras; Jackie, o que falar de você, é o porto seguro de todos, a quem recorremos nas horas de aperto, obrigada por ser essa amiga maravilhosa; Fabíola, um coração enorme, quer sempre ajudar, quero ser igual a você quando crescer!; Moki, minha amiguinha desde as épocas da Bio, amiga leal e que adoro muito; Janine, a “JanJan”, chiquetíssima, torço muito por você; Ricardão, meu assessor para assuntos culturais e “computadorescos”, obrigada pelas ajudas; Daniel, boa sorte no futuro e você me deve uma viagem à Argentina!; Welbert, uma pessoa de sensibilidade incrível e um talento musical admirável; Júlia, Maíra e Bruna, muito sucesso para vocês três nessa vida. É muito bom ter amigos como vocês. Obrigada por toda ajuda, discussões científicas e ótimas risadas.

Às duas Gabrielas, 1 e 2, trabalhar com vocês foi sempre divertido. Me lembro com saudades. Que bom que continuamos amigas! Obrigada por todos os bons momentos!

Ao Axel, uma pessoa muito culta e de um bom gosto louvável. Obrigada por todas as conversas e por me fazer rir com o seu mau-humor!

À todas as pessoas que conheci nesses anos de Departamento. Obrigada Eliana, Valdênia, Carla, Gi, Lília, Dri, Claudinho, Vláudia, Ulisses, Henrique, Ademir, Luciana, Alessandra, Karina, Daniel, Pira, Luizão, Rosa, Sônia e todos os outros que tornaram os corredores do ICB lugar de conversas e pessoas agradáveis.

Aos meus amigos de “Cursão”, Leuridan, Simone, Fernando e Andréia. Foi muito bom aprender Imunologia na companhia de vocês.

Aos funcionários do ICB IV: Andréas, Milton, Moisés, Nelson, Otacílio, Roberto e todo pessoal da segurança do Departamento de Imunologia. “Miltão” e Otacílio, é sempre uma alegria chegar no ICB e encontrar vocês!

Aos meus amigos de Londres: Eva, Nahla, Steve, Dan, Manuel, Eugenio, David, Valéria, Daniela, Maria, Catarina, Oscar e Tânia.

À Jotelma Leite Ribeiro, à Valéria Machado dos Santos e Eni do Sacramento Santos, obrigada por toda ajuda e suporte nesses anos.

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas, pela seriedade e eficiência de seus serviços e no tratamento dado aos alunos.

Às minhas “hermanas” de Arquidiocesano: Beta, Di, Dri, Mi, Teca, Júlia, Koga, Renata, Dri, Di, Mariana, Marcella e Andresa. É muito bom ter vocês na minha vida.

Aos meus amigos da Bio, em especial, ao Gustavinho e ao Rodrigo, obrigada pelas conversas e risadas.

À toda minha família, sempre presente e maravilhosa. Agradeço a cada um de vocês: minhas avós, avôs, tias, tios, primos e primas, obrigada por tudo!

À família Oliveira, Laura, Pedro e Andrea. Pelos dias e conversas agradáveis.

Ao Felipe, com quem tenho tantas histórias e aventuras. Obrigada pelo companheirismo e pela enorme paciência e ajuda durante a confecção desta tese. Nem sei como te agradecer.

Aos meus irmãos, minhas cunhadas e minha linda sobrinha que enfeitam o meu dia. Obrigada pelo carinho de vocês. E Sofia...seja bem-vinda!

Aos meus pais, Maria José e Luís Carlos, pelo incentivo constante, carinho e dedicação. É muito bom ter vocês por perto.

RESUMO E ABSTRACT

RESUMO

Bueno-da-Silva, AEB. Aspectos Moleculares da Transformação Celular Induzida por Bcr-Abl [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

As leucemias positivas para o cromossomo Philadelphia, como a Leucemia Mielóide Crônica, estão intimamente associadas à proteína Bcr-Abl. Essa molécula apresenta atividade tirosina-quinase elevada e é capaz de induzir transformação maligna. Em células hematopoéticas, a expressão de Bcr-Abl induz independência de fatores de crescimento, alterações nas propriedades de adesão e alta resistência à apoptose. Os mecanismos moleculares pelos quais essa proteína promove transformação celular parecem envolver vias dependentes e independentes de sua atividade tirosina-quinase; contudo, essas vias, principalmente as independentes, ainda não foram completamente esclarecidas. O objetivo principal deste trabalho foi investigar alterações moleculares envolvidas na transformação celular induzida por Bcr-Abl, com enfoque especial para aquelas relacionadas ao seu potencial anti-apoptótico. Para tanto, foram adotadas duas linhas de investigação. A primeira concentrou-se no estudo da contribuição da sinalização independente da atividade quinase de Bcr-Abl para a indução de resistência à apoptose. A segunda envolveu o uso de uma abordagem proteômica para identificar alterações no padrão de expressão protéica global associadas com a ação de Bcr-Abl. Para a primeira investigação, analisamos o comportamento de células positivas para Bcr-Abl frente a estímulos pró-apoptóticos, enquanto sua função quinase estava inibida farmacológica (mesilato de imatinibe) ou geneticamente (mutante quinase-deficiente). Células que expressam Bcr-Abl se mostraram resistentes a indutores de morte mesmo na presença do mesilato de imatinibe, sugerindo que a resistência à apoptose não depende da manutenção constante da atividade tirosina-quinase, nem tampouco da presença de proteínas fosforiladas em tirosina. Similarmente, a expressão de Bcr-Abl quinase-deficiente foi capaz de bloquear a morte em alguns contextos celulares, indicando a existência de sinalização independente desta atividade, a qual contribui parcialmente para a resistência à apoptose. Essa inibição da sinalização apoptótica não parece estar associada à expressão de nenhuma das moléculas analisadas, incluindo as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL. A comparação do proteoma de células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl revelou que a presença de Bcr-Abl acarreta em alterações profundas no padrão de expressão protéica. As proteínas cuja expressão foi afetada por Bcr-Abl estão associadas a diversos processos celulares, como adesão, mobilidade, transdução de sinais, resposta a estresse, metabolismo, proliferação e morte celular. Os achados deste trabalho ampliam o conhecimento sobre as moléculas-alvo de Bcr-Abl e podem contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na transformação celular e para a identificação de novos marcadores de prognóstico e possíveis alvos terapêuticos.

Palavras-chave: Bcr-Abl. Apoptose. Tirosina-quinase.

ABSTRACT

Bueno-da-Silva, AEB. Molecular Aspects of Bcr-Abl-induced Cell Transformation [Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Philadelphia chromosome positive leukemias, especially Chronic Myeloid Leukemia, are closely associated with Bcr-Abl oncoprotein. This molecule is a constitutively activated tyrosine-kinase and induces cell transformation in a variety of cell lines. In haematopoietic cells Bcr-Abl promotes growth factor independence, alters cell adhesion properties and confers resistance to apoptosis. Although it has been suggested that cell transformation by Bcr-Abl involves both tyrosine-kinase-dependent and -independent pathways, the precise mechanisms are not fully understood, specially the ones apparently not connected with its kinase activity. The aim of this study was to investigate molecular alterations induced by Bcr-Abl that may be important for malignant transformation and required for resistance to apoptosis. For this purpose we used two different strategies. First, we addressed whether Bcr-Abl-positive cells would remain resistant to apoptosis in the absence of Bcr-Abl tyrosine-kinase activity (inhibition by imatinib or the expression of a kinase-deficient Bcr-Abl molecule). We found that Bcr-Abl-positive cells, despite responding to imatinib with a blockage of Bcr-Abl kinase activity and consequent disappearance of pY-containing proteins, remained extremely resistant to apoptogenic insults; additionally, our data suggest that phosphotyrosine-containing proteins may not be responsible for the antiapoptotic effect of Bcr-Abl. In accordance to this data, expression of a kinase-deficient Bcr-Abl molecule induced resistance to apoptosis, suggesting the existence of kinase independent signals driven by Bcr-Abl and related to the blockage of cell death. Our results suggest that Bcl-xL and Bcl-2 are not involved in the short-term resistance to apoptosis observed in the absence of Bcr-Abl tyrosine kinase. In the second part of the study, we used a proteomic approach to identify changes in protein expression patterns associated with Bcr-Abl. The comparison between HL-60.vector and HL-60.Bcr-Abl cells revealed that Bcr-Abl interfered on the expression of a great variety of proteins. The molecules that were differentially expressed are associated with signal transduction pathways, cell death, cellular motility, adhesion, communication, growth, stress response and metabolism. The findings of this work improve the understanding of the signaling cascades initiated by Bcr-Abl and might help to find new prognostic markers and therapeutic targets.

Key words: Bcr-Abl. Apoptosis. Tyrosine-kinase.

ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abl	–	Abelson leukemia
Act-D	–	Actinomicina D
ACN	–	Acetonitrila
AIF	–	“Apoptosis Inducing Factor”
Apaf-1	–	“Apoptotic protease activating factor-1”
Ara-C	–	Citarabina
ATP	–	Trifosfato de adenosina
Bcl-2	–	“B-cell lymphoma”
Bcr	–	“Breakpoint cluster region”
BH3	–	“Bcl-2 homology”
BSA	–	Albumina de soro bovino
CaCl₂	–	Cloreto de Cálcio
CD	–	“Cluster of Differentiation”
CHX	–	Cicloheximida
CDK	–	“Cyclin-Dependent Kinase”
CO₂	–	Dióxido de carbono
DD	–	“Death Domain” (Domínio de Morte)
DED	–	“Death Effector Domain” (Domínio Efetor de Morte)
Diablo	–	“Direct IAP-binding protein with low pI”
DISC	–	“Death Inducing Signaling Complex” (Complexo de indução de sinalização)
DMEM	–	“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
DNA	–	Ácido desoxirribonucléico
DTT	–	“Dithiothreitol”
DR	–	“Death receptor” (Receptor de Morte)
EDTA	–	Ácido etileno-diaminotetraacético
EGTA	–	Ácido etilenoglicol-bis
EGFP	–	“Enhanced Green Fluorescent Protein”
FACS	–	“Fluorescence-Activated Cell Sorting”
FADD	–	“Fas-Associated Death Domain”
FITC	–	Isotiocianato de fluoresceína
FLICE	–	“FADD like ICE” (caspases-8)
FLIP	–	Proteína inibidora de FLICE (FLICE-inhibitory protein)

FSC – “Forward Scatter”

G418 – Gentamicina

GFP – “Green Fluorescent Protein”

Grb2 – “Growth Factor Receptor-Bound protein 2”

HEPES – Hidroxietilpiperazina

HFS – “Hypotonic Fluorescent Solution” (Solução Hipotônica Fluorescente)

IAP – “Inhibitor of Apoptosis” (Inibidor da apoptose)

IEF – “Isoelectric focusing”

IFN- α – Interferon alfa

I- κ B – Inibidor de NF- κ B

IL – Interleucina

KCL – Cloreto de potássio

kDa – KiloDaltons

LB – Luria Bertani

LLA – Leucemia Linfocítica Aguda

LMC – Leucemia Mielóide Crônica

LNC – Leucemia Neutrofílica Crônica

MALDI – “Matrix assisted laser desorption/ionization”

MAPK – “Mitogen Activated Protein Kinase”

MCL-1 – “Myeloid Cell Leukemia-1”

MM – Massa molecular

NaCl – Cloreto de sódio

NF- κ B – “Nuclear Factor kappa B”

NRTKs – “Non-receptor Tyrosine Kinases”

PBS – “Phosphate Buffered Saline” (Salina tamponada com fosfato)

pI – Ponto isoelétrico

PI – Iodeto de propídeo

PI3-k – Fosfatidil Inositol-3-quinase

PKB – Proteína quinase B

PMF – “peptide mass fingerprint”

PTKs – “Protein Tyrosine Kinases”

PVDF – DifluoridoPolividileno

RTKs – “Receptor Tyrosine Kinases”

SBF – Soro Bovino Fetal

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SH – “SHC-homology (domain)”

SMAC – “Second Mitochondria-derived Activator of Caspases”

SPK1 – “Sphingosine kinase-1”

SSC – “Side Scatter”

STAT – “Signal transducer and activator of transcription”

STI571 – “Signal Transduction Inhibitor 571”

STS – Estaurosporina

TAE – “Tris Acetate EDTA”

TBS – Salina tamponada com Tris

TE – Tris EDTA

TGF – Fator de crescimento de tumor

TNF – Fator de necrose tumoral

ToF – “Time-of-Flight”

TRAIL – “TNF-related apoptosis inducing ligand”

Tris HCl – Tris hidrocloreídrico

UV – Ultravioleta

VDAC – “Voltage-dependent anion channel”

VM26 – Teniposídeo

VP16 – Etoposídeo

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Câncer e apoptose	22
1.2	Câncer e tirosina-quinases	30
1.3	Leucemia mielóide crônica	35
1.4	Bcr-Abl: estrutura, atividade enzimática e efeitos celulares	39
1.5	Vias de sinalização ativadas por Bcr-Abl	43
1.5.1	Bcr-Abl e a via de Ras	43
1.5.2	Bcr-Abl e a via de PI3-k/Akt	45
1.5.3	Bcr-Abl e a ativação de NF-κB	47
1.5.4	Bcr-Abl e a via de STAT	48
1.5.5	Vias de sinalização ativadas por Bcr-Abl: considerações finais	49
1.6	Inibidores de tirosina-quinase – resultados e perspectivas	50
2	OBJETIVOS	56
3	MATERIAIS E MÉTODOS	58
3.1	Linhagens celulares	58
3.1.1	Células de mamíferos	58
3.1.2	Bactérias	60
3.2	Plasmídeos utilizados	60
3.3	Agentes indutores de apoptose	61
3.4	Inibidor da atividade tirosina-quinase	62
3.5	Transformação bacteriana	62
3.6	Purificação de DNA plasmidial	62
3.6.1	Preparação do pré-inóculo e inóculo	62
3.6.2	Obtenção do DNA plasmidial	63
3.7	Digestões enzimáticas	63
3.8	Eletroforese de DNA	64
3.9	Sequenciamento do plasmídeo pSRαMSVtkneo.Bcr-Abl/KR	64
3.10	Transfecções celulares, obtenção de partículas retrovirais e infecções de células-alvo	64
3.11	Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) e Western-blot	67

3.12	Quantificação da morte celular por citometria de fluxo	68
3.13	Análise do padrão de expressão protéica global e de proteínas fosforiladas em tirosina - eletroforese em gel bidimensional	69
3.13.1	Eletroforese bidimensional	70
3.13.1.1	Preparo das amostras	70
3.13.1.2	Focalização isoeétrica: primeira dimensão	70
3.13.1.3	Eletroforese SDS-PAGE: segunda dimensão	71
3.13.2	Coloração dos géis com azul de Coomassie e marcação com anticorpo anti-fosfotirosina	72
3.13.3	Aquisição das imagens	72
3.13.4	Análise e comparação dos géis	73
3.13.5	Processamento dos “spots”	75
3.13.6	Análise por espectrometria de massas e identificação das proteínas	76
4	RESULTADOS	80
	Parte 1: Contribuição da sinalização independente da atividade tirosina- quinase de bcr-abl para a resistência à apoptose	80
4.1	Estratégia 1: inibição da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl pelo mesilato de imatinibe	80
4.1.1	Expressão de Bcr-Abl confere resistência à apoptose	80
4.1.2	Inibição da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl pelo mesilato de imatinibe é dose-dependente, rápida e duradoura	82
4.1.3	Efeito do tratamento com mesilato de imatinibe na viabilidade de células Bcr-Abl-positivas	84
4.1.4	A inibição da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl não sensibiliza as células à indução de apoptose por diferentes drogas	86
4.1.5	Mesilato de imatinibe não sensibiliza células que expressam Bcr-Abl à ativação de caspase-3 por drogas quimioterápicas	89
4.1.6	Análise da expressão de proteínas da família Bcl-2 em células tratadas com mesilato de imatinibe	91
4.2	Estratégia 2: Expressão de Bcr-Abl-quinase-deficiente	97
4.2.1	Seqüenciamento do plasmídeo pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl/KD	97
4.2.2	Transfecção de células 293T para obtenção de partículas retrovirais utilizadas para a infecção de células alvos	98

4.2.3	Infecção e seleção de células HL-60 incubadas com o sobrenadante viral de células empacotadoras	101
4.2.4	Efeito da expressão de Bcr-Abl/KR em células HeLa	104
4.2.4.1	Expressão de Bcr-Abl-quinase-deficiente confere resistência à apoptose induzida por luz ultravioleta	105
4.2.5	Células Jurkat, Jurkat.vetor, Jurkat.Bcr-Abl/KR e Jurkat.Bcr-Abl: caracterização e resistência à apoptose	111
4.2.6	Células THP-1, THP-1.vetor, THP-1.Bcr-Abl/KR e THP-1.Bcr-Abl – caracterização e resistência à apoptose	114
	Parte 2: Impacto da expressão de Bcr-Abl no proteoma de células HL-60 .Bcr-Abl (OW)	119
4.3.1	Proteoma e fosfoproteoma de células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl	119
4.3.1.1	“Spots” com maior intensidade em células HL-60.Bcr-Abl	136
4.3.1.2	“Spots” regulados negativamente em células HL-60.Bcr-Abl	141
5	DISCUSSÃO	147
5.1	Contribuição da sinalização independente da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl para a resistência à apoptose	147
5.2	Impacto da expressão de Bcr-Abl no proteoma de células HL-60	172
6	CONCLUSÕES	185
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	187
	ANEXOS	217
	Artigo publicado: “Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis is independent of constant tyrosine-kinase activity”	217
	Lista completa de publicações	223

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER E APOPTOSE

Câncer é um termo genérico utilizado para designar um conjunto de doenças que podem afetar diferentes partes do organismo (OMS – Organização Mundial da Saúde) e cuja fisiopatologia está associada a um processo dinâmico e progressivo de alterações genéticas, como anormalidades cromossômicas e mutações em genes supressores de tumor e oncogenes (Vogelstein e Kinzler, 1993).

Apesar de décadas dedicadas à pesquisa do câncer e à investigação de novos tratamentos para essa doença, as taxas de mortalidade continuam altas, fazendo com que as neoplasias representem atualmente uma das principais causas de morte no mundo. Em 2005, segundo relatório da OMS, das 58 milhões de pessoas que morreram no mundo, 7,6 milhões (13%) tiveram como causa da morte o câncer. Esse número de mortes por câncer também foi citado nas estimativas da “American Cancer Society” para o ano de 2007. O diagnóstico tardio, o pouco entendimento da epidemiologia e da etiologia molecular dos cânceres humanos são apontados como potenciais razões para a alta mortalidade (Lim, 2005).

A maioria das neoplasias humanas tem sua fisiopatologia ligada à mutações somáticas pontuais e apenas 1% à mutações na linhagem germinativa (Blume-Jensen e Hunter, 2001). Mutações que promovem o ganho de função de produtos gênicos foram as primeiras alterações genéticas descritas como fatores desencadeadores do câncer. Com base nessa observação definiu-se um grupo de oncogenes que representam versões mutadas de genes celulares normais. Esses últimos, pelo potencial de se transformarem em oncogenes, passaram a ser denominados de proto-oncogenes. Posteriormente, foi demonstrado que mutações que induzem a perda de função de genes conhecidos como genes supressores de tumor, contribuem igualmente para o processo de carcinogênese (Collins et al., 1997; Bertram, 2000).

A transformação de uma célula normal em tumoral (tumorigênese) é um processo multifatorial e altamente complexo, relacionado a alterações genéticas que podem, portanto, ativar oncogenes ou inativar genes supressores de tumor. Os produtos desses genes mutantes conferem características malignas específicas às células, como: a proliferação descontrolada, o bloqueio da diferenciação e da morte celular, a indução de neoangiogênese, a instabilidade genômica e a invasão de tecidos (Bertram, 2000; Shachaf e Felscher, 2005).

A compreensão de que o câncer é uma doença genética sugere que a tumorigênese pode ser revertida pela inativação ou reparo do(s) gene(s) mutante(s) específico(s) (Shachaf e

Felsher, 2005). Nesse contexto, a indústria farmacêutica e a comunidade científica têm se empenhado muito para o desenvolvimento de terapias que atuem direta e exclusivamente no circuito celular que está alterado nas células neoplásicas (“target therapy”).

Nos últimos anos diversos estudos relataram que, além das alterações genéticas, fenômenos epigenéticos, como o silenciamento gênico por hipermetilação de seqüências presentes nos promotores de diversos genes, são importantes para o início, manutenção e progressão de tumores (Baylin e Ohm, 2006). Desse modo, a célula tumoral seria resultante da somatória de numerosas influências genéticas, epigenéticas e micro-ambientais (Irish et al., 2004).

A despeito da grande variedade de neoplasias, o que se observa em todos os cânceres é a existência de acúmulo celular, o qual parece estar associado à redução da sensibilidade das células tumorais aos mecanismos regulatórios normais de proliferação, adesão, diferenciação e morte (Collins et al., 1997).

Hanahan e Weinberg propuseram seis modificações na fisiologia celular que induziriam a transformação de células normais em tumores malignos e que seriam compartilhadas pela maioria, senão por todos os tipos de câncer humano. São elas: 1) auto-suficiência na geração de sinais de crescimento, 2) insensibilidade ou redução da sensibilidade a estímulos inibitórios do crescimento, 3) escape da morte celular por apoptose, 4) potencial replicativo ilimitado, 5) angiogênese, e 6) invasão tecidual e metástase (Hanahan e Weinberg, 2000). Células neoplásicas apresentam, portanto, defeitos em vias de sinalização que controlam os processos de proliferação, homeostase e morte celular (Hanahan e Weinberg, 2000). Essas alterações são adquiridas por uma seleção gradativa de mutações gênicas e oferecem vantagens replicativas para as células tumorais sobre as células normais (Blagosklonny, 2003).

Um dos maiores avanços na pesquisa do câncer foi o reconhecimento de que a apoptose tem um papel central tanto na formação do tumor, uma vez que algumas mutações oncogênicas bloqueiam a apoptose, contribuindo para o início e progressão de tumores (Debatin et al., 2003), quanto na resposta ao tratamento, visto que a indução de morte de células tumorais por diversas estratégias citotóxicas, como drogas anticâncer, irradiação- γ , genes suicidas ou imunoterapia, é mediada, em grande parte, pela indução de apoptose nas células-alvo (Debatin et al., 2003).

A apoptose é um processo ativo e molecularmente controlado de eliminação celular, que desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase de organismos multicelulares (Samali et al., 1997). Em condições fisiológicas esse tipo de morte representa, provavelmente, o principal mecanismo de compensação da geração de células por mitose,

sendo crucial em diversos processos biológicos, como: desenvolvimento embrionário, durante o qual é essencial para a organogênese; manutenção da homeostase tecidual; seleção e estabelecimento do repertório imunológico; controle da hematopoese e das respostas imunes; citotoxicidade mediada por linfócitos T e células NK (Samali et al., 1997; Meier et al., 2000; Creagh et al., 2003; Danial e Korsmeyer, 2004). Morfologicamente as células apoptóticas são caracterizadas pelos seguintes eventos: degradação do DNA genômico em fragmentos oligonucleossomais, condensação da cromatina, a diminuição do volume e o aumento da granulosidade celular, manutenção da estrutura das organelas, formação de pregas citoplasmáticas e conseqüente fragmentação das células nos chamados corpos apoptóticos (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980). Outra característica importante de células em apoptose é o fato de serem reconhecidas e fagocitadas por células adjacentes ou fagócitos profissionais, evitando a instalação de um processo inflamatório (Savill et al., 1993; Fadok et al., 1998).

Uma grande variedade de estímulos pode induzir a morte por apoptose, incluindo a sinalização via receptores de morte, retirada de fatores de crescimento e agentes causadores de dano no DNA, como a irradiação e as drogas citotóxicas. Esses sinais desencadeiam uma cascata de sinalização intracelular, conservada evolutivamente e controlada geneticamente, muito semelhante nos diversos tipos celulares e que depende da ação de proteases distribuídas nos compartimentos celulares (Herr e Debatin, 2001; Debatin et al., 2003).

Em mamíferos, diversos estímulos de morte induzem apoptose por meio da ativação de membros de uma família de proteases denominadas caspases. As caspases são cisteíno-proteases encontradas no citoplasma e no retículo endoplasmático que possuem um resíduo de cisteína em seu sítio ativo e apresentam a particularidade de clivar após ácido aspártico (Cohen, 1997; Thornberry, 1998; Thornberry e Lazebnik, 1998). Essas proteases são sintetizadas na forma de precursores inativos ou zimógenos, que são constituídos estruturalmente por três regiões: um pró-domínio na extremidade amino-terminal, uma subunidade grande na porção central da molécula e uma subunidade pequena na porção carboxi-terminal (Cohen, 1997; Nicholson e Thornberry, 1997). De modo geral, a ativação dessas proteases por indutores de apoptose envolve: o processamento proteolítico da região contendo o resíduo de ácido aspártico, a remoção do pró-domínio e a associação das subunidades grandes e pequenas para a formação do sítio ativo. Como durante a ativação há o agrupamento dessas subunidades em tetrâmeros, o arranjo final possui dois sítios ativos (Cohen, 1997; Thornberry e Lazebnik, 1998; Danial e Korsmeyer, 2004). Quatorze caspases já foram identificadas em mamíferos, no entanto, nem todas são encontradas em humanos, e somente parte delas está envolvida na regulação da apoptose, enquanto as demais parecem estar mais relacionadas ao processamento de citocinas pró-inflamatórias (Slee et al., 2001).

Com base em seu arranjo estrutural e atividade biológica, as caspases foram divididas em dois grandes grupos: caspases envolvidas no controle da apoptose (caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9 e -10) e caspases envolvidas nas respostas inflamatórias (caspase-1, -4, -5 e -11) (Belmokhtar et al., 2001; Creagh et al., 2003). No contexto da morte celular, as caspases participam como iniciadoras do programa de morte, como elementos regulatórios e elementos efetores, sendo responsáveis pelas alterações morfológicas e bioquímicas que ocorrem no núcleo, citoplasma, organelas e na membrana plasmática de células apoptóticas. (Slee et al., 1999). De modo geral, as caspases iniciadoras (caspase-2, -8, -9 e -10) se auto-ativam após serem agregadas por moléculas adaptadoras (FADD e Apaf-1, ver adiante) e, após acionadas, promovem a ativação de caspases efetoras (caspases-3, -6 e -7), as quais clivam substratos celulares necessários para o funcionamento normal das células, incluindo proteínas estruturais do citoesqueleto e proteínas nucleares (Slee et al., 2001). Por exemplo, as mudanças na morfologia do núcleo durante a apoptose, estão associadas à clivagem de lamina nuclear, enquanto as alterações na forma geral da célula estão provavelmente relacionadas com a clivagem de proteínas do citoesqueleto, como fodrina, actina, gelsolina e citoqueratina (Herr e Debatin, 2001). Além disso, as caspases ativam outras enzimas, como DNAses, que iniciam a clivagem do DNA em regiões específicas (Riccardi e Nicoletti, 2006). Uma das características típicas de células em apoptose é a fragmentação do DNA em fragmentos oligossomais (Wyllie et al., 1980), fenômeno atribuído a ação da endonuclease CAD (“caspase-dependent deoxiribonuclease”). Em condições normais CAD se encontra no citoplasma ligada ao seu inibidor, ICAD (“Inhibitor of CAD”). ICAD, por sua vez, é um dos substratos de caspase-3 e, quando clivado, libera CAD que transloca para o núcleo, onde promove a degradação do DNA (Wyllie et al., 1980; Sakahira et al., 1998). A ativação de caspases pode ser inibida por membros de uma família de inibidores endógenos de caspases conhecidos por IAPs (“Inhibitors of Apoptosis”), que incluem XIAP, c-IAP1, c-IAP2, que inibem caspase-3, -7 e -9, e survivina que está envolvida na regulação do ciclo celular e mitose (Herr e Debatin, 2001).

Em mamíferos foram identificadas duas vias principais de sinalização da apoptose que envolvem a ativação de caspases, são elas: a Via Intrínseca (via mitocondrial) e a Via Extrínseca (via dos receptores de morte) (Figura 1) (Hengartner, 2000; Puthalakath e Strasser, 2002).

FIGURA 1: Vias principais de sinalização da apoptose. Esquema geral das vias Extrínseca (à esquerda) e Intrínseca (à direita). Figura adaptada de (Hengartner, 2000).

A Via Intrínseca inicia-se pela ação de diferentes sinais de estresse intra e extracelulares, tais como irradiação, agentes quimioterápicos, anóxia, vírus, bactérias e retirada de fatores de crescimento celular, os quais, após sensibilizarem moléculas regulatórias, são convergidos para a mitocôndria, podendo resultar na ativação do programa de morte (Puthalakath e Strasser, 2002). Dependendo da intensidade do estresse celular, a mitocôndria, ao receber os estímulos apoptóticos, pode sofrer alterações nas propriedades da sua membrana externa, acarretando na liberação para o citosol de fatores apoptogênicos que antes se encontravam aprisionados no espaço intermembranar, desencadeando assim o processo apoptótico. Dentre os fatores mitocondriais que são liberados para o citosol durante a apoptose, destacam-se: citocromo c, Smac/Diablo (“second mitochondria-derived activator of caspases”/“direct IAP-binding protein with a low isoelectric point”), AIF (“apoptosis-

inducing factor”), Omi/HtrA2 e endonuclease G (Endo G) (Liu et al., 1996; Breckenridge e Xue, 2004).

O citocromo c, quando no citossol, desencadeia uma série de reações que culminam com a formação de um complexo de ativação de caspases, denominado apoptossomo, formado por citocromo-c, Apaf-1 (“apoptosis protease-activating factor-1”), dATP e pró-caspase-9 (Li et al., 1997). Uma vez clivada e ativada nesse complexo multi-molecular, a caspase-9 promove a ativação de caspases executoras (efetoras), como caspase-3, -6 e -7 que clivam uma série de substratos celulares críticos, levando ao desmantelamento da célula e às características fenotípicas que definem a apoptose (Figura 1) (Liu et al., 1996; Slee et al., 2001). Dentre esses substratos, destacam-se: PARP (“poly-(ADP-ribose) polimerase”), uma enzima de reparo clivada preferencialmente por caspase-3 e -7 (Lazebnik et al., 1994) e laminas, que são componentes da lâmina nuclear e são clivadas preferencialmente por caspase-6 (Belmokhtar et al., 2001).

Smac/Diablo e Omi/HtrA2, por sua vez, atuam como neutralizadores dos efeitos inibitórios dos IAPs e contribuem, dessa forma, para a ativação das caspases. Enquanto citocromo c e Smac/DIABLO atuam em última análise como ativadores de caspases, AIF e Endo G podem mediar a indução de morte caspase-independente. Já Omi/HtrA2 tem um papel duplo: como ativador de caspases, na medida em que age como um inibidor de IAPs, e um efetor de morte independente de caspase, por meio de sua atividade de protease (Herr e Debatin, 2001; Breckenridge e Xue, 2004).

Algumas moléculas que atuam na mitocôndria exercem um papel central no controle da apoptose pela via intrínseca. Esse é o caso das proteínas da família Bcl-2, que apresenta membros que inibem a apoptose, regulando e prevenindo a translocação dos fatores apoptogênicos da mitocôndria para o citossol; e membros que promovem a morte celular. Com base nas suas funções e na quantidade de domínios de homologia do tipo BH (“Bcl-2 Homology”) que apresentam em sua estrutura, os componentes dessa família podem ser reunidos em três grupos (Reed, 1997). Os membros anti-apoptóticos, como Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, Boo/Diva/Bcl2-L-10 e Bcl-B, compartilham 3-4 domínios BH (BH1-4), enquanto os membros pró-apoptóticos são divididos em duas sub-famílias: uma que inclui Bax, Bak, Bok/Mtd, Bcl-x_S e Bcl-G_L, cujos membros possuem 2 a 3 domínios BH; e o terceiro grupo que caracteriza-se pela presença de um único domínio BH (“BH-3 only”), do qual fazem parte as proteínas Bad, Bik/Nbk, Blk, Hrk/DP5, Bid, Bim/Bod, Noxa, Puma/Bbc3, Bcl-G_S e Bmf (Figura 2) (Puthalakath e Strasser, 2002).

FIGURA 2: Proteínas anti- e pró-apoptóticas da família Bcl-2. Figura adaptada de (Cory e Adams, 2002).

A maioria das proteínas da família Bcl-2 é capaz de interagir fisicamente com outras proteínas da mesma família, formando homo- ou heterodímeros. Essas interações podem fazer com que os membros dessa família atuem como agonistas ou antagonistas uns dos outros, sendo que a proporção entre os componentes pró- e anti-apoptóticos nos dímeros é crítica para a indução da morte celular (Antonsson e Martinou, 2000).

Os mecanismos pelos quais os membros da família Bcl-2 regulam a permeabilização das membranas da mitocôndria e a liberação dos fatores apoptogênicos para o citosol, ainda não foram completamente desvendados (Herr e Debatin, 2001; Breckenridge e Xue, 2004). No entanto, sabe-se que proteínas das duas sub-famílias de membros pró-apoptóticos colaboram e são necessárias para a indução da apoptose e liberação dos fatores apoptogênicos pela mitocôndria. Enquanto as proteínas do grupo “BH3-only” parecem agir como sensores de danos celulares e antagonistas diretos das proteínas anti-apoptóticas, sendo essenciais para o início da sinalização apoptótica, os membros da família de Bax atuam “downstream” provavelmente na ruptura da mitocôndria (Cory e Adams, 2002).

Em células saudáveis Bak e Bax são, geralmente, mantidos na mitocôndria e no citosol, respectivamente, na forma monomérica (inativa ou dormente), por meio de interações com outras proteínas. Em resposta a estímulos pró-apoptóticos, Bak e Bax formam homo-oligômeros na membrana externa da mitocôndria e isso parece ser essencial para a indução de morte. A importância dessas duas proteínas para o processo apoptótico, foi observada em uma série de estudos que mostraram que, enquanto a inativação individual de Bax e Bak tem pouco efeito sobre a apoptose, a inativação concomitante de ambos, bloqueia drasticamente a

liberação de citocromo c e a apoptose induzida por diversos estímulos da via intrínseca (Lindsten et al., 2000; Wei et al., 2001; Cory e Adams, 2002). Quanto ao papel dos oligômeros de Bak e Bax na permeabilização da membrana da mitocôndria e na indução da apoptose, foi proposto que esse arranjo estaria envolvido na formação de poros (canais) na membrana externa da mitocôndria, os quais permitiriam a saída dos fatores apoptogênicos (Antonsson et al., 2000; Pavlov et al., 2001). Uma hipótese alternativa, seria a interação de Bax com componentes de poros de transição de permeabilidade já presentes na mitocôndria, como, por exemplo, VDAC (“voltage-dependent anion channel”), para a formação de canais maiores (Shimizu et al., 1999; Cory e Adams, 2002).

Quanto ao controle negativo da morte celular na Via Intrínseca, diversas evidências sugerem que as proteínas anti-apoptóticas se utilizam de duas estratégias principais para prevenir a liberação de citocromo c e bloquear a apoptose, são elas: a interação e seqüestro de proteínas da família “BH3-only” e a inibição da oligomerização de Bak e Bax na mitocôndria (Cory e Adams, 2002; Breckenridge e Xue, 2004).

A Via Extrínseca é desencadeada pela interação de receptores localizados na superfície celular, denominados “Receptores de Morte” (DR, “death receptors”), com seus ligantes específicos. Esses receptores pertencem à superfamília dos receptores TNF (“tumor necrosis factor”), como CD95 (Fas/APO-1), TNF-R1, DR3, TRAIL (“TNF-related apoptosis-inducing ligand”)-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5) e DR6 e possuem um domínio de morte (DD, “death domain”) na cauda citoplasmática (Ashkenazi e Dixit, 1998; Golks et al., 2005). A estimulação dos receptores de morte por seus respectivos ligantes (CD95/CD95L, por exemplo) resulta na trimerização dos DR, a qual permite o recrutamento para a membrana de duas proteínas sinalizadoras, a molécula adaptadora FADD (“Fas-associated death domain”) e pró-caspase-8 (em humanos, caspase-10 também pode ser recrutada), formando o complexo sinalizador para a indução de morte, DISC (“Death Inducing Signaling Complex”) (Chinnaiyan et al., 1995). A interação entre os receptores de morte e a molécula FADD é realizada via os domínios DD de ambos, enquanto que a interação entre FADD e a pró-caspase-8 é mediada pelos domínios DED (“death effector domain”). Além de FADD, outras moléculas adaptadoras, como TRADD, podem ser recrutadas para o DISC, dependendo do receptor de morte envolvido (Ashkenazi e Dixit, 1998). Após o seu recrutamento, a pró-caspase-8 é convertida em sua forma ativa e é liberada para o citossol, onde pode agir diretamente na fase executora da apoptose ao ativar caspase-3, ou então promover o desencadeamento da via intrínseca por meio da clivagem da molécula Bid. Quando truncado pela ação de caspase-8, Bid (tBid) se dirige à mitocôndria, promove a oligomerização das proteínas pró-apoptóticas Bak e Bax, o que resulta em alterações nas funções mitocondriais e

na liberação de citocromo c (Wei et al., 2001). A caspase-8 também pode ser ativada em outros contextos, como na morte induzida por grânulos de células citotóxicas (linfócitos T e células NK), durante a qual caspase-8 é processada diretamente pela protease granzima B presente nos grânulos, e na morte induzida por estresse celular, durante a qual pode ser ativada proteoliticamente por caspase-6 (Murphy et al., 2004). O recrutamento e ativação da pró-caspase-8 são alvos de proteínas anti-apoptóticas, como a proteína c-FLIP (“FADD-like ICE inhibitory protein”) que, apesar de ser estruturalmente semelhante a caspase-8, não possui domínio catalítico ativo. Dessa forma, c-Flip pode se ligar ao complexo CD95-FADD por meio de interações DED-DED, inibindo o recrutamento e a conseqüente clivagem e ativação da pró-caspase-8, impedindo assim o desencadeamento dos sinais apoptóticos (Figura 1) (Golks et al., 2005).

Diversas patologias estão associadas à perturbações na regulação do processo de apoptose. Enquanto a resistência anormal à apoptose está associada ao aparecimento de neoplasias e doenças auto-imunes, devido a persistência de células mutantes ou transformadas, a sua exacerbação pode acarretar no surgimento de doenças degenerativas agudas e crônicas, como imunodeficiências e infertilidade (Danial e Korsmeyer, 2004).

Um grande número de genes está envolvido no controle molecular da apoptose e alguns deles já foram identificados como oncogenes ou estão desregulados em alguns tipos de câncer. Considera-se que os oncogenes podem utilizar duas estratégias de transformação celular, uma que inclui independência de fatores de crescimento, aumento da taxa de mitose e outros eventos que levam à desregulação da proliferação celular, e outra baseada na geração de sinais anti-apoptóticos (Amarante-Mendes et al., 1997). A maioria das neoplasias, incluindo as leucemias associadas à tirosina-quinase Bcr-Abl, apresenta mais de uma dessas estratégias ativadas.

Muitos trabalhos têm mostrado que a desregulação da atividade de proteínas quinases exacerba a proliferação celular, bloqueia a diferenciação celular e suprime a apoptose, levando a carcinogênese (Blume-Jensen e Hunter, 2001).

1.2 CÂNCER E TIROSINA-QUINASES

Determinadas classes de proteínas e vias de sinalização são mais freqüentemente alvos de mutações oncogênicas do que outras. Um exemplo são as proteínas tirosina-quinases (PTKs, “protein tyrosine kinases”), cuja atividade enzimática está fortemente regulada em células não transformadas, mas quando mutadas ou alteradas estruturalmente apresentam

atividade quinase constitutivamente ativa e se tornam potentes oncoproteínas, promovendo a transformação celular (Blume-Jensen e Hunter, 2001).

As proteínas tirosina-quinases são enzimas que transferem grupos fosfato da molécula de ATP para resíduos de tirosina localizados em substratos protéicos (Hunter e Cooper, 1985; Hubbard, 2002). A habilidade das proteínas quinases de fosforilar outras proteínas pode ser considerada a base da transmissão de sinais celulares (Hunter, 1987), sendo utilizada por organismos multicelulares para comunicação celular e importante para inúmeros processos biológicos como o desenvolvimento embrionário, metabolismo, regulação do sistema imune e manutenção dos tecidos adultos.

A fosforilação em resíduos de tirosina é uma modificação pós-traducional essencial e finamente regulada, capaz de modular praticamente todas as propriedades de uma proteína, incluindo sua atividade enzimática, estabilidade protéica, localização subcelular e atividade transcricional, além de promover a criação de sítios de ligação para outras proteínas sinalizadoras, modificando, assim, a interação entre proteínas (Hunter, 1987; Lim, 2005). Os substratos fosforilados participam da regulação de processos celulares fundamentais como: proliferação, diferenciação e sobrevivência (Mauro e Druker, 2001).

O Projeto Genoma Humano revelou que aproximadamente 20% dos nossos genes codificam proteínas que participam na transdução de sinais e, dentre elas, existem mais de 520 proteínas quinases e 130 fosfatases envolvidas no controle da fosforilação de substratos protéicos (Blume-Jensen e Hunter, 2001). Muitos dos sinais celulares envolvidos no crescimento, diferenciação, adesão, motilidade e morte celular, são freqüentemente transmitidos por tirosina-quinases (Robinson et al., 2000). Além disso, as PTKs possuem relevância particular no aparecimento e desenvolvimento de inúmeras doenças humanas, tais como: diabetes, retinopatia, aterosclerose e câncer (Hubbard e Till, 2000; Robinson et al., 2000; Hubbard, 2002).

Cerca de 90 proteínas tirosina-quinases foram identificadas, dentre as quais 58 são do tipo receptor transmembrânico (Figura 3) e 32 do tipo não receptor (Figura 4), as quais são geralmente encontradas no citoplasma (Robinson et al., 2000; Blume-Jensen e Hunter, 2001; Hubbard, 2002; Vlahovic e Crawford, 2003).

A família de proteínas PTK do tipo receptor (RTKs – “receptor tyrosine kinases”) inclui os receptores para insulina e para os diversos fatores de crescimento, como EGF (“epidermal growth factor”), PDGF (“platelet-derived growth factor”), FGF (“fibroblast growth factor”) e VEGF (“vascular endothelial growth factor”) que ativam vias de sinalização intracelular, regulando proliferação, diferenciação, migração e metabolismo (Hubbard e Till, 2000).

Quanto a sua organização, as RTKs são moléculas de superfície que possuem uma porção extracelular composta por múltiplos domínios, envolvida na interação com ligantes polipeptídicos, uma porção transmembrânica e uma região citoplasmática que contém um domínio tirosina-quinase cercado por seqüências regulatórias dispostas nas porções C-terminal e N-terminal desse domínio enzimático (Figura 3) (Hubbard e Till, 2000; Hubbard, 2002). Essas glicoproteínas de membrana são geralmente monoméricas e, após serem ativadas pela interação com seus ligantes, transmitem os sinais extracelulares para o citoplasma por meio da fosforilação de resíduos de tirosina presentes nos próprios receptores (autofosforilação) ou em outras proteínas sinalizadoras (Hubbard e Till, 2000).

FIGURA 3: Organização dos domínios de tirosina-quinases do tipo receptor. O protótipo do receptor de cada família está indicado acima do esquema do receptor e os membros de cada família estão listados abaixo. A parte superior refere-se à porção extracelular e a inferior à porção citoplasmática dos receptores. Abreviaturas: EGFR, “epidermal growth factor receptor”; InsR, “insulin receptor”; PDGFR, “platelet-derived growth factor receptor”; VEGFR, “vascular endothelial growth factor receptor”; FGFR, “fibroblast growth factor receptor”; KLG/CCK, “colon carcinoma kinase”; NGFR, “nerve growth factor receptor”; HGFR, “hepatocyte growth factor receptor”, EphR, “ephrin receptor”; Axl, a Tyro3 PTK; TIE, “tyrosine kinase receptor in endothelial cells”; RYK, “receptor related to tyrosine kinases”; DDR, “discoidin domain receptor”; Ret, “rearranged during transfection”; ROS, RPTK “expressed in some epithelial cell types”; LTK, “leukocyte tyrosine kinase”; ROR, “receptor orphan”; MuSK, “muscle-specific kinase”; LMR, “Lemur”. Destacam-se em negrito, os membros dessa família implicados em doenças malignas humanas. Figura retirada de (Blume-Jensen e Hunter, 2001).

O grupo das PTK do tipo não receptor (NRTKs - “nonreceptor tyrosine kinases”) engloba, além de outras, as proteínas Src, Abl, Fak e Janus quinases (Jaks) (Hubbard, 2002). Essas moléculas são componentes integrais das cascatas de sinalização desencadeadas por tirosina-quinases receptoras e por outros receptores de superfície. A maior subfamília é Src

que apresenta nove membros e participa da regulação de processos celulares como mitose, ativação de linfócitos B e T e organização do citoesqueleto. Dentre os substratos dos membros dessa subfamília, destacam-se: a quinase de adesão focal (Fak), receptores de EGF e PDGF e p130Cas, uma molécula adaptadora envolvida na sinalização mediada por integrinas e fatores de crescimento (Hubbard e Till, 2000).

A maioria das NRTKs está localizada no citoplasma, no entanto, algumas podem ser encontradas ancoradas na membrana citoplasmática por via de modificações amino-terminais como miristoilação e palmitoilação. A organização dos domínios dessas tirosina-quinases varia consideravelmente (Figura 4). Além de um domínio tirosina-quinase (SH1), essas proteínas possuem freqüentemente domínios sinalizadores adicionais, importantes para interações proteína-proteína, proteína-lipídeo e proteína-DNA, tais como SH2 (ligação a fosfotirosina), SH3 (ligação a seqüências ricas em prolina) e o PH (se liga a fosfatidilinositol) (Hubbard e Till, 2000).

FIGURA 4: Tirosina-quinases citoplasmáticas humanas. Organização dos domínios dos membros das principais subfamílias de tirosina-quinases do tipo não-receptor. Os membros de cada família estão listados à direita (região carboxi-terminal) e o nome da família está à esquerda (região amino-terminal) de cada tirosina-quinase. Destacam-se em negrito, os membros dessa família que foram implicados em doenças malignas humanas. Figura adaptada de (Blume-Jensen e Hunter, 2001).

O domínio tirosina-quinase das PTKs adota uma arquitetura bilobada, na qual o ATP se liga na fenda formada entre os dois lobos e a porção do substrato protéico contendo o resíduo de tirosina, interage com seqüências presentes no lobo C-terminal (Hubbard, 2002).

A maioria das PTKs é mantida no interior das células em um estado de baixa atividade por meio de mecanismos de autoregulação que previnem a adoção da configuração da forma ativa. De acordo com Hubbard e Till, dois processos são necessários para a ativação das

PTKs: o aumento de sua atividade catalítica intrínseca e a criação de sítios de ligação envolvidos no recrutamento de proteínas sinalizadoras (Hubbard e Till, 2000).

Geralmente a ativação das RTKs é alcançada pela oligomerização do receptor, a qual é desencadeada pela interação do ligante com o seu domínio extracelular. A estabilização do arranjo oligomérico facilita a autofosforilação em “trans” do domínio citoplasmático do receptor, resultando na ativação de seu potencial tirosina-quinase e na geração de resíduos de tirosina fosforilada. Essas tirosinas fosforiladas servem de sítio de ligação para proteínas sinalizadoras citoplasmáticas contendo domínios SH2 e PTB (“protein tyrosine-binding”), que interagem com resíduos de fosfotirosina (Blume-Jensen e Hunter, 2001). Para muitas RTKs, a fosforilação da cauda citoplasmática em resposta à interação com o ligante promove o re-posicionamento do “loop” de ativação que deixa de bloquear o sítio ativo da molécula e permite o acesso do substrato ou do ATP, dependendo da quinase considerada. Já para as NRTKs o mecanismo de ativação é mais complexo e pode envolver tanto interações heterólogas proteína-proteína, como também a homo-oligomerização para promover a fosforilação em “trans” do “loop” de ativação. Para muitas PTKs (receptores ou não) o “loop” de ativação, que serve de plataforma para a ligação do substrato, não está na configuração apropriada em seu estado basal. A fosforilação em “trans” de uma ou mais tirosinas no “loop” de ativação promove um re-posicionamento dessa porção da molécula e um aumento na eficiência catalítica (Hubbard, 2002).

Como as proteínas tirosina-quinases desempenham um papel fundamental na transdução de sinais, a desregulação de sua atividade enzimática tem sido associada ao desenvolvimento de câncer em muitos sistemas (Wong e Witte, 2004). De maneira geral, para as PTKs envolvidas no câncer, a desregulação oncogênica está associada à perda ou afrouxamento dos mecanismos de auto-controle que, em condições normais, garantiam a regulação de sua atividade enzimática (Hubbard e Till, 2000; Blume-Jensen e Hunter, 2001; Vlahovic e Crawford, 2003). Nessa linha, um dado que merece destaque é que mais de 50% das tirosina-quinases descritas na literatura já foram associadas à fisiopatologia de cânceres humanos, como resultado de sua atividade enzimática descontrolada, que surge de mutações e re-arranjos genômicos (deleções, translocações e inserções virais e/ou superexpressão) (Blume-Jensen e Hunter, 2001; Lim, 2005).

Um exemplo de tirosina-quinase do tipo não receptor com grande relevância clínica é a proteína Bcr-Abl. Essa proteína está intimamente associada às leucemias positivas para o cromossomo Philadelphia, como a Leucemia Mielóide Crônica.

1.3 LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma neoplasia hematológica mieloproliferativa caracterizada pelo acúmulo de células mielóides maduras no sangue periférico resultante da expansão clonal de células tronco hematopoéticas positivas para o cromossomo Ph (Mauro e Druker, 2001). Com incidência de 1 a 2 casos a cada 100000 pessoas por ano, essa leucemia é mais comum em pessoas com uma idade média de 65 anos (Mauro e Druker, 2001; Hehlmann et al., 2007) e representa, nas populações ocidentais, 15-20% dos casos de leucemia em adultos (Quintas-Cardama et al., 2007).

Essa doença apresenta um curso clínico trifásico: fases crônica, acelerada e blástica. A maioria dos pacientes é diagnosticada na fase crônica, que pode durar muitos anos e na qual ainda há produção de granulócitos maduros, mas o número de células progenitoras mielóides presentes no sangue periférico está aumentado. As principais manifestações clínicas nessa fase são: aumento do baço, fadiga, perda de peso, leucocitose e blastos no sangue periférico e contagem de plaquetas normal ou aumentada. Com a progressão da doença para as fases acelerada e crise blástica, que são mais agressivas, a hematopoese fica seriamente comprometida, uma vez que os clones leucêmicos perdem a capacidade de diferenciação levando a substituição das células maduras por blastos e ao acúmulo de células diferenciadas anormalmente ou de blastos imaturos na medula óssea e no sangue periférico (Wong e Witte, 2004; Jagani et al., 2007). Na crise blástica, que representa o estágio final da doença e pode ou não ser precedida de uma fase acelerada, há agravamento dos sinais e sintomas, que incluem trombocitopenia, anemia e esplenomegalia. Os critérios para o diagnóstico de crise blástica, segundo a OMS, incluem mais de 20% de blastos no sangue periférico ou medula óssea; e/ou proliferação extramedular dos blastos (Melo e Barnes, 2007). A crise blástica pode ser linfóide ou mielóide e nessa fase o paciente é refratário à maioria dos tratamentos, podendo morrer num período que varia de 6 a 12 meses (McLaughlin et al., 1989; Melo et al., 2003).

A LMC foi a primeira neoplasia humana associada a uma anormalidade cromossômica, o cromossomo Philadelphia (Ph) (Nowell e Hungerford, 1960). Esse cromossomo é detectado em praticamente todos os casos de LMC (90-95%) e em 10-25% dos casos de Leucemia Linfocítica Aguda (LLA). Alguns anos após sua descrição e com o avanço dos métodos de bandeamento cromossômico, o cromossomo Ph foi identificado como sendo o produto da translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 (9;22) (q34;q11) (Rowley, 1973; Bartram et al., 1983; Groffen et al., 1984). Essa translocação resulta em um cromossomo 22 menor (cromossomo Ph) do que seu homólogo (Figura 5) e na formação de um gene híbrido, *bcr-abl*, consistindo das seqüências 5' do gene *bcr*, presente no

cromossomo 22 (Groffen et al., 1984), unidas à porção 3' do proto-oncogene *c-abl*, localizado no cromossomo 9 (Bartram et al., 1983).

FIGURA 5: Cromossomo Ph. A) Cariótipo de paciente no qual foi detectado o cromossomo Ph. B) Destaque dos pares de cromossomos 9 e 22, mostrando o resultado da translocação recíproca presente em pacientes com LMC. As setas indicam as porções envolvidas na translocação, com enfoque especial para o encurtamento do cromossomo 22 (Ph). Figura adaptada de www.emedicine.com (acessado em Janeiro, 2008).

O mecanismo responsável pela translocação cromossômica que induz a formação do cromossomo Ph ainda não é conhecido, no entanto, foi sugerido que a radiação ionizante seria uma possível causa, devido ao aumento da incidência de LMC no Japão após a bomba atômica de Hiroshima e Nagasaki (Hehlmann et al., 2007).

Translocações recíprocas entre cromossomos não homólogos são observadas em várias doenças malignas, incluindo leucemias, linfomas e sarcomas e têm sido implicadas na fisiopatologia dessas enfermidades (Gollin, 2007). O mecanismo pelo qual essas translocações são formadas ainda não foi completamente esclarecido, mas acredita-se que um pré-requisito para a translocação entre cromossomos não homólogos é que os cromossomos envolvidos sofreriam quebra concomitante e os locais lesados estariam próximos durante o núcleo interfásico. Nessa linha, alguns estudos sugerem que o arranjo topográfico dos cromossomos

9 e 22 no interior do núcleo favorecerá a translocação recíproca entre eles. Da mesma forma, foi também observado que durante fases críticas do ciclo celular a distância entre os genes *abl* e *bcr* em células hematopoéticas humanas (linfócitos e células progenitoras CD34⁺) é menor do que seria esperado e tal proximidade poderia favorecer a translocação dos cromossomos e a fusão desses genes (Bartova et al., 2000; Melo e Deininger, 2004).

Dependendo do local de quebra do gene *bcr* (“breakpoint cluster region”), o neogene *bcr-abl* resultante da translocação pode codificar proteínas quiméricas de 190 kDa, 210 kDa ou 230 kDa. Essas isoformas estão associadas a tipos distintos de leucemia (Melo, 1996; Pane et al., 1996; Gollin, 2007).

Em 95% dos pacientes com LMC e em aproximadamente um terço dos pacientes com LLA Ph⁺, a quebra do gene *bcr* ocorre em uma região denominada “major breakpoint cluster region” e o RNAm gerado consiste de uma sequência de 8.5 kb que codifica a proteína Bcr-Abl de 210 kDa (p210^{Bcr-Abl}). No restante dos pacientes com LLA Ph⁺ e em casos raros de LMC, a quebra de *bcr* ocorre em uma região localizada “upstream” do “major breakpoint cluster region” conhecida por “minor breakpoint cluster region”. Nesse caso, o RNAm apresenta cerca de 7 kb e sua tradução resulta em uma proteína quimérica de 190 kDa (p190^{Bcr-Abl} ou p185^{Bcr-Abl}), cuja presença está associada a um pior prognóstico. A LLA Ph⁺ é caracterizada pelo acúmulo de células linfóides imaturas na medula óssea, sangue e órgãos linfóides, e é particularmente refratária aos tratamentos quando comparada a LLA Ph⁻ (Hehlmann et al., 2007). A terceira região de quebra de *bcr* foi denominada “micro breakpoint cluster region”, na qual verifica-se que as quebras ocorrem entre os exons e19 e e20 e o gene híbrido *bcr-abl* codifica a proteína de 230 kDa (p230^{Bcr-Abl}), culminando com o desenvolvimento de uma forma mais branda de LMC definida como Leucemia Neutrófila Crônica (LNC) Ph⁺ (Melo e Deininger, 2004). Em todos os casos, no RNAm do gene *bcr-abl*, a sequência de *abl* presente é constante, visto que independentemente do local em que ocorreu a quebra do gene *abl*, o transcrito do gene híbrido formado consiste dos exons de *bcr* fundidos com o exon 2 de *abl*. Desse modo a variação de tamanho das isoformas de Bcr-Abl está diretamente associada a região de quebra do gene *bcr*. Além desses pontos de quebra, que são mais comuns, já foram descritos pacientes com transcritos de *bcr-abl* atípicos (Holyoake, 2001).

O fato das três isoformas de Bcr-Abl (p190, p210 e p230) compartilharem o mesmo segmento Abl mas diferirem quanto a porção Bcr, sugere que as diferenças na agressividade e na linhagem celular (mielóide ou linfóide) afetada nas leucemias Ph⁺ podem ser atribuídas à sequência Bcr que está presente na proteína quimérica (Melo e Deininger, 2004).

A prova definitiva de que a molécula Bcr-Abl é a responsável pela fisiopatologia da LMC veio com os modelos murinos nos quais camundongos transplantados com células de medula óssea transduzidas com o gene *bcr-abl* desenvolveram uma síndrome mieloproliferativa com características semelhantes à LMC (Daley et al., 1990).

Alterações citogenéticas e moleculares adicionais ao cromossomo Ph são freqüentemente encontradas em pacientes na crise blástica da LMC, assim como o aumento da expressão e da atividade tirosina-quinase da proteína Bcr-Abl expressa (Elmaagacli et al., 2000). Os mecanismos responsáveis pela progressão da LMC da fase crônica para a crise blástica ainda não foram esclarecidos, mas foi proposto que o aumento da expressão de Bcr-Abl nas fases avançadas da doença aumentaria a instabilidade genética e promoveria alterações moleculares e cromossômicas secundárias, importantes para a expansão dos clones leucêmicos (Hehlmann et al., 2007).

Com base nos conhecimentos adquiridos e citados acima, o diagnóstico da LMC é realizado pela observação dos resultados do hemograma (contagens global e diferencial dos leucócitos, número de plaquetas), mielograma e a pela detecção do cromossomo Ph e/ou dos transcritos de *bcr-abl* nas células do sangue periférico ou medula óssea dos pacientes (Hehlmann et al., 2007).

Quando o diagnóstico é confirmado, o tratamento da LMC pode ser realizado por meio de quimioterápicos (hidroxiuréia e bussulfano), interferon-alfa (IFN- α), interferon-alfa associado à citarabina e inibidores de tirosina-quinase (mesilato de imatinibe e dasatinibe).

Inicialmente o tratamento da LMC visa o controle do número de leucócitos circulantes durante a fase crônica e o fármaco quimioterapêutico utilizado com maior freqüência é a hidroxiuréia, um inibidor de ribonucleotídeo-redutase, que auxilia na diminuição da alta contagem de leucócitos e na redução do tamanho do baço que estava aumentado. Geralmente essa droga é bem tolerada pela maioria dos pacientes e é eficiente no controle do número de elementos sanguíneos, mas, com raras exceções, não produz uma resposta citogenética e nem tem efeito sobre a progressão da doença para a fase blástica.

O IFN- α foi durante um tempo a abordagem terapêutica preferida para o tratamento da LMC, principalmente para os pacientes que não eram candidatos ao transplante de medula. Em 10-20% dos pacientes, a terapia com IFN- α induz resposta citogenética completa e aumenta o tempo de duração da fase crônica (atrasando a progressão da doença) e de sobrevivência dos pacientes, quando comparada à quimioterapia convencional. Apesar dos bons resultados, o índice de intolerância ao IFN- α é alto, fazendo com que muitos pacientes tenham que interromper o tratamento. O IFN- α reduz o crescimento e a proliferação das células leucêmicas e é freqüentemente utilizado em associação com a droga quimioterápica

citarabina (Ara-C). O seu mecanismo de ação ainda é pouco compreendido, mas acredita-se que o IFN- α pode agir diretamente, por meio de seus efeitos anti-proliferativos ou restaurando as propriedades adesivas de células de LMC, ou indiretamente, melhorando a resposta do sistema imune contra as células leucêmicas (Salesse e Verfaillie, 2002).

O transplante de medula óssea representa ainda a única terapia comprovadamente curativa para LMC, promovendo uma porcentagem de sobrevivência de 65-80%, para pacientes jovens, com idade inferior a 40 anos, na fase crônica da doença. No entanto, a maioria dos pacientes não é elegível para essa estratégia terapêutica, devido a idade avançada ou falta de doadores compatíveis (Thiesing et al., 2000; Ren, 2005).

O conhecimento de que o gene *bcr-abl* é a principal molécula envolvida na fisiopatologia da LMC permitiu o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras, como os inibidores de tirosina-quinase Abl, que serão abordados no item 1.6 dessa introdução.

1.4 BCR-ABL: ESTRUTURA, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E EFEITOS CELULARES

A proteína Bcr-Abl é uma tirosina-quinase constitutivamente ativa, expressa nas leucemias positivas para o cromossomo Ph. Essa proteína é codificada pelo neogene *bcr-abl*, resultante da fusão dos genes celulares *bcr* e *abl*, a qual ocorre durante a translocação cromossômica responsável pelo aparecimento do cromossomo Ph. Os mecanismos envolvidos na indução de leucemia por Bcr-Abl não estão completamente esclarecidos, mas se sabe que a inibição da apoptose é uma das estratégias utilizadas por essa proteína para prolongar a sobrevivência de células hematopoéticas.

Bcr-Abl possui o potencial de ativar múltiplas cascatas de sinalização e isso depende não só da sua atividade tirosina-quinase, mas de diversos domínios estruturais provenientes tanto da porção Bcr da molécula, quanto das seqüências Abl. O gene *bcr* é amplamente expresso e codifica uma proteína citoplasmática de 160 kDa composta por diversos domínios funcionais. Os domínios mais críticos de Bcr são o domínio de dimerização, envolvido na oligomerização “coiled-coil” da proteína Bcr (Mcwhirter et al., 1993), um domínio de ligação a SH2 (“SH2 binding domain”), um domínio de serina-treonina-quinase, um domínio homólogo a “DBL- or GTPase-activating protein (GAP)” e um domínio pleckstrina (PH). As propriedades e funções de Bcr ainda são pouco conhecidas, mas alguns trabalhos sugerem que o mesmo atue na regulação do ciclo celular visto que em células quiescentes Bcr se encontra no citoplasma e durante a mitose essa molécula pode ser detectada próxima aos cromossomos (Holyoake, 2001).

c-Abl é uma proteína tirosina-quinase de 145 kDa do tipo não receptor muito conservada evolutivamente e amplamente expressa nos variados tipos celulares. Duas isoformas foram descritas que diferem quanto ao primeiro exon (1a e 1b) e pela presença, em somente uma delas (1b), de um sítio de miristoilação que possibilita a ancoragem na membrana plasmática. Essa proteína localiza-se preferencialmente no núcleo, entretanto pode ser detectada no citoplasma, onde está associada a filamentos de actina. Além disso, outros trabalhos já relataram sua presença no retículo endoplasmático e na mitocôndria (Hantschel e Superti-Furga, 2004).

A molécula c-Abl é composta por múltiplos domínios, sendo alguns deles compartilhados com proteínas envolvidas na transdução de sinais. A regulação dessa proteína envolve diversos domínios homólogos a domínios existentes em proteínas da família Src e, por isso, denominados SH (“Src Homology”). O domínio SH1 é a região mais conservada evolutivamente e é onde se encontra o sítio catalítico responsável pela atividade tirosina-quinase de c-Abl. O domínio SH2 reconhece e se liga a resíduos de fosfotirosina e apresenta aparentemente um efeito positivo na transformação celular. O domínio SH3 interage com seqüências ricas em resíduos de prolina, encontradas em proteínas como Crk e Crkl, e, contrastando com o domínio SH2, apresenta um efeito regulador negativo sobre a atividade tirosina-quinase de c-Abl. Esse efeito inibitório foi demonstrado por estudos em que a deleção ou mutação do domínio SH3 de c-Abl, ativa esta proteína para a transformação celular (Amarante-Mendes et al., 1997; Samali et al., 1997).

Além dos domínios SH, c-Abl possui espalhados por sua região C-terminal, domínios de ligação ao DNA, necessários para a ligação entre esta proteína e a cromatina, um domínio de associação a filamentos de actina, três sinais de localização nuclear (NLS, “nuclear localization signals”) e uma seqüência de exportação nuclear (NES, “nuclear export signal”) (Zhu et al., 1996; Hantschel e Superti-Furga, 2004). Esses últimos sinais mencionados estão envolvidos no transporte de c-Abl entre o núcleo e o citoplasma (Taagepera et al., 1998). Ainda na porção C-terminal, Abl possui seqüências ricas em prolina que funcionam como sítios de ligação para o domínio SH3 de diversas proteínas adaptadoras, como Crk, Grb2 e Nck (Holyoake, 2001).

Por meio de seus diversos domínios, c-Abl interage com uma grande variedade de proteínas celulares, incluindo moléculas adaptadoras, fosfatases, quinases, fatores de transcrição, proteínas do citoesqueleto e reguladores do ciclo celular e participa do controle de muitos processos celulares, dentre eles a regulação do crescimento e sobrevivência celular, resposta a danos no DNA (genotoxicidade) e ao estresse oxidativo, sinalização por receptores de crescimento e integrinas, dinâmica de actina e migração celular (Kurzrock et al., 2003;

Hantschel e Superti-Furga, 2004). A importância de c-Abl para o crescimento e desenvolvimento normais foi observada em estudos nos quais camundongos nocautes para *c-abl* apresentaram fenótipos variados, incluindo o aumento da incidência de mortalidade perinatal, linfopenia, osteoporose e desenvolvimento anormal do olho e da cabeça (Tybulewicz et al., 1991; Ren, 2005).

In vivo a atividade tirosina-quinase de c-Abl é mantida sob intenso controle, sendo ativada somente em determinadas situações, tais como em resposta ao estresse genotóxico (Dierov et al., 2004). Análises estruturais e funcionais revelaram que a atividade enzimática de Abl é mantida em um estado de inibição por meio de interações intramoleculares complexas que envolvem, além do domínio SH1, os domínios SH2 e SH3 e outras seqüências localizadas na metade amino-terminal da proteína, incluindo os conectores que unem SH2-SH3 e SH1-SH2, o grupo “miristoil” e uma região próxima de SH3 conhecida como “Cap” (Nagar et al., 2003). Além da auto-inibição por interações intramoleculares, outros grupos propõem a existência de proteínas intracelulares que atuam como inibidores da atividade enzimática de c-Abl (Wang, 2004).

Diversos domínios funcionais foram identificados na proteína Bcr-Abl que podem contribuir para seus efeitos transformantes. Na porção Abl, esses domínios são: SH1 (domínio quinase), SH2 e o domínio de ligação à actina. Na porção Bcr, inclui o domínio de oligomerização “coiled-coil”, a tirosina na posição 177 e o domínio rico em fosfoserina/treonina que serve de ligação para domínios SH2 de outras proteínas.

O mecanismo envolvido na ativação da atividade tirosina-quinase de Abl pela fusão com as seqüências de Bcr ainda não está completamente esclarecido, mas sabe-se que os domínios provenientes tanto da porção Bcr quanto da porção Abl de Bcr-Abl e suas interações são importantes para funcionamento da tirosina-quinase. Buscando analisar a contribuição da porção Bcr para os efeitos de Bcr-Abl, Witte e colaboradores mostraram que seqüências codificadas pelo primeiro exon de *bcr* potencializam a atividade tirosina-quinase de c-Abl e o seu potencial transformante em fibroblastos e células hematopoéticas (Muller et al., 1991).

Presente em todas as isoformas de Bcr-Abl, a região N-terminal contendo 426 aa codificada pelo primeiro exon de *bcr*, contém o domínio serina/treonina-quinase que tem como substratos Bcr e Bap-1 (um membro da família das proteínas 14-3-3) e duas regiões ricas em resíduos de serina-treonina que servem de sítio de ligação para o domínio SH2 de outras proteínas, dentre elas Abl e Bcr-Abl (Deininger et al., 2000). Dois motivos codificados pelo primeiro exon de *bcr* são elementos-chave para os efeitos oncogênicos de Bcr-Abl, são eles: a tirosina 177 e o domínio “coiled-coil” contido nos primeiros 63 aminoácidos da porção Bcr. O resíduo de tirosina encontrado na posição 177 quando fosforilado forma um sítio de

ligação para a molécula adaptadora Grb2, importante para a ativação da via de Ras por Bcr-Abl e, conseqüentemente, para a indução do fenótipo leucêmico (Pendergast et al., 1993). O motivo “coiled-coil” medeia a homo-oligomerização de Bcr-Abl, permitindo a formação de dímeros e/ou tetrâmeros e, conseqüentemente, a ativação da sua atividade tirosina-quinase (Chopra et al., 1999).

Mutações e deleções no domínio “coiled-coil” da porção Bcr bloqueiam a capacidade de Bcr-Abl de formar dímeros e inibem, conseqüentemente, a sua atividade tirosina-quinase e a capacidade de transformar células e de induzir a leucemia mielóide em camundongos. Isso porque a dimerização de Bcr-Abl permite, dentre outras coisas, a fosforilação em “trans” de um resíduo de tirosina regulatório presente no “loop” de ativação. Van Etten e Smith mostraram, utilizando um indutor químico de dimerização, que só a dimerização de c-Abl já é suficiente para promover a ativação de sua atividade tirosina-quinase, induzir transformação celular e alterar a localização de c-Abl do núcleo para o citoplasma (Smith e Van Etten, 2001).

Embora grande parte da proteína Abl seja mantida na proteína quimérica Bcr-Abl, os efeitos celulares de Abl e Bcr-Abl são muito diferentes, senão completamente opostos.

Contrastando com Abl, a proteína Bcr-Abl exibe atividade tirosina-quinase constitutivamente ativa e elevada (Ben-Neriah et al., 1986) sendo encontrada exclusivamente no citoplasma complexada a proteínas do citoesqueleto (Van Etten et al., 1989). A alta atividade enzimática de Bcr-Abl e sua localização citoplasmática são essenciais para seus efeitos leucemogênicos, pois possibilitam a fosforilação de diversos substratos celulares, a autofosforilação da proteína Bcr-Abl e o recrutamento e ligação de moléculas e proteínas adaptadoras, propiciando, assim, a ativação de múltiplas vias de sinalização (Salesse e Verfaillie, 2002).

As principais vias ativadas por Bcr-Abl são: Ras, PI3-k/Akt, NF-κB e STAT (Kawauchi et al., 2003). É por meio da ativação dessas vias de sinalização que Bcr-Abl interfere em processos celulares fundamentais, como: proliferação, sobrevivência, diferenciação, reparo de DNA, adesão e circulação de células hematopoéticas, utilizando mecanismos transcripcionais e pós-transcripcionais que dependem da atividade tirosina-quinase e da formação de complexos multi-protéicos (Perrotti e Calabretta, 2002; Salesse e Verfaillie, 2002). Bcr-Abl pode transformar fibroblastos Rat-1 (Lugo e Witte, 1989), células linfóides primárias (McLaughlin et al., 1987) e células hematopoéticas dependentes de IL-3 (Daley e Baltimore, 1988). Em células hematopoéticas, a expressão de Bcr-Abl, além de induzir independência de fatores de crescimento (Sirard et al., 1994), promove alterações na adesão de células progenitoras à matriz extracelular e às células estromais (Verfaillie et al.,

1992; Skorski et al., 1998), inibição da apoptose (Bedi et al., 1995) e leucemogênese (Skorski et al., 1998).

Dentre as características de células que expressam Bcr-Abl, a redução da sensibilidade à quimioterápicos é uma característica compartilhada por linhagens celulares hematopoéticas expressando Bcr-Abl ectopicamente e por células progenitoras de LMC nas fases crônica e blástica da doença (Perrotti et al., 2005). A resistência a apoptose é, portanto, uma característica marcante das células que expressam Bcr-Abl, fazendo com que esta proteína seja considerada uma das mais potentes moléculas anti-apoptóticas descritas (Amarante-Mendes et al., 1998a; Amarante-Mendes et al., 1998b; Amarante-Mendes et al., 1998c; Quackenbush et al., 2000), exercendo um efeito protetor maior do que a superexpressão de outras moléculas anti-apoptóticas como Bcl-2 e Bcl-x_L (Brumatti et al., 2003). Tal resistência à indução de morte seria a principal responsável pela baixa eficácia de quimioterápicos convencionais no tratamento de leucemias Ph⁺ (Bedi et al., 1995).

1.5 VIAS DE SINALIZAÇÃO ATIVADAS POR BCR-ABL

1.5.1 BCR-ABL E A VIA DE RAS

A via de sinalização Ras/Raf/MEK/ERK é uma via central de transdução de sinais que transmite estímulos de inúmeros receptores celulares para fatores de transcrição e que pode, portanto, ser estimulada por mitógenos, citocinas e fatores de crescimento.

Ras é uma proteína de baixo peso molecular que se liga a GTP e apresenta um papel crítico na transmissão de estímulos mitóticos provenientes de tirosina-quinases do tipo receptor, transduzindo sinais para moléculas como Raf1 e proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs, “mitogen-activated protein kinases”) (Ehrhardt et al., 2002). A família MAPK inclui três serina-treonina-quinases: Erk (“extracellular signal regulated kinase”), JNK (“Jun-terminal kinase”)/SAPK e p38. ERK é ativada por estímulos mitóticos levando a transformação e diferenciação celular, enquanto as outras duas são ativadas por estresse (Chang e Karin, 2001).

O estado de ativação de Ras é controlado negativamente por GTPases, que removem o fosfato do GTP que está acoplado a Ras, e positivamente por fatores GEF (“guanine nucleotide exchange factors”), que estimulam a troca de GDP para GTP e são, portanto, ativadores das funções de Ras. Dessa forma, quando Ras está ativo se encontra ligado a GTP e quando inativo se encontra acoplado a GDP (Chopra et al., 1999; Steelman et al., 2004).

Estima-se que em cerca de 25-30% dos tumores humanos podem ser encontradas formas alteradas de Ras que desencadeiam sinais mitóticos, mesmo na ausência de seus

reguladores normais (Hanahan e Weinberg, 2000). Mutações que ativam Ras resultam em aumento da proliferação e sobrevivência celular. Em células que expressam Bcr-Abl a via de Ras está constitutivamente ativa e a inibição dessa via interfere na habilidade de Bcr-Abl de transformar fibroblastos e células hematopoéticas (Sawyers et al., 1995).

O mecanismo molecular pelo qual Bcr-Abl ativa a via de Ras envolve proteínas adaptadoras, como Grb2 e Shc (Fernandez-Luna, 2000). Pendergast e colaboradores (Cortez et al., 1995) mostraram que Bcr-Abl ativa a via de Ras por meio de sua ligação com Grb2 e que essa ligação de Grb2 com Bcr-Abl é mediada por um resíduo de tirosina fosforilada localizado na posição 177 (Y177) da porção Bcr da oncoproteína. A autofosforilação de Bcr-Abl na tirosina 177 gera um sítio de ligação para a molécula adaptadora Grb2. Grb2, por sua vez, se associa com a proteína Sos (uma “guanine nucleotide exchange factor”) que estimula a conversão da forma inativa de Ras (ligada a GDP) para sua forma ativa (ligada a GTP). Outras proteínas adaptadoras podem ativar Ras, como Shc e CrkL. Ras ativado se liga a serina/treonina-quinase Raf-1 recrutando-a para a membrana plasmática, onde é ativada pela fosforilação em tirosina e inicia uma cascata de sinalização pela via de MAPK. A importância desse resíduo de tirosina foi observada em experimentos em que a substituição da tirosina 177 de Bcr-Abl por fenilalanina (Y177F), bloqueou o recrutamento de Grb2 e, por consequência, a ativação de Ras em fibroblastos (Pendergast et al., 1993; Jagani et al., 2007). No entanto, em um outro estudo foi observado que, em células hematopoéticas, Bcr-Abl mantém a capacidade de ativar Ras e de promover independência de citocinas, mesmo na presença dessa mutação (Cortez et al., 1995). Isso indica que, na ausência de Grb2, outras moléculas adaptadoras fornecem vias alternativas de ativação de Ras para a transformação de células hematopoéticas (Chopra et al., 1999).

Outra molécula que em células positivas para Bcr-Abl é recrutada pelo complexo formado entre a tirosina 177 fosforilada e Grb2, é Gab2. Grb2 recruta Gab2 que é então fosforilada por Bcr-Abl, resultando na ativação das vias de PI3-k/Akt e Ras/Erk. A mutação da tirosina por fenilalanina na posição 177 diminui a fosforilação de Gab2 e reduz a ativação das vias de Ras/Erk e PI3-k/Akt, o que resulta na diminuição da proliferação e migração celular. Além disso, células progenitoras mielóides derivadas de medula óssea de camundongos deficientes em Gab2 são resistentes à transformação por Bcr-Abl (Sattler et al., 2002).

As vias ativadas por Ras que estão envolvidas na transformação celular mediada por Bcr-Abl parecem envolver as vias de Erk e JNK. A ativação de Erk envolve Raf 1, um dos alvos diretos de Ras. Em células positivas para o cromossomo Ph, a inibição de Ras inibe o crescimento celular. Outras moléculas ativadas por Ras são c-myc e ciclina D1, sugerindo que

diversos componentes do ciclo celular atuam abaixo das vias de sinalização dependentes do domínio SH2 de Bcr-Abl, para induzir a transformação maligna (Chopra et al., 1999). A ativação de JNK mediada por Bcr-Abl necessita de Ras, MEK quinase e JNK e é importante para a atividade transformante de Bcr-Abl (Raitano et al., 1995).

Quanto à participação de Ras na geração de sinais anti-apoptóticos, foi demonstrado que a expressão constitutiva de Mcl-1, um membro anti-apoptótico da família Bcl-2, depende da via de Ras/Raf/MEK e que a inibição de Mcl-1 diminui a sobrevivência e aumenta a sensibilidade de células que expressam Bcr-Abl à indução de morte pelo mesilato de imatinibe (Aichberger et al., 2005).

1.5.2 BCR-ABL E A VIA DE PI3-K/AKT

A via de fosfatidilinositol-3 quinase (PI3-k) participa da regulação de diversos processos celulares, incluindo sobrevivência, proliferação, diferenciação, adesão, motilidade, apoptose e outros eventos envolvendo tirosina-quinases (Chopra et al., 1999; Jagani et al., 2007).

PI3-k é uma lipídeo-quinase heterodimérica formada, de maneira geral, por uma subunidade catalítica com 110 kDa (p110) e uma subunidade regulatória de 85 kDa (p85). É por meio de seus domínios SH2 e SH3 que a p85 atua como uma molécula adaptadora, permitindo que a subunidade catalítica p110 interaja com proteínas tirosina-quinases que promovem a ativação enzimática de PI3-k. Quando ativada, por exemplo, por receptores do tipo tirosina-quinase de fatores de crescimento, PI3-k fosforila o fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) a fosfatidilinositol trifosfato (PIP3) e esse último promove o recrutamento de quinases, como Akt e PDK (“3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1”) (Chopra et al., 1999).

Akt, uma das moléculas alvo de PI3-k, é uma serina/treonina-quinase que atua na regulação de sinais de sobrevivência celular em resposta a diversos estímulos internos e externos, incluindo perda de adesão, danos no DNA, retirada de fatores de crescimento e descompasso no ciclo celular (Datta et al., 1997; Franke et al., 1997). Um dos mecanismos pelo qual Akt promove a sobrevivência das células é através da inativação de componentes da maquinaria da apoptose, incluindo a inibição da proteína pró-apoptótica Bad (Datta et al., 1997) e o bloqueio da via de apoptose dependente de caspase (Cardone et al., 1998; Yamaguchi e Wang, 2001). Além de Bad outros substratos de Akt foram descritos, dentre os quais, destacam-se caspase-9, Mdm2, mTOR e a sub-classe de fatores de transcrição “forkhead” FoxO (FoxO1, FoxO3a e FoxO4) (Jagani et al., 2007).

A molécula Bad, quando não fosforilada, se liga a Bcl-x_L e a outros membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, inibindo sua função de bloqueio da morte, e promovendo a morte celular (Yang et al., 1995). Sinais de sobrevivência (citocinas, fatores de crescimento, oncogenes) promovem a fosforilação de Bad em resíduos de serina através da via dependente de PI3k/Akt (Datta et al., 1997). Akt é o responsável pela fosforilação de Bad na serina 136 que fosforilado é sequestrado no citosol pela ligação com proteínas da família 14-3-3 não sendo mais capaz de se ligar a Bcl-x_L e de sequestrá-lo no citossol (Datta et al., 2000). A via PI3k/Akt/Bad representa uma ponte entre os sinais de sobrevivência extracelulares e os moduladores da apoptose na mitocôndria.

Nas células hematopoéticas que expressam Bcr-Abl, Bad está constitutivamente fosforilado e esse efeito depende da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl, visto que a expressão de mutantes de Bcr-Abl quinase-deficientes não induz sua fosforilação. No entanto, a capacidade de Bcr-Abl de fosforilar essa molécula não é suficiente para a proteção completa das células leucêmicas da apoptose, sugerindo a existência de vias dependentes e independentes de Bad, mas dependentes de PI3-k (Neshat et al., 2000), que participam na geração de sinais anti-apoptóticos. Essa observação é reforçada por dados que mostram que a ativação de Akt não resulta necessariamente em fosforilação de Bad (Neshat et al., 2000). Além dos efeitos sobre Bad, Akt suprime apoptose pela regulação positiva do potencial de transativação de NF-κB, o que aumenta a expressão de moléculas inibidoras da apoptose, como Bcl-x_L e A1 (Fernandez-Luna, 2000).

Um outro alvo de Akt é mTOR (“mammalian target of rapamycin”), uma serina/treonina-quinase cuja inibição por rapamicina, bloqueia o crescimento de células primárias derivadas de LMC e células leucêmicas resistentes ao inibidor de Bcr-Abl, mesilato de imatinibe (Kantarjian et al., 2007).

Interessante observar que em muitos tipos de neoplasias, incluindo a LMC, há a ativação constitutiva da via de PI3-k/Akt (Skorski et al., 1995). Skorski e colaboradores mostraram que a proliferação de linhagens e células primárias Bcr-Abl-positivas é dependente de PI3-k (Skorski et al., 1995). O mecanismo envolvido na ativação da via PI3-k/Akt por Bcr-Abl ainda não foi completamente esclarecido. Alguns estudos apontam para uma interação direta entre Bcr-Abl e PI3-k, na qual Bcr-Abl se liga a subunidade regulatória (p85) de PI3-k, enquanto outros pesquisadores apostam na participação de moléculas adaptadoras intermediando essa conexão. Atualmente existem fortes evidências da participação da molécula adaptadora Gab2, a qual é recrutada indiretamente para a sítio Y177 por meio da formação de complexo com Grb2. A fosforilação de Gab2 em tirosina promove sítios de ligação para o domínio SH2 de p85 de PI3-k, o que leva à ativação de PI3-k. Assim como

para a ativação da via de Ras, a tirosina 177 localizada na porção Bcr parece ser de grande importância para a ativação de PI3-k por Bcr-Abl. Apesar de caspase-9 ser um substrato de Akt, não foram observadas em células positivas para Bcr-Abl alterações na expressão, nem no estado de fosforilação dessa caspase que pudessem explicar a resistência a apoptose (Brumatti et al., 2003; Deming et al., 2004).

Mdm2 é uma proteína reguladora de p53, que além de inibir diretamente a transcrição dessa proteína, se liga a p53 e atua como uma ubiquitina ligase E3 direcionando-a para a via de degradação pelo proteassoma. Foi observado em linhagens celulares dependentes de fatores de crescimento que, tanto a retirada de IL-3 como a inibição de Bcr-Abl pelo mesilato de imatinibe, promovem a redução da expressão de Mdm2, e que tal efeito precede a indução de apoptose pelo inibidor. Nesse mesmo trabalho foi mostrado que a morte induzida pelo mesilato de imatinibe depende em parte de p53 (Goetz et al., 2001).

A relevância da via PI3-k/Akt para os efeitos tumorigênicos de Bcr-Abl foi também observada em ensaios que mostram que inibidores de PI3-k (LY294002 e Wortmannin) sinergizam com o mesilato de imatinibe para a indução de morte de células de LMC nas fases crônica e crise blástica da doença (Klejman et al., 2002a).

1.5.3 BCR-ABL E A ATIVAÇÃO DE NF-κB

Os fatores de transcrição da família NF-κB (“nuclear factor-κB”) são ativados por uma ampla gama de estímulos (citocinas, estresse e vírus) e regulam a expressão de genes envolvidos em diversos processos, como proliferação, sobrevivência e diferenciação celular, angiogênese, inflamação e modulação da resposta imune. NF-κB é regulado negativamente por I-κB (“inhibitor of κB”) que o sequestra no citoplasma. A fosforilação e degradação de I-κB promovem a liberação de NF-κB e permitem a sua translocação para o núcleo, no qual induz a transcrição de genes-alvo. Os alvos anti-apoptóticos de NF-κB incluem os membros da família Bcl-2, Bcl-x_L, A1/Bfl-1, e inibidores da apoptose da família dos IAPs (c-IAP-1, c-IAP-2 e XIAP). Bcr-Abl ativa a via de NF-κB de maneira dependente de sua atividade tirosina-quinase e a transcrição gênica mediada por esta família de fatores de transcrição parece ser necessária tanto para os efeitos transformantes de Bcr-Abl em células primárias derivadas de medula óssea quanto para o desenvolvimento de tumores em modelos animais (Reuther et al., 1998; Chopra et al., 1999; Brumatti et al., 2003; Kirchner et al., 2003).

1.5.4 BCR-ABL E A VIA DE STAT

STATs (“signal transducers and activators of transcription”) são fatores de transcrição citoplasmáticos latentes que se tornam ativados após serem recrutados para um complexo receptor e fosforilados em resíduos de aminoácidos específicos. Os STATs quando ativados por citocinas ou fatores de crescimento se dimerizam, migram para o núcleo e induzem alterações no padrão de expressão gênica ao se ligarem aos promotores de genes-alvo (Darnell, 1997). Inúmeros processos, incluindo crescimento, diferenciação e apoptose celular, desenvolvimento, inflamação e resposta imune envolvem a participação dos fatores de transcrição dessa família (Baskiewicz-Masiuk e Machalinski, 2004).

A família STAT é composta por sete membros: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b e STAT6. Estruturalmente essas proteínas são formadas por um domínio de oligomerização amino-terminal, um domínio de ligação ao DNA, um domínio SH2 e um domínio de transativação. Esse último domínio varia de tamanho entre os diferentes STATs e é o responsável pela ativação da transcrição dos genes-alvos. O domínio de oligomerização contém uma tirosina que é fosforilada por Jaks, o que permite a sua interação com o domínio SH2 de outras proteínas STAT (Steelman et al., 2004).

As proteínas tirosina-quinase Janus, também conhecidas por Jak, são proteínas citoplasmáticas envolvidas na sinalização por receptores de citocinas e proteínas PTKs do tipo receptor transmembrânico. Além das Jaks, outras proteínas podem ativar proteínas STATs direta ou indiretamente, como RTKs e PTKs citoplasmáticas, como Src e Abl.

STAT5 é um fator de transcrição que é ativado em resposta a diversas citocinas hematopoéticas. STAT5A e STAT5B são produtos de dois genes diferentes que podem apresentar múltiplas funções na transdução de sinais (Gesbert e Griffin, 2000). A ativação de STAT5 já foi associada com o aumento da expressão de várias proteínas, incluindo ciclina D1, Bcl-x_L, CIS, A1, pim-1, Id-1, OSM, c-fos e c-jun (Horita et al., 2000; Jagani et al., 2007).

Em linhagens celulares derivadas de pacientes com LMC ou transduzidas com o oncogene *bcr-abl*, STAT5 está constitutivamente ativo (Chopra et al., 1999). A ativação de STAT5 por Bcr-Abl induz a expressão de Bcl-x_L, uma importante molécula anti-apoptótica, além de A1 e da serina/treonina-quinase pim-1 (Horita et al., 2000).

Fisiologicamente STATs são fosforiladas por Jak (Janus kinases) que agem na via de sinalização de receptores de fatores de crescimento. No entanto, em células Bcr-Abl-positivas a fosforilação de STAT5 parece ser mediada por Hck, uma quinase da família Src, que se liga aos domínios SH2 e SH3 de Bcr-Abl (Klejman et al., 2002b).

Estudos utilizando mutantes dominante-negativo e dominante-positivo de STAT5 mostraram que esse fator de transcrição é essencial para a transformação de células hematopoéticas por Bcr-Abl e que sua inibição bloqueia a transformação por essa oncoproteína (Sexl et al., 2000).

1.5.5 VIAS DE SINALIZAÇÃO ATIVADAS POR BCR-ABL: CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre as vias de sinalização ativadas por Bcr-Abl, Ras e PI3-k parecem ser essenciais para a transformação celular mediada por Bcr-Abl (Kawauchi et al., 2003). Quanto à resistência à apoptose, Bad e Bcl-x_L parecem ser os principais reguladores da apoptose sob o controle de Bcr-Abl. A via de sinalização PI3-k/Akt induz a fosforilação e a conseqüente inativação de Bad e contribui para a expressão de Bcl-x_L, por meio da ativação da via de NFκB. Além disso, a expressão de Bcl-x_L é aumentada pela ativação constitutiva de STAT5 em células que expressam Bcr-Abl (Fernandez-Luna, 2000).

Resultados obtidos por Sonoyama e colaboradores (Sonoyama et al., 2002) indicam que, embora as vias de Ras, PI3-k e STAT5 participem individualmente da sobrevivência e crescimento dependentes de Bcr-Abl, a cooperação dessas vias de sinalização é necessária para a completa atividade leucêmica dessa tirosina-quinase. Além disso, a contribuição de cada uma das diferentes vias de sinalização, depende do contexto celular em que Bcr-Abl está expressa (Fernandez-Luna, 2000).

A atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl é crítica para seus efeitos oncogênicos, visto que a expressão de formas mutantes desta proteína com atividade enzimática sensível a temperatura ou com o domínio tirosina-quinase inativo não são oncogênicas *in vitro* e *in vivo* (Wertheim et al., 2002). Diversos estudos utilizando inibidores de tirosina-quinase têm sido feitos na tentativa de elucidar a relação entre a alta atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl e o fenótipo de transformação celular e resistência à apoptose observado em células que expressam esta molécula. A análise mutacional de Bcr-Abl sugere que os sinais responsáveis pela proteção da apoptose podem ser separados daqueles responsáveis por alguns dos fenótipos da transformação celular (Neshat et al., 2000). De acordo com Lugo e colaboradores, o potencial transformante desta oncoproteína está diretamente relacionado com sua atividade enzimática (Lugo et al., 1990). No entanto, estudos recentes indicam que algumas das alterações nas propriedades de adesão decorrentes da expressão de Bcr-Abl são independentes da atividade tirosina-quinase desta molécula (Weinstein, 2002).

1.6 INIBIDORES DE TIROSINA-QUINASE – RESULTADOS E PERSPECTIVAS

A descoberta de que a proteína Bcr-Abl é necessária para a patogênese da LMC e de que a atividade tirosina-quinase é essencial para seus efeitos leucemogênicos, tornou-a um alvo muito atraente para intervenções terapêuticas. Atualmente, diversas estratégias estão sendo empregadas no desenvolvimento de tratamentos para leucemias Ph⁺, que atuem direta e exclusivamente sobre as células leucêmicas, tendo como alvo a molécula Bcr-Abl e, principalmente, sua alta atividade tirosina-quinase.

Nesse sentido, uma das drogas utilizadas com grande sucesso no tratamento de pacientes com LMC é o mesilato de imatinibe (CGP57148, STI571, Glivec[®], Novartis Pharma AG, Switzerland). O mesilato de imatinibe é um inibidor de tirosina-quinase, derivado de 2-fenilaminopirimidina, que apresenta especificidade pela tirosina-quinase Abl (Druker et al., 1996), inibindo a ligação do ATP ao domínio quinase de Abl, bloqueando, assim, a atividade enzimática de Bcr-Abl (Mahon et al., 2000).

Os compostos da classe 2-fenilaminopirimidina foram desenhados com base na estrutura do sítio de ligação das proteínas quinases ao ATP, e o mesilato de imatinibe (na época chamado de CGP57148) foi identificado e caracterizado como um poderoso composto anti-tumoral por sua habilidade de inibir a atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl, bloquear a proliferação e induzir morte em células derivadas de LMC (Carroll et al., 1997; Gollin, 2007). Apesar da alta seletividade, o mesilato de imatinibe não é um inibidor exclusivo de Bcr-Abl, bloqueando também a atividade tirosina-quinase de c-Kit (“stem-cell factor receptor”), c-FMS, PDGFR (“platelet-derived growth factor receptor”), Abl e Arg, mas com pouco efeito sobre outras quinases (Mauro e Druker, 2001).

Em Junho de 1998 foi iniciado um estudo clínico de fase I, no qual foram incluídos pacientes com LMC na fase crônica que não tinham respondido ao tratamento com interferon- α (refratários, resistentes ou intolerantes a essa droga). Num estágio mais avançado desse estudo foram incluídos também pacientes com LMC na crise blástica e pacientes com LLA Ph⁺. Os benefícios do mesilato de imatinibe para o tratamento da LMC são claros e significantes, 98% dos pacientes na fase crônica da doença que receberam doses diárias de mesilato de imatinibe iguais ou superiores a 300 mg atingiram resposta hematológica completa e em 96% deles a resposta durou mais de um ano. Em pacientes com crise blástica seu efeito é mais limitado, apenas 55% dos pacientes responderam ao tratamento com doses diárias iguais ou superiores a 300mg, dentre os quais 18% tiveram respostas com duração maior do que um ano. Nos estudos de fase II foram incluídos pacientes refratários ou intolerantes a terapia com interferon- α , pacientes na crise blástica e com LLA Ph⁺. Nos

pacientes com diagnóstico de LMC na crise blástica, foram obtidas taxas de resposta citogenética de 6% e 18% para as doses de 400 e 600 mg/dia de mesilato de imatinibe, respectivamente. O seguimento dos pacientes indicou uma taxa de sobrevivência de 14% e 17% em 24 a 36 meses. Respostas hematológicas na fase acelerada foram obtidas em 65% dos pacientes tratados com a dose de 400 mg/dia e em 71% dos pacientes tratados com 600 mg/dia. Na fase II com pacientes com LMC na fase crônica tratados com imatinibe após falha ou intolerância ao IFN- α , a taxa de resposta hematológica completa foi de 95%, a de resposta citogenética completa, após 5 anos, foi de 57% e a de sobrevivência foi de 79% (Druker, 2002; Kantarjian et al., 2007).

No estudo denominado IRIS (“International Randomized Study of IFN versus STI571”), os efeitos do mesilato de imatinibe em pacientes na fase crônica da doença foram comparados aos de IFN- α associado à citarabina, tendo sido observadas taxas de resposta citogenética completa em 87% dos pacientes tratados com imatinibe contra 35% para pacientes tratados com IFN- α associado à citarabina. Ainda nesse estudo foi detectado que a porcentagem de pacientes que utilizou mesilato de imatinibe e que não progrediu para as fases acelerada ou blástica foi de 97% (Kantarjian et al., 2007). Com base nos ótimos resultados obtidos nos estudos clínicos de fase I, II e III, o mesilato de imatinibe foi aprovado no início de 2001 para ser utilizado no tratamento de pacientes com LMC, fazendo dessa neoplasia a primeira doença para a qual uma “targeted therapy”, ou terapia alvo, foi desenvolvida. O uso do mesilato de imatinibe revolucionou a abordagem terapêutica para LMC e é atualmente a primeira linha de tratamento para pacientes com LMC na fase crônica e a droga escolhida para induzir uma resposta rápida, embora de curta duração, em estágios mais avançados da doença (Vigneri e Wang, 2001).

De modo geral essa droga induz remissão hematológica e citogenética na maioria dos pacientes com LMC na fase crônica, no entanto, estudos clínicos com este inibidor de tirosina-quinase Abl, mostraram que pacientes na fase avançada da LMC (crise blástica) respondiam inicialmente ao tratamento, mas depois recaíam. Através de análises bioquímicas e moleculares, Sawyers e colaboradores associaram esta resistência clínica ao inibidor a uma reativação do sinal de transdução de Bcr-Abl, que em alguns casos resultava de uma mutação no domínio quinase de Abl e em outros estava ligada a uma amplificação progressiva do gene *bcr-abl* (Gorre et al., 2001). Um outro estudo mostrou que a resistência ao mesilato de imatinibe, entre as células que expressam Bcr-Abl, pode se desenvolver através de múltiplos mecanismos, como: superexpressão de Bcr-Abl (amplificação gênica ou por outros mecanismos pós-transcricionais), redução na captura do composto devido a superexpressão de glicoproteína P (Pgp) ou, alternativamente, por degradação excessiva (Mahon et al., 2000).

Além disso, foi proposto que células tronco leucêmicas quiescentes e insensíveis ao tratamento com imatinibe, podem estar associadas à persistência da LMC (“molecular residual disease”) (Kantarjian et al., 2007).

O aparecimento de resistência à terapia com mesilato de imatinibe é uma grande preocupação atual e os mecanismos envolvidos têm sido amplamente investigados. Em um estudo em amostras de pacientes foi observado que 50-90% dos casos de resistência ao imatinibe estavam associados a presença de mutações pontuais no domínio tirosina-quinase de Bcr-Abl. Mais de 50 mutações pontuais distintas codificando substituições de aminoácidos no domínio tirosina-quinase de Bcr-Abl foram detectadas em pacientes com LMC resistentes ao mesilato de imatinibe. Como resultado dessas mutações, a proteína Bcr-Abl, em especial o domínio quinase, sofre alterações em sua estrutura o que impede a adoção da configuração apropriada para a ligação do inibidor. Algumas dessas mutações, como a T315I, são freqüentemente observadas em pacientes refratários ao inibidor, mas também podem ser detectadas em pacientes antes mesmo do início do tratamento (Quintas-Cardama et al., 2007).

A análise da estrutura cristalográfica do domínio quinase de Abl em complexo com o mesilato de imatinibe mostrou que essa droga se liga à conformação inativa da quinase. Portanto, espera-se que mutações que interfiram no mecanismo de autoregulação e favoreçam a adoção do estado ativo conduzam a resistência ao tratamento com mesilato de imatinibe (Hubbard, 2002).

A necessidade de novas estratégias terapêuticas para o tratamento dos pacientes resistentes ao imatinibe estimulou a comunidade científica e as indústrias farmacêuticas na descrição de novos inibidores de Bcr-Abl. Dois novos agentes, dasatinibe (Sprycel; BMS-354825) e nilotinibe (Tasigna), parecem ser promissores pois mostraram-se efetivos em grande parte dos pacientes com LMC resistentes ao mesilato de imatinibe.

O nilotinibe é um inibidor estruturalmente relacionado ao imatinibe, 20 a 50 vezes mais potente do que esse último na ação contra o Bcr-Abl e que apresenta atividade contra a maioria das mutações pontuais que conferem resistência ao imatinibe, tendo inibido, em ensaios de proliferação, 32 das 33 linhagens mutantes resistentes ao imatinibe, com exceção da T315I. O dasatinibe, um inibidor sintético de quinases das famílias Src e Abl, age competindo com o ATP pelo sítio de ligação na enzima. Sua ação sobre a atividade quinase de Bcr-Abl não está tão restrita à conformação de Abl quanto a ação do mesilato de imatinibe e por isso possui potencial inibitório 100 vezes maior do que esse fármaco. Além dos inibidores da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl que atuam competindo com o ATP pela ligação à quinase, outras modalidades terapêuticas estão sendo investigadas e desenvolvidas para o tratamento de pacientes com leucemias Ph⁺, dentre elas inibidores de Bcr-Abl que

reconhecem o sítio da quinase responsável pela ligação ao substrato e inibidores de vias de sinalização que são alteradas por Bcr-Abl, como inibidores de Src quinases, proteínas Ras (inibidores de farnesiltransferases) e da via de PI3-k (rapamicina), além de agentes hipometilantes (Kantarjian et al., 2007).

Embora o desenvolvimento de resistência ao mesilato de imatinibe represente novos desafios terapêuticos, o fato de Bcr-Abl continuar ativo nas células resistentes ao mesilato de imatinibe sugere que esta oncoproteína continua um valioso alvo para drogas terapêuticas (Gorre et al., 2001).

Apesar de todos esses estudos envolvendo inibidores de tirosina-quinase, o mecanismo de ação anti-leucêmica e pró-apoptótica desses inibidores, em especial do mesilato de imatinibe, ainda não foi completamente descrito (Donato et al., 2001). Isso, provavelmente porque ainda não se conhece integralmente a relação entre a alta atividade enzimática de Bcr-Abl e o fenótipo de transformação celular e resistência à apoptose induzido por essa tirosina-quinase.

Sabe-se que a atividade quinase é crítica para os efeitos oncogênicos de Bcr-Abl. Em um estudo realizado por Pendergast e colaboradores utilizando diversas formas mutantes de Bcr-Abl, foi demonstrado que células expressando uma versão quinase-deficiente de Bcr-Abl não apresentam independência de fatores de crescimento, resistência à apoptose induzida pela retirada de IL-3 e nem são tumorigênicas (Cortez et al., 1995). Em contraste, alterações na adesão à filamentos de fibronectina e a associação à F-actina são atividades de Bcr-Abl independentes da sua função tirosina-quinase (Wertheim et al., 2002). Isso sugere que a transformação celular induzida por Bcr-Abl envolve a ação conjunta de mecanismos dependentes e independentes de sua atividade tirosina-quinase.

Os sinais gerados por Bcr-Abl de maneira independente de sua atividade enzimática são de particular interesse quando consideramos que a monoterapia com o mesilato de imatinibe é incapaz de eliminar completamente as células leucêmicas (Graham et al., 2002; Li e Li, 2007). Por razões desconhecidas, mas não associadas à mutações no domínio quinase de Bcr-Abl, o mesilato de imatinibe é muito menos eficaz em pacientes com LMC na crise blástica e em pacientes com LLA-B Ph⁺. Isso provavelmente ocorre porque algumas das vias ativadas por Bcr-Abl, como Src quinases em células linfóides-B, não têm sua atividade reduzida pela inibição de Bcr-Abl pelo mesilato de imatinibe. Essa observação sugere que para a eliminação dessas células leucêmicas é necessária a inibição conjunta de Bcr-Abl e da outra via por ela ativada.

O estudo aprofundado dos mecanismos moleculares envolvidos na transformação celular mediada por Bcr-Abl, em particular os independentes de sua atividade tirosina-

quinase, poderá fornecer informações importantes, tanto para compreendermos a resistência à quimioterapia encontrada em leucemias Ph⁺, como para o desenvolvimento de marcadores de prognóstico e de novas estratégias terapêuticas mais eficientes no tratamento dessas neoplasias.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi investigar mecanismos moleculares envolvidos na transformação celular induzida por Bcr-Abl, com enfoque especial para aqueles relacionados ao seu potencial anti-apoptótico. Para tanto, foram adotadas duas linhas principais de investigação, as quais serão abordadas na seção “Resultados” em duas partes. O tema de cada parte e seus objetivos específicos estão descritos a seguir.

PARTE 1: CONTRIBUIÇÃO DA SINALIZAÇÃO INDEPENDENTE DA ATIVIDADE TIROSINA-QUINASE DE BCR-ABL PARA A RESISTÊNCIA À APOPTOSE

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se a inibição farmacológica da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl é capaz de sensibilizar células à indução de morte por agentes apoptogênicos;
- Analisar o impacto da inibição farmacológica da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl na expressão de proteínas pró- e anti-apoptóticas;
- Estabelecer linhagens celulares que expressem as versões selvagem e quinase-deficiente da proteína Bcr-Abl;
- Analisar o impacto da expressão da forma mutante quinase-deficiente de Bcr-Abl sobre a resistência à morte e a expressão de proteínas pró- e anti-apoptóticas;
- Avaliar o papel do contexto celular na resistência à apoptose mediada pela expressão de Bcr-Abl.

PARTE 2: IMPACTO DA EXPRESSÃO DE BCR-ABL NO PROTEOMA DE CÉLULAS HL-60

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os padrões de expressão protéica global e de proteínas fosforiladas em tirosina de células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl;
- Identificar proteínas diferencialmente expressas em células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl, por meio da comparação dos perfis de expressão protéica global;
- Procurar por moléculas-alvo de Bcr-Abl que possam estar envolvidas nos efeitos oncogênicos dessa tirosina-quinase;
- Investigar, de maneira exploratória, vias de sinalização intracelular possivelmente alteradas por Bcr-Abl e que possam estar associadas à transformação celular.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS CELULARES

3.1.1 CÉLULAS DE MAMÍFEROS

293T: linhagem que expressa o antígeno T de SV40, utilizada nos ensaios de transfecção transitória e para a produção de partículas retrovirais. Derivada de células 293 (ref. ATCC n° CRL-11268), uma linhagem estabelecida a partir de células embrionárias renais humanas transformadas por adenovírus tipo 5.

293 *GAG/POL*: linhagem derivada de células 293 que foram transfectadas com pCMVgag-pol e que, portanto, expressam estavelmente os genes *gag* e *pol* que codificam proteínas virais. Utilizada nos ensaios de transfecção e produção de retrovírus.

HELA: linhagem de células malignas humanas derivadas de adenocarcinoma de colo cervical. Utilizada por ser facilmente transfectada e infectada com partículas retrovirais (ref. ATCC n° CCL-2).

HELA.BCR-ABL: linhagem estabelecida pela doutoranda Gabriela Brumatti resultante da infecção de células HeLa com retrovírus presentes no sobrenadante de células 293T transfectadas com o plasmídeo pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl. Expressa Bcr-Abl.

HL-60: linhagem promielocítica humana, estabelecida do sangue periférico de uma paciente com leucemia aguda pró-mielocítica (ref. ATCC n° CCL-240) (Collins et al., 1977).

HL-60.BCR-ABL (OW): linhagem resultante da infecção de células HL-60 selvagens com retrovírus recombinante produzido por meio da transfecção por eletroporação de uma combinação de células empacotadoras das linhagens PA317 e ψ 2 com o plasmídeo pSR α MSVp185*bcr-abl* tkneo, contendo o gene *bcr-abl* (Amarante-Mendes et al., 1998).

HL-60.VECTOR: linhagem controle das células HL-60.Bcr-Abl (OW) estabelecidas usando o plasmídeo pSR α MSV.tkneo (Amarante-Mendes et al., 1998).

HL-60.BCR-ABL (JW): linhagem resultante da infecção de células HL-60 selvagens com retrovírus recombinante produzido por meio da transfecção por eletroporação de uma combinação de células empacotadoras das linhagens PA317 e ψ 2 com o plasmídeo pSLX-CMV.Bcr-Abl. Essa linhagem difere da OW pelo fato do gene *bcr-abl* ser resultado de uma construção artificial, contendo a porção *bcr* humana associada à porção truncada de *c-abl* de origem murina.

K562 (ref. ATCC n° CCL-243), KCL22 (ref. DSMZ n° ACC 519), LAMA-84 (ref. DSMZ n° ACC 168): linhagens celulares derivadas de pacientes com LMC na crise blástica.

JURKAT: linhagem celular humana estabelecida do sangue periférico de paciente com leucemia linfoblástica aguda (ref. DSMZ n° ACC 282).

PA317: linhagem empacotadora anfotrópica derivada de fibroblasto de camundongo, utilizada para a produção de partículas retrovirais, por expressar os genes *gag*, *pol* e *env* (ref. ATCC n° CRL-907).

THP-1: linhagem humana de origem monocítica, derivada de paciente com leucemia monocítica aguda (ref. DSMZ n° ACC 16).

O cultivo das células 293T, 293 *gag/pol*, PA317, HeLa e HeLa.Bcr-Abl foi feito em meio DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium” - Life Technologies Gibco-BRL). As linhagens celulares HL-60, HL-60.Bcr-Abl (OW), HL-60.Bcr-Abl (JW), K562, KCL22, LAMA-84, Jurkat e THP-1 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Life Technologies Gibco). Em ambos os casos os meios foram suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF), 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina/100 μ g/mL estreptomicina e 25 mM HEPES (Life Technologies Gibco). Os meios foram esterilizados por filtração em membranas com poros de 0,22 μ m. No caso das linhagens 293T, 293 *gag/pol* e PA317 utilizadas para a produção de partículas retrovirais recombinantes, é importante ressaltar que para a produção de partículas virais foi utilizado o soro bovino fetal *defined* da Hyclone para a suplementação do meio de cultura utilizado durante as transfecções. As linhagens acima citadas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂.

3.1.2 BACTÉRIAS

Células competentes da linhagem bacteriana DH5- α (Life Technologies), derivada de *Echerichia coli*, foram utilizadas para a amplificação e propagação dos plasmídeos utilizados nesse trabalho.

Para o cultivo dessa linhagem foi utilizado o meio de cultura Luria Bertani (LB) (171,1 mM NaCl, 1% bacto-peptona, 0,5% de extrato de levedura, pH 7,0), líquido e/ou sólido (LB ágar: meio LB acrescido de 1,5% de bacto-ágar) contendo, quando necessário, ampicilina (100 μ g/ml) ou kanamicina (50 μ g/ml), dependendo do plasmídeo utilizado. Além disso, durante a transformação das bactérias foram utilizados os meios SOB (2% peptona; 0,5% extrato de levedura; 8,56 mM NaCl; 2,5 mM KCl – pH 7,0) e SOC (SOB + 10 mM MgCl₂ + 20 mM de glicose) (Sambrook et al., 1989).

3.2 PLASMÍDEOS UTILIZADOS

- pSR α MSVtkneo: plasmídeo retroviral deficiente em replicação, utilizado como vetor para transduzir o gene de interesse. Esse plasmídeo contém o gene de resistência a neomicina e foi gentilmente cedido pelo Dr. Owen Witte (Howard Hughes Medical Institute, University of California Los Angeles, CA, USA).
- pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl: plasmídeo retroviral deficiente em replicação, contendo o gene *bcr-abl* selvagem, gentilmente cedido pelo Dr. Owen Witte (Howard Hughes Medical Institute, University of California Los Angeles, CA, USA).
- pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl/KD e pSLX-CMV.Bcr-Abl/KD: plasmídeos retrovirais deficientes em replicação, contendo o gene *bcr-abl* mutado, gentilmente cedidos pelos Drs. Owen Witte (Howard Hughes Medical Institute, University of California Los Angeles, CA, USA) e Jean Wang (University of California, San Diego, CA, USA), respectivamente. No primeiro plasmídeo o gene *bcr-abl* apresenta uma mutação pontual que resulta na substituição de uma lisina por uma arginina na posição 671 de Bcr-Abl (K671R). No segundo plasmídeo, a mutação presente resulta na substituição de uma lisina por uma histidina na posição 295 de Abl (K295H). Para simplificação e melhor identificação desses dois plasmídeos foi adotada a denominação KR para o plasmídeo pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl/KD que apresenta uma substituição de uma lisina (K) por uma arginina (R), como acima explicado, e a denominação KH para o outro plasmídeo cuja mutação leva à substituição de uma lisina (K) por uma histidina (H). Nos dois casos, a mutação promove a a inibição da

atividade quinase de Bcr-Abl que, portanto, não apresenta qualquer atividade enzimática (KD, “kinase deficient”).

- pEGFPN-1 (Clontech): plasmídeo contendo o gene que codifica a proteína verde fluorescente (EGFP – “enhanced green fluorescent protein”) utilizado para a confirmação das eficiências de transfecção. Essa proteína emite fluorescência verde quando excitada por luz ultravioleta. Tal emissão pode ser observada tanto em microscópio de fluorescência quanto no citômetro de fluxo.
- pCL-ampho: plasmídeo contendo os genes *gag*, *pol* e *env*, necessários para formação e replicação da partícula viral. O gene *gag* codifica proteínas estruturais, *pol* codifica a transcriptase reversa/integrase e o *env* codifica uma glicoproteína do envelope viral (gp70). Esse plasmídeo foi gentilmente cedido pela Profa Dra Eugênia Costanzi-Straus e foi utilizado para complementação das células empacotadoras na produção de partículas retrovirais recombinantes.
- pMX-IRES-EGFP: plasmídeo retroviral bicistrônico que, por conter o elemento IRES (“internal ribosome entry site”), permite a expressão da proteína EGFP e de um gene de interesse nele clonado, a partir do mesmo transcrito. No caso do presente trabalho nenhum outro gene foi clonado nesse plasmídeo e o uso dele ficou restrito aos ensaios de eficiência de transfecção e infecção celular. Esse plasmídeo foi gentilmente cedido pelo Dr. Douglas Green (La Jolla Institute for Allergy and Immunology, San Diego, CA, EUA).
- pVSV-G (Clontech): plasmídeo que expressa a glicoproteína G do vírus da estomatite vesicular. Essa proteína interage com fosfolipídios presentes na membrana da célula alvo, facilitando a fusão da membrana viral com a membrana celular.

3.3 AGENTES INDUTORES DE APOPTOSE

Para os ensaios de resistência à apoptose, foram utilizados indutores de morte com diferentes mecanismos de ação, dentre eles: a) inibidores de topoisomerase II: teniposídeo (VM26) e etoposídeo (VP16); b) inibidor de síntese protéica: cicloheximida (CHX); c) inibidor de mitose: (Ara-C); d) inibidor de transcrição: actinomicina D (Act D); e) inibidor de proteínas quinases: estaurosporina (STS) e indutor de danos no DNA: irradiação ultravioleta (UV)

3.4 INIBIDOR DA ATIVIDADE TIROSINA-QUINASE

Para a inibição da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl foi utilizada a droga mesilato de imatinibe (CGP57148B, STI571, Glivec[®]), cujo modo de ação e especificidade já foram abordados na Introdução desse trabalho. Esse composto foi gentilmente cedido pela Dra. Anna Maria Suter (Novartis Pharma AG, Suíça), tendo sido preparada uma solução estoque de 10 mM em DMSO.

3.5 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

As transformações foram feitas a partir de bactérias competentes da linhagem DH5- α , utilizando-se o método do choque térmico. Esse procedimento consistiu na adição do DNA plasmidial (0,5 – 1 μ g) de interesse a 50 μ l de células competentes, seguida da incubação no gelo por 30 minutos. Prosseguiu-se com um choque térmico a 42°C por 2 minutos, para permitir a internalização do plasmídeo e nova exposição à temperatura de 0°C por 5 minutos. A seguir foi adicionado meio SOC em quantidade igual a 9 X o volume de bactérias e a suspensão foi incubada sob agitação orbital por 1 hora a 37°C para permitir a expressão do gene de resistência ao antibiótico. Após esse período de incubação, 50 μ l dessa solução contendo bactéria + DNA plasmidial, foram distribuídos em placas de Petri contendo meio LB agar com antibiótico de seleção. As placas foram, então, incubadas na estufa a 37°C por um período de 14 – 16 horas.

3.6 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

3.6.1 PREPARAÇÃO DO PRÉ-INÓCULO E INÓCULO

Para a preparação do pré-inóculo, uma colônia de bactérias de cada placa de Petri obtida na transformação, foi colocada em um tubo separado, contendo 3 ml de meio LB líquido com o antibiótico de seleção adequado. Foi também feito um controle negativo contendo somente meio e antibiótico. Os tubos foram, então, incubados a 37 °C por 8 horas sob agitação constante (300 rpm).

Após esse período de incubação, 1ml de cada pré-inóculo foi transferido para 500 ml de meio LB com 100 μ g/ml de ampicilina ou 50 μ g/ml de kanamicina. Cada inóculo foi incubado por 14-16 horas a 37°C sob agitação constante (300 rpm). Esse procedimento tem

por objetivo aumentar a quantidade de cópias das bactérias que carregam o plasmídeo de interesse, a fim de se obter uma alta concentração de DNA plasmidial.

3.6.2 OBTENÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

Para a obtenção e purificação dos DNAs plasmidiais foi adotado o procedimento padrão, que consiste em uma adaptação do protocolo de lise alcalina geralmente empregado, servindo para preparações em pequena escala. Para isso, foram utilizadas colunas QIAGEN de MIDI ou MAXI Kit. Num primeiro momento as suspensões de bactérias foram centrifugadas a 6000 g por 15 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as bactérias foram ressuspensas no reagente 1 (50mM Tris-Cl, 10mM EDTA e 100µg/ml de RNase) e receberam posteriormente os reagentes 2 (200mM NaOH, 1% SDS) e 3 (3,0 M acetato de potássio, pH 5.5) nessa ordem, para que houvesse a lise bacteriana e a precipitação das proteínas. Após a lise das bactérias, o DNA foi ligado a uma resina de sílica, sendo posteriormente lavado com uma solução composta de 1 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7,0) e 15% de isopropanol e eluído em uma solução contendo 1,6 M NaCl, 50 mM Tris-Cl (pH 8,5) e 15% isopropanol. Para a obtenção do precipitado de DNA, acrescentou-se à solução de eluição 0,7 volume de isopropanol. Prosseguiu-se com a centrifugação por 30 minutos a 15000 g a 4°C.

O *pellet* de DNA foi recuperado e lavado com uma solução de etanol 70% (15000g por 10 minutos). Após a secagem do sobrenadante, o DNA plasmidial foi ressuspendido em 50 µl de um tampão de baixo sal (TE pH 8,0: 10 mM Tris-Cl, 0.1mM EDTA) e posteriormente dosado por espectrofotometria.

3.7 DIGESTÕES ENZIMÁTICAS

Para confirmar o tamanho dos vetores, bem como dos insertos, os plasmídeos foram submetidos a digestões com enzimas de restrição específicas, de acordo com o protocolo do fabricante (New England, Biolabs). Resumidamente, as digestões consistiram na incubação por 1 hora a 37°C de 1 µg de DNA, em um volume final de 50 µl contendo, além do DNA, 1 unidade de enzima de restrição, tampão de digestão (específicos para cada enzima) e, quando necessário, 100 µg/mL de BSA (Sambrook et al., 1989).

3.8 ELETROFORESE DE DNA

Para a eletroforese de DNA foram preparados géis de agarose de concentrações de 0,7 a 0,8%, em tampão tris-acetato-EDTA, TAE 1X (40 mM Tris-Base, 0,1% ácido acético glacial e 1 mM EDTA), conforme os procedimentos descritos por Sambrook e colaboradores (Sambrook et al., 1989).

As corridas foram realizadas em cubas de eletroforese submetidas à voltagem constante (40-60 V). Para a comparação do tamanho dos fragmentos de DNA, foram utilizados os seguintes padrões da Gibco BRL: 1 Kb Ladder para formas lineares, quando o DNA foi digerido por enzimas de restrição, e o padrão de DNA “supercoiled” para a análise de DNAs circulares.

3.9 SEQUENCIAMENTO DO PLASMÍDEO pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl/KR

O sequenciamento do plasmídeo pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl/KR foi realizado no Laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática do Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto, pela técnica Cláudia Pantaleão.

Para o sequenciamento da região do gene *bcr-abl* contendo a mutação de interesse foram utilizados 250 ng do plasmídeo e 3,2 pmol/ μ l do primer (TG GTGTGAAGCCCAAACC). A reação foi feita com o auxílio do kit Big Dye versão 3 e envolveu 30 ciclos de amplificação. Cada ciclo seguiu o seguinte procedimento: 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de anelamento a 52°C e 1 minuto de extensão a 70°C. Após os 30 ciclos, foi feito um ciclo final de 5 minutos a 72°C. As seqüências obtidas foram analisadas com o auxílio do ABI Prism 3100 Genetic Analyzer.

3.10 TRANSFECCÕES CELULARES, OBTENÇÃO DE PARTÍCULAS RETROVIRAIS E INFECÇÕES DE CÉLULAS-ALVO

Para as transfecções de células 293T foi adotado o método do fosfato de cálcio (Jordan e Wurm, 2004). Para obtenção de uma confluência celular de 50-80% no dia da transfecção, as células 293T foram distribuídas, 48 horas antes da transfecção, em placas de cultura de 10 cm na concentração de 1×10^6 células/placa em 9 ml de meio DMEM completo suplementado com soro *defined* (Hyclone). No dia da transfecção, 2-4 horas antes de acrescentar o precipitado, o meio dessas células foi completamente substituído pelo mesmo volume de meio fresco. Para o preparo do precipitado, adicionou-se 10 μ g do plasmídeo de interesse em 50 μ l

de 2,5 M CaCl_2 , completando com água deionizada estéril para um volume final de 500 μl . Essa solução que contém DNA, foi adicionada, gentilmente, a um tubo contendo 500 μl do tampão 2x HeBS (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na_2HPO_4 – pH 7,05). Após seu preparo, a solução contendo DNA foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente, para que fosse formado o precipitado. Passado esse período de incubação, o precipitado formado foi despejado sobre as células 293T das placas.

Com o intuito das células 293T produzirem partículas virais com o vetor vazio ou com o gene que codifica a proteína Bcr-Abl (selvagem ou mutada) essas foram co-transfectadas com 10 μg de um dos plasmídeos de interesse (pSR α MSVtkneo, pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl/KR, pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl, pSLX.CMV.Bcr-Abl/KH) e 10 μg do pCL-ampho, o qual fornece os genes que codificam proteínas essenciais para a produção de retrovírus.

Após a adição do precipitado, as células foram incubadas na estufa a 37°C por 6 horas e, após esse período, o meio de cultura foi completamente substituído por meio DMEM completo fresco. No dia seguinte, o meio das células 293T transfectadas foi trocado novamente, sendo que, com o intuito de aumentar a quantidade de partículas virais presentes por ml de sobrenadante, foi colocado um volume menor de meio fresco por placa (5 ml). As células foram incubadas na estufa por mais 18 horas para obtenção das partículas virais.

Após esse período, as amostras das células controle e transfectadas com pEGFP-NI ou pMX-IRES-EGFP foram tripsinizadas (Trypsina 0,25%) e separadas para análise da eficiência de transfecção no citômetro de fluxo e no microscópio de fluorescência. O sobrenadante das células 293T co-transfectadas com um dos plasmídeos de interesse (pSR α MSVtkneo, pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl/KR, pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl, pSLX.CMV.Bcr-Abl/KH) e com o pCL-ampho foi recolhido para ser utilizado na infecção de células-alvo. O mesmo foi feito com plasmídeo pMX-IRES-EGFP para a obtenção de retrovírus carregando o gene para proteína verde fluorescente (EGFP).

Após coletar os sobrenadantes contendo as partículas virais produzidas pelas células empacotadoras co-transfectadas, este sobrenadante foi centrifugado a 500 g por 5 minutos e transferido para um novo tubo. Para cada 1 ml de sobrenadante das células 293T transfectadas utilizou-se 1×10^6 células das linhagens HL-60, Jurkat e THP-1 e 1×10^5 de células HeLa, que por serem aderentes foram plaqueadas no dia anterior à infecção. Antes da infecção, todas as linhagens a serem infectadas foram lavadas em DMEM suplementado com soro *defined* para, então, serem ressuspensas no sobrenadante disponível, sempre acrescido de polibrene na concentração final de 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$. As células infectadas foram, então, plaqueadas em placa de 6 poços (1ml/poço) e incubadas na presença das partículas virais por 4 horas na estufa. Ao término desse período, cada poço foi acrescido de 1ml de meio fresco com polibrene (8

µg/ml). Após uma incubação de aproximadamente 20 horas, o meio das células foi totalmente substituído por meio de cultura fresco.

A seleção das células expostas ao sobrenadante contendo partículas retrovirais, foi iniciada 48-72 horas após a infecção e, para isso, as células em suspensão foram plaqueadas em placa de 6 poços na concentração de 5×10^5 células/2ml/poço e as células HeLas foram plaqueadas um dia antes do início da seleção na concentração de 1×10^5 células/2 ml/poço e submetidas a dose de G418 apropriada para cada tipo celular.

O G418 é um antibiótico análogo à neomicina, que interfere na atividade ribossomal e, conseqüentemente, mata células de mamíferos através do bloqueio da síntese de proteínas. Os plasmídeos pSRαMSVtkneo (vetor), pSRαMSVtkneo.Bcr-Abl, pSRαMSVtkneo.Bcr-Abl/KR e pSLX-CMV.Bcr-Abl/KD aqui utilizados apresentam um gene marcador (*neo*) que codifica uma enzima (fosfotransferase) que destrói o G418. Portanto, as células transfectadas/infectadas com os plasmídeos acima citados podem ser selecionadas por serem resistentes ao tratamento com esse antibiótico. A dose de G418 necessária para a seleção de células transfectadas ou infectadas varia de acordo com o tipo celular. Sendo assim, para cada linhagem foi estabelecida uma concentração de G418 capaz de matar as células controles após 5-7 dias de tratamento. No caso das células THP-1 foi utilizada a dose de 400 µg/ml, enquanto que para Jurkat e HeLa foi utilizada a dose de 800 µg/ml e para as HL-60 foram testadas diversas doses, dentre elas 400, 800 µg/ml e 1 mg/ml. Uma nova dose do antibiótico foi administrada a cada três dias. De dez a trinta dias depois do início da seleção foram preparadas amostras das células selecionadas para análise da expressão de Bcr-Abl por Western-blot.

A eficiência de transfecção das células 293T com os plasmídeos pSRαMSVtkneo.Bcr-Abl, pSRαMSVtkneo.Bcr-Abl/KR e pSLX.CMV.Bcr-Abl/KH foi confirmada em cada transfecção através da análise da expressão transitória de Bcr-Abl por Western-blot. Para isso uma alíquota de 1×10^6 dessas células e das 293T controle.

Cabe aqui ressaltar que durante o desenvolvimento desse trabalho foram feitos diversos ensaios de transfecção e infecção celular até serem obtidas as linhagens desejadas. De maneira geral o protocolo adotado foi o descrito acima, no entanto, em algumas ocasiões esse protocolo foi adaptado proporcionalmente conforme tamanho da placa na qual foi feita a transfecção, a quantidade de células a serem transfectadas ou infectadas, o volume de sobrenadante disponível. Esse mesmo procedimento foi adotado para as transfecções em PA317 e 293 *gag/pol*.

3.11 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS (SDS-PAGE) E WESTERN-BLOT

Este método foi utilizado para verificar a expressão das proteínas de interesse, bem como a atividade fosforilativa de Bcr-Abl e a ativação e clivagem de substratos característicos da via de apoptose.

Para a preparação das amostras (lisado total), alíquotas da ordem de 10^6 células foram centrifugadas imediatamente após o seu recolhimento, por 5 minutos a 240 g, e o sedimento celular obtido solubilizado em 80-100 µl de tampão de amostra, de acordo com a linhagem celular utilizada, contendo SDS (50mM Tris-Cl, pH 6,8; 2% SDS, 10% glicerol e 2,5% de β-mercaptoetanol). As amostras foram, então, aquecidas a 100°C por 5 minutos e estocadas no freezer -20°C. O azul de bromofenol foi adicionado às amostras no momento da eletroforese.

A análise das proteínas presentes nos extratos celulares foi realizada por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE - “Sodium dodecyl sulphate gel electrophoresis”), seguida de Western-blot. Como resultado da presença de um detergente neutralizante, o SDS, as proteínas das amostras são desnaturadas e suas cargas neutralizadas, fazendo com que elas migrem no gel de acordo apenas com a sua massa molecular.

Após o preparo do gel de corrida (mix de acrilamida 30% (1% bisacrilamida: 29% acrilamida); Tris-Cl 1,5 M (pH 8,8); SDS 10%; água miliQ; persulfato de amônio 10% e TEMED), esse foi acoplado a um sistema vertical (Mini Protean II, Bio Rad) no qual fica em contato com o tampão de eletroforese (25 mM Tris; 250 mM glicina; 0.1% SDS; pH 8,3). Nessa fase foram aplicadas nas cavidades, 20-50 µg de proteína dos extratos celulares. Seguiu-se com a eletroforese a 80-100 V, voltagem constante por cerca de 2 horas. Como as proteínas de interesse possuem diferentes pesos moleculares, a porcentagem de poliacrilamida dos géis variou de 6 -15%. Para as proteínas c-Abl, Bcr-Abl e proteínas fosforiladas em tirosina foram utilizados géis de 8-10% poliacrilamida, enquanto que para a análise de proteínas com massa molecular pequena, como Bcl-2 e Bcl-x_L, foram preparados géis de 15%.

Após a eletroforese, as proteínas dos géis foram transferidas para membranas de PVDF 0,45 µm (Pierce) por 3-6 horas em uma amperagem constante de 100-200 mA (Tampão de transferência - 39 mM glicina; 48 mM Tris base; 0.037% SDS e 20 % metanol, pH 8,3). Após a transferência, as membranas foram colocadas por 16-18 horas na solução de bloqueio adequada. Nesse sentido, para a marcação com os anticorpos aqui descritos, utilizou-se para o bloqueio uma solução 5% leite desnatado em pó em TBS-Tween (150 mM NaCl; 50 mM Tris-Cl; 0,05% Tween 20, pH 7,5); 0,1% Azida, enquanto que as membranas marcadas com anticorpo anti-fosfotirosina foram bloqueadas com uma solução de 5% BSA em TBS-Tween;

0,1% Azida. A seguir, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários por 1-2 horas a temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C, lavadas em TBS-Tween e marcadas por 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase alcalina apropriado. As membranas foram, então, novamente submetidas à lavagem por 3-4 vezes consecutivas em TBS-Tween.

A detecção dos imunocomplexos foi feita pelo método de quimioluminescência e seguido da exposição das membranas a filmes de auto-radiografia. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-A1 (Clone N-20, Santa Cruz Biotechnology, Inc), anti-c-Abl (Calbiochem, San Diego, CA, EUA), anti-actina (ICN, Costa Mesa, CA, EUA), anti-Apaf-1 (BD PharmingenTM), anti-Bad (BD Transduction Laboratories), anti-Bak (Upstate Biotechnology), anti-Bax (Upstate Biotechnology), anti-Bcl-2 (Dako e BD Pharmingen), anti-Bcl-x_L (BD PharmingenTM), anti-Bcl-w (clone N-19, Santa Cruz Biotechnology, Inc), anti-Bid (BD Transduction Laboratories e BD Pharmingen), anti-Bim (BD PharmingenTM), anti-caspase-3 (Calbiochem, San Diego, CA, EUA), anti-caspase-9 (BD PharmingenTM), anti-CRKL (clone C-20, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-c-Flip (Upstate Biotechnology), anti-fodrina (Chemicon), anti-fosfotirosina (purificado no laboratório a partir do sobrenadante do hibridoma 4G10), anti-c-IAP-1 (BD PharmingenTM), anti-c-IAP-2 (R&D), anti-Mcl-1 (clone K20, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-PARP (BD PharmingenTM), anti-SET (Santa Cruz Biotechnology, Inc., gentilmente cedido pela Profa Andréia Machado Leopoldino, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP), anti-survivina (clone D-8, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-XIAP (hILP/XIAP – clone 48, BD Transduction Labs). Os anticorpos secundários espécie-específicos, anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra, estavam conjugados a peroxidase alcalina.

3.12 QUANTIFICAÇÃO DA MORTE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Uma das características de células em apoptose é a fragmentação do DNA. Os produtos formados são fragmentos de DNA nucleossomais ou oligonucleossomais (180 pares de base e múltiplos de 180 pares de base) e geram um padrão de escada quando observado em eletroforese em gel de agarose. O método que escolhemos para quantificar a indução de apoptose por citometria de fluxo está baseado no uso de um tampão hipotônico, que lisa as células deixando somente os núcleos, e na marcação do DNA com o iodeto de propídeo. Este último é um composto fluorogênico que se liga estequiometricamente a ácidos nucléicos e, por isso, a emissão de fluorescência é proporcional à quantidade de DNA de uma célula. Como células em apoptose perdem parte do conteúdo de DNA, os núcleos definidos como

apoptóticos, são hipodiplóides e, por isso, quando é analisado o ciclo celular, se encontram à esquerda do pico G0-G1 que representa as células com conteúdo de DNA normal (diplóide) (Nicoletti et al., 1991).

De maneira simplificada uma amostra da ordem de 10^5 células da suspensão analisada, foi submetida a centrifugação por 5 minutos a 240g a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 150-300 µl de solução hipotônica fluorocrômica (HFS, “hypotonic fluorochromic solution” - 0,1% citrato de sódio, 0,1% Triton X-100, 50 µg/ml iodeto de propídeo) e incubadas sob o abrigo da luz por pelo menos 1 hora a 4° C. Após esse período, o conteúdo de DNA foi determinado por citometria de fluxo por análise do ciclo celular (aparelho FACScalibur da Becton & Dickinson). A porcentagem de apoptose foi avaliada pela porcentagem de núcleos hipodiplóides.

3.13 ANÁLISE DO PADRÃO DE EXPRESSÃO PROTÉICA GLOBAL E DE PROTEÍNAS FOSFORILADAS EM TIROSINA - ELETROFORESE EM GEL BIDIMENSIONAL

Com o intuito de comparar a expressão protéica global das linhagens HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl (OW) e identificar moléculas cuja expressão é alterada por Bcr-Abl, foi utilizada a técnica de eletroforese em géis bidimensionais seguida da análise por espectrometria de massas e identificação de proteínas. Esses experimentos foram realizados em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Edecio Cunha-Neto, especialmente com o auxílio da doutoranda Priscila Camilo Teixeira e da técnica Andréia C. K. Kuramoto, do Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração da Universidade de São Paulo. Uma das facilidades encontradas nesse laboratório foi a disponibilidade de um sistema automatizado de retirada e processamento dos “spots” dos géis, o que possibilita a análise de proteínas em larga escala.

A eletroforese bidimensional é um método que permite a análise de misturas de proteínas extraídas de células, tecidos e outras amostras biológicas. Essa técnica separa as proteínas de acordo com duas propriedades independentes: na primeira dimensão, ou focalização isoeletrica, as proteínas são separadas de acordo com o seu ponto isoeletrico (pI), que é o pH específico no qual a carga total de uma proteína é zero; e na segunda dimensão, SDS-PAGE, as proteínas são separadas de acordo com o sua massa molecular. Cada “spot” no gel corresponde, de maneira geral, a uma única proteína da amostra.

3.13.1 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

3.13.1.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

Para obtenção das amostras utilizadas na eletroforese bidimensional, 24 horas antes as células foram centrifugadas, ressuspensas em meio de cultura fresco, contadas e ajustadas para a concentração de 1×10^6 células/mL e recolocadas em estufa umidificada. Os extratos protéicos de células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl (OW) foram obtidos de acordo com uma adaptação do protocolo descrito por Unwin e colaboradores (Unwin et al., 2005).

Resumidamente, amostras com 1 a 2×10^7 células foram centrifugadas (240 g, 5 minutos a 4°C), lavadas duas vezes em PBS gelado e, então, lisadas em 850 µl de tampão contendo 9M uréia, 4% CHAPS e 65 mM DTT. Após serem sonicadas (2 ciclos de 15 segundos a 1-2Watts, gelo entre os ciclos), as amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, e a seguir centrifugadas por 10 minutos a 14000 rpm (20000 g). O sobrenadante protéico recuperado foi armazenado no freezer -80°C.

A concentração de proteína presente nas amostras foi determinada pelo método de Bradford modificado (Bio Rad modified Bradford protein assay), de acordo com as instruções contidas no manual do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada a 595 nm e a concentração de proteínas estimada em relação a uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA), contendo os pontos com as concentrações de: 1, 2, 4, 8 e 10 µg/µl.

3.13.1.2 FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA: PRIMEIRA DIMENSÃO

A focalização isoeletrica, ou primeira dimensão, foi realizada em sistema “Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System” (Amersham Biosciences, GE Health Care, USA), seguindo os procedimentos do manual “2D Electrophoresis – using immobilized pH gradients – Principles and Methods” do fabricante.

Para análise do padrão global de expressão protéica e das proteínas fosforiladas em tirosina, foram utilizadas tiras de gradiente de pH imobilizado na faixa de 4-7, de 13 cm (Immobiline DryStrip gels, Amersham Biosciences). As tiras foram reidratadas em uma solução contendo 9M uréia; 4% CHAPS; 65 mM DTT; 0,5% IPG Buffer pH 4-7; 0,002% de azul de bromofenol e 450 µg de proteína dos extratos celulares, num volume total de 250 µl. As amostras foram, portanto, carregadas durante o procedimento de reidratação (reidratação passiva) das tiras de pH imobilizado, o qual foi realizado a temperatura ambiente por 12-20 horas. Para evitar o ressecamento do sistema, as tiras foram cobertas com um óleo especial (“DryStrip Cover Fluid”).

Após a reidratação, as tiras foram transferidas para o sistema de focalização isoeletrica, com a face contendo o gel voltada para cima, e os eletrodos foram posicionados em suas extremidades. Novamente as tiras foram cobertas pelo óleo “Cover Fluid”.

A focalização isoeletrica das amostras foi realizada a 20°C e diferentes voltagens, seguindo os seguintes passos: **1)** 500V mantidos por 1 hora (Voltagem constante), **2)** gradiente até 1000V por 1 hora (Voltagem em gradiente), **3)** gradiente até 8000V, 2:30 horas (Voltagem em gradiente), **4)** 8000V, por 1 hora (Voltagem constante). Ao final foram acumulados cerca de 20000 V.

3.13.1.3 ELETROFORESE SDS-PAGE: SEGUNDA DIMENSÃO

Antes da segunda dimensão, as tiras foram submetidas ao processo de “equilíbrio” que consiste na redução das pontes dissulfeto das proteínas seguida por uma alquilação. O procedimento envolve duas etapas de 15 minutos cada, em um tampão contendo 50 mM Tris-HCl, pH 8,8; 6M uréia; 30% glicerol (v/v); 2% SDS (w/v); 0,002% de azul de bromofenol (w/v), na presença de 10 mg/mL de DTT (solução redutora), na primeira etapa, ou de 25 mg/ml de iodoacetamida (alquilante), na segunda etapa.

A segunda dimensão foi realizada em sistema vertical (SE 600 Ruby, géis de 14 cm × 16 cm x 1,5 mm, GE Health Care, USA), utilizando géis de 10% poliacrilamida e tampão de eletroforese (Tris-HCl 25mM pH 8,3; glicina 192mM; SDS 0,1%). Terminada a fase de equilíbrio, as tiras foram posicionadas sobre os géis de poliacrilamida e o conjunto foi selado com uma solução de 0,5% agarose em tampão de eletroforese. Ao lado das tiras foram colocados papéis-filtro contendo o padrão de peso molecular adsorvido.

Para a retirada e processamento dos “spots” pelo sistema automatizado, os géis foram fixados às placas de vidro. Para isso, antes da montagem dos géis, algumas das placas foram tratadas com uma solução contendo o reagente “Bind Silane”.

A eletroforese (SDS-PAGE) foi iniciada com uma corrente de 15 mA/gel que posteriormente foi aumentada para 30 mA/gel. Um resfriador “MultiTemp III” (GE Health Care, USA) na temperatura de 10°C foi utilizado para manutenção da temperatura de 20°C nas cubas.

3.13.2 COLORAÇÃO DOS GÉIS COM AZUL DE COOMASSIE E MARCAÇÃO COM ANTICORPO ANTI-FOSFOTIROSINA

Com o objetivo de obter os perfis em gel bidimensional tanto do proteoma total como das proteínas fosforiladas em tirosina de células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl, foram preparados dois géis idênticos, por experimento, de cada extrato celular. Um dos géis foi corado com a solução de azul de Coomassie (0,1% CoomassieTM Brilliant Blue R-250 Ultrapure; 40% metanol e 10% ácido acético) e o outro foi transferido para uma membrana de PVDF e marcado com o anticorpo anti-fosfotirosina (ver protocolo para Western-blot).

Para a visualização das proteínas totais, após a eletroforese, os géis foram fixados por 1 hora em solução fixadora (40% metanol e 10% ácido acético) e, então, corados *overnight* com a solução de azul de Coomassie. Após esse período os géis foram descorados inicialmente em água deionizada e posteriormente em soluções descorantes fraca (20% metanol e 5% ácido acético) e/ou forte (20% metanol e 7,5% ácido acético). Uma vez descorados, os géis foram mantidos em uma solução de 15% etanol em água deionizada.

No caso dos géis utilizados para a detecção das proteínas fosforiladas em tirosina, a transferência das proteínas dos géis para as membranas de PVDF (0,45 µm) foi realizada em um sistema semi-seco por 2 horas a 204 mA (0,8 mA/cm² de membrana), utilizando tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, 0,1% SDS). Após a transferência, seguiu-se com o protocolo usual de Western-blot já descrito aqui, que consiste no bloqueio das membranas e marcação com os anticorpos primários e secundários apropriados. Para poder comparar a quantidade e intensidade dos substratos fosforilados encontrados nas linhagens HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl, os filmes de auto-radiografia foram expostos pelo mesmo período de tempo nas duas membranas.

3.13.3 AQUISIÇÃO DAS IMAGENS

As imagens dos géis corados com azul de Coomassie foram adquiridas no digitalizador de imagem “Image Scanner” (Amersham Biosciences), previamente calibrado com tira Kodak 2, utilizando o programa Lab Scan 5.0 no modo transparente, com filtro verde e resolução de 300 dpi. Duas referências adesivas foram grudadas nas placas onde os géis estavam fixados (uma referência de cada lado, como mostra a Figura 6). Essas referências servem de orientação para o sistema automatizado de retirada de “spots”, que as utiliza para determinar as coordenadas de cada “spot” a ser extraído do gel.

FIGURA 6: Referências utilizadas pelo sistema automatizado de retirada e processamento de “spots” “Ettan Spot Handling Workstation”. As referências (indicadas com setas) foram aderidas às placas dos géis de HL-60.vetor (à esquerda) e HL-60.Bcr-Abl (à direita) antes destes serem digitalizados.

3.13.4 ANÁLISE E COMPARAÇÃO DOS GÉIS

A análise e comparação dos géis foi feita com o software “ImageMaster 2D Platinum Ed.” (Amersham Biosciences, GE Healthcare). A detecção dos “spots” foi realizada inicialmente com o uso da ferramenta de auto-deteção do próprio programa, de acordo com os parâmetros de saliência, tamanho e *smooth* que pareciam mais adequados. Tais parâmetros se referem, dentre outras coisas, ao tamanho, intensidade e curvatura dos “spots” e foram sendo ajustados para minimizar a seleção de outras coisas que não “spots” pelo programa, tais como: manchas, resíduos, bordas, e outras imperfeições dos géis. Após a detecção automática, todos os “spots” selecionados pelo equipamento foram conferidos minuciosamente um a um e, quando necessário, foram editados (excluídos, ampliados, diminuídos, divididos em outros “spots” ou fundidos a outros “spots”) para minimizar diferenças no formato de “spots” correspondentes em géis diferentes. Durante a detecção, cada “spot” dos géis recebe uma identificação numérica (ID) e seus dados de intensidade, área e volume são computados.

A abundância de uma dada proteína foi avaliada pelo volume de marcação de seu respectivo “spot”, calculado a partir dos valores de intensidade e área. Para avaliar diferenças de expressão entre géis foi utilizada a porcentagem de volume (% de volume) dos “spots” que

é o parâmetro mais indicado e eficiente. A % volume é definida como o volume de cada “spot” normalizado em relação à soma do volume total dos “spots” detectados no gel.

A normalização do volume dos “spots” é um tipo de calibração para tornar os dados independentes de variações entre géis causadas por condições tais como: diferenças na quantidade de proteína carregada ou na coloração dos géis. Por exemplo, um “spot” poderia ser mais intenso não porque representa uma proteína que está mais expressa, mas sim porque aquele gel está mais corado ou recebeu uma quantidade inicial de proteínas maior do que o outro. Com base nisso, para todas as análises posteriores foram utilizados os valores de % de volume dos “spots”.

Para encontrar os “spots” diferencialmente expressos e calcular o valor de alteração da expressão das proteínas, os géis foram comparados e os “spots” que podiam ser observados nas duas linhagens celulares (“spots” correspondentes) foram pareados/agrupados. O pareamento (“matching”) entre os géis das duas linhagens foi feito manualmente usando o programa “ImageMaster 2D Platinum” e, para isso, o gel da linhagem HL-60.vetor foi utilizado como gel de referência.

Algumas ferramentas desse programa foram utilizadas para auxiliar no pareamento dos “spots”. Uma delas foi a sobreposição dos géis em transparência (Figura 7). Nessa estratégia os “spots” de um dos géis ficam marcados em vermelho, os pertencentes ao outro gel são visualizados em azul e as áreas de sobreposição aparecem em preto. O modo transparência é utilizado para encontrar as similaridades e diferenças entre os géis.

FIGURA 7: Modo transparência. Nesse modo de visualização, os géis de HL-60.vetor (azul) e HL-60.Bcr-Abl (vermelho) foram sobrepostos no modo transparência. O local de sobreposição dos “spots” fica marcado em preto.

Cada grupo ou par de “spots” recebe o mesmo número que aquele “spot” possui no gel de referência. Os “spots” agrupados possuem, portanto, dois números: o seu número de “spot”

individual e o número do grupo ao qual pertencem. No caso do gel de referência o número do “spot” e o número do grupo coincidem.

Na análise diferencial, considerou-se como “spots” diferencialmente expressos aqueles cuja % de volume foi alterada em um valor igual ou maior a duas vezes entre as amostras.

3.13.5 PROCESSAMENTO DOS “SPOTS”

Como o Bcr-Abl possui uma alta atividade tirosina-quinase e é uma molécula que conhecidamente gera alterações pós-traducionais, optamos por fazer o processamento e a identificação de todos os “spots” detectados nos géis que representavam uma % de volume maior do que 0,02%. Além disso, foram também incluídos os “spots” que, apesar de representarem menos que 0,02% do volume dos géis, estavam diferencialmente expressos.

Os “spots” escolhidos para identificação foram retirados dos géis e depois de descorados e digeridos, os peptídeos resultantes da digestão trípica de cada “spot” foram submetidos à análise no espectrômetro de massa para identificação das proteínas. A retirada e o processamento dos “spots” foram feitas pelo sistema automatizado “Ettan Spot Handling Workstation”.

Na etapa de retirada dos “spots” (“picking”), amostras de 1,4 mm de diâmetro de cada “spot” (“spot picker” de 1,4 mm) foram extraídas dos géis e transferidas para placas de 96 poços. O processamento dos “spots” foi iniciado com as incubações em solução contendo bicarbonato de amônio (AMBIC) e acetonitrila (ACN) para descorá-los. Nessa etapa são usadas sequencialmente uma solução de 200 mM AMBIC e 50% ACN e uma solução de 50 mM AMBIC e 50% ACN. Depois de descorados, os “spots” foram desidratados e então submetidos à etapa de digestão de proteínas *in gel*, utilizando a enzima tripsina. Para isso foi adicionado ao “spot” seco uma solução de 20 mM AMBIC contendo tripsina (0,3 – 0,5 µg de tripsina/“spot”; “trypsin, sequencing grade” - Amersham Biosciences.) e a digestão prosseguiu por 6 horas a 37° C. Prosseguiu-se com a extração dos produtos da digestão trípica utilizando uma solução de 50% acetonitrila e 0,45% TFA. Terminada a extração, os fragmentos peptídicos obtidos foram secos e depois ressuspensos em 5µL da solução de 50% acetonitrila e 0,5% TFA.

3.13.6 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Para a análise dos peptídeos no espectrômetro de massas, alíquotas dos produtos da digestão trípica dos “spots” foram aplicadas sobre lâminas especiais de metal (slides) e acrescidas de matriz, que nesse caso foi o ácido cinâmico (“ACH - Cinnamic Acid”). As amostras foram então analisadas em um espectrômetro de massas do tipo MALDI-ToF, “Matrix assisted laser desorption/ionization – Time-of-Flight, Ettan MALDI-ToF/Pro” (GE Health Care, USA). Nesse tipo de aparelho o modo de ionização é o MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization), visto que para a ionização e vaporização do material a ser analisado é utilizado um segundo composto, a matriz. Já o modo de separação é o TOF (tempo de voo ou “time of flight”) que separa íons baseado no tempo que eles levam para voar em um tubo de voo. O que determina a diferença no tempo de voo é a relação massa/carga de cada peptídeo. Os espectros de massa foram adquiridos no modo reflectron, positivo (reflectron positive ion mode), que detecta massas de até 3000 Da.

Como resultado da análise de cada amostra, foram obtidas listas de valores correspondentes à relação massa/carga (m/z) de cada peptídeo presente nas amostras. Considerando que a ionização deste aparelho adiciona apenas uma carga ao peptídeo, o valor da relação m/z é igual a massa molecular do peptídeo em questão acrescido de um próton.

Para a identificação das proteínas utilizou-se a massa monoisotópica de cada peptídeo, que é a massa de um peptídeo no qual todos os átomos são os isótopos mais abundantes na natureza (C^{12} , N^{14} , H^1). Na maioria das vezes, é o primeiro pico da distribuição dos isótopos. Para assegurar a precisão do aparelho, o espectrômetro de massas foi calibrado usando calibrantes externos (ACTH [$M + H^+$] = 2465,191; e angiotensina III, [$M + H^+$] = 897,523) e internos (picos da auto-digestão da tripsina, Figura 8) à amostra.

A lista do conjunto das massas obtida para cada “spot”/proteína compõe o “PMF” (impressão digital peptídica, “peptide mass fingerprint”) e é característica desta proteína, visto que a enzima tripsina hidroliza polipeptídeos na porção carboxi-terminal dos aminoácidos lisina e arginina. Assim, as massas geradas a partir da digestão de uma proteína desconhecida com uma enzima específica são comparadas com massas de peptídeos previstas a partir da digestão teórica de proteínas presentes em bancos de dados. A identificação é realizada quando um número significativo de peptídeos do espectro de massa real se sobrepõe ao do teórico.

Os “PMFs” experimentais obtidos foram comparados com bancos de dados de proteínas. Os picos contaminantes conhecidos, tais como, produtos da matriz, queratina e

fragmentos da auto-digestão da tripsina (auto-proteólise), foram removidos da lista de massas antes da busca na base de dados (Figura 8).

FIGURA 8: Espectro de massas obtido para uma das amostras analisadas. Os picos apontados com as setas correspondem a picos (m/z = massa/carga) da auto-proteólise da tripsina ou a picos contaminantes e, por isso, não fazem parte da lista de PMF utilizada para a identificação da proteína nos bancos de dados. Os picos de 842,509 e 2211,104 correspondentes a peptídeos derivados da auto-digestão da tripsina foram utilizados como calibrantes internos do espectro.

Uma ferramenta de identificação de proteínas (MALDI-ToF Evaluation, Amersham Biosciences), que utiliza como base de dados o banco de proteínas do NCBIInr (não redundante), está associada ao próprio programa de análise do espectrômetro de massas. Além disso, foram também utilizados os bancos de dados do SwissProt e NCBIInr, com o auxílio da ferramenta MASCOT (Matrix Science, London, UK, www.matrixscience.org). A investigação quanto à função das proteínas analisadas foi conduzida com as ferramentas do NCBI, UCSC, SwissProt e Uniprot.

Nos programas de identificação foram lançados os valores de m/z obtidos para cada amostra e colocadas algumas das características das amostras, como a enzima utilizada na digestão (tripsina) e se os valores de massas são as massas monoisotópicas.

Nesses programas de identificação, as proteínas são ranqueadas com base na probabilidade da proteína candidata ser a proteína da amostra testada. A probabilidade estatística é apresentada como um valor de “expectation”. O valor de “expectation” é a probabilidade da identificação ter sido um evento ao acaso. Sendo assim, quanto menor o

valor do “expectation”, melhor a identificação. Nesses programas são obtidas informações sobre as proteínas, tais como o seu nome completo, número de acesso na base de dados, ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MM) da suposta proteína, cobertura (“coverage”), lista dos peptídeos usados na identificação. A cobertura (“coverage”) se refere a porcentagem da sequência de aminoácidos da proteína candidata que é coberta pelos peptídeos lançados durante a busca. Também é analisado quantas das massas lançadas no banco de dados coincidiram com as massas geradas pela digestão teórica da proteína candidata (“Matched versus Searched”).

Foram utilizados como parâmetros para a busca: a) de 0,1 até 1 Da de tolerância de desvio da massa do peptídeo e b) de 0 a, no máximo, 2 sítios de clivagem perdidos. Os parâmetros variaram de acordo com a qualidade dos espectros analisados. Para a identificação das proteínas foi utilizado exclusivamente o banco de dados para *Homo sapiens*. Como possível modificação pós-traducional foi considerada a oxidação pela iodoacetamida. No Mascot foram considerados os valores de *score* (“expectation” values) maiores que 55, que representam, no banco do SwissProt, $p \leq 0,05$. No Evaluation, por sua vez, considerou-se as identificações com “expectation” menor do que 0,05.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Como citado anteriormente essa seção está dividida em duas partes, a primeira relata os dados referentes à contribuição dos sinais independentes da atividade tirosina-quinase para resistência à apoptose mediada por Bcr-Abl e o segundo capítulo aborda a busca por novos alvos moleculares de Bcr-Abl com o uso de abordagem proteômica.

PARTE 1: CONTRIBUIÇÃO DA SINALIZAÇÃO INDEPENDENTE DA ATIVIDADE TIROSINA-QUINASE DE BCR-ABL PARA A RESISTÊNCIA À APOPTOSE

Para investigar o papel da atividade tirosina-quinase na resistência à apoptose, foram adotadas duas estratégias principais: 1) inibição farmacológica da atividade enzimática de Bcr-Abl pelo inibidor mesilato de imatinibe e 2) determinação dos efeitos da expressão de Bcr-Abl mutado sem atividade tirosina-quinase (quinase-deficiente), obtido por manipulação genética. Essas duas abordagens permitiram analisar a resposta de células Bcr-Abl-positivas frente a estímulos pró-apoptóticos, quando a atividade enzimática de Bcr-Abl está bloqueada farmacológica ou geneticamente.

4.1 ESTRATÉGIA 1: INIBIÇÃO DA ATIVIDADE TIROSINA-QUINASE DE BCR-ABL PELO MESILATO DE IMATINIBE

A primeira parte do trabalho foi confirmar a resistência à apoptose conferida por Bcr-Abl e caracterizar os efeitos do mesilato de imatinibe sobre o padrão de fosfoproteínas e viabilidade celular. O segundo passo foi avaliar se a inibição da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl é capaz de sensibilizar as células à drogas apoptogênicas, interferindo no fenótipo de resistência à apoptose.

4.1.1 EXPRESSÃO DE BCR-ABL CONFERE RESISTÊNCIA À APOPTOSE

Sabe-se que a expressão de Bcr-Abl torna as células resistentes a agentes quimioterápicos. Um exemplo disso é que células HL-60, apesar de transformadas, são muito sensíveis à apoptose induzida por diversas drogas, porém a expressão de Bcr-Abl nessas células (HL-60.Bcr-Abl) faz com que elas passem a ser altamente resistentes a esses agentes pró-apoptóticos (Amarante-Mendes et al., 1997; Amarante-Mendes et al., 1998a).

Com o intuito de avaliar e confirmar a resistência à apoptose conferida por Bcr-Abl, células HL-60.vetor, HL-60.Bcr-Abl (OW), HL-60.Bcr-Abl (JW) e K562 foram incubadas por 18-24 horas na presença ou ausência de alguns agentes quimioterápicos. A morte celular foi avaliada por diferentes metodologias, dentre elas: a externalização de resíduos de fosfatidilserina, a perda do potencial da membrana mitocondrial (dados não mostrados) e a fragmentação do DNA (% de núcleos hipodiplóides, Figura 9).

Para mostrar que o efeito de Bcr-Abl é amplo, protegendo de drogas que atuam por mecanismos diversos, foram utilizados como indutores de morte: Ara-C, um inibidor de DNA polimerases, Act-D, um inibidor de transcrição, CHX, um inibidor de síntese protéica e VM26, um inibidor de topoisomerase II.

FIGURA 9: Expressão de Bcr-Abl confere resistência à apoptose. Células HL-60.vetor, HL-60.Bcr-Abl (OW), HL-60.Bcr-Abl (JW) e K562 foram incubadas por 18-24 horas na ausência ou presença de 100 μ M de Ara-C, 1 μ M de Act D, 50 μ M de CHX ou 10 μ M de VM26. O conteúdo de DNA foi quantificado através da análise do ciclo celular por citometria de fluxo. A porcentagem de apoptose refere-se a quantidade de núcleos hipodiplóides. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão das porcentagens de núcleos hipodiplóides (% de apoptose) obtidas nas triplicatas. Resultado representativo de três experimentos independentes.

A análise do conteúdo de DNA e da porcentagem de núcleos hipodiplóides revelou que células HL-60.vetor são muito sensíveis à indução de morte pelas quatro drogas utilizadas, com índices de até 90% de células em apoptose quando expostas aos tratamentos com Act-D e VM26. Por outro lado, células que expressam Bcr-Abl, HL-60.Bcr-Abl (OW), HL-60.Bcr-Abl (JW), K562, apresentam resistência à apoptose frente aos estímulos testados,

não ultrapassando o valor de 15% de morte. A resistência à apoptose promovida pela expressão de Bcr-Abl também foi observada nas demais linhagens derivadas de pacientes com LMC, como: KCL22 e LAMA-84 (dados não mostrados).

4.1.2 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE TIROSINA-QUINASE DE BCR-ABL PELO MESILATO DE IMATINIBE É DOSE-DEPENDENTE, RÁPIDA E DURADOURA

Uma vez confirmada a resistência à morte de células que expressam Bcr-Abl e estabelecidas as condições de cultura celular e avaliação da resposta apoptogênica, a caracterização do efeito do inibidor mesilato de imatinibe sobre a atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl foi realizada.

Com o objetivo de determinar a dose de mesilato de imatinibe capaz de reduzir os níveis de fosforilação protéica em resíduos de tirosina, células HL-60.vetor, HL-60.Bcr-Abl (OW), HL-60.Bcr-Abl (JW) e K562 foram tratadas por 18-24 horas com diversas doses (0,4; 2 ou 10 μ M) dessa droga. Ao término do período de incubação, as amostras foram recolhidas, submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida e analisadas quanto à quantidade de fosfoproteínas presente nos extratos celulares.

Ao contrário das células que expressam Bcr-Abl, que apresentam uma grande quantidade de proteínas fosforiladas em tirosina, células HL-60.vetor são escassas nesse tipo de fosfoproteína (Figura 10). A alta atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl fica evidente quando se compara a marcação das células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl com anticorpos anti-fosfotirosina. É importante destacar que, nesse sistema experimental, o “background” celular é o mesmo e, assim, as diferenças observadas são essencialmente decorrentes da expressão ectópica de Bcr-Abl.

Quanto à ação do mesilato de imatinibe em células que expressam Bcr-Abl, observa-se uma redução na intensidade das bandas correspondentes as proteínas fosforiladas em tirosina, incluindo tanto a banda referente à própria autofosforilação de Bcr-Abl quanto as bandas referentes aos seus substratos, de maneira dependente da dose utilizada. Como pode ser observado, a exposição das células a dose de 0,4 μ M foi capaz de promover uma queda drástica na atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl se comparada ao controle, resultando na redução de mais da metade da quantidade de proteínas fosforiladas detectadas. Na presença da dose de 2 μ M ainda foram detectadas proteínas fosforiladas em tirosina, cuja presença foi completamente inibida pela dose de 10 μ M de mesilato de imatinibe. Essa dose foi tão eficaz na inibição da atividade tirosina-quinase, que as células HL-60.Bcr-Abl passaram a apresentar um perfil de marcação com anti-fosfotirosina semelhante ao das células HL-60.vetor. Baseado

nesses resultados e em outros dados da literatura, foi escolhida, então, a dose de 10 μ M de mesilato de imatinibe para os experimentos seguintes.

FIGURA 10: Mesilato de imatinibe bloqueia a atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl de maneira dose-dependente. Células das linhagens HL-60.vetor, HL-60.Bcr-Abl (OW), HL-60.Bcr-Abl (JW) e K562 foram incubadas por 18-24 horas na presença de diferentes doses (0,4; 2 ou 10 μ M) do inibidor mesilato de imatinibe. Western-blot dos extratos celulares utilizando anticorpo anti-fosfotirosina.

Uma vez definida a dose de mesilato de imatinibe capaz de reduzir a níveis indetectáveis o aparecimento de proteínas fosforiladas em tirosina, em uma segunda etapa procuramos estimar em quanto e por quanto tempo essa droga é capaz de inibir a atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl sem a necessidade de re-estimulação por uma nova dose. Para tanto foi realizada uma cinética na qual células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl foram incubadas por 5, 15, 30 minutos, 1, 2 ou 24 horas na presença de 10 μ M de mesilato de imatinibe e a expressão de Bcr-Abl e de fosfoproteínas foi analisada por Western blot. Como controle foram utilizadas células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl que não receberam o tratamento e que foram incubadas por 24 horas.

Como pode ser observada (Figura 11) a ação do mesilato de imatinibe sobre a atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl é incrivelmente rápida, visto que o tratamento por 5 minutos levou não só a uma drástica redução na quantidade de fosfoproteínas detectadas, como parece também ter atingido o máximo do potencial inibitório dessa droga num curto período de incubação.

Tal efeito foi mantido nos outros períodos de tratamento, sendo visto mesmo após 24 horas de exposição à droga, sem a necessidade de administrar uma nova dose do inibidor. Isso mostra a rápida ação e a grande estabilidade da ligação do mesilato de imatinibe com a molécula de Bcr-Abl.

FIGURA 11: Inibição da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl pelo mesilato de imatinibe é rápida e duradoura. Células das linhagens HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl (OW) foram incubadas na presença de 10 μ M de mesilato de imatinibe por 5, 15, 30 minutos, 1, 2 ou 24 horas. Ao término de cada período de incubação, as células foram recolhidas, centrifugadas e preparadas para a análise da quantidade de proteínas fosforiladas em tirosina por Western-blot. Os controles (-) foram incubados por 24 horas. Western-blot dos extratos celulares utilizando anticorpo anti-c-Abl, anti-fosfotirosina e anti-actina.

Apesar do efeito desse inibidor sobre a atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl, verifica-se por meio da marcação com o anticorpo anti-c-Abl que a expressão da proteína Bcr-Abl nas células HL-60.Bcr-Abl não foi afetada pelo tratamento com mesilato de imatinibe, reforçando a idéia de que seu mecanismo de ação está direcionado apenas a inibição da atividade enzimática dessa oncoproteína. Essa figura também confirma a presença de Bcr-Abl somente nas células HL-60.Bcr-Abl.

4.1.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM MESILATO DE IMATINIBE NA VIABILIDADE DE CÉLULAS BCR-ABL-POSITIVAS

Uma vez determinados a dose e o tempo de incubação necessários para o bloqueio da atividade enzimática de Bcr-Abl pelo mesilato de imatinibe, o passo seguinte foi a análise dos efeitos desse inibidor sobre a viabilidade celular. Para isso, células das linhagens HL-60.vetor, HL-60.Bcr-Abl (OW), HL-60.Bcr-Abl (JW), K562, KCL22 e LAMA-84 foram incubadas por 24, 48 ou 72 horas na presença ou ausência de 10 μ M de mesilato de imatinibe. Ao término dos períodos de incubação, as amostras foram recolhidas e as células ressuspensas em tampão HFS para a análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo.

A análise do conteúdo de DNA como medida da porcentagem de apoptose revelou que, enquanto a viabilidade das células HL-60 não foi alterada pelo tratamento com mesilato de imatinibe em nenhum dos períodos de incubação analisados, células positivas para Bcr-Abl começaram a morrer quando expostas a este inibidor por um tempo superior a 24 horas (Figura 12). Esse fato reforça o conceito de que o mesilato de imatinibe tem uma ação bem específica sobre Bcr-Abl, interferindo pouco na ação de outras quinases e, portanto, na viabilidade de células que não expressam essa proteína.

FIGURA 12: Efeito do tratamento com mesilato de imatinibe na viabilidade de células Bcr-Abl-positivas. Células das linhagens HL-60.vetor, HL-60.Bcr-Abl (OW), HL-60.Bcr-Abl (JW), K562, KCL22 e LAMA-84 foram incubadas na estufa por 24, 48 ou 72 horas na ausência (símbolos vazados) ou presença (símbolos preenchidos) de 10 μ M do inibidor de tirosina-quinase. A porcentagem de apoptose refere-se a quantidade de núcleos hipodiplóides analisados por citometria de fluxo. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão das porcentagens de núcleos hipodiplóides (% de apoptose) obtidas nas triplicatas. Resultado representativo de três experimentos independentes.

No caso das células HL-60.Bcr-Abl (OW) a porcentagem de morte induzida em 48 horas foi muito semelhante à observada em 72 horas, cerca de 50%. As células HL-60.Bcr-Abl (JW) também apresentaram cerca de 50% de núcleos hipodiplóides após 48 horas de tratamento, no entanto, contrastando com o resultado obtido para células HL-60.Bcr-Abl (OW), essa porcentagem aumentou para aproximadamente 70% no tempo de 72 horas.

Linhagens celulares derivadas de pacientes com LMC apresentaram um padrão de resposta ao mesilato de imatinibe semelhante ao descrito para as células HL-60.Bcr-Abl (OW e JW). As linhagens KCL22 e LAMA-84 apresentaram cerca de 50% e 80% de células em apoptose, respectivamente, após a exposição ao mesilato de imatinibe por 48 horas e, assim como observado para células HL-60.Bcr-Abl (OW), não houve um incremento significativo na porcentagem de morte em decorrência da maior exposição ao inibidor. Já para K562 a porcentagem de células mortas passou de 45% a 60% nos tempos de 48 e 72 horas.

Portanto, de maneira geral, as células derivadas de pacientes com LMC e as linhagens de HL-60 que expressam Bcr-Abl ectopicamente se comportaram de maneira semelhante, não sendo afetadas pelo tratamento com mesilato de imatinibe por 24 horas, mas mostrando uma diminuição da viabilidade em decorrência da exposição ao inibidor por 48-72 horas. Algumas pequenas variações foram observadas, tais como: células LAMA-84 parecem um pouco mais sensíveis ao tratamento, apresentando uma maior porcentagem de células em apoptose nos tempos de 48 e 72 horas, do que as demais linhagens; e para algumas células, houve um aumento na porcentagem de células mortas em 72 horas comparado com a obtida em 48 horas, enquanto que para outras linhagens não houve diferença na porcentagem de células mortas em decorrência da maior exposição ao inibidor.

A capacidade do mesilato de imatinibe de promover a morte de células Bcr-Abl-positivas é bem conhecida e, de fato, é a base de seu uso para o tratamento de pacientes com LMC. No entanto, um aspecto que nos chama bastante a atenção e é muito interessante é que a inibição da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl por 24 horas, embora promova o desaparecimento das proteínas fosforiladas em tirosina, não induz morte nessas células.

4.1.4 A INIBIÇÃO DA ATIVIDADE TIROSINA-QUINASE DE BCR-ABL NÃO SENSIBILIZA AS CÉLULAS À INDUÇÃO DE APOPTOSE POR DIFERENTES DROGAS

Tendo em vista que a expressão de Bcr-Abl confere resistência à apoptose induzida por drogas apoptogênicas e que o tratamento com mesilato de imatinibe por 24 horas reduz drasticamente a atividade enzimática dessa proteína, sem induzir alterações significativas na

viabilidade celular, o próximo passo foi testar se células que expressam Bcr-Abl são capazes de manter a resistência à estímulos pró-apoptóticos mesmo na ausência de sua atividade enzimática.

Com essa finalidade, células HL-60.vetor, HL-60.Bcr-Abl (OW), HL-60.Bcr-Abl (JW), K562, KCL22 e LAMA-84 foram pré-tratadas ou não por 1-2 horas com 10 μ M de mesilato de imatinibe, garantindo a inibição da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl e da fosforilação de seus substratos, e incubadas por mais 22 horas na presença ou ausência do indutor de apoptose teniposídeo (VM26) (Figura 13).

FIGURA 13: Inibição da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl não sensibiliza as células à indução de apoptose. Células das linhagens HL-60.vetor, HL-60.Bcr-Abl (OW), HL-60.Bcr-Abl (JW), K562, KCL22 e LAMA-84 foram tratadas (barras pretas) ou não (barras brancas) por 1-2 horas com 10 μ M mesilato de imatinibe e incubadas por 22 horas na presença ou ausência de um indutor de apoptose (10 μ M VM26). O mesilato de imatinibe permaneceu na cultura durante todo o experimento. O nível de fragmentação do DNA foi quantificado através da análise do ciclo celular por citometria de fluxo. A porcentagem de apoptose refere-se a quantidade de núcleos hipodiploides. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão das porcentagens de núcleos hipodiploides (% de apoptose) obtidas nas triplicatas. Resultado representativo de três experimentos independentes.

Analisando os resultados (Figura 13), nota-se que as células HL-60.vetor são altamente susceptíveis a indução de apoptose pelo tratamento com VM26 e que tal resultado não foi alterado pelo tratamento com mesilato de imatinibe. Já as células que expressam Bcr-Abl mantiveram a resistência à apoptose mesmo quando previamente tratadas com o inibidor da atividade tirosina-quinase. Isso demonstra que mesmo quando a atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl está totalmente inibida e não é mais possível detectar proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina, as células Bcr-Abl-positivas continuam resistentes à indução de apoptose. Esses resultados não se restringem apenas ao uso do teniposídeo como agente indutor de apoptose, mas também são verdadeiros para todas as drogas que foram testadas, como demonstra a figura 14.

FIGURA 14: Efeito da inibição da atividade tirosina-quinase na resistência à apoptose observada em células positivas para Bcr-Abl. Células HL60 e HL60.Bcr-Abl (OW) foram pré-tratadas (+) ou não (-) por 1-2 horas com mesilato de imatinibe e incubadas “overnight” na presença ou ausência de 10 μ M de teniposídeo (VM26), 50 μ M de etoposídeo (VP16), 50 μ M de cicloheximida (CHX) ou 1 μ M de estaurosporina. O nível de fragmentação do DNA foi quantificado através da análise do ciclo celular por citometria de fluxo. A porcentagem de apoptose refere-se a quantidade de núcleos hipodiploides. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão das porcentagens de núcleos hipodiploides (% de apoptose) obtidas nas triplicatas. Resultado representativo de três experimentos independentes.

Nesse experimento células das linhagens HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl foram incubadas na estufa por 1-2 horas na ausência ou presença de 10 μ M de mesilato de imatinibe e, então, tratadas com drogas indutoras de apoptose. Mais uma vez, as células HL-60.vetor se mostraram susceptíveis à morte induzida por todas as drogas utilizadas, enquanto as células HL-60.Bcr-Abl mantiveram a resistência aos tratamentos, mesmo quando a atividade enzimática de Bcr-Abl estava bloqueada pela exposição ao inibidor mesilato de imatinibe.

4.1.5 MESILATO DE IMATINIBE NÃO SENSIBILIZA CÉLULAS QUE EXPRESSAM BCR-ABL À ATIVAÇÃO DE CASPASE-3 POR DROGAS QUIMIOTERÁPICAS

Um dos principais eventos que ocorre durante a apoptose é a ativação de caspases, particularmente de caspase-3, uma caspase efetora responsável por grande parte das alterações morfológicas observadas em células apoptóticas. É sabido que a expressão de Bcr-Abl previne a liberação de citocromo-c da mitocôndria para o citosol, impedindo assim, a ativação de caspase-3 e, conseqüentemente, a clivagem de PARP e fodrina (Amarante-Mendes et al., 1998b).

Com base nas informações mencionadas acima, foi investigado se, na presença do mesilato de imatinibe, células que expressam Bcr-Abl ficam mais sensíveis à ativação de caspase-3 por drogas pró-apoptóticas. Além da ativação de caspase-3, utilizamos também como indicadores da sinalização apoptótica a clivagem de dois substratos: PARP (poly-ADP ribose polymerase), uma enzima de 116 kDa envolvida no reparo do DNA que é clivada por caspase-3 durante a apoptose e cujo processamento proteolítico produz fragmentos de 85 e 31 kDa, e a clivagem de fodrina, uma proteína de 240 kDa envolvida na estrutura do citoesqueleto e que também é clivada por caspases durante o processo apoptótico. Os produtos de clivagem de fodrina têm 150 e 120 kDa.

A análise dos resultados (Figura 15) revelou que nas células HL-60.vetor incubadas com o indutor de apoptose (VM26) houve a ativação de caspase-3 e a clivagem de PARP e fodrina, independentemente das células terem sido pré-tratadas com o mesilato de imatinibe. Tal ativação de caspase-3 nas células HL-60.vetor pelo VM26 era esperada, já que o tratamento com essa droga induziu uma porcentagem significativa de morte nessa linhagem celular (Figuras 9, 13 e 14). Contrastando com as células HL-60.vetor, as linhagens que expressam Bcr-Abl não mostraram nenhuma alteração na expressão da forma inativa de caspase-3 em decorrência dos tratamentos utilizados, ou seja, não houve ativação de caspase-3 e, portanto da via de apoptose, mesmo quando essas células foram submetidas a estímulos apoptogênicos e estavam com a atividade enzimática de Bcr-Abl inibida, como demonstrado

com o anticorpo anti-fosfotirosina. Os resultados estão de acordo com os dados de porcentagem de morte apresentados anteriormente, utilizando como parâmetro a análise do conteúdo de DNA. Nenhum dos tratamentos aos quais as células Bcr-Abl-positivas foram submetidas induziu ativação de caspase-3, nem a exposição ao mesilato de imatinibe e VM26 isolados e nem mesmo a combinação dos dois tratamentos.

FIGURA 15: Inibição da atividade tirosina-quinase pelo mesilato de imatinibe não sensibiliza as células a ativação de caspase-3 por drogas quimioterapêuticas. As linhagens HL-60.vetor, HL-60.Bcr-Abl (OW), KCL22 e K562 foram tratadas ou não com 10 μ M de STI571 e incubadas “overnight” na presença ou ausência de VM26. Western-blot dos extratos celulares utilizando anticorpos anti-caspase-3, anti-PARP, anti-fodrina, anti-fosfotirosina e anti-actina.

Tal diferença entre HL-60.vetor e as células que expressam Bcr-Abl não está associada a quantidade de caspase-3, visto que na situação controle as células que expressam Bcr-Abl apresentam uma quantidade igual ou maior de caspase-3 na forma inativa.

Na tentativa de desvendar os mecanismos responsáveis pela resistência à apoptose conferida por Bcr-Abl e especialmente aqueles envolvidos na manutenção do fenótipo de resistência à morte durante o bloqueio farmacológico da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl (tratamento com mesilato de imatinibe), foi analisado o efeito de Bcr-Abl e de seu inibidor sobre a expressão de moléculas reguladoras do processo apoptótico. Os primeiros candidatos

analisados foram Bcl-2 e Bcl-x_L, que sabidamente são regulados por Bcr-Abl (Amarante-Mendes et al., 1998a).

4.1.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA FAMÍLIA BCL-2 EM CÉLULAS TRATADAS COM MESILATO DE IMATINIBE

Com o intuito de compreender como células que expressam Bcr-Abl permanecem resistentes à apoptose na ausência de proteínas fosforiladas em tirosina, foram analisadas inicialmente a expressão de Bcl-2 e Bcl-x_L, após o tratamento das células com mesilato de imatinibe. Para isso células das linhagens HL-60.vetor, HL-60.Bcr-Abl (OW), K562 e LAMA-84 foram incubadas por 18 horas, na ausência ou presença de 10 µM do inibidor mesilato de imatinibe.

Os resultados mostraram que a expressão de Bcr-Abl, tanto ectópica (HL-60.Bcr-Abl) como endógena (K562 e LAMA-84) está associada a altos níveis de Bcl-x_L e a níveis quase indetectáveis de Bcl-2 (Figura 16).

FIGURA 16: Tratamento com mesilato de imatinibe inibe a expressão de Bcl-x_L. Células das linhagens HL-60.vetor, HL-60.Bcr-Abl (OW), K562 e LAMA-84 foram incubadas por 18 horas na presença (+) ou ausência (-) de 10 µM de mesilato de imatinibe. Western-blot utilizando anticorpos anti-fosfotirosina, anti-Bcl-2 e anti-Bcl-x_L.

A inibição da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl, evidenciada pelo desaparecimento das bandas referentes às proteínas fosforiladas em tirosina, levou a uma diminuição nos níveis de Bcl-x_L nas três linhagens Bcr-Abl-positivas (HL-60.Bcr-Abl (OW), K562 e LAMA-84). Nenhuma dessas linhagens apresentou níveis detectáveis de Bcl-2, uma potente molécula anti-apoptótica, nem antes e nem após o tratamento com mesilato de imatinibe.

Como a manutenção da resistência à apoptose em células positivas para Bcr-Abl tratadas com mesilato de imatinibe não parece estar associada a expressão de Bcl-x_L, foi investigada nesse trabalho a expressão de outras moléculas que de alguma forma regulam ou estão associadas ao processo de morte celular por apoptose, dentre elas membros da família Bcl-2 (anti- e pró-apoptóticos) e dos IAPs. Assim sendo, células HL-60.vetor, HL-60.Bcr-Abl, K562, KCL22 e LAMA-84 foram incubadas por 18 horas na presença ou ausência de 10 µM de mesilato de imatinibe e, ao final desse período, foram preparados os extratos protéicos dos lisados totais para análise da expressão das proteínas supracitadas por Western-blot (Figuras 17, 18, 19 e 20). Esse experimento permitiu a análise do impacto de Bcr-Abl e do mesilato de imatinibe sobre a expressão de proteínas reguladoras da apoptose.

A marcação com o anticorpo anti-fosfotirosina confirmou o efeito do mesilato de imatinibe sobre a atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl, levando a uma diminuição na intensidade e quantidade das bandas referentes a proteínas fosforiladas em tirosina nas células que expressam Bcr-Abl (Figura 17). Já as células HL-60, que não expressam Bcr-Abl, mais uma vez mostraram uma baixa expressão de fosfoproteínas, a qual não foi afetada pelo tratamento com mesilato de imatinibe. Assim como o observado para as células HL-60.Bcr-Abl na figura 11, o tratamento com mesilato de imatinibe alterou os níveis de fosfoproteínas sem modificar a expressão de Bcr-Abl nas linhagens derivadas de pacientes com LMC, reforçando seu modo de ação.

A análise dos membros da família Bcl-2 (Figura 18) revelou que cada uma das linhagens positivas para Bcr-Abl apresenta um perfil de expressão diferente para essas moléculas. Quanto aos membros anti-apoptóticos, a proteína Bcl-2 é expressa em altos níveis nas linhagens HL-60 e KCL22, mas sua expressão é baixa em LAMA-84 e quase indetectável em HL-60.Bcr-Abl e K562. Foi possível notar que o tratamento com mesilato de imatinibe não alterou os níveis de expressão dessa proteína em nenhuma das linhagens analisadas. Apesar de não ter sido possível a marcação com anti-Bcl-x_L nesse experimento, os resultados apresentados na figura 16, mostram que células que expressam Bcr-Abl apresentam uma maior quantidade de Bcl-x_L e que esta expressão depende da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl, uma vez que o tratamento com mesilato de imatinibe diminui seus níveis de expressão.

FIGURA 17: Tratamento de células que expressam Bcr-Abl com mesilato de imatinibe. Células das linhagens HL-60.vetor, HL-60.Bcr-Abl (OW), K562, KCL22 e LAMA-84 foram incubadas por 18 horas na presença (+) ou ausência (-) de 10 μ M de mesilato de imatinibe. Western-blot utilizando anticorpos anti-c-Abl, anti-fosfotirosina e anti-actina.

FIGURA 18: Efeito da inibição da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl na expressão de reguladores da apoptose da família Bcl-2. Células das linhagens HL-60.vetor, HL-60.Bcr-Abl (OW), K562, KCL22 e LAMA-84 foram incubadas por 18 horas na presença (+) ou ausência (-) de 10 μ M de mesilato de imatinibe. Western-blot utilizando anticorpos anti-Bcl-2, anti-Bid, anti-Bad, anti-Bak, anti-Bax e anti-Bim.

Quanto aos membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, Bax e Bad não tiveram de maneira geral sua expressão alterada pelo inibidor, enquanto que Bak mostrou uma leve diminuição de sua expressão em células HL-60.Bcr-Abl e K562, mas não em KCL22 e LAMA-84. Na verdade essa última linhagem apresentou níveis de Bak muito baixos mesmo na situação controle, onde não foram submetidas ao inibidor de Bcr-Abl. Esses resultados estão de acordo com diversos estudos que mostram que os efeitos de Bcr-Abl sobre a ação dessas moléculas é realizada no nível pós-traducional.

Células HL-60.Bcr-Abl apresentaram níveis menores de Bid e Bad e, aparentemente, um pouco maiores de Bax e Bak quando comparadas às células HL-60.vetor. A menor expressão de Bid nessas células sugere que Bcr-Abl regula negativamente a expressão dessa proteína em células HL-60. No entanto, nas linhagens derivadas de pacientes com LMC, os níveis de expressão de Bid foram semelhantes ou até maiores do que o observado em células HL-60. Quanto aos efeitos da inibição de Bcr-Abl, enquanto Bid não parece ter a expressão afetada pelo tratamento com mesilato de imatinibe em células HL-60.Bcr-Abl e LAMA-84, sua expressão parece diminuir nas células K562 e KCL22 tratadas.

A molécula Bim de modo geral se mostrou mais expressa em células Bcr-Abl-positivas do que em HL-60 e, de acordo com resultados descritos na literatura, Bim teve sua expressão aumentada com a inibição da atividade enzimática de Bcr-Abl. Além da diferença na quantidade de proteína, é possível identificar uma alteração na migração dessa proteína no gel, uma vez que nas células Bcr-Abl-positivas não tratadas, Bim parece ter um tamanho um pouco maior (migrou menos) e, na presença do inibidor, seu tamanho parece menor (migrou mais), o que indica que essa proteína estava fosforilada antes do tratamento e que a incubação com o mesilato de imatinibe reverteu seu estado fosforilativo. Interessantemente, quando analisamos as amostras de HL-60.vetor parece que o padrão se inverte e com o tratamento passamos a ter uma menor migração da proteína Bim expressa.

Considerando o grupo dos IAPs (Figura 19), células que expressam Bcr-Abl parecem ter mais survivina do que as células HL-60 e tal expressão é reduzida pelo tratamento com mesilato de imatinibe. Nas células HL-60 o tratamento com mesilato de imatinibe não induziu alterações na expressão de survivina, indicando que o aumento na expressão dessa proteína nas demais linhagens está associado à ação de Bcr-Abl. O mesmo fenômeno foi observado para XIAP, ou seja, uma maior expressão dessa proteína nas células que expressam Bcr-Abl e uma redução na expressão após o tratamento com mesilato de imatinibe. c-IAP-1 também parece ser mais expresso em células que expressam Bcr-Abl, mas na maioria dos casos não teve sua expressão alterada pelo tratamento com mesilato de imatinibe.

Além de moléculas pertencentes às famílias Bcl-2 e IAP de reguladores da apoptose, outras proteínas tiveram a sua expressão analisada (Figura 20).

A expressão de FLIP não parece ser alterada pelo tratamento com mesilato de imatinibe, mas células que expressam Bcr-Abl, em especial a HL-60.Bcr-Abl, quando comparadas com HL-60 parecem ter níveis aumentados de FLIP-s. Analisamos também a expressão do inibidor da fosfatase PP2A, conhecida como SET. Células que expressam Bcr-Abl apresentam uma maior quantidade de SET, no entanto, a incubação com o inibidor de Bcr-Abl, não induziu alterações na expressão dessa molécula no tempo de tratamento utilizado nesse ensaio.

Quanto a expressão de caspase-3, foi confirmado novamente que o tratamento com mesilato de imatinibe por esse período de incubação, não é capaz de induzir a ativação dessa molécula, uma vez que os níveis de caspase-3 na forma inativa não foram alterados em resposta ao tratamento. Além disso, como mencionado anteriormente, a resistência à apoptose de células positivas para Bcr-Abl, também não pode ser atribuída a uma menor expressão de caspase-3, visto que a expressão dessa proteína parece ser até maior nas células que expressam Bcr-Abl do que nas células HL-60.vetor analisadas. Da mesma forma, Apaf-1, uma molécula que participa da formação do apoptossomo juntamente com caspase-9 e citocromo-c, também não foi alterada pela expressão de Bcr-Abl e nem pelo tratamento com mesilato de imatinibe.

Analisamos também a expressão de CRKL, uma molécula muito conhecida por ser um dos principais alvos de fosforilação da quinase Bcr-Abl. A expressão dessa proteína é muito maior em células HL-60.Bcr-Abl do que em células HL-60.vetor e, além da diferença em intensidade, também pode ser observada uma alteração da migração da proteína no gel. A alta expressão de CRKL também foi vista nas outras linhagens que expressam Bcr-Abl. O tratamento com mesilato de imatinibe parece diminuir a expressão de CRKL, mas seu efeito mais evidente é sobre a migração da proteína no gel, reforçando dados da literatura que apontam CRKL como alvo de Bcr-Abl. Nesse sentido, CRKL está fosforilado nas células Bcr-Abl-positivas e o tratamento com mesilato de imatinibe altera seu estado fosforilativo (desfosforila).

FIGURA 19: Efeito da inibição da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl na expressão de reguladores da apoptose do grupo dos IAPs. Células das linhagens HL-60.vetor, HL-60.Bcr-Abl (OW), K562, KCL22 e LAMA-84 foram incubadas por 18 horas na presença (+) ou ausência (-) de 10 μ M de mesilato de imatinibe. Western-blot utilizando anticorpos anti-c-IAP-1, anti-XIAP e anti-survivina.

FIGURA 20: Efeito da inibição da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl na expressão de reguladores da apoptose e outras moléculas. Células das linhagens HL-60, HL-60.Bcr-Abl (OW), K562, KCL22 e LAMA-84 foram incubadas por 18 horas na presença (+) ou ausência (-) de 10 μ M de mesilato de imatinibe. Western-blot utilizando anticorpos anti-flip, anti-apaf-1, anti-caspase-3, anti-fodrina, anti-SET e anti-Crkl.

4.2 ESTRATÉGIA 2: EXPRESSÃO DE BCR-ABL – QUINASE-DEFICIENTE

Na parte anterior desse trabalho foram apresentados os resultados obtidos com o inibidor da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl, o mesilato de imatinibe. Nossos dados indicam a existência de componentes independentes da atividade enzimática de Bcr-Abl que contribuem de alguma forma para a manutenção do fenótipo de resistência à apoptose.

Para investigar se Bcr-Abl consegue induzir resistência à apoptose na ausência de sua atividade enzimática, estabelecemos diferentes linhagens celulares expressando uma versão mutada do Bcr-Abl. A mutação presente nessa versão leva a substituição de um aminoácido na região da proteína responsável pela ligação ao ATP, fazendo com que a proteína expressa não tenha atividade tirosina-quinase.

4.2.1 SEQUENCIAMENTO DO PLASMÍDEO pSR α MSVTKNEO.BCR-ABL/KD

Antes de iniciarmos os ensaios de transfecção e infecção celular utilizando o plasmídeo pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl/KR, uma parte do gene *bcr-abl* clonado nesse vetor foi sequenciada para confirmar a presença da mutação responsável pela inativação da atividade tirosina-quinase. O sequenciamento da região de ligação ao ATP da molécula Bcr-Abl, permitiu a confirmação da mutação do gene *bcr-abl* codificado pelo plasmídeo pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl/KR. Ao compararmos a sequência de bases do *bcr-abl* selvagem (linha p185 Bcr-Abl) com o mutado (linha 4F_140203) (Figura 21), podemos observar que na posição 671 da sequência de aminoácidos de Bcr-Abl (posições 2014 a 2016 da sequência de bases), há originalmente uma lisina (AAG), que na forma mutada foi substituída por uma arginina (CGC) (troca de base na posição 2015). Essa mutação no domínio de ligação do ATP é responsável pela incapacidade desta forma mutante de fosforilar seus substratos e, portanto, pela inativação da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl.

p185 Bcr-Abl 4F_140203	1521	1531	1541	1551	1561	1571	1581	1591	
	CCAAGGCTGGGTCCCAAGCAACTACATCAGCCAGTCAACAGTCTGG	-AGAAACACTCCTGGTACCATGGGCTGTGTCC		----- CCGNNAACAGTCTGGTAGAAACACTCCTGGTACTTTGGGCTGTGTCC					
p185 Bcr-Abl 4F_140203	1601	1611	1621	1631	1641	1651	1661	1671	
	CGCAATGCCGCTGAGTATCTGCT	GAGCAGCGGGATCAATGGCAGCTTCTTGGTGCGTGAGAGTGAGAGCAGTCTGGCCA		CGCNTGCCGCTGAGTATCTGCTGAGCAGCGGGATCAATGGCAGCTTCTTGGTGCGTGAGAGTGAGAGCAGTCTGGCCA					
p185 Bcr-Abl 4F_140203	1681	1691	1701	1711	1721	1731	1741	1751	
	GAGGTCCATCTCGCTGAGATACGAAGGGAGGGTGTACCATTACAGGATCAACACTGCTTCTGATGGCAAGCTCTACGTCT	GAGGTCCATCTCGCTGAGATACGAAGGGAGGGTGTACCATTACAGGATCAACACTGCTTCTGATGGCAAGCTCTACGTCT							
p185 Bcr-Abl 4F_140203	1761	1771	1781	1791	1801	1811	1821	1831	
	CCTCCGAGAGCCGCTTCAACACCCTGGCCGAGTTGGTTCATCATCATTCAACGGTGGCCGACGGGCTCATCACCACGCTC	CCTCCGAGAGCCGCTTCAACACCCTGGCCGAGTTGGTTCATCATCATTCAACGGTGGCCGACGGGCTCATCACCACGCTC							
p185 Bcr-Abl 4F_140203	1841	1851	1861	1871	1881	1891	1901	1911	
	CATTATCCAGCCCCAAAGCGCAACAAGCCCACTGTCTATGGTGTGTCCCCAACACTACGACAAGTGGGAGATGGAACGCAC	CATTATCCAGCCCCAAAGCGCAACAAGCCCACTGTCTATGGTGTGTCCCCAACACTACGACAAGTGGGAGATGGAACGCAC							
p185 Bcr-Abl 4F_140203	1921	1931	1941	1951	1961	1971	1981	1991	
	GGACATCACCATGAAGCACAAGCTGGGCGGGGGCCAGTACGGGG	-AGGTGTACGAGGGCGTGTGGAAGAAATACAGCCTG		GGACATCACCATGAAGCACAAGCTGGGCGGGGGCCAGTACGGGGAGGTGTACGAGGGC GTGTGGAANAAATACAGCCTG					
p185 Bcr-Abl 4F_140203	2001	2011	K	2021	2031	2041	2051	2061	2071
	ACGGTGG-CCGTGAAGACCTTGAAGGAGGACACCATGG	-AGGTGGAAGAGTTCCTTGAAAGAA		-GCTGCAGTCATGAAAGA		ACGGTGGGCGTG CGC			
			R						
p185 Bcr-Abl 4F_140203	2081	2091	2101	2111	2121	2131	2141	2151	
	GA-TCAAACACCCTAACCTAGTGCAGCTCCTTGGGGTCTGCACCCGGGAGCCCCGTTCTATATCATCAC	TGAGTTCATG		AAATCAAACACCCC -----T--A----- ACCTGGGGGCNACN-----T					
p185 Bcr-Abl 4F_140203	2161	2171	2181	2191	2201	2211	2221	2231	
	ACCTACGGGAACCTCCTGGACTACCTGAGGGAGTGCAACC	GGCAGGAGGTGAACGCCGTGGTGTGCTGTACATGGCCAC		-----N----- CTTGGGGGTNTGCA-CCC-----					

FIGURA 21: Confirmação da mutação responsável pela inativação de Bcr-Abl. Alinhamento das seqüências da região de ligação ao ATP do gene *bcr-abl* presente no plasmídeo pSRαMSVtkneo.Bcr-Abl/KR (linhas inferiores) em comparação ao selvagem (linhas superiores). A linha p185 Bcr-Abl contém as seqüências do gene *bcr-abl* selvagem, enquanto a linha 4F_140203 contém a seqüência do gene mutado. Em destaque, na posição 671 da seqüência de aminoácidos de Bcr-Abl, a substituição de uma lisina (K) por uma arginina (R), pela troca da base 2015.

4.2.2 TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS 293T PARA OBTENÇÃO DE PARTÍCULAS RETROVIRAIS UTILIZADAS PARA A INFECÇÃO DE CÉLULAS ALVOS

A técnica de transferência gênica utilizando retrovírus é uma ferramenta altamente eficiente utilizada para introduzir genes estavelmente em células em divisão. Embora o genoma de retrovírus seja feito de RNA, logo após infectarem uma célula-alvo, os retrovírus produzem uma cópia de DNA do seu material genético, a qual pode se integrar no genoma da célula hospedeira.

O protocolo de produção de partículas virais é baseado na transfeção de células empacotadoras com vetores de expressão retrovirais. No interior dessas células, o RNA viral é envolvido por proteínas estruturais virais e os retrovírus formados são liberados para o

sobrenadante. Esse sobrenadante é, então, recolhido e as partículas virais presentes são utilizadas para infectar células-alvo, transmitindo, assim, os genes de interesse.

Como já mencionado, um dos objetivos do presente trabalho era o estabelecimento de linhagens celulares, expressando a versão mutada da proteína Bcr-Abl que não apresenta atividade tirosina-quinase (quinase-deficiente). Para isso foram utilizados os sobrenadantes de células empacotadoras da linhagem 293T transfectadas com os plasmídeos retrovirais de interesse.

Para a produção de partículas virais, células 293T foram co-transfectadas, pelo método do fosfato de cálcio, com um dos plasmídeos retrovirais de interesse (pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl/KR, pSR α MSVtkneo ou pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl) e o plasmídeo pCL-ampho. Enquanto os plasmídeos de interesse carregam o gene a ser introduzido nas células-alvo, o plasmídeo pCL-ampho fornece os genes *gag*, que codifica proteínas do capsídeo, *pol*, que codifica as proteínas envolvidas na transcrição (transcriptase reversa) e na integração do genoma viral no genoma do hospedeiro (integrases) e *env*, que codifica as glicoproteínas do envelope viral, proteínas essas que são necessárias para a produção das partículas virais. Um outro elemento importante é o sinal de empacotamento (ψ) que deve estar presente no RNA viral e é imprescindível para a montagem da partícula retroviral.

Para avaliar a eficiência das transfecções com os plasmídeos de interesse, foram realizadas em paralelo, transfecções com plasmídeos que carregam o gene *egfp* (pEGFP-NI ou pMX-IRES-EGFP), que codifica a proteína verde fluorescente e cuja expressão pode ser analisada tanto em microscópio de fluorescência como por citometria de fluxo. Apesar de não ser uma medida direta da eficiência de transfecção com os plasmídeos de interesse, essa ferramenta foi utilizada tanto para estimar as eficiências de transfecção, como para padronizar, melhorar ou detectar problemas nesse protocolo. Além disso, outro ponto importante é que por se tratar de um plasmídeo retroviral, o pMX-IRES-EGFP foi utilizado também em testes para avaliar a eficiência de infecção de células-alvo. A eficiência das transfecções foi na maioria dos casos analisada 48-72 horas após a transfecção.

O sobrenadante viral também foi recolhido e utilizado para a infecção de células-alvo 48 horas após a transfecção das células empacotadoras. As infecções foram realizadas na presença de polibrene (8 μ g/ml), uma molécula pequena carregada positivamente que se liga a membrana celular neutralizando a carga da superfície. Esse efeito parece facilitar a ligação das glicoproteínas virais com os seus receptores presentes na membrana celular, aumentando a eficiência de infecção. Após cerca de 18-24 horas de contato com o sobrenadante viral, o meio de cultura das células foi trocado e 48-72 horas após o procedimento de infecção, foi iniciado o protocolo de seleção com o antibiótico G418.

Como será mostrado ao longo dessa seção da tese, foram estabelecidas diversas linhagens celulares expressando a proteína Bcr-Abl (quinase-deficiente ou ativa) ou com o vetor vazio. Muitas dessas linhagens, apesar de expressarem a mesma proteína, foram infectadas com sobrenadantes virais produzidos em dias diferentes, resultantes de transfecções diferentes que variaram, dentre outras coisas, em sua eficiência, dada pela menor ou maior quantidade de células que expressavam a proteína verde fluorescente 48 horas após o protocolo de transfecção (dados não mostrados).

Como uma medida mais direta do sucesso da transfecção de células 293T com os plasmídeos pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl/KR e pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl, também foi usada a análise da expressão transitória de Bcr-Abl por Western-blot. Para essa análise, o preparo das amostras das células empacotadoras foi realizado logo após a coleta do sobrenadante que seria utilizado na infecção das células-alvo. Em alguns desses ensaios, células 293T foram transfectadas com os plasmídeos pSR α MSVtkneo (vetor vazio), pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl/KR e pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl e após 48 horas foram lisadas para análise da expressão de Bcr-Abl por Western blot.

A transfecção das células 293T com os plasmídeos pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl/KR, pSR α MSVtkneo, pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl foi confirmada por Western-blot, através da marcação com os anticorpos anti-c-Abl e anti-fosfotirosina (Figura 22). Como podemos notar, células 293T que foram transfectadas transitoriamente com o plasmídeo pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl/KR (Figura 22A), apesar de passarem a expressar altos níveis de Bcr-Abl, mantiveram a mesma quantidade de proteínas fosforiladas em tirosina manifestada por células controle ou transfectadas com o vetor vazio (Figura 22B), confirmando o caráter quinase-deficiente da molécula Bcr-Abl expressa. Por outro lado, as células 293T transfectadas com pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl (Figura 22B), além de expressarem muito Bcr-Abl, passaram a apresentar também uma grande quantidade de proteínas fosforiladas em tirosina, já que a versão expressa representa a forma quinase ativa dessa oncoproteína.

FIGURA 22: Expressão transitória de Bcr-Abl (quinase-deficiente e mutado). Células 293T foram co-transfectadas com pCL-ampho e um dos seguintes plasmídeos: (A) pSRαMSVtkneo.Bcr-Abl/KR, (B) pSRαMSVtkneo (vetor vazio) ou pSRαMSVtkneo.Bcr-Abl. Western-blot dos extratos celulares de células 293T controle e transfectada (48 horas), utilizando anticorpos anti-c-Abl e anti-fosfotirosina.

4.2.3 INFECÇÃO E SELEÇÃO DE CÉLULAS HL-60 INCUBADAS COM O SOBRENADANTE VIRAL DE CÉLULAS EMPACOTADORAS

Visto que os ensaios com mesilato de imatinibe apresentados no bloco anterior e muitos dos trabalhos sobre os efeitos de Bcr-Abl realizados pelo nosso grupo de pesquisa estão baseados na comparação de células HL-60 e HL-60.Bcr-Abl, nossa proposta inicial estava focada no desenvolvimento de células HL-60 expressando a versão quinase-deficiente de Bcr-Abl. Com isso poderíamos, dentre outras coisas, comparar a resistência à apoptose das células HL-60, HL-60.Bcr-Abl e HL-60.Bcr-Abl/KR e examinar qual é a contribuição da atividade tirosina-quinase para os efeitos anti-apoptóticos de Bcr-Abl, além de comparar o perfil de expressão de proteínas envolvidas no processo apoptótico. Diversas tentativas foram feitas com o objetivo de obter células HL-60.Bcr-Abl/KR. Inicialmente foram utilizados os sobrenadantes de células 293T co-transfectadas com os plasmídeos pSRαMSVtkneo.Bcr-Abl/KR e pCL-ampho. As células HL-60 submetidas ao protocolo de infecção celular foram selecionadas com o antibiótico G418 e após cerca de 3-4 semanas de seleção, amostras dos extratos celulares foram preparadas para análise da expressão de Bcr-Abl por Western-blot.

Em praticamente todas as vezes em que células HL-60 foram submetidas ao protocolo de infecção, foi possível a seleção de células resistentes ao antibiótico G418. Apesar do

aparente sucesso das infecções e da seleção, todas as células HL-60 selecionadas, apesar de resistentes ao antibiótico, inexplicavelmente não expressavam a proteína Bcr-Abl. É importante ressaltar que durante o período de seleção das células infectadas, em paralelo, células HL-60 controle, não submetidas a infecções, também foram expostas às mesmas doses de G418 e condições de cultivo, mas em nenhuma das vezes foram obtidas células resistentes ao antibiótico a partir dessa população.

Em uma dessas tentativas, células HL-60 e HeLa foram submetidas ao protocolo de infecção com o mesmo sobrenadante viral, proveniente de células 293T co-transfectadas com os plasmídeos pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl/KR e pCL-ampho. Após a seleção com G418, as populações de HL-60 e HeLa selecionadas foram examinadas para a presença de Bcr-Abl por Western-blot (Figura 23A). A marcação com anticorpo anti-c-Abl confirmou o estabelecimento de células HeLa expressando Bcr-Abl/KR (HeLa.Bcr-Abl/KR). Já as células HL-60 selecionadas, apesar de infectadas com o mesmo sobrenadante de células HeLa, não expressavam a proteína Bcr-Abl.

As células HeLa.Bcr-Abl/KR serão abordadas novamente mais adiante nesse trabalho, mas a sua obtenção confirmou a presença de partículas virais no sobrenadante das células empacotadoras e o funcionamento do protocolo de infecção e seleção celular.

Após algumas tentativas frustradas de estabelecer uma linhagem de células HL-60 expressando o gene *bcr-abl* mutado, em que conseguimos obter diversas populações de células HL-60 resistentes ao antibiótico de seleção, mas que não expressam Bcr-Abl (Figura 23A), decidimos fazer uma nova tentativa de infecção celular utilizando duas estratégias: uma seguindo o protocolo descrito acima e já bem estabelecido em nosso laboratório, na qual as células HL-60 foram expostas ao sobrenadante de células 293T co-transfectadas com os plasmídeos pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl/KR e pCL-ampho e outra na qual as células HL60 foram co-cultivadas por 48 horas com as células produtoras de partículas virais.

Ao final dos dois protocolos de infecção, as células infectadas foram submetidas ao mesmo procedimento de seleção com G418, ou seja, foram distribuídas em placas de 6 poços numa concentração de 1×10^6 célula/poço/2 ml de meio de cultura e submetidas a uma dose de 1 mg/ml de G418. Após uma semana, as células HL-60 controle estavam completamente mortas, enquanto as células submetidas a qualquer um dos protocolos de infecção apresentavam uma quantidade expressiva de células vivas. Ao longo da seleção as populações de células vivas foram crescendo e após um mês obtivemos as duas populações de células resistentes ao antibiótico e que supostamente expressavam nossa proteína de interesse. Entretanto, novamente a marcação com o anticorpo anti-c-Abl (Figura 23C) revelou que as células HL-60 selecionadas, apesar de resistentes ao G418, não expressavam, pelo menos em

níveis detectáveis, a proteína Bcr-Abl, independentemente do protocolo utilizado para infecção. Como controle positivo para a expressão de Bcr-Abl foi utilizada uma amostra da linhagem HL-60.Bcr-Abl (OW).

FIGURA 23: Tentativas de obtenção de células HL-60 expressando Bcr-Abl-quinase-deficiente. A) Células HL-60 e HeLa foram incubadas com o sobrenadante de células 293T co-transfectadas com pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl/KR e pCl-ampho e selecionadas por 10-20 dias com 1mg/ml de G418. Western blot dos extratos celulares de HeLa (controle), HeLa.Bcr-Abl/KR (selecionada), HL-60 (controle), HL-60 (selecionada) e HL-60.Bcr-Abl (OW). B) Células PA317.Bcr-Abl/KR foram obtidas pela transfecção de células PA317 com o plasmídeo pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl/KR e selecionadas com 800 μ g/mL de G418. C) Células HL-60 foram co-cultivadas ou incubadas com o sobrenadante de células 293T co-transfectadas com pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl/KR e pCl-ampho e selecionadas com 1mg/ml de G418. Western blot dos extratos celulares de HL-60 (controle), HL-60 (infectada com o sobrenadante), HL-60 (co-cultivada com células produtoras de vírus) e HL-60.Bcr-Abl (OW). Western blot utilizando anticorpos anti-c-Abl, anti-fosfotirosina e anti-actina.

Em paralelo ao uso de células 293T para a produção de partículas virais, foram obtidas por transfecção com fosfato de cálcio e seleção com 800 μ g/mL de G418, células da linhagem PA317 expressando Bcr-Abl/KR (Figura 23B). As células PA317.Bcr-Abl/KR obtidas apresentam uma alta expressão de Bcr-Abl e uma quantidade de proteínas fosforiladas em tirosina semelhante as células controle. Pelo fato da PA317 ser uma linhagem capaz de produzir partículas retrovirais, tentamos também utilizar o sobrenadante das células

PA371.Bcr-Abl/KR para produzir células HL-60.Bcr-Abl/KR, mas não obtivemos sucesso (dados não mostrados).

Diversas alterações nos protocolos de transfecção de células 293T, infecção de células-alvo e seleção com G418 foram testadas com o intuito de aumentar a eficiência de infecção de células HL-60. Essas alterações incluem até a adoção de um outro sistema de produção de retrovírus envolvendo o uso de células empacotadoras 293 gag/pol e o plasmídeo pVSV-G, que carrega o gene para uma proteína de envelope, no caso, a glicoproteína G do vírus da estomatite vesicular (VSV). A grande vantagem que esse sistema oferecia para a infecção de células HL-60 é que, ao contrário da proteína de envelope codificada pelo pCL-ampho (gp70), que utiliza um receptor celular específico, a glicoproteína G do VSV não utiliza um receptor específico para entrar na célula-alvo, mas sim fosfolipídios de membrana que propiciam a fusão do vírus com a membrana citoplasmática da célula-alvo. Mesmo assim, em todas as tentativas as células HL-60 infectadas e selecionadas não expressavam a proteína Bcr-Abl, apesar da resistência ao G418.

Em paralelo às tentativas de obtenção de células HL-60.Bcr-Abl/KR, utilizamos os sobrenadantes virais de células 293T para a infecção de diversas linhagens celulares, tais como: HeLa, Jurkat e THP-1. A primeira linhagem expressando a versão quinase-deficiente de Bcr-Abl estabelecida, como mostrado na figura 23A, foi a HeLa.Bcr-Abl/KR.

4.2.4 EFEITO DA EXPRESSÃO DE BCR-ABL/KR EM CÉLULAS HELa

As células HeLa submetidas ao protocolo de infecção com os sobrenadantes virais foram selecionadas com 800 µg/ml do antibiótico G418. Duas semanas após o início da seleção foi confirmada a expressão de Bcr-Abl nas células selecionadas (Figuras 23A e 24). Pode-se notar que, apesar da alta expressão de Bcr-Abl nessas células, não houve diferença na quantidade de proteínas fosforiladas em tirosina entre as células HeLa controle e as HeLa.Bcr-Abl/KR selecionadas.

O estabelecimento de uma linhagem de células HeLa expressando o gene *bcr-abl* mutado foi de grande importância pois, a partir desse momento puderam ser iniciados alguns experimentos de resistência à apoptose comparando as células HeLa controle, HeLa.Bcr-Abl/KR e HeLa.Bcr-Abl.

FIGURA 24: Estabelecimento da linhagem HeLa.Bcr-Abl/KR. Expressão estável de Bcr-Abl nas células HeLa infectadas com o sobrenadante de células 293T co-transfectadas com os plasmídeos pSR α MSVtkneo.Bcr-Abl/KR e pCL-ampho. Western-blot dos extratos celulares de células HeLa controle, HeLa.Bcr-Abl/KR, utilizando anticorpos anti-c-Abl e anti-fosfotirosina.

4.2.4.1 EXPRESSÃO DE BCR-ABL-QUINASE DEFICIENTE CONFERE RESISTÊNCIA À APOPTOSE INDUZIDA POR LUZ ULTRAVIOLETA

Células das linhagens HeLa, HeLa.Bcr-Abl/KR e HeLa.Bcr-Abl foram submetidas a ensaios de indução de morte pela irradiação com luz ultravioleta (UV). É importante ressaltar que o estímulo pró-apoptótico só foi dado quando as células já estavam aderidas às placas. Após o período de incubação, que variou de 18 a 48 horas, as células foram recolhidas, ressuspensas em tampão HFS e analisadas quanto ao conteúdo de DNA por citometria de fluxo. Para recuperar tanto as células vivas como as mortas, foram recolhidas tanto as células que estavam no sobrenadante de cada amostra, como as que ainda estavam aderidas à placa.

A incubação das células HeLa por 18-20 horas após irradiação com luz ultravioleta induziu uma porcentagem de morte de aproximadamente 60%, enquanto o controle não tratado manteve uma porcentagem de 10 % de células mortas (Figura 25). Como esperado, as células HeLa.Bcr-Abl se mostraram muito resistentes à apoptose induzida por esse estímulo, não havendo diferença na viabilidade entre as células que receberam ou não o tratamento com UV. Interessantemente, as células que expressam o Bcr-Abl quinase-deficiente (HeLa.Bcr-Abl/KR), apresentaram uma resistência à apoptose intermediária entre a encontrada nas células HeLa controle e células HeLa.Bcr-Abl, com aproximadamente 30% das células em apoptose pós tratamento.

FIGURA 25: Células HeLa.Bcr-Abl-quinase deficiente exibem resistência à apoptose induzida por UV. As linhagens HeLa, HeLa.Bcr-Abl/KR e HeLa.Bcr-Abl foram incubadas por 18 horas, após terem sido ou não submetidas a 200 mJ/cm² de irradiação ultravioleta. A porcentagem de apoptose foi analisada por citometria de fluxo, através do nível de fragmentação do DNA. Os resultados apresentados representam a média ± desvio padrão dos valores obtidos nas triplicatas. Experimento representativo de 2 experimentos independentes.

Posteriormente foram obtidas células HeLa.vetor (Figura 26) para serem utilizadas como controle no lugar das células HeLa. Essas células foram obtidas pela infecção com o sobrenadante de células 293T co-transfectadas com os plasmídeos pCL-ampho e pSR α MSVtkneo (vetor) e seleção com o antibiótico G418 numa concentração de 800 μ g/ml.

Como optamos por fazer a seleção de populações resistentes ao G418, ao invés da clonagem das células infectadas e/ou selecionadas, isso pode às vezes resultar na obtenção de populações celulares que expressam níveis diferentes da proteína de interesse. Na marcação com anti-c-Abl fica claro que a expressão de Bcr-Abl é bem mais intensa na população de células HeLa.Bcr-Abl/KR selecionada do que na população de HeLa.Bcr-Abl (Figura 26). Como estamos particularmente interessados nos efeitos da expressão de Bcr-Abl/KR, essa diferença, apesar de considerada na análise dos dados, não prejudicou o estudo em questão.

Quanto à marcação com o anticorpo anti-fosfotirosina, diferentemente do que foi visto para as células HL-60, as células HeLa já possuem uma atividade tirosina-quinase alta e tal atividade, como esperado, não parece ser aumentada em decorrência da expressão de Bcr-Abl-quinase-deficiente. O aumento na atividade enzimática em consequência da expressão da forma selvagem do Bcr-Abl também não ficou tão evidente, parecendo ser só um pouco maior do que o das células controle, o que talvez possa ser explicado pelo fato das células controle já apresentarem grandes quantidade de fosfoproteínas, dificultando a visualização do ganho em proteínas fosforiladas em tirosina. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de que substratos específicos de Bcr-Abl estejam fosforilados apenas nas HeLa.Bcr-Abl (selvagem).

FIGURA 26: Linhagens obtidas a partir da infecção de células HeLa. Western-blot das linhagens HeLa, HeLa.vetor, HeLa.Bcr-Abl/KR e HeLa.Bcr-Abl, utilizando anticorpos anti-c-Abl, anti-fosfotirosina e anti-actina.

Após a obtenção da linhagem HeLa.vetor, foram repetidos os experimentos de resistência a UV. Novamente as células HeLa.Bcr-Abl/KR mostraram uma porcentagem de células em apoptose (cerca de 35%) intermediária aos valores obtidos para células HeLa.vetor, que são mais sensíveis (cerca de 70%), e HeLa.Bcr-Abl, que são mais resistentes (cerca de 20%) (Figura 27). O mesmo perfil foi obtido em ensaios mais longos.

FIGURA 27: Células HeLa.Bcr-Abl quinase-deficiente exibem resistência à apoptose induzida por UV. Células HeLa.vetor, HeLa.Bcr-Abl/KR e HeLa.Bcr-Abl foram plaquedadas na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/mL e incubadas por 18-20 horas, após terem sido ou não submetidas a 200 mJ/cm^2 de irradiação ultravioleta. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos nas triplicatas. Experimento representativo de 3 experimentos independentes.

Visando a melhor compreensão do mecanismo pelo qual a molécula Bcr-Abl quinase-deficiente confere resistência à apoptose, foram analisadas nas células HeLa, HeLa.vetor, HeLa.Bcr-Abl/KR e HeLa.Bcr-Abl as expressões de diversas proteínas que classicamente participam na regulação/sinalização da morte celular por apoptose (Figuras 28 e 29).

Apesar da altíssima expressão de Bcr-Abl/KR nas células HeLa.Bcr-Abl/KR, não foram observadas alterações nas expressões de Bax, Bak, Bcl-x_L, Bid, A1, c-IAP-1, XIAP, CRKL, Mcl-1, caspase-3, caspase-9 e Flip nas células HeLa.Bcr-Abl/KR quando comparadas às células HeLa e HeLa.vetor. Já a expressão de Bcr-Abl selvagem parece ter induzido apenas um aumento da expressão de c-IAP-1. A proteína Bcl-2 não foi detectada em nenhuma das linhagens celulares testadas.

FIGURA 28: Expressão de proteínas reguladoras do processo de apoptose. Western-blot dos lisados totais de células HeLa, HeLa.vetor, HeLa.Bcr-Abl/KR e HeLa.Bcr-Abl, utilizando anticorpos anti-c-Abl, anti-fosfotirosina, anti-actina, anti-Bax, anti-Bak, anti-Bcl-x_L, anti-Mcl-1, anti-CRKL, anti-c-IAP-1 e anti-XIAP.

FIGURA 29: Expressão de proteínas reguladoras do processo de apoptose. Western-blot dos lisados totais de células HeLa, HeLa.vetor, HeLa.Bcr-Abl/KR e HeLa.Bcr-Abl, utilizando anticorpos, anti-Bcl-x_L, anti-Bax, anti-Bak, anti-Bid, anti-XIAP, anti-A1, anti-FLIP, anti-caspase-3, anti-caspase-9 e anti-actina.

Em conjunto os resultados de resistência à apoptose obtidos em HeLa.Bcr-Abl/KR, indicam que a proteína Bcr-Abl quinase-deficiente é capaz de conferir resistência à apoptose.

Um conceito bem estabelecido é o de que o efeito da expressão de uma proteína pode variar de acordo com o contexto celular. Assim, com o intuito de confirmar os resultados de resistência à apoptose obtidos com expressão de Bcr-Abl-quinase-deficiente em células HeLa e analisar se a expressão de Bcr-Abl, tanto o quinase-deficiente como o selvagem, induz efeitos diferentes de acordo com o tipo celular, foram estabelecidas outras linhagens celulares expressando os genes de interesse.

Como as células HeLa são derivadas de carcinoma de colo de útero e o oncogene *bcr-abl* está associado à leucemias, decidimos complementar os estudos realizados em HeLa, focando no estabelecimento de linhagens celulares de origem hematopoética expressando a molécula Bcr-Abl-quinase deficiente. Foram incluídas nos ensaios de infecção celular com retrovírus, as células Jurkat, uma linhagem humana derivada de leucemia linfocítica aguda e THP-1, derivada de paciente com leucemia monocítica aguda.

Em um dos ensaios de transfecção de células 293T co-transfectadas com pSRαMSVtkneo.Bcr-Abl/KR e pCL-ampho (Figura 30A), o sobrenadante viral produzido foi utilizado para a infecção de células HeLa, HL-60, Jurkat e THP-1. Após o protocolo de infecção, as células foram cultivadas com G418 para a seleção das células expressando Bcr-Abl/KR.

As células HeLa foram utilizadas somente como controle de infecção e a expressão de Bcr-Abl/KR foi confirmada após dez dias de seleção (Figura 30A).

FIGURA 30: Análise da expressão de Bcr-Abl nas células 293T co-transfectadas com os plasmídeos pSR α MSV.tkneo.Bcr-Abl/KR e pCL-ampho transfectadas e em células infectadas e selecionadas com G418. (A) Extratos celulares de células 293T, 293T transfectadas, HeLa e HeLa.Bcr-Abl/KR selecionada com 800 μ g/mL de G418. (B) Extratos celulares de células HL-60, HL-60 submetidas a infecção e selecionadas com 400 e 800 μ g/mL de G418, respectivamente e HL-60.Bcr-Abl (OW). (C) Expressão estável de Bcr-Abl/KR nas linhagens Jurkat e THP-1 infectadas com sobrenadante das células 293T transfectadas. As células HL-60 apesar de infectadas com o mesmo sobrenadante e selecionadas com G418 não expressam Bcr-Abl. Western-blot dos extratos celulares utilizando anticorpos anti-c-Abl e anti-fosfotirosina.

Quanto às demais linhagens que foram infectadas, após cerca de trinta dias de seleção foram preparadas amostras das células selecionadas para análise da expressão de Bcr-Abl/KR por Western-blot. Novamente as células HL-60 selecionadas não expressam a proteína de interesse (Figura 30B). No entanto, foram obtidas com sucesso, linhagens derivadas de Jurkat e THP-1 expressando a proteína Bcr-Abl/KR. São elas: Jurkat.Bcr-Abl/KR e THP-1.Bcr-Abl/KR (Figura 30C). Posteriormente foram obtidas as linhagens, Jurkat.vetor, Jurkat.Bcr-Abl, THP-1.vetor e THP-1.Bcr-Abl para os ensaios de comparação com as células que expressam Bcr-Abl/KR. Os ensaios realizados com cada grupo de células estão apresentados a seguir.

4.2.5 CÉLULAS JURKAT, JURKAT.VETOR, JURKAT.BCR-ABL/KR E JURKAT.BCR-ABL – CARACTERIZAÇÃO E RESISTÊNCIA À APOPTOSE

As células estabelecidas a partir da infecção de células Jurkat com o sobrenadante contendo retrovírus estão apresentadas na Figura 31. Com a marcação com o anticorpo anti-c-Abl observa-se que células Jurkat.Bcr-Abl/KR expressam grandes quantidades de Bcr-Abl, mas apresentam o mesmo perfil de proteínas fosforiladas em tirosina das células controle ou que expressam só o vetor. Já as células Jurkat.Bcr-Abl, além de expressarem uma altíssima quantidade de Bcr-Abl, superior a de Jurkat.Bcr-Abl/KR, passaram a apresentar um perfil de fosfoproteínas diferente do observado nas outras três linhagens e marcado pelo aumento expressivo de proteínas fosforiladas em tirosina. Essa característica é uma das marcas da expressão de Bcr-Abl e sua atividade tirosina-quinase.

Com o objetivo de analisar se a expressão de Bcr-Abl protege as células Jurkat da indução de morte por agentes pró-apoptóticos, células das linhagens Jurkat, Jurkat.vetor, Jurkat.Bcr-Abl/KR e Jurkat.Bcr-Abl foram expostas a diferentes agentes indutores de apoptose e a porcentagem de morte foi determinada pela análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo. Como pode ser observado (Figura 32), as células Jurkat.Bcr-Abl se mostraram, como esperado, mais resistentes à indução de morte do que as demais linhagens celulares analisadas. Isso indica que em Jurkat, assim como em HL-60, HeLa e tantas outras linhagens celulares descritas na literatura, a expressão de Bcr-Abl é capaz de modificar a resposta celular à agentes apoptogênicos, bloqueando a indução de morte. No experimento aqui apresentado, o aumento na resistência à morte foi observado para três (Act-D, CHX e UV) das quatro drogas testadas. Estranhamente, em Jurkat a expressão de Bcr-Abl parece não ter muito efeito sobre a indução de morte por Ara-C. O efeito protetor de Bcr-Abl em Jurkat também foi observado para o VM26 (dado não mostrado).

FIGURA 31: Expressão de Bcr-Abl nas linhagens derivadas de Jurkat. Western-blot das linhagens Jurkat, Jurkat.vetor, Jurkat.Bcr-Abl/KR e Jurkat.Bcr-Abl, utilizando anticorpos anti-c-Abl, anti-fosfotirosina e anti-actina.

FIGURA 32: Expressão de Bcr-Abl, mas não de Bcr-Abl-quinase deficiente (Bcr-Abl/KR) confere resistência à apoptose em células Jurkat. Células Jurkat, Jurkat.vetor, Jurkat.Bcr-Abl/KR e Jurkat.Bcr-Abl foram incubadas por 18-20 horas na ausência ou presença de de 1 μ M de Act D, 100 μ M Ara-C, 50 μ M de CHX ou após terem submetidas a 100 mJ/cm² de UV. A porcentagem de células em apoptose foi analisada por citometria de fluxo, através da análise do ciclo celular. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos nas triplicatas. Experimento representativo de 3 experimentos independentes.

Contrastando com os resultados obtidos para a célula HeLa.Bcr-Abl/KR, na qual a expressão de Bcr-Abl-quinase-deficiente é capaz de induzir resistência à apoptose, as células Jurkat.Bcr-Abl/KR se comportaram frente a grande maioria dos tratamentos testados de maneira muito semelhante às linhagens Jurkat e Jurkat.vetor, indicando que em células Jurkat a expressão de Bcr-Abl/KR não foi capaz de induzir resistência à apoptose. Apesar disso, as células Jurkat.Bcr-Abl/KR só se mostraram consistentemente mais resistentes do que células controle e vetor quando o estímulo utilizado foi a Act-D.

A expressão das moléculas Bad, Bax, Bim, survivina, c-IAP-1, XIAP, Apaf-1 e Flip, envolvidas na regulação da apoptose, foi analisada por Western-blot (Figura 33).

FIGURA 33: Expressão de proteínas reguladoras do processo de apoptose. Western-blot dos lisados totais de células Jurkat, Jurkat.vetor, Jurkat.Bcr-Abl/KR e Jurkat.Bcr-Abl, utilizando anticorpos anti-c-Abl, anti-fosfotirosina, anti-actina, anti-Bad, anti-Bax, anti-Bim, anti-survivina, anti-c-IAP-1, anti-XIAP, anti-Apaf-1 e anti-Flip. Foram aplicadas duas amostras das linhagens Jurkat.Bcr-Abl/KR e Jurkat.Bcr-Abl.

Como pode ser observado, a expressão de Bcr-Abl/KR não induziu alterações no padrão de expressão de nenhuma das proteínas analisadas. Por outro lado, a expressão de Bcr-Abl induziu um aumento da expressão das moléculas anti-apoptóticas survivina e c-IAP-1 e uma diminuição da expressão de Bim, um membro pró-apoptótico da família Bcl-2. Estranhamente a expressão de Bcr-Abl (quinase-ativo) em células Jurkat induziu a expressão de níveis altíssimos de Bax e um leve aumento na expressão de Bad, duas moléculas pró-apoptóticas. Também foram observadas alterações no padrão de marcação de Apaf-1 e XIAP. Nas linhagens Jurkat, Jurkat.vetor e Jurkat.Bcr-Abl/KR a marcação com anticorpo anti-XIAP revelou duas bandas, sendo que a banda inferior se mostrava bem mais intensa do que a superior nessas linhagens. Já a marcação da Jurkat.Bcr-Abl revelou a existência de uma banda única, intensa e com tamanho similar ao da banda superior observada nas outras linhagens. Quanto ao Apaf-1, foram observadas duas bandas nas linhagens Jurkat, Jurkat.vetor e Jurkat.Bcr-Abl/KR, sendo a banda superior um pouco mais intensa do que a inferior. Enquanto isso a expressão do Bcr-Abl parece ter induzido o desaparecimento da banda superior e um aumento da intensidade da banda inferior. Em uma das amostras de Jurkat.Bcr-Abl também apareceram duas bandas, a mais forte e superior de mesmo tamanho que a banda inferior encontrada nas outras linhagens e uma banda inferior mais fraca.

4.2.6 CÉLULAS THP-1, THP-1.VETOR, THP-1.BCR-ABL/KR E THP-1.BCR-ABL – CARACTERIZAÇÃO E RESISTÊNCIA À APOPTOSE

Como grande parte dos trabalhos realizados com Bcr-Abl em nosso laboratório foi feita em células HL-60, uma linhagem mielóide que fica resistente à apoptose na presença de Bcr-Abl, realizamos também ensaios de resistência à morte nas linhagens de THP-1, uma outra linhagem mielóide, para ver se os resultados seriam semelhantes. A análise por Western-blot das linhagens THP-1, THP-1.vetor, THP-1.Bcr-Abl/KR e THP-1.Bcr-Abl, confirmou a expressão de Bcr-Abl (selvagem e mutado) (Figura 34).

Com o objetivo de analisar se a expressão de Bcr-Abl protege as células THP-1 da indução de morte por agentes pró-apoptóticos, células das linhagens THP-1, THP-1.vetor, THP-1.Bcr-Abl/KR e THP-1.Bcr-Abl foram expostas a diferentes doses de UV e de VM26 e incubadas por 16-20 horas na estufa.

Contrastando com o conceito bem estabelecido de que a expressão de Bcr-Abl induz resistência à morte (Figura 35), as quatro linhagens celulares se comportaram de maneira muito semelhante frente aos dois tratamentos testados, indicando que em células THP-1, a expressão de Bcr-Abl não é capaz de bloquear a indução de morte.

FIGURA 34: Expressão de Bcr-Abl nas linhagens de THP-1 selecionadas. Western-blot das linhagens THP-1, THP-1.vetor, THP-1.Bcr-Abl/KR e THP-1.Bcr-Abl, utilizando anticorpos anti-c-Abl, anti-fosfotirosina e anti-actina.

FIGURA 35: Efeito da expressão de Bcr-Abl na resistência à apoptose de células THP-1. Células THP-1, THP-1.vetor, THP-1.Bcr-Abl/KR e THP-1.Bcr-Abl foram incubadas por 18-20 horas na ausência ou presença de um indutor de apoptose. A porcentagem de apoptose foi analisada por citometria de fluxo, através do nível de fragmentação do DNA. Os resultados apresentados representam a média e o desvio padrão dos valores obtidos nas triplicatas.

Uma hipótese levantada para explicar esse fenômeno é que o bloqueio da apoptose por Bcr-Abl seria um processo gradual e que, portanto, a célula precisaria de um tempo maior de exposição ao Bcr-Abl para que ocorresse a indução do fenótipo de resistência à apoptose. Para testar essa hipótese, as linhagens THP-1, THP-1.vetor, THP-1.Bcr-Abl/KR e THP-1.Bcr-Abl foram mantidas em cultura por cerca de 4 meses e, então, submetidas a novos testes de resistência à apoptose. A porcentagem de morte foi novamente determinada por citometria de fluxo (Figura 36).

FIGURA 36: Efeito da expressão de Bcr-Abl na resistência à apoptose de células THP-1. Células THP-1, THP-1.vetor, THP-1.Bcr-Abl/KR e THP-1.Bcr-Abl foram incubadas por 18-20 horas na ausência ou presença de um indutor de apoptose. A porcentagem de apoptose foi analisada por citometria de fluxo, através do nível de fragmentação do DNA. Os resultados apresentados representam a média e o desvio padrão dos valores obtidos nas triplicatas.

Como pode ser observado, mais uma vez as células THP-1.Bcr-Abl se comportaram de maneira semelhante às linhagens controle (THP-1 e THP-1.vetor) frente aos estímulos apoptogênicos. Esse resultado reforça a idéia de que nessa linhagem celular (THP-1), a expressão de Bcr-Abl não é capaz de bloquear a indução de morte, pelo menos, utilizando os estímulos adotados nesse estudo.

Como discutido anteriormente, um dos fatores relevantes para o fenótipo de resistência à apoptose promovido por Bcr-Abl é a regulação da expressão de proteínas da família Bcl-2 que atuam como reguladores do sinal apoptótico na mitocôndria. Dentre os membros dessa família, Bcl-x_L, parece estar aumentado em células que expressam Bcr-Abl e são resistentes à apoptose, tais como as linhagens HL-60.Bcr-Abl e K562.

Na tentativa de compreender os resultados obtidos, verificamos inicialmente a expressão de alguns membros da família Bcl-2 nas quatro linhagens de THP-1. Células THP-1, THP-1.vetor, THP-1.Bcr-Abl/KR e THP-1.Bcr-Abl apresentaram o mesmo nível de expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-x_L, e Mcl-1 e da proteína pró-apoptótica Bax (Figura 37), mostrando que a expressão de Bcr-Abl em células THP-1 não modificou a expressão de nenhuma das proteínas analisadas. Também não foram observadas alterações no padrão de expressão de Bad, Bim, survivina, c-IAP-1, XIAP, Apaf-1 e Flip em decorrência da expressão de Bcr-Abl (Figura 38). Somente survivina parece ter tido um leve aumento de sua expressão em células THP-1.Bcr-Abl. Já o nível de expressão de c-IAP-1 foi baixo em todas as linhagens.

FIGURA 37: Expressão de Bcr-Abl em células THP-1 não altera o padrão de expressão de proteínas reguladoras da apoptose. Western-blot de células THP-1, THP-1.vetor, THP-1.Bcr-Abl/KR e THP-1.Bcr-Abl, utilizando anti-c-Abl, anti-Bcl-2, anti-Bcl-x_L, anti-Bax, anti-Mcl-1 e anti-actina

FIGURA 38: Expressão de proteínas reguladoras do processo de apoptose. Western-blot de células THP-1, THP-1.vetor, THP-1.Bcr-Abl/KR e THP-1.Bcr-Abl, utilizando anti-c-Abl, anti-fosfotirosina, anti-actina, anti-Bad, anti-Bim, anti-survivina, anti-c-IAP-1, anti-XIAP, anti-Apaf-1 e anti-Flip.

PARTE 2: IMPACTO DA EXPRESSÃO DE BCR-ABL NO PROTEOMA DE CÉLULAS HL-60

Diversas alterações fenotípicas são observadas em células que expressam Bcr-Abl, destacando-se o aumento da proliferação, a resistência à indução de apoptose por drogas quimioterápicas e as modificações nas propriedades de adesão celular (Wong e Witte, 2004). Com base no fato de que a maioria das vias ativadas por Bcr-Abl transmite sinais para a maquinaria de transcrição e tradução da célula transformada, é plausível que o fenótipo maligno de células que expressam Bcr-Abl possa ser explicado, pelo menos em parte, por alterações no padrão de expressão protéica induzidas por Bcr-Abl.

Com o intuito de estudar o impacto da expressão de Bcr-Abl no padrão global de expressão de proteínas foram comparados os géis bidimensionais das linhagens celulares HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl (OW).

4.3.1 PROTEOMA E FOSFOPROTEOMA DE CÉLULAS HL-60.VETOR E HL-60.BCR-ABL

Nos experimentos preliminares, utilizando tiras de gradiente de pH imobilizado na faixa de 3-10 e de 7 cm de comprimento, durante a focalização isoeletrica, foi observado que a maioria das proteínas presentes no lisado total de células HL-60.Bcr-Abl e, em especial, as proteínas fosforiladas em tirosina, está concentrada na faixa de pH de 4-7 (Figura 39). Com base nesses dados, utilizamos nos experimentos de comparação do proteoma de células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl, tiras de gradiente de pH imobilizado de 4-7 e com um comprimento de 13 cm, para uma melhor separação das proteínas na primeira e na segunda dimensões da eletroforese bidimensional.

FIGURA 39: Padrão da expressão protéica global (A) e de proteínas fosforiladas em tirosina (B) de células HL-60.Bcr-Abl. Foram feitos dois géis bidimensionais idênticos utilizando tira de gradiente de pH imobilizado na faixa de 3-10, de 7cm, de um extrato protéico de HL-60.Bcr-Abl (250 µg). Um gel foi corado com azul de Coomassie (A) para a visualização das proteínas globalmente expressas e o outro foi utilizado para Western-blot, no qual houve marcação com anticorpo anti-fosfotirosina (B).

Sendo assim, para identificar alterações induzidas por Bcr-Abl, 450 µg dos extratos protéicos de células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl foram separados por eletroforese bidimensional utilizando tiras de gradiente de pH imobilizado na faixa de 4-7, de 13 cm. Após o equilíbrio das tiras, a segunda dimensão foi realizada em géis de 10% poliacrilamida. Foram feitos dois géis idênticos de cada linhagem, sendo que um deles foi corado com azul de Coomassie para a visualização das proteínas totais e o outro foi transferido para uma membrana de PVDF e marcado com anticorpo anti-fosfotirosina. O padrão de expressão das proteínas totais e das proteínas fosforiladas em tirosina das células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl pode ser observado nas figuras 40 e 41.

Nas células HL-60.vetor podemos observar uma grande quantidade de “spots” no gel corado com azul de Coomassie, os quais estão distribuídos principalmente na faixa de massa molecular entre 20 e 90 kDa e em pH de 4-6 (Figura 40). Apesar da alta quantidade de proteína detectada nessa linhagem, a marcação com anti-fosfotirosina demonstra que somente uma fração muito pequena dessas proteínas está fosforilada em tirosina. Células HL-60.Bcr-Abl também apresentaram um grande número de “spots” no gel corado com azul de Coomassie e do mesmo modo ao observado para células HL-60.vetor, as proteínas expressas estão localizadas preferencialmente na faixa de pH de 4-6 e de massa molecular de 20-90 kDa (Figura 41). A alta atividade tirosina-quinase da molécula Bcr-Abl presente nessa linhagem fica evidente na marcação com o anticorpo anti-fosfotirosina, que revelou a grande quantidade de “spots” que representam proteínas fosforiladas em tirosina. Essas fosfoproteínas estão distribuídas por todo o gel, sendo visualizadas inclusive em áreas do gel que na marcação com azul de Coomassie não foram detectados “spots”. Tal contraste entre o padrão do proteoma e do fosfoproteoma, pode ser explicado pela enorme diferença na sensibilidade e especificidade dos dois métodos de detecção de proteínas aqui utilizados. Contrastando esses dados com os obtidos em eletroforese unidimensional, nota-se que o número de “spots” que representam proteínas fosforiladas em tirosina detectados na técnica de gel bidimensional é muito superior à quantidade de bandas visualizada em um gel de uma dimensão. Para poder comparar os resultados de HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl, as membranas foram marcadas exatamente nas mesmas condições e os filmes mostrados nas figuras 40 e 41 representam filmes que foram expostos simultaneamente por 30 minutos nas membranas das duas linhagens. A diferença na quantidade de proteínas fosforiladas em tirosina de células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl fica ainda mais marcante quando analisamos o seu perfil em gel bidimensional.

Landscape figura 40

Landscape figura 41

Inicialmente esse trabalho estava focado em dois pontos principais: a análise de moléculas cuja expressão é modulada pela presença do Bcr-Abl e a descrição de substratos que se encontram fosforilados em células positivas para essa tirosina-quinase. No entanto, devido a dificuldades e imprecisões na sobreposição dos “spots” visualizados por azul de Coomassie e na marcação com antifosfotirosina, decidimos concentrar as análises no impacto de Bcr-Abl na expressão protéica global, deixando o estudo das fosfoproteínas para outro momento.

Para encontrar as proteínas diferencialmente expressas relacionadas aos efeitos de Bcr-Abl, foram comparados os géis de HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl corados com azul de Coomassie. Todas as figuras de gel ou de áreas de gel apresentadas a seguir foram feitas a partir das imagens utilizadas nas figuras 40 e 41. A instantânea e superficial comparação entre os géis de HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl corados com azul de Coomassie já permite que semelhanças e diferenças na distribuição e intensidade dos “spots” sejam vislumbradas (Figura 42).

A análise mais refinada e precisa dos géis e das alterações observadas em células que expressam Bcr-Abl pôde ser realizada com o emprego do programa “ImageMaster 2D Platinum”. Esse programa possibilita tanto a detecção dos “spots”, como a comparação entre os géis e a quantificação das alterações nas intensidades dos “spots”, sendo uma ferramenta eficiente para encontrar proteínas diferencialmente expressas. Utilizando a ferramenta de auto-deteção de “spots” disponível no programa, foram detectados 592 “spots” no gel de HL-60.vetor e 532 no gel de HL-60.Bcr-Abl. A grande maioria dos “spots” é bem definida, no entanto, em alguns casos, os “spots” fazem parte de rastros de proteínas e em muitos casos todos os “spots” encontrados nos rastros representam a mesma proteína. Na figura 43 estão apresentados os dois géis lado a lado e seus respectivos “spots”.

Landscape figura 42

Landscape figura 43

Visto que a expressão de Bcr-Abl ativa diversas vias de sinalização e dentre outras coisas provoca alterações pós-traducionais em uma série de proteínas (fosforilação, em tirosina, por exemplo), optamos por extrair a maioria dos “spots” presentes nos dois géis para serem analisados por espectrometria de massas e identificados. Dessa forma, foram selecionados para serem retirados dos géis, os “spots” com valor maior que 0,02 % de volume e aqueles que, embora tivessem uma porcentagem de volume menor do que o valor mencionado, pareciam interessantes para a investigação por algum motivo, como o fato de estarem diferencialmente expressos nas duas linhagens. O valor de 0,02% foi definido com base nos dados dos “spots” que eram considerados de baixa intensidade e de pouca chance de identificação. A retirada e processamento de 495 “spots” do gel de HL-60.vetor e de 510 “spots” do gel de HL-60.Bcr-Abl, foram realizadas pelo sistema automatizado “Ettan Spot Handling Workstation”. As proteínas foram digeridas *in gel* pela enzima tripsina e os produtos da digestão trípica foram analisados em um espectrômetro de massas do tipo MALDI-ToF/Pro. Para a identificação das proteínas foram utilizados os banco de dados do NCBI e do SwissProt.

Duas estratégias principais foram aplicadas para descrição das proteínas diferencialmente expressas: **1)** o pareamento dos “spots” comuns às células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl e **2)** a análise dos “spots” visualizados somente em uma das linhagens.

A primeira estratégia foi o pareamento dos “spots” que podiam ser observados nas duas linhagens. Nesse tipo de análise, os “spots” correspondentes, ou seja, presentes nas duas linhagens, são reunidos em grupos. Utilizando-se os valores de % de volume de cada “spot” foi analisado quantas vezes um dado “spot” está aumentado ou diminuído em células HL-60.Bcr-Abl em relação às células HL-60.vetor, propiciando, portanto, a quantificação do valor de alteração dos “spots”. A outra estratégia foi a identificação dos “spots” encontrados em somente uma das duas linhagens, que denominamos “exclusivos”. É importante ressaltar que esse termo se refere tão-somente à presença do “spot” em uma região específica do gel de cada linhagem, conforme a resolução dos métodos de detecção utilizados. Essa exclusividade não significa, portanto, a inexistência definitiva do “spot” na outra linhagem, pois existe a possibilidade de que ele pudesse ser detectado com outros métodos mais sensíveis (ex: detecção com prata ou reagentes fluorescentes). Da mesma forma, não é possível afirmar que a proteína representada por um “spot exclusivo” seja de fato expressa em apenas uma das linhagens, visto que uma mesma proteína pode ser representada por mais de um “spot” e, como não obtivemos a identificação de todos eles, não podemos excluir a presença de uma certa proteína em outras áreas dos géis. Portanto, a presença de um “spot exclusivo” pode

resultar de dois possíveis efeitos da ação de Bcr-Abl: o aparecimento ou desaparecimento de uma proteína em uma dada linhagem, ou alterações (ex: fosforilação) que acarretem mudanças na massa molecular e/ou ponto isoelétrico das proteínas.

A comparação entre os géis de HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl permitiu, por meio do pareamento dos “spots”, a formação de 267 grupos (Figura 44). Para evitar erros de pareamento, os rastros e os “spots” localizados em regiões dos géis que estavam muito diferentes entre as duas linhagens não foram agrupados e nem considerados na análise dos “exclusivos”, sendo agrupados somente os “spots” bem definidos e cujo pareamento não era duvidoso.

Os “spots” que foram agrupados puderam ser analisados quanto ao fator de alteração e para a análise diferencial foram utilizados os valores de volume relativo (% de volume). As alterações nas intensidades dos “spots” foram consideradas significativas quando o valor de % de volume de um “spot” foi alterado para valor maior ou igual a 2 vezes entre as amostras. Dentre os “spots” agrupados, 111 estavam diferencialmente expressos e os demais 156 “spots” não foram alterados pela expressão de Bcr-Abl (Figura 45). Dos 111 “spots” diferencialmente expressos nas duas linhagens, 64 tiveram sua intensidade aumentada (Figura 46) e 47 (Figura 47) estavam diminuídos nas células HL-60.Bcr-Abl em comparação às células HL-60.vetor.

Landscape figura 44

Landscape figura 45

Landscape figura 46

Landscape figura 47

Para ilustrar como as proteínas foram identificadas, o espectro de massas de um dos “spots” identificados e que tem intensidade aumentada em células HL-60.Bcr-Abl (grupo 3085) está mostrado na Figura 48. A lista de massas obtida foi usada para a identificação da proteína no banco de dados do SwissProt com a ferramenta Mascot. Parte do relatório da identificação está relatado nas figuras 49 e 50. A primeira parte (Figura 49) contém a lista dos parâmetros utilizados na busca e uma relação de proteínas candidatas. No entanto, como pode ser observado, nessa identificação só uma das proteínas listadas, a peroxiredoxina-2, apresentava valores de “score” e “expectation” significativos. Na segunda parte do relatório (Figura 50) são mostrados alguns detalhes da identificação, incluindo os dados específicos da proteína candidata bem como a sua sequência de aminoácidos e o quanto dessa sequência foi coberta pelos peptídeos utilizados na busca (cobertura ou “coverage”).

FIGURA 48: Espectro de massas utilizado na identificação dos “spots” do grupo 3085.

Mascot Search Results

User : Ana Elisa
 Email : anabbueno@yahoo.com
 Search title :
 Database : SwissProt 54.3 (285335 sequences; 104773129 residues)
 Taxonomy : Homo sapiens (human) (17399 sequences)
 Timestamp : 11 Oct 2007 at 23:14:27 GMT
 Top Score : 216 for **PRDX2_HUMAN**, Peroxiredoxin-2 - Homo sapiens (Human)

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 55 are significant ($p < 0.05$).

Concise Protein Summary Report

Format As

Concise Protein Summary

[Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$

Max. number of hits AUTO

Re-Search All

Search Unmatched

1. [PRDX2_HUMAN](#) Mass: 21878 Score: **216** Expect: 4.4e-18 Queries matched: Peroxiredoxin-2 - Homo sapiens (Human)
[WDR32_HUMAN](#) Mass: 60544 Score: 42 Expect: 1.2 Queries matched: 4
 WD repeat-containing protein 32 - Homo sapiens (Human)
[RHEB_HUMAN](#) Mass: 20485 Score: 39 Expect: 2.2 Queries matched: 3
 GTP-binding protein Rheb precursor - Homo sapiens (Human)
[WDR55_HUMAN](#) Mass: 42097 Score: 36 Expect: 4.4 Queries matched: 3
 WD repeat-containing protein 55 - Homo sapiens (Human)
[HIF1A_HUMAN](#) Mass: 92612 Score: 35 Expect: 5.1 Queries matched: 4
 Hypoxia-inducible factor 1 alpha - Homo sapiens (Human)
[ECBP1_HUMAN](#) Mass: 40546 Score: 34 Expect: 6.5 Queries matched: 3
 EF-hand calcium-binding protein 1 - Homo sapiens (Human)
[PCCA_HUMAN](#) Mass: 77305 Score: 34 Expect: 7.1 Queries matched: 4
 Proton-coupled CoA carboxylase alpha chain mitochondrial precursor - Homo sapiens

Search Parameters

Type of search : Peptide Mass Fingerprint
 Enzyme : Trypsin
 Mass values : Monoisotopic
 Protein Mass : Unrestricted
 Peptide Mass Tolerance : ± 0.1 Da
 Peptide Charge State : 1+
 Max Missed Cleavages : 1
 Number of queries : 13

FIGURA 49: Identificação do “spot” 3085 pelo Mascot. O produto da digestão triptica do “spot” 3085 foi analisado por espectrometria de massas e a lista de valores de m/z obtida foi utilizada para a identificação da proteína no Mascot. Relatório do Mascot (Parte 1) usando o banco de dados de proteínas do SwissProt.

MASCOT Mascot Search Results

Protein View

Match to: **PRDX2_HUMAN** Score: **216** Expect: **4.4e-18**
Peroxiredoxin-2 - Homo sapiens (Human)

Nominal mass (M_r): **21878**; Calculated pI value: **5.66**

NCBI BLAST search of [PRDX2_HUMAN](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: **13**

Number of mass values matched: **11**

Sequence Coverage: **44%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MASGNAR**IGK PAPDFKATAV VDGAFKEVKL** SDYKGKYVVL FFYPLDFTFV
 51 CPTETIAFSN RAEDFRKLGK EVLGVSVD SQ FTHLAWINTP **RKEGGLGPLN**
 101 **IPLLADVTRR LSEDYGVLT DEGIAYRGLF IIDGKGVLRQ ITVNDLPVGR**
 151 SVDEALRLVQ AFQYTDEHGE VCPAGWKPGS DTIKENVDDS **KEYFSKHN**

Show predicted peptides also

Sort Peptides By

☒ Residue Number ☐ Increasing Mass ☐ Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
8 - 16	972.4910	971.4837	971.5440	-0.0603	0	R.IGKPAPDFK.A
17 - 29	1334.6560	1333.6487	1333.7242	-0.0754	1	K.ATAVVDGAFKEVK.L
92 - 109	1863.0450	1862.0377	1862.0625	-0.0248	1	R.KEGGLGPLNIPLLADV
93 - 109	1734.9460	1733.9387	1733.9676	-0.0289	0	K.EGGLGPLNIPLLADV
93 - 110	1891.0670	1890.0597	1890.0687	-0.0090	1	K.EGGLGPLNIPLLADV
110 - 119	1179.6420	1178.6347	1178.6295	0.0052	1	R.RLSEDYGVLT.T
111 - 127	1928.9140	1927.9067	1927.9527	-0.0460	1	R.LSEDYGVLTDEGIAY
128 - 135	862.4620	861.4547	861.4960	-0.0413	0	R.GLFIIDGK.G
128 - 139	1287.7100	1286.7027	1286.7711	-0.0683	1	R.GLFIIDGKGVLR.Q
140 - 150	1211.6460	1210.6387	1210.6670	-0.0283	0	R.QITVNDLPVGR.S
192 - 198	924.3990	923.3917	923.4137	-0.0220	1	K.EYFSKHN.-

No match to: 897.5130, 1194.6360

FIGURA 50: Identificação do “spot” 3085 pelo Mascot. O produto da digestão triptica do “spot” 3085 foi analisado por espectrometria de massas e a lista de valores de m/z obtida foi utilizada para a identificação da proteína no Mascot. Relatório do Mascot (Parte 2) usando o banco de dados de proteínas do SwissProt.

4.3.1.1 “SPOTS” COM MAIOR INTENSIDADE EM CÉLULAS HL-60.BCR-ABL

Dos 64 “spots” agrupados que estão aumentados em células HL-60.Bcr-Abl, 25 foram identificados, representando 24 proteínas distintas (Tabela 1, Figura 51).

Tabela 1 : Proteínas de “spots” aumentados em células HL-60.Bcr-Abl.

nº grupo	Identidade	Cov. (%)	Exp.	pI (T)	MM (T)	Número de acesso	Símbolo da proteína	Fator de alteração
2997	Heat-shock protein beta-1	33	0.000	6.0	22.8	P04792	HSPB1_HUMAN	11.6
2551	Vimentin	24	0.000	5.1	53.6	P08670	VIME_HUMAN	10.4
3069	Glutathione S-transferase P	30	0.001	5.4	23.3	P09211	GSTP1_HUMAN	6.0
2543	Vimentin	21	0.000	5.1	53.6	P08670	VIME_HUMAN	5.0
3085	Peroxiredoxin-2	44	0.000	5.7	21.9	P32119	PRDX2_HUMAN	4.6
2717	Mannose-6-phosphate receptor-binding protein 1	28	0.000	5.3	47.0	O60664	M6PBP_HUMAN	4.3
2582	Tubulin alpha-1C chain	34	0.000	5.0	49.9	Q9BQE3	TBA1C_HUMAN	3.2
2367	Zinc finger protein 442	14	0.028	9.0	72.8	Q9H7R0	ZN442_HUMAN	3.0
2990	Chain A. 14-3-3 Protein Epsilon (Human) Complexed to Peptide	32.5	0.020	4.9	26.9	P62258	1433E_HUMAN	3.0
3561	40S ribosomal protein SA (p40)	22	0.000	4.8	32.8	P08865	RSSA_HUMAN	2.9
2449	Heat shock cognate 71 kDa protein	19	0.000	5.4	70.9	P11142	HSP7C_HUMAN	2.8
2972	nuclear chloride channel	23.7	0.000	5.0	27.3	O00299	CLIC1_HUMAN	2.8
2425	Stress-induced-phosphoprotein 1	16	0.000	6.4	62.6	P31948	STIP1_HUMAN	2.6
2894	Serpin B12	13	0.027	5.4	46.2	Q96P63	SPB12_HUMAN	2.6
3019	Peroxiredoxin-4	13	0.046	5.9	30.5	Q13162	PRDX4_HUMAN	2.6
2826	Protein SET (Phosphatase 2A inhibitor I2PP2A)	22	0.000	4.2	33.5	Q01105	SET_HUMAN	2.5
2617	PDZ and LIM domain protein 2	14	0.030	9.0	37.4	Q96JY6	PDLI2_HUMAN	2.4
2523	Chain B, Crystal Structure Of Constant Regulatory Domain Of Human Pp2a. Pr65alpha	16	0.077	5.0	66.0	P30153	2AAA_HUMAN	2.4
2595	Nucleosome assembly protein 1-like 1	10	0.013	4.4	45.3	P55209	NP1L1_HUMAN	2.4
2505	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	11	0.008	5.4	50.9	P61978	HNRPK_HUMAN	2.4
2581	RAD23B protein	16.1	0.033	4.8	43.2	P54727	RD23B_HUMAN	2.3
2919	Splicing factor. arginine/serine-rich 7 (Splicing factor 9G8)	26	0.000	11.8	27.4	Q16629	SFRS7_HUMAN	2.3
2625	Tubulin beta chain	25	0.000	4.8	49.6	P07437	TBB5_HUMAN	2.1
2587	Tubulin alpha-1C chain	26	0.000	5.0	49.9	Q9BQE3	TBA1C_HUMAN	2.1
2774	BAG family molecular chaperone regulator 5	13	0.032	5.8	51.2	Q9UL15	BAG5_HUMAN	2.0

Cov: Coverage. **Exp.:** Expectation. **pI (T):** ponto isoelétrico teórico. **MM (T):** massa molecular teórica. **Fator de alteração:** quantas vezes está mais expresso em células HL-60.Bcr-Abl do que em HL-60.vetor.

FIGURA 51: Análise diferencial das proteínas expressas em células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl. Áreas dos géis de HL-60.vetor (à esquerda) e HL-60.Bcr-Abl (à direita). Os “spots” encontrados nas duas linhagens foram agrupados e comparados quanto aos seus valores de % de volume. As setas mostram alguns dos “spots” cuja expressão está aumentada em células que expressam Bcr-Abl. Ao lado de cada área, a identificação dos “spots” marcados e o fator de alteração (quantas vezes está mais expresso em células HL-60.Bcr-Abl do que em células HL-60.vetor).

Dos 13 “spots” potencialmente interessantes encontrados somente no gel de HL-60.Bcr-Abl e que foram selecionados para análise, nove foram identificados (Tabela 2, Figura 52). Alguns dos “spots” visualizados somente em HL-60.Bcr-Abl representam a mesma proteína de “spots” que estavam aumentados nessa linhagem na análise dos grupos. Dentre eles a proteína vimentina que em dois “spots” está mais expressa e é também uma proteína de um “spot” exclusivo de células que expressam Bcr-Abl. Outro exemplo é “Heat shock protein beta-1”.

Tabela 2: Proteínas de “spots” exclusivos de HL-60.Bcr-Abl.

nº spot	Identidade	Cov. (%)	Exp.	pI (T)	PM (T)	Número de acesso	Símbolo da proteína
3692	Vimentin	24	0.000	5.06	53.6	P08670	VIME_HUMAN
3819	NI						
4195	Serpin B9	25	0.000	5.61	42.4	P50453	SPB9_HUMAN
4992	Glyoxalase I	36.4	0.004	5.1	21.0	Q04760	LGUL_HUMAN
4083	Keratin, type I cytoskeletal 18	33	0.000	5.34	48.0	P05783	K1C18_HUMAN
3848	Keratin, type II cytoskeletal 8	27	0.000	5.52	53.7	P05787	K2C8_HUMAN
3769	Retinal dehydrogenase 2	11	0.041	5.79	56.7	O94788	AL1A2_HUMAN
4192	NI						
4236	NI						
4345	Tubulin alpha-1C chain	26	0.000	4.96	49.9	Q9BQE3	TBA1C_HUMAN
4444	Elongation factor 1-delta	16	0.037	4.9	31.1	P29692	EF1D_HUMAN
4665	NI						
4819	Heat-shock protein beta-1	36	0.000	5.98	22.8	P04792	HSPB1_HUMAN

Cov: Coverage. **Exp.:** Expectation. **pI (T):** ponto isoelétrico teórico. **MM (T):** massa molecular teórica. **NI=** “spot” não identificado.

FIGURA 52: Análise diferencial das proteínas expressas em células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl. Comparação de áreas dos géis de HL-60.vetor (à esquerda) e HL-60.Bcr-Abl (à direita). As setas indicam os “spots” que foram observados exclusivamente em células HL-60.Bcr-Abl. Os “spots” circutados são aqueles que foram agrupados por serem visualizados em ambos os géis. Ao lado de cada área, a identificação dos “spots” indicados com as setas e entre parênteses o número do “spot”. NI= “spot” não identificado.

As proteínas moduladas positivamente por Bcr-Abl estão relacionadas a diversos processos celulares e podem ser agrupadas conforme as suas funções em:

- Proteínas estruturais e moléculas relacionadas à adesão e mobilidade celular: vimentina (2 “spots”), alfa-tubulina (2 “spots”), beta-tubulina, “PDZ and LIM domain protein 2”, citoqueratina 8 e citoqueratina 18.
- Crescimento e Proliferação celular: “Nucleosome assembly protein 1-like 1”.
- Processamento de RNA e controle da transcrição e tradução: “Zinc finger protein 442”, “40S ribosomal protein SA”, SET, Ribonucleoproteína nuclear heterogênea K, “Splicing factor, arginine/serine-rich 7” e “Elongation factor 1-delta”.
- Metabolismo: “Glutathione S-transferase P”, Glioxalase I e desidrogenase retinal 2.
- Transdução de sinais: 14-3-3 épsilon, “40S ribosomal protein SA”, Serpina B9, Serpina B12 e SET.
- Chaperonas e moléculas envolvidas na resposta a estresse: Proteína de choque térmico beta-1, “Glutathione S-transferase P”, Peroxiredoxina-2, “Heat shock cognate 71 kDa protein”, Fosfoproteína 1 induzida por estresse, Peroxiredoxina-4, homólogo B de RAD23 e “BAG family molecular chaperone regulator 5”.
- Reparo de DNA: homólogo B de RAD23.
- Transporte: “Mannose-6-phosphate receptor-binding protein 1” e Proteína de canal de cloreto intracelular 1.

4.3.1.2 “SPOTS” REGULADOS NEGATIVAMENTE EM CÉLULAS HL-60.BCR-ABL

Quanto às proteínas que foram reguladas negativamente pela expressão de Bcr-Abl, dos 47 “spots” agrupados, foram identificados 23 “spots” representando 19 proteínas distintas (Tabela 3, Figura 53).

Tabela 3: Proteínas de “spots” regulados negativamente em células HL-60.Bcr-Abl.

nº grupo	Identidade	Cov. (%)	Exp.	pI (T)	PM (T)	Número de acesso	Símbolo da proteína	Fator de alteração
2461	Plastin-2	25	0.000	5.2	70.2	P13796	PLSL_HUMAN	18.4
2424	Heat shock cognate 71 kDa protein	19	0.000	5.37	70.9	P11142	HSP7C_HUMAN	7.5
2565	Protein disulfide-isomerase precursor	20	0.000	4.76	57.1	P07237	PDIA1_HUMAN	5.0
2948	Purine nucleoside phosphorylase	24.9	0.000	7.1	32.4	P00491	PNPH_HUMAN	4.5
2784	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)/ Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	30	0.000	5.29/ 5.31	41.7/ 41.8	P60709/ P63261	ACTB_HUMAN/ ACTG_HUMAN	4.3
2585	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)/ Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	20	0.000	5.29/ 5.31	41.7/ 41.8	P60709/ P63261	ACTB_HUMAN/ ACTG_HUMAN	4.1
2861	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	18	0.014	8.57	36.0	P04406	G3P_HUMAN	3.9
2654	Actin-like protein 3 (Actin-related protein 3)	14	0.031	5.61	47.3	P61158	ARP3_HUMAN	3.9
2750	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)/ Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	20	0.000	5.29/ 5.31	41.7/ 41.8	P60709/ P63261	ACTB_HUMAN/ ACTG_HUMAN	3.6
2407	Annexin A6	23	0.000	5.42	75.8	P08133	ANXA6_HUMAN	3.6
2635	RuvB-like 2	22	0.000	5.49	51.1	Q9Y230	RUVB2_HUMAN	3.4
2553	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)/ Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	10	0.030	5.29/ 5.31	41.7/ 41.8	P60709/ P63261	ACTB_HUMAN/ ACTG_HUMAN	2.9
2536	PRAME family member 14	14	0.048	8.7	49.4	Q5SWL7	PRA14_HUMAN	2.7
2460	Lamin-B2	13	0.006	5.29	67.6	Q03252	LMNB2_HUMAN	2.6
2816	Serine/threonine protein kinase MASK	20.0	0.068	5.1	46.8	Q9P289	MST4_HUMAN	2.4
2978	Proteasome activator complex subunit 1	22	0.002	5.78	28.7	Q06323	PSME1_HUMAN	2.4
2690	26S protease regulatory subunit 6B	35	0.000	5.09	47.3	P43686	PRS6B_HUMAN	2.3
2724	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)/ Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	20	0.000	5.29/ 5.31	41.7/ 41.8	P60709/ P63261	ACTB_HUMAN/ ACTG_HUMAN	2.3
3071	TCTP	37.2	0.002	5	19.7	P13693	TCTP_HUMAN	2.3
2584	Protein disulfide-isomerase precursor	31	0.000	4.76	57.1	P07237	PDIA1_HUMAN	2.2
2534	T-complex protein 1 subunit theta	22	0.000	5.42	59.6	P50990	TCPQ_HUMAN	2.1
3026	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 (Rho GDI 1)	25	0.019	5.02	23.2	P52565	GDIR_HUMAN	2.0
2507	Lactase-like protein precursor	10	0.042	8.17	65.0	Q6UWM7	LCTL_HUMAN	2.0

Cov: Coverage. Exp.: Expectation. pI (T): ponto isoelétrico teórico. MM (T): massa molecular teórica. Fator de alteração: quantas vezes está menos expresso nas células HL-60.Bcr-Abl do que em HL-60.vetor.

FIGURA 53: Análise diferencial das proteínas expressas em células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl. Áreas dos géis de HL-60.vetor (à esquerda) e HL-60.Bcr-Abl (à direita). Os “spots” encontrados nas duas linhagens foram agrupados e comparados quanto à sua intensidade. As setas mostram alguns dos “spots” cuja expressão está diminuída em células que expressam Bcr-Abl. Ao lado de cada área, a identificação dos “spots” marcados e o fator de alteração (quantas vezes está menos expresso em células HL-60.Bcr-Abl do que em células HL-60.vetor).

Dos oito “spots” potencialmente interessantes encontrados somente em HL-60 e que foram selecionados para análise, cinco foram identificados (Tabela 4, Figura 54). Alguns desses “spots” representam a mesma proteína que estava diminuída no gel das células HL-60.vetor na análise dos grupos, como a proteína Plastina-2.

Tabela 4: Proteínas de “spots” exclusivos de HL-60.vetor.

nº spot	Identidade	Cov. (%)	Exp.	pI (T)	PM (T)	Número de acesso	Símbolo da proteína
2781	Plastin-2	19	0.000	5.2	70.2	P13796	PLSL_HUMAN
3141	NI						
3133	NSFL1 cofactor p47	29	0.000	5.0	40.5	Q9UNZ2	NSF1C_HUMAN
2778	NA						
2777	NI						
3637	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	11	0.058	5.1	23.0	P52566	GDIS_HUMAN
3565	Prohibitin	55	0.000	5.6	29.8	P35232	PHB_HUMAN
2928	T-complex protein 1 subunit beta	32	0.000	6.0	57.5	P78371	TCPB_HUMAN

Cov: Coverage. Exp.: Expectation. pI (T): ponto isoelétrico teórico. MM (T): massa molecular teórica. NI= “spot” não identificado. NA= “spot” não analisado.

FIGURA 54: Análise diferencial das proteínas expressas em células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl. Comparação de áreas dos géis de HL-60.vetor (à esquerda) e HL-60.Bcr-Abl (à direita). As setas indicam os “spots” que foram observados exclusivamente em células HL-60.vetor. Os “spots” circutados são aqueles que foram agrupados por serem visualizados em ambos os géis. Ao lado de cada área a identificação dos “spots” indicados com as setas e entre parênteses o número do spot. NI= “spot” não identificado. NA= “spot” não analisado.

As proteínas reguladas negativamente por Bcr-Abl estão principalmente associadas às seguintes funções:

- Proteínas estruturais e moléculas relacionadas à adesão e mobilidade celular: Actina, “Actin-related protein 3”, Lamina-B2, plastina-2, “Rho GDP-dissociation inhibitor 1” e “Rho GDP-dissociation inhibitor 2”.
- Crescimento e proliferação celular: “RuvB-like 2”, “Serine/threonine-protein kinase MST4” e “Prohibitin”.
- Processamento de RNA, controle da transcrição e tradução e “folding” de proteínas: “Protein disulfide-isomerase precursor”, “Purine nucleoside phosphorylase”, “RuvB-like 2”, “T-complex protein 1 subunit theta”, “T-complex protein 1 subunit beta” e “Prohibitin”.
- Metabolismo: “Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase”.
- Transdução de sinal: Anexina A6 e “Rho GDP-dissociation inhibitor 1”.
- Regulação da apoptose: “Serine/threonine-protein kinase MST4”, “Translationally-controlled tumor protein (TCTP)” e “Rho GDP-dissociation inhibitor 1”.
- Degradação de proteínas: “26S protease regulatory subunit 6B”.
- Resposta imune: “Proteasome activator complex subunit 1”.
- Resposta a estresse: “Heat shock cognate 71 kDa protein”.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 CONTRIBUIÇÃO DA SINALIZAÇÃO INDEPENDENTE DA ATIVIDADE TIROSINA-QUINASE DE BCR-ABL PARA A RESISTÊNCIA À APOPTOSE

O equilíbrio entre os sinais gerados por proteínas quinases e fosfatases é essencial para o controle apropriado da sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (Hunter, 1995). A relevância desse balanço de atividades enzimáticas pode ser exemplificada pelo fato de que sua alteração está associada à fisiopatologia de algumas leucemias humanas. Nessas doenças observa-se freqüentemente translocações cromossômicas cujo produto gênico codifica proteínas tirosina-quinases constitutivamente ativadas. Nesse contexto, a Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é o protótipo das neoplasias desencadeadas por quinases oncogênicas, na qual a translocação cromossômica resulta na produção da oncoproteína quimérica Bcr-Abl que possui elevada atividade tirosina-quinase. (Perrotti e Neviani, 2006).

O potencial oncogênico de Bcr-Abl e seu papel na patogênese das leucemias cromossomo Ph⁺ são incontestáveis. Em células hematopoéticas, a expressão de Bcr-Abl induz resistência à apoptose, independência de fatores de crescimento, alterações nas interações célula-célula e célula-matriz e leucemogênese, sendo, portanto, importante para a transformação maligna celular (Verfaillie et al., 1992; Sirard et al., 1994; Skorski et al., 1998). Além disso, cada vez mais há evidências indicando que a expressão de Bcr-Abl está envolvida na progressão da LMC da fase crônica para a crise blástica.

A habilidade de Bcr-Abl em induzir e sustentar o fenótipo leucêmico parece depender diretamente de sua atividade tirosina-quinase constitutiva e de sua localização citoplasmática. A proteína Bcr-Abl recruta e aciona múltiplas vias de sinalização que transmitem os sinais oncogênicos, promovendo proliferação celular independente de fatores de crescimento, resistência à apoptose, aumento da sobrevivência e alteração da diferenciação dos precursores mielóides (Bedi et al., 1994; McGahon et al., 1994; Perrotti e Neviani, 2006).

A proteína c-Abl pode ser encontrada no núcleo e no citoplasma. Isso porque essa proteína possui seqüências de localização nuclear (NLS) e uma seqüência de exportação nuclear (NES), que medeiam o seu trânsito entre esses compartimentos celulares. c-Abl nuclear pode ser ativada por meio de certas lesões no DNA e, juntamente com p73 ativado, está envolvida no desencadeamento da apoptose por dano ao DNA (Wang, 2000). Embora Bcr-Abl conserve em sua estrutura os três sinais de localização nuclear de Abl e o sinal de exportação, essa oncoproteína está localizada exclusivamente no citoplasma e é uma potente molécula anti-apoptótica. A retenção citoplasmática de Bcr-Abl parece estar associada à

ausência de sua importação para o núcleo e depende, pelo menos em parte, de sua atividade tirosina-quinase, uma vez que o tratamento de células transformadas por Bcr-Abl com o mesilato de imatinibe, restaura parcialmente a importação de Bcr-Abl para o núcleo. Utilizando o agente leptomicina B, que inibe a exportação nuclear via Crm1/exportina-1, Vigneri e Wang demonstraram que o aprisionamento de Bcr-Abl no núcleo, seguido da reativação de sua atividade tirosina-quinase pela remoção do mesilato de imatinibe da cultura, promove a morte celular. Esse resultado mostra a importância da localização citoplasmática e da atividade tirosina-quinase constitutivamente elevada de Bcr-Abl para seus efeitos oncogênicos e demonstra que os efeitos antagônicos de Bcr-Abl e Abl sobre a apoptose, estão fortemente associados às diferenças na atividade enzimática e na localização dessas proteínas no interior da célula (Vigneri e Wang, 2001).

A transformação do fenótipo celular, de normal para maligno, mediada por Bcr-Abl se dá por meio da ativação de diversas vias de sinalização, incluindo as vias Ras, PI3-k/Akt, STATs e NFκB. Diversas abordagens experimentais já foram utilizadas para descrever os alvos de fosforilação diretos ou indiretos de Bcr-Abl. Algumas das moléculas identificadas como alvos de Bcr-Abl são: Grb2, Shc, Sos, Ras, Raf-1, Cbl, Crkl, Akt, STAT5 e Fak (Deininger et al., 2000; Jagani et al., 2007)

Uma das provas irrefutáveis da relevância de Bcr-Abl na fisiopatologia da LMC é a capacidade do inibidor de tirosina-quinase Abl, mesilato de imatinibe, de induzir apoptose seletivamente em células transformadas por Bcr-Abl e promover remissão molecular e citogenética em pacientes na fase crônica da doença (Jagani et al., 2007). Embora o mesilato de imatinibe seja eficaz no tratamento de pacientes com LMC, uma porcentagem significativa dos pacientes desenvolve resistência ao inibidor e/ou ainda progride para a crise blástica. Os mecanismos envolvidos na resistência variam, estando frequentemente associados a mutações no domínio quinase de Bcr-Abl ou à superexpressão dessa oncoproteína. Por razões desconhecidas o mesilato de imatinibe não é tão eficiente no tratamento de pacientes com LMC na crise blástica e B-ALL Ph⁺, o que não parece estar associado a mutações no domínio quinase, sugerindo que talvez, para essas doenças, a inativação somente de Bcr-Abl não seja suficiente para controlar a patologia (Li e Li, 2007). Além disso, alguns trabalhos sugerem que as células tronco leucêmicas na LMC são resistentes ao tratamento com mesilato de imatinibe, o que explicaria a persistência da doença (Copland et al., 2006).

O grande potencial anti-apoptótico de Bcr-Abl limita também a eficácia do uso de drogas quimioterapêuticas para o tratamento de LMC (Bedi et al., 1995). Sendo assim, a compreensão das vias de sinalização utilizadas por Bcr-Abl para inibir a apoptose é

fundamental para a obtenção de novas estratégias terapêuticas para pacientes resistentes ao mesilato de imatinibe.

Apesar da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl ser essencial para a indução do fenótipo leucêmico, surgem cada vez mais dados que confirmam ou sugerem propriedades da molécula Bcr-Abl que não estão relacionadas diretamente à sua atividade enzimática. As primeiras evidências de que Abl tem funções independentes de sua atividade tirosina-quinase, vieram de estudos em *Drosófila* (Henkemeyer et al., 1990). Zhelev e colaboradores mostraram em um estudo de microarray que a supressão da síntese de bcr-abl por siRNAs ou a inibição da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl pelo mesilato de imatinibe, alteram de modo diferente a expressão de genes envolvidos na regulação da apoptose e na proliferação e crescimento celular, sugerindo que nem todos os sinais enviados por Bcr-Abl dependem de sua atividade enzimática (Zhelev et al., 2004). Wertheim e colaboradores mostraram que os defeitos de adesão de células que expressam Bcr-Abl, como o aumento da ligação à fibronectina, são independentes da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl. Além disso, esses autores sugerem que a localização de Bcr-Abl nos filamentos de actina também ocorre por meio de mecanismos independentes da sua atividade quinase (Wertheim et al., 2002).

Embora muitos trabalhos tenham sido publicados sobre as vias de sinalização ativadas por Bcr-Abl, os mecanismos moleculares envolvidos na transformação celular e, em especial, na resistência à apoptose mediada por essa oncoproteína ainda não estão completamente esclarecidos. Com o intuito de avaliar a importância da atividade tirosina-quinase para a resistência à apoptose induzida por Bcr-Abl, foram adotadas, neste trabalho, duas estratégias experimentais: a inibição farmacológica da sua atividade enzimática e o estudo dos efeitos da expressão da forma mutante quinase-deficiente de Bcr-Abl.

Para os estudos envolvendo o inibidor mesilato de imatinibe, utilizamos células HL-60.vetor, HL-60.Bcr-Abl (OW e JW) e as linhagens derivadas de pacientes com LMC na crise blástica: K562, KCL22 e LAMA-84. Por serem de origem mielóide e negativas para o cromossomo Ph e para Bcr-Abl, células HL-60 são muito utilizadas como controle nos estudos comparativos entre células positivas para Bcr-Abl e células que não expressam essa oncoproteína. A comparação de células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl foi a ferramenta empregada na análise dos efeitos de Bcr-Abl e de sua inibição pelo mesilato de imatinibe. Isso porque, por apresentarem o mesmo “background” genético, diferenças fenotípicas observadas entre essas duas linhagens estão possivelmente associadas à expressão de Bcr-Abl. Além disso, para analisar a relevância clínica dos dados obtidos com a expressão ectópica de Bcr-Abl, foram incluídas nesse estudo algumas linhagens derivadas de pacientes com LMC que, portanto, possuem o cromossomo Ph e expressam Bcr-Abl de maneira endógena. Uma

particularidade de células HL-60, que as torna especialmente interessante para o estudo das propriedades anti-apoptóticas de Bcr-Abl, é que elas são muito sensíveis a uma grande variedade de estímulos pró-apoptóticos, mas se tornam extremamente resistentes à indução de morte, quando expressam Bcr-Abl ectopicamente (Amarante-Mendes et al., 1997; Amarante-Mendes et al., 1998b; Brumatti et al., 2003; Bueno-Da-Silva et al., 2003).

Nos ensaios de resistência à morte confirmamos que a expressão de Bcr-Abl, tanto ectópica como endógena, confere alta resistência à indução de apoptose pela Via Intrínseca. Essa resistência foi observada frente a drogas que possuem mecanismos de ação distintos, tais como: inibidores de DNA polimerase, inibidores de topoisomerase II, inibidores de proteína quinase e inibidores de transcrição e tradução. Além de bloquear a indução de apoptose pela Via Intrínseca, Bcr-Abl também promove resistência a estímulos iniciados pela Via Extrínseca, uma vez que células que expressam essa tirosina-quinase são mais resistentes à indução de morte por Fas e TRAIL (Fang et al., 2000; Brumatti et al., 2003).

Utilizando o modelo de células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl, além da linhagem K562, Amarante-Mendes e colaboradores mostraram que a expressão de Bcr-Abl é capaz de bloquear a liberação de citocromo-c das mitocôndrias para o citosol, prevenindo, assim, a ativação de caspases executoras e a indução de morte em células tratadas com drogas quimioterápicas (Amarante-Mendes et al., 1998b). Além de bloquear a liberação de citocromo c, Bcr-Abl inibe também a saída de Smac/Diablo da mitocôndria para o citosol (Yon, M, dados não publicados). O mecanismo pelo qual Bcr-Abl previne a saída dos fatores apoptogênicos da mitocôndria envolve a regulação dos membros da família Bcl-2.

Embora grande parte do potencial anti-apoptótico de Bcr-Abl possa ser atribuída à sua capacidade de regular a expressão e função de proteínas que coordenam os eventos mitocondriais desencadeados durante a apoptose, o bloqueio da morte por essa oncoproteína não parece ocorrer somente nessa organela. Uma evidência disso é que Bcr-Abl é capaz de prevenir também a indução de morte pela injeção direta de citocromo c no citoplasma. Esse efeito protetor pós-mitocondrial parece ocorrer no nível do apoptosomo executor, formado por pró-caspase-9, Apaf-1, citocromo-c e dATP, por meio de mecanismos pós-traducionais que inibem o recrutamento da pró-caspase-9 pelo Apaf-1 e impedem a formação desse apoptosomo. Apesar de Akt e Erk serem alvos de Bcr-Abl e poderem fosforilar caspase-9 e inibir sua atividade enzimática, não foi observada a fosforilação de caspase-9 nesse modelo. Como a expressão de Bcr-Abl também não afetou os níveis de expressão de Apaf-1 e caspase-9, uma das hipóteses levantadas pelos autores para explicar como Bcr-Abl interfere e bloqueia o recrutamento de caspase-9 por Apaf-1, foi a fosforilação de Apaf-1 na presença de Bcr-Abl

(Deming et al., 2004). O possível efeito protetor extra-mitocondrial de Bcr-Abl é também evidenciado quando analisamos os resultados obtidos por Brumatti e colaboradores, em nosso laboratório, que mostram que, comparado às moléculas anti-apoptóticas Bcl-x_L e Bcl-2, Bcr-Abl é um inibidor mais potente da morte celular, sugerindo que seu modo de ação pode não estar restrito apenas ao controle dos eventos mitocondriais (Brumatti et al., 2003).

Confirmado o fenótipo de resistência à apoptose conferido por Bcr-Abl, os efeitos do mesilato de imatinibe sobre a atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl foram investigados. Nos ensaios de western-blot, observamos que células que expressam Bcr-Abl apresentam grande quantidade de proteínas fosforiladas em tirosina, contrastando com células HL-60.vetor, que são escassas nesse tipo de fosfoproteína. Nas células que expressam Bcr-Abl, o tratamento com o mesilato de imatinibe por 18-24 horas reduziu drasticamente a quantidade de substratos fosforilados em tirosina e tal inibição foi dependente da dose do inibidor utilizada. Nessa curva de dose-resposta a menor dose do inibidor utilizada foi a de 0,4 µM que reduziu os substratos fosforilados em tirosina em mais de 50%. Esses dados estão de acordo com os primeiros estudos com mesilato de imatinibe da literatura, nos quais foi demonstrado que, para diversas linhagens celulares derivadas de LMC, incluindo K562, a concentração dessa droga necessária para a inibição de 50% (IC₅₀) da autofosforilação de Bcr-Abl é de 0,25-0,35 µM (Carroll et al., 1997) e que a inibição completa da autofosforilação de Bcr-Abl é atingida com 1 a 10 µM (Le Coutre et al., 1999). Nos nossos experimentos, verificamos que com a dose de 10 µM do inibidor de tirosina-quinase, a fosforilação de proteínas em resíduos de tirosina fica impedida e as células HL-60.Bcr-Abl passam a apresentar um perfil de marcação com anticorpo anti-fosfotirosina semelhante ao das células HL-60.vetor. O efeito dessa droga sobre a atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl é rápido, ocorre após 5 minutos de tratamento, e duradouro, uma vez que seu efeito inibitório perdura por pelo menos 24 horas, mostrando a grande estabilidade da ligação do mesilato de imatinibe com sua molécula alvo, o Bcr-Abl. Apesar dos efeitos inibitórios do mesilato de imatinibe sobre a atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl, a expressão de c-Abl e Bcr-Abl, como esperado e relatado na literatura, permanece inalterada (Fang et al., 2000).

A exposição ao mesilato de imatinibe por um tempo maior do que 24 horas induz morte em células que expressam Bcr-Abl, inclusive nas HL-60.Bcr-Abl, mas não afeta a viabilidade de células HL-60.vetor. Apesar dos efeitos tóxicos do mesilato de imatinibe ao longo do tempo, células que expressam Bcr-Abl mantêm a viabilidade celular quando tratadas com esse inibidor por um período curto (18-24 horas). Beran e colaboradores mostraram que, para a indução de apoptose nas células que expressam Bcr-Abl, é necessária a incubação com

mesilato de imatinibe por um período superior a 24 horas e que a remoção da droga antes deste tempo, resulta na recuperação do crescimento celular (Beran et al., 1998).

Para investigar se a atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl é crucial para seus efeitos anti-apoptóticos, analisamos se células que expressam Bcr-Abl são capazes de manter a resistência à apoptose quando a atividade enzimática de Bcr-Abl está bloqueada. Para isso, células HL-60.vetor, HL-60.Bcr-Abl, K562, KCL22 e LAMA-84 foram tratadas simultaneamente com o inibidor mesilato de imatinibe e drogas pró-apoptóticas por um período de 20-24 horas e analisadas quanto à porcentagem de morte por citometria de fluxo. A escolha do período de incubação foi baseada nos seguintes fatos: nesse tempo de tratamento o mesilato de imatinibe é capaz de inibir a atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl, mas sem afetar a viabilidade celular, e as células Bcr-Abl não morrem quando tratadas somente com os indutores de morte. Nossos resultados mostram que, apesar do mesilato de imatinibe bloquear a atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl e o conseqüente aparecimento de proteínas fosforiladas em tirosina, as células que expressam essa oncoproteína continuam extremamente resistentes aos agentes apoptogênicos utilizados. Para complementar os resultados obtidos com a utilização da porcentagem de núcleos hipodiplóides como medida da porcentagem de células apoptóticas, foram também analisados alguns dos eventos moleculares característicos da ativação da via apoptótica, tais como a ativação de caspase-3 e a clivagem de PARP e fodrina. Nessa análise, observamos que Bcr-Abl, mesmo quando inibido, previne a ativação de caspase-3 e a clivagem dos substratos PARP e fodrina. O fenômeno da manutenção da resistência à apoptose durante a inibição da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl foi observada tanto na presença do inibidor específico de Abl, mesilato de imatinibe, quanto na presença de herbimicina A e genisteína, que são considerados pan-inibidores de tirosina-quinases (Bueno-Da-Silva et al., 2003).

Embora os mecanismos envolvidos na resistência à apoptose mediada por Bcr-Abl não estejam esclarecidos, diversos trabalhos mostraram que essa tirosina-quinase é capaz de regular a expressão de proteínas envolvidas no controle da apoptose, tanto no nível transcricional quanto nos níveis traducional e pós-traducional. Amarante-Mendes e colaboradores demonstraram que a expressão de Bcr-Abl nas células HL-60 conduz ao aumento da expressão de Bcl-x_L e à diminuição da expressão de Bcl-2. Além disso, esses autores mostraram, com o uso de oligonucleotídeos anti-senso para bcl-x_L, que esse aumento na expressão da molécula anti-apoptótica Bcl-x_L colabora somente em parte para o fenótipo de resistência à morte observado em células positivas para Bcr-Abl (Amarante-Mendes et al., 1998a).

Sendo assim, na tentativa de explicar a manutenção da resistência à apoptose de células que expressam Bcr-Abl tratadas com mesilato de imatinibe, analisamos o efeito da inibição da atividade enzimática de Bcr-Abl sobre a expressão de diversas moléculas que participam na regulação da apoptose ou que já foram descritas como alvos dessa oncoproteína.

De maneira geral e de acordo com a literatura, nossos resultados mostram que a expressão de Bcr-Abl, ectópica ou endógena, está associada a altos níveis de Bcl-x_L e a quantidades extremamente baixas ou não detectáveis de Bcl-2. O efeito de Bcr-Abl sobre a expressão dessas duas moléculas anti-apoptóticas fica evidente quando células HL-60.vetor, que apresentam altos níveis de Bcl-2 e baixos de Bcl-x_L, são comparadas às células HL-60.Bcr-Abl que, como já mencionado, expressam grandes quantidades de Bcl-x_L, mas não expressam Bcl-2 em níveis detectáveis. Curiosamente, a superexpressão de Bcl-x_L em células HL-60 também provoca uma diminuição nos níveis de Bcl-2 (Brumatti et al., 2003), sugerindo que mecanismos compensatórios atuam na regulação da expressão de moléculas anti-apoptóticas. Embora em nosso modelo de estudo Bcl-2 não pareça relevante para os efeitos anti-apoptóticos de Bcr-Abl, alguns trabalhos sugerem a sua participação na transformação maligna mediada por essa tirosina-quinase (Cirinna et al., 2000).

Em nosso estudo, o tratamento com mesilato de imatinibe reduziu a expressão de Bcl-x_L e não alterou a expressão de Bcl-2. Contrastando com as demais linhagens positivas para Bcr-Abl, células KCL22 expressam altas quantidades de Bcl-2, a qual não é alterada pela exposição dessa linhagem celular ao mesilato de imatinibe, sugerindo que o alto nível de expressão de Bcl-2 não está associado aos efeitos de Bcr-Abl nesta linhagem.

Resultados obtidos em nosso laboratório mostram que o tratamento de células HL-60.Bcr-Abl com mesilato de imatinibe por 15 minutos, reduz drasticamente a transcrição de bcl-x_L, que atinge um nível de expressão semelhante ao observado em HL-60 (Ulbrich, A, dados não publicados). Esses resultados sugerem que a diminuição na quantidade de proteína Bcl-x_L observada após o tratamento com mesilato de imatinibe, está associada à inibição de sua transcrição.

O aumento na expressão de Bcl-x_L induzido por Bcr-Abl já foi observado em outras linhagens celulares, como K562 (Benito et al., 1996), e está associado a ativação de STAT5 por Bcr-Abl (Gesbert e Griffin, 2000; Horita et al., 2000). Em células transformadas pelo Bcr-Abl, o fator de transcrição STAT5 está constitutivamente fosforilado e ativo (Carlesso et al., 1996). A expressão de Bcl-x_L é induzida pela ativação de fatores de transcrição da família dos STATS, principalmente de STAT1, STAT3 e STAT5, que se ligam diretamente a uma sequência consenso presente no promotor de bcl-x_L. Apesar dessas diferentes STATs estarem

associadas a transcrição de Bcl-x_L, o tratamento com mesilato de imatinibe bloqueia particularmente a fosforilação de STAT5, mas não de STAT1 e STAT3, as quais permanecem fosforiladas na presença do inibidor de Bcr-Abl (Horita et al., 2000). Esse resultado indica que, embora STAT1 e STAT3 estejam fosforiladas em células Bcr-Abl-positivas, o aumento de expressão de Bcl-x_L nessas células, não está ligado diretamente à ação dessas STATs, mas sim de STAT5. Os mesmos autores relataram ainda que a inibição da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl em linhagens celulares que expressam Bcr-Abl e em células CD34⁺ derivadas de pacientes na fase crônica ou crise blástica da LMC, induz apoptose por suprimir a capacidade de STAT5 de interagir com o promotor de bcl-x_L. Consistente com esses dados, também foi observada que a expressão de um mutante dominante negativo de STAT5 em células K562, promove a redução dos níveis intracelulares de Bcl-x_L e induz apoptose, confirmando a importância de STAT5 na modulação dessa molécula anti-apoptótica por Bcr-Abl (Horita et al., 2000). A ativação constitutiva de STAT5 sozinha já é suficiente para induzir em células BaF3, o crescimento e sobrevivência independentes de IL-3, embora em uma extensão menor do que Bcr-Abl (Gesbert e Griffin, 2000). Utilizando o sistema condicional, Gesbert e Griffin mostraram que a expressão de Bcr-Abl induz aumento da expressão de Bcl-x_L, mas não altera Bcl-2. Com a forma mutante, ativa de STAT5 só houve indução de Bcl-x_L na presença de IL-3, indicando que, embora STAT5 contribua para a indução de Bcl-x_L, uma segunda via ativada pelo receptor de IL-3 ou por Bcr-Abl é necessária para o aumento de Bcl-x_L. A indução de Bcl-x_L parece envolver a ação conjunta de sinais fornecidos pelas vias de PI3-k e STAT5 que sinergizam para aumentar a expressão de Bcl-x_L, possivelmente diminuindo a degradação protéica e aumentando a transcrição ou via outros mecanismos (Gesbert e Griffin, 2000). A importância de STAT5 para as células leucêmicas foi também observada em um estudo no qual a inibição de STAT5 por oligonucleotídeos antisense, inibiu o crescimento celular e induziu apoptose em blastos derivados de pacientes com LMC (Baskiewicz-Masiuk e Machalinski, 2004).

O padrão de aumento de expressão de Bcl-x_L e diminuição de Bcl-2 também foi observado em células mononucleares de pacientes com LMC. Resultados obtidos em nosso laboratório por Castro e colaboradores (dados não publicados), utilizando pacientes nas três fases da doença (crônica, acelerada e blástica), mostram que há um aumento na expressão de bcl-x_L e diminuição de bcl-2 de acordo com a progressão da doença para fases mais avançadas. Nesse mesmo estudo foi observado que pacientes em remissão após mesilato de imatinibe, apresentam um padrão de expressão dessas moléculas semelhante ao de pessoas saudáveis, ou seja, uma alta expressão de bcl-2 e baixa expressão de bcl-x_L. Por outro lado, pacientes refratários ao tratamento apresentam altos níveis de bcl-x_L e baixos de bcl-2.

A inibição da expressão de Bcl-x_L pelo tratamento com mesilato de imatinibe e a baixa expressão de Bcl-2 na maioria das células positivas para Bcr-Abl, sugerem que a manutenção da resistência à apoptose na ausência da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl, não envolve a expressão dessas moléculas anti-apoptóticas. No presente estudo, outras moléculas da família Bcl-2 de reguladores da apoptose foram também avaliadas, como Bid, Bak, Bax, Bad e Bim.

Bid participa da indução de apoptose iniciada por receptores de morte e conecta a Via Extrínseca à Via Intrínseca. A trimerização dos receptores de morte, induzida pela interação com seus ligantes, ativa caspase-8 no complexo de sinalização de morte (DISC). Quando ativada, caspase-8 processa a forma citosólica de Bid convertendo-na em uma forma truncada (tBid, “truncated Bid”) que transloca para a mitocôndria onde interage com membros pró- e anti-apoptóticos da família Bcl-2 e promove a liberação de citocromo c para o citosol (Li et al., 1998). Células HL-60.Bcr-Abl apresentaram níveis de expressão de Bid menores do que o observado em células HL-60.vetor, indicando que Bcr-Abl regula negativamente a expressão dessa proteína. No entanto, células K562, KCL22 e LAMA-84 apresentaram quantidades de Bid semelhantes ao de células HL-60.vetor. Em três das quatro linhagens de células que expressam Bcr-Abl, o tratamento com mesilato de imatinibe induziu uma diminuição na quantidade de Bid expressa. Esse fenômeno não foi observado em células HL-60.vetor, nem em LAMA-84.

Embora camundongos deficientes em Bak ou Bax sejam normais ou apresentem pequenas anormalidades no programa de morte celular, animais duplo nocautes, que não expressam nenhuma das duas proteínas, exibem um acúmulo substancial de células em diversos tecidos, causando a persistência das membranas interdigitais e linfadenopatias progressivas. Além disso, as células desses animais se mostram extremamente resistentes a inúmeros estímulos apoptóticos, reforçando que essas proteínas são componentes essenciais na indução de apoptose (Lindsten et al., 2000). Em nossos experimentos, as linhagens Bcr-Abl-positivas apresentaram níveis ligeiramente aumentados de Bax, quando comparadas às células HL-60.vetor. O aumento dos níveis protéicos de Bax em células HL-60.Bcr-Abl já havia sido observado pelo nosso grupo de pesquisa (Brumatti et al., 2003). No entanto, em um outro trabalho realizado em nosso laboratório foi observado que tal alteração não ocorre no âmbito transcricional, uma vez que células HL-60.Bcr-Abl apresentam quantidades de transcritos de bax inferiores aos observados em HL-60 (Ulbrich, A, dados não publicados). Essa diferença entre os níveis de RNAm e de proteína de Bax poderiam ser explicados por mecanismos pós-traducionais que atuam nas células HL-60.Bcr-Abl, por exemplo, aumentando a estabilidade do RNAm e/ou da proteína. Uma possibilidade seria a prevenção da degradação de Bax pelo proteossoma por meio de sua fosforilação, o que resultaria em seu

acúmulo no citoplasma. Em neutrófilos, foi demonstrado que Bax pode ser fosforilado pela via PI3k/Akt no resíduo Ser¹⁸⁴ e que, na forma fosforilada, essa molécula é detectada no citoplasma e forma heterodímeros com as proteínas anti-apoptóticas Mcl-1, Bcl-x_L e A1 (Gardai et al., 2004). Baseado nesses achados os autores sugerem a fosforilação de Bax como um mecanismo de inibição da apoptose, uma vez que essa modificação impede a translocação de Bax para a mitocôndria e promove a heterodimerização com proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 (Gardai et al., 2004).

Apesar das diferenças de expressão de Bax, o tratamento com mesilato de imatinibe não alterou a expressão dessa proteína nas linhagens analisadas, com exceção da linhagem KCL22 que apresentou uma diminuição dessa proteína frente ao tratamento. A comparação da expressão de Bax em pacientes nas fases crônica, acelerada e blástica mostrou que não há correlação entre a expressão dessa molécula pró-apoptótica e a progressão da LMC (Ravandi et al., 2001).

A expressão de Bak variou entre as linhagens testadas. Enquanto células HL-60.vetor, HL-60.Bcr-Abl e KCL22 apresentaram quantidades semelhantes de Bak, com as duas células que expressam Bcr-Abl expressando até um pouco mais de Bak do que células HL-60.vetor, a linhagem K562 mostrou uma expressão menor dessa proteína e a linhagem LAMA-84 apresentou níveis quase não detectáveis de Bak. Em HL-60.Bcr-Abl e K562, o tratamento com mesilato de imatinibe promoveu uma diminuição da expressão de Bak. Uma possibilidade é que a diminuição dos níveis de Bak e Bid pelo mesilato de imatinibe, colabore, pelo menos em parte, para a manutenção da resistência à indução de morte durante o co-tratamento desse inibidor com indutores de apoptose. Uma outra alternativa é que a diminuição dessas proteínas seria o reflexo do início da sinalização de morte nessas células.

Na ausência de um sinal apoptótico, as moléculas pró-apoptóticas Bax e Bad estão predominantemente localizadas no citosol. No entanto, após um estímulo apoptótico essas proteínas pró-apoptóticas são redistribuídas para a mitocôndria. Células que expressam grandes quantidades de Bcr-Abl são capazes de bloquear a translocação de Bax e Bad para a membrana da mitocôndria após estímulos citotóxicos (Keeshan et al., 2002).

Os membros da família Bcl-2 podem ser regulados por alterações na transcrição, modificações pós-traducionais, dimerização e distribuição subcelular (Keeshan et al., 2002). Sabe-se que para algumas moléculas a regulação por Bcr-Abl ocorre no nível pós-traducional, o que explicaria a não alteração da expressão dessas moléculas quando são analisados os níveis de RNAm e/ou de proteína. Um exemplo é a regulação de Bad, uma molécula pró-apoptótica cuja atividade está diretamente relacionada com seu estado de fosforilação. Bad não fosforilado pode formar heterodímeros com Bcl-x_L e Bcl-2, impedindo que essas

proteínas exerçam suas funções anti-apoptóticas e possibilitando a homodimerização de Bax na mitocôndria para promover a apoptose (Yang et al., 1995). Sinais de sobrevivência mediados por citocinas, como IL-3, promovem a fosforilação de Bad de modo dependente da via PI3-k/Akt. A consequência da fosforilação de Bad em dois resíduos de serina (Ser¹¹² e Ser¹³⁶) é a inibição da sua ligação com Bcl-x_L e seu seqüestro no citosol pela interação com a proteína 14-3-3, que interage com resíduos de fosfoserina. A fosforilação de Bad na Ser¹³⁶ é mediada por Akt e na Ser¹¹², parece envolver a proteína quinase A (PKA) (Datta et al., 1997). Neshat e colaboradores mostraram que Bad está constitutivamente fosforilado em células que expressam Bcr-Abl e que essa fosforilação depende da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl e necessita da participação de PI3-k, Ras e Raf. Nesse trabalho, observaram que quando a capacidade de Bcr-Abl de fosforilar Bad foi inibida pelo uso de um dominante negativo de Raf, uma subpopulação das células permaneceu viva, sugerindo a existência de vias de sobrevivência independentes de Bad (Neshat et al., 2000). Nos nossos resultados, de maneira geral, a expressão de Bad não parece ter sido modulada pela expressão de Bcr-Abl, nem por sua inibição pelo mesilato de imatinibe. Esses resultados estão de acordo com a literatura que, como exposto acima, indica que a regulação de Bad por Bcr-Abl é principalmente no nível pós-traducional, por meio da sua fosforilação e seqüestro no citosol. Apesar de não termos feito a marcação para Bad fosforilado, outros trabalhos mostram que a fosforilação dessa molécula pró-apoptótica depende da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl, sendo, portanto inibida na presença do mesilato de imatinibe e/ou pela expressão de formas mutantes de Bcr-Abl quinase-deficientes (Neshat et al., 2000). Baseado nisso, a permanência das células em um estado de resistência não está associada à manutenção de Bad em seu estado fosforilado. Apesar dos diversos trabalhos mostrando a importância da sinalização mediada pela via de PI3-k para os efeitos de Bcr-Abl, Amarante-Mendes e colaboradores demonstraram que, embora Bcr-Abl promova a ativação de PI3-k em células HL-60, a resistência à apoptose induzida pela expressão dessa tirosina-quinase não depende da atividade de PI3-k, uma vez que o tratamento com wortmanina, um inibidor potente dessa via, não interferiu na resposta das células à agentes apoptogênicos. Baseado nesses resultados, os autores sugerem que embora PI3-k participe da resposta anti-apoptótica mediada por alguns fatores de crescimento e parece importante para o crescimento de células que expressam Bcr-Abl, essa via não tem papel fundamental na resistência à apoptose mediada por Bcr-Abl (Amarante-Mendes et al., 1997). É importante destacar, no entanto, que alguns trabalhos sugerem que Bad pode ser fosforilado de maneira independente de PI3-k/Akt.

A molécula Bim (“Bcl-2 interacting mediator of cell death”) é um membro da família “BH3-only” de proteínas pró-apoptóticas. A expressão de Bim e suas funções são reguladas

tanto no nível transcricional como no pós-traducional. A regulação da transcrição de Bim é um processo relativamente complexo, sendo que três proteínas são sintetizadas a partir do mesmo transcrito: Bim-EL, Bim-L e Bim-S (O'Connor et al., 1998), onde Bim-EL é a forma predominante. Foi observado que a privação de fatores de crescimento aumenta a expressão de Bim em linhagens neuronais e hematopoéticas (Putchá et al., 2001) contudo, foi mostrado que a estimulação de células hematopoéticas por IL-3, reprime a expressão de Bim por meio da via de Erk (Shinjyo et al., 2001). Luciano e co-autores mostraram que a fosforilação de Bim-EL no resíduo Ser⁶⁹ (resíduo presente só na forma EL) pela Erk1/2 é necessária e suficiente para promover a sua rápida degradação pelo proteossoma e proteger as células da indução de apoptose (Luciano et al., 2003). Nesse manuscrito relataram que, em K562, o tratamento com imatinibe bloqueia a fosforilação de Bim-EL e sua degradação e ainda induz ativação de caspases e apoptose, sugerindo que a fosforilação de Bim via Erk representa outro mecanismo de repressão da apoptose utilizado por Bcr-Abl (Luciano et al., 2003). Posteriormente, foi sugerido que a função pró-apoptótica de Bim-EL também pode ser regulada pela sua fosforilação no resíduo Ser⁸⁷, e que essa fosforilação é intermediada por Akt, não envolvendo Erk (Qi et al., 2006).

A indução de morte celular é uma atividade farmacológica crítica do mesilato de imatinibe e fundamental para a eliminação de células que expressam Bcr-Abl. Kuroda e colaboradores mostraram que o mesilato de imatinibe mata as células leucêmicas por meio da ativação de algumas proteínas pró-apoptóticas da família “BH3-only”. Nesse estudo observaram que a exposição ao inibidor promove aumento da transcrição de bim e bmf e ativação pós-traducional de Bim e Bad (Kuroda et al., 2006). Portanto, a expressão de Bcr-Abl promove a diminuição da expressão de Bim e induz a sua fosforilação. Com o uso de células transfectadas com bcr-abl, derivadas de camundongos que eram deficientes para Bim, Bad ou para a combinação dos dois fatores, Kuroda e colaboradores mostraram que células deficientes para uma das duas moléculas são parcialmente susceptíveis à indução de morte pelo mesilato de imatinibe, no entanto, células que não expressam Bim e Bad simultaneamente, são altamente resistentes ao inibidor. O aumento da transcrição de Bim parece ser mediado por FoxO3a, o qual está constitutivamente fosforilado em células Bcr-Abl-positivas (BV173 e BaF3.Bcr-Abl). A inibição de Bcr-Abl pelo mesilato de imatinibe resulta na ativação de FoxO3a, indução da expressão de Bim e apoptose. Por outro lado, o silenciamento de FoxO3a em células que expressam Bcr-Abl bloqueia o aumento de Bim e inibe a indução de apoptose mediada pelo mesilato de imatinibe (Essafi et al., 2005).

Nossos resultados mostram que o tratamento com mesilato de imatinibe induz o aumento da expressão de Bim e a perda da fosforilação, estando de acordo, portanto, com os

dados da literatura apresentados acima. Essas alterações na expressão de Bim são importantes para que essa proteína exerça suas funções pró-apoptóticas. Dessa forma, a manutenção da resistência à apoptose na ausência da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl não parece estar associada à perda ou alterações dos mecanismos de controle da atividade de Bim por essa oncoproteína.

A1 e Mcl-1, membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, embora não tenham sido analisados no nosso trabalho, nos ensaios com o mesilato de imatinibe, parecem ser importantes para o efeito anti-apoptótico de Bcr-Abl em alguns modelos celulares. A1 protege as células da morte por diversos agentes, tais como TNF- α e retirada de fatores de crescimento. Essa proteína está localizada na mitocôndria e é capaz de inibir a despolarização mitocondrial e a liberação de citocromo c (Duriez et al., 2000). A expressão da serina/treonina quinase pim-1 está correlacionada com a divisão celular e sobrevivência independente de fatores de crescimento, além de proteção de células hematopoéticas da morte por agentes genotóxicos. Nieborowska-Skorska e colaboradores observaram que Bcr-Abl induz, de maneira dependente de STAT5, a expressão de A1 e pim-1, os quais são necessários para a leucemogênese mediada por Bcr-Abl e parecem se complementar na proteção a apoptose e promoção da independência de fatores de crescimento (Nieborowska-Skorska et al., 2002).

Células mononucleares derivadas de medula óssea de pacientes com LMC expressam níveis mais altos de Mcl-1 do que células de indivíduos saudáveis, e tal expressão independe da fase da doença. O tratamento com mesilato de imatinibe promove a redução na quantidade de Mcl-1 expressa em células que possuem Bcr-Abl (K562, KU812), mas não em células negativas para essa oncoproteína (HL-60, U937, KG1). Algumas evidências sugerem que além da via Ras/Raf/MEK/ERK, a ativação de STAT5 pode contribuir para a expressão de Mcl-1 dependente de Bcr-Abl nas células leucêmicas. Em K562, o efeito do STI571 sobre a expressão de Mcl-1 é dose-dependente e está associado à diminuição da viabilidade celular e aumento da porcentagem de células em apoptose, sendo que a diminuição de Mcl-1 precedeu a indução de morte, indicando que Mcl-1 atua como uma importante molécula anti-apoptótica na LMC (Aichberger et al., 2005). Aichberger e colaboradores observaram também que a diminuição dos níveis protéicos de Mcl-1 em K562, com a dose de 1 μ M de mesilato de imatinibe, pode ser observada em 8, 12 e em 24 horas. Considerando que em nosso trabalho também utilizamos a linhagem K562, podemos imaginar que no tempo de incubação do nosso experimento e com a dose de inibidor utilizada (10 μ M), a expressão de Mcl-1 estava reduzida e, portanto, a resistência aos indutores de morte não poderia ser atribuída a essa proteína anti-apoptótica. Em um trabalho publicado recentemente, foi observado que a expressão de Bcr-Abl em NIH-3T3, uma linhagem de fibroblasto, BaF3, linhagem pró-B murina, e HL-60

promove um aumento da expressão e atividade de SPK1 (“sphingosine kinase-1”) e o tratamento de células K562 e células primárias derivadas de LMC com mesilato de imatinibe reduz a expressão e a atividade de SPK1. A superexpressão de SPK1 em BaF3 e HL-60 induz o aumento de Mcl-1 e sua inibição leva a uma redução na expressão dessa molécula anti-apoptótica, indicando que SPK1 contribui para o aumento de Mcl-1 induzido por Bcr-Abl. O silenciamento de SPK1, seguido do tratamento com mesilato de imatinibe por 12 horas, induziu cerca de 15% de apoptose em K562 (Li et al., 2007).

Além dos reguladores da apoptose pertencentes à família Bcl-2, investigamos os efeitos de Bcr-Abl e de sua inibição, na expressão de proteínas anti-apoptóticas da família dos IAPS.

Nossos resultados mostram que células HL-60.Bcr-Abl expressam quantidades maiores de survivina do que células HL-60.vetor, confirmando a indução de survivina pela expressão de Bcr-Abl. Em K562, os níveis de survivina parecem ligeiramente maiores do que os de HL-60.vetor, já os de KCL22 e LAMA-84 parecem menores ou similares ao expresso pelas células controle. Enquanto o tratamento de células HL-60.vetor com o mesilato de imatinibe não afetou as quantidades intracelulares de survivina, a inibição da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl promoveu uma redução dos níveis dessa proteína em todas as linhagens que expressam Bcr-Abl. A intensidade da redução variou entre as linhagens analisadas.

Survivina é um membro da família de inibidores de apoptose (IAP) que apresenta um papel importante na proliferação e morte celular (Altieri e Marchisio, 1999), sendo normalmente expressa em grandes quantidades durante o desenvolvimento fetal e tornando-se quase imperceptível em tecidos adultos diferenciados (Carter et al., 2006). No entanto, em células transformadas e em diversos tipos de câncer essa proteína é expressa em níveis elevados, tendo sido associada a um pior prognóstico em algumas neoplasias. Quanto à associação da expressão da survivina com LMC, alguns trabalhos indicam que essa proteína é expressa em pacientes nas fases acelerada e crise blástica da LMC, enquanto seus níveis são baixos ou não detectados em pacientes na fase crônica (Conte et al., 2005; Carter et al., 2006). Em um trabalho recente, foi observado que a exposição de células que expressam Bcr-Abl ao mesilato de imatinibe, está associada a uma inibição dose-dependente dos níveis de survivina, que atingem o máximo da redução após 48 horas de tratamento, e a diminuição da viabilidade celular e aumento da morte celular em 48 horas. Em células negativas para Bcr-Abl, o tratamento com o mesilato de imatinibe não alterou a expressão de survivina. Nesse trabalho mostraram que a expressão ectópica de Bcr-Abl induz o aumento da expressão de survivina em células HL-60 e que o mesilato de imatinibe não afeta os níveis de survivina nem o

crescimento e sobrevivência de HL-60, enquanto induz morte e reduz os níveis de survivina em HL-60.Bcr-Abl. A regulação da expressão de survivina pelo Bcr-Abl parece ocorrer tanto no nível do RNAm quanto no da proteína, o que parece envolver o proteassoma. O tratamento com STI571 diminui survivina reduzindo a quantidade de RNAm e a estabilidade da proteína, induzindo a sua degradação. A survivina é altamente expressa em células KBM5, que são derivadas de paciente com LMC na crise blástica, e a sua expressão parece ser regulada pela cascata de sinalização Bcr-Abl-MAPK. Nessas células a inibição de survivina (anti-senso) resultou em parada do ciclo e morte, tanto em KBM5 quanto em KBM5 resistente ao imatinibe.

A expressão de XIAP não parece ser alterada por Bcr-Abl e nem pelo inibidor. A não alteração da expressão de XIAP e de c-IAP1 em células HL-60.Bcr-Abl em comparação às células HL-60.vetor, já havia sido relatada (Fang et al., 2000; Brumatti et al., 2003). No entanto, Fang e colaboradores mostraram que o tratamento com mesilato de imatinibe por 48 horas, promove a redução dos níveis de expressão de c-IAP1 e XIAP em células HL-60.Bcr-Abl e K562, mas não em HL-60 (Fang et al., 2000). A diferença desses dados com os nossos resultados pode ser explicada pelo tempo de incubação com a droga, que no nosso caso foi de até 24 horas e não de 48 horas.

Outras moléculas que participam da regulação da apoptose ou estão de alguma forma associadas a esse processo também foram analisadas. Não foram observadas alterações significativas nos níveis de expressão de caspase-3, Apaf-1 e fodrina em decorrência da presença de Bcr-Abl ou de sua inibição. No entanto, não podemos descartar que mecanismos pós-traducionais regulem essas proteínas.

c-Flip existe no nível de RNAm na forma de múltiplas variantes, enquanto que no nível protéico três isoformas foram detectadas: c-FLIP_L, c-FLIP_R e c-FLIP_S (Golks et al., 2005). Ao analisarmos a expressão de c-FLIP, observamos que células que expressam Bcr-Abl, incluindo a linhagem HL-60.Bcr-Abl expressam uma quantidade maior de c-FLIP_S do que células HL-60.vetor. c-FLIP_S bloqueia o processamento e ativação de caspase-8 no DISC. O aumento dessa proteína poderia explicar a resistência que essas células apresentam em relação à indução de morte pela via de Fas, mas não pela via intrínseca.

A molécula Crkl foi identificada como a principal proteína fosforilada em tirosina em neutrófilos de pacientes com LMC (Oda et al., 1994) e muito fosforilada também em K562 (Ten Hoeve et al., 1994). Células HL-60.Bcr-Abl apresentaram, em relação às células HL-60.vetor, quantidades muito superiores de Crkl. Esse aumento na expressão de Crkl foi também observado nas demais linhagens positivas para o Bcr-Abl. Além de uma maior expressão de Crkl nas linhagens que expressam Bcr-Abl, também é possível notar que, na

situação controle (não tratadas), as bandas referentes a essa proteína, apresentam uma menor migração no gel nas células que expressam Bcr-Abl do que nas células HL-60.vetor. Essa menor migração provavelmente está associada à fosforilação de Crkl nas células que expressam Bcr-Abl. O tratamento com mesilato de imatinibe promoveu uma leve alteração da expressão da proteína, reduzindo a intensidade da banda referente ao Crkl, mas o maior efeito desse inibidor foi, com certeza, sobre a fosforilação dessa proteína que passou a migrar mais no gel, indicando a sua desfosforilada quando Bcr-Abl foi inibido.

Além das proteínas citadas acima, foi analisada a molécula SET, inibidor da fosfatase PP2A. A expressão de SET é induzida por Bcr-Abl de maneira dependente da dose e da atividade tirosina-quinase e aumenta com a progressão da doença (Neviani et al., 2005). No presente modelo experimental, a expressão de SET foi maior em HL-60.Bcr-Abl e K562 do que em células HL-60.vetor, mas tal expressão não foi modulada pela ação do mesilato de imatinibe. Esse resultado contrasta com o dado obtido por Neviani e colaboradores que mostra que o tratamento com 1 μ M de mesilato de imatinibe promove a redução da expressão de SET em células K562 (Neviani et al., 2005). Outros detalhes da regulação de SET por Bcr-Abl, serão discutidos juntamente com os resultados da análise proteômica.

Embora não possamos descartar definitivamente a possibilidade de que haja quantidades indetectáveis de fosfoproteína na presença do inibidor da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl, os resultados obtidos com o mesilato de imatinibe sugerem que a atividade enzimática de Bcr-Abl não precisa estar constantemente ativa para a manutenção da resistência à apoptose e que proteínas fosforiladas em tirosina não são responsáveis diretas pelo efeito anti-apoptótico dessa tirosina-quinase. Uma possível explicação para esses resultados seria a existência de mecanismos independentes da atividade enzimática de Bcr-Abl que colaboram para o fenótipo de resistência à morte. Outra possibilidade é que os substratos fosforilados em tirosina seriam importantes nos eventos iniciais de geração e manutenção dos sinais anti-apoptóticos e que esses últimos poderiam permanecer ativos por um período curto de tempo, mesmo na ausência da atividade enzimática de Bcr-Abl e das proteínas fosforiladas em tirosina. Dessa forma, os sinais anti-apoptóticos secundários, iniciados pela atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl, seriam responsáveis pelo fenótipo de resistência às drogas quimioterápicas observado em células que expressam Bcr-Abl e sua identificação poderia auxiliar na compreensão da patologia da LMC e no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. O fato da exposição prolongada ao mesilato de imatinibe induzir morte em células positivas para Bcr-Abl indica que a re-estimulação dos sinais anti-apoptóticos depende da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl.

O grande sucesso do mesilato de imatinibe como uma droga anti-LMC pode ser atribuído à alta dependência das células leucêmicas derivadas da LMC da atividade tirosina-quinase de Abl e ao alto grau de especificidade desse inibidor (Hubbard, 2002).

O tratamento da LMC com mesilato de imatinibe está embasado na alta especificidade do fármaco pela tirosina-quinase Abl, que faz com que esse inibidor induza morte das células que expressam Bcr-Abl sem afetar ou com mínimos efeitos sobre as células normais. Nos nossos resultados sobre os efeitos do mesilato de imatinibe na viabilidade celular, mostramos que células positivas para Bcr-Abl, tanto as HL-60 transfectadas com Bcr-Abl quanto as células derivadas de pacientes, não têm a viabilidade afetada pelo tratamento com mesilato de imatinibe por 24 horas, no entanto passam a morrer após 48 horas de exposição ao inibidor. Uma discussão interessante que surge a partir da análise desses resultados é a de que células HL-60 já são transformadas, não expressam Bcr-Abl e não têm a viabilidade afetada pelo tratamento com mesilato de imatinibe, por outro lado, células HL-60.Bcr-Abl morrem quando a atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl é inibida pelo mesilato de imatinibe, ao invés de voltarem a se comportar como células HL-60 “selvagens”. Essas considerações sugerem que, de alguma forma, células HL-60.Bcr-Abl se tornaram dependentes da atividade enzimática de Bcr-Abl, não sobrevivendo quando a atividade tirosina-quinase dessa proteína é inibida.

Atualmente um dos focos de debate da comunidade científica é até que ponto um oncogene que é crucial para o início e desenvolvimento de um tumor específico é também necessário para a manutenção do fenótipo maligno desse tumor. Essa questão surge tendo em vista a publicação e realização de diversas pesquisas que indicam que, freqüentemente, as células cancerosas são dependentes ou estão “viciadas” na atividade contínua de oncogenes específicos.

Nessa linha de pensamento, Felder e Bishop divulgaram que camundongos transgênicos expressando o oncogene myc em células hematopoéticas, desenvolveram leucemias de células T e leucemia mielóide aguda. No entanto, quando o gene myc foi desligado, as células leucêmicas pararam de proliferar e entraram em diferenciação e apoptose (Felsher e Bishop, 1999). Um resultado semelhante foi observado em um outro modelo transgênico, no qual a expressão condicional de bcr-abl, resultou no desenvolvimento de leucemia nos camundongos, seguida da morte dos animais. Do mesmo modo descrito no experimento anterior, quando a expressão de Bcr-Abl foi bloqueada, mesmo em estágios avançados da doença, as células leucêmicas entraram em apoptose e os camundongos sobreviveram (Huettner et al., 2000; Weinstein, 2002).

Baseado nesse conceito de dependência de oncogene, atribui-se o sucesso do mesilato de imatinibe à vulnerabilidade das células tumorais à ruptura da via oncogênica dominante,

um fenômeno conhecido por “oncogene dependence” ou “oncogene addiction” (Weinstein, 2002). Tal dependência de um oncogene resultaria da subversão e reorganização das redes de sinalização normais, através da introdução de um oncogene dominante, fazendo com que a remoção ou modulação do oncogene leve a alterações na sinalização aberrante que são prejudiciais à proliferação e/ou sobrevivência celular (Weinstein, 2002; Hingorani e Tuveson, 2003). Outra hipótese levantada para explicar a dependência de Bcr-Abl está relacionada ao fato dessa quinase bloquear a apoptose em diversos níveis, funcionando como uma barreira para os sinais pró-apoptóticos. Nessa hipótese, o autor propõe que os estímulos apoptogênicos que agem acima do bloqueio por Bcr-Abl, embora não causem apoptose, promoveriam o acúmulo de moléculas pró-apoptóticas acima do controle por Bcr-Abl e, com isso, assim como uma corrente de água bloqueada por uma barragem, a pressão pró-apoptótica acumulada seria liberada caso o Bcr-Abl fosse removido bruscamente, e com isso haveria a ativação da cascata apoptótica. Do mesmo modo, a inibição de Bcr-Abl eliminaria também as forças que direcionam o ciclo celular e que são ativadas por Bcr-Abl, como a Cdk2, por exemplo. Dessa forma, é a repentina inativação de proteínas que promovem o crescimento e a sobrevivência das células leucêmicas que causa a parada no ciclo e morte celular (Blagosklonny, 2004). Alguns estudos sugerem uma via comum relacionada a dependência de oncogenes e que envolve sinais de sobrevivência gerados por Erk, Akt e Stat3/5 e estímulos pró-apoptóticos provenientes de p38 fosforilada (Sharma et al., 2006). Recentemente Baylin e Ohm discutiram também a possibilidade de alterações epigenéticas, desencadeadas durante o processo de carcinogênese, participarem e contribuírem para dependência oncogênica (Baylin e Ohm, 2006). Além disso, é possível que a expressão de Bcr-Abl promova o acúmulo de lesões no DNA, as quais impossibilitariam a reversibilidade das vias de sinalização celulares normais no momento em que Bcr-Abl fosse inibido.

O grau de dependência e de necessidade da atividade contínua de um oncogene específico para a manutenção do câncer pode depender de outros fatores, tais como a função do próprio oncogene, contexto celular e outros fatores envolvidos na formação do tumor (Weinstein, 2002).

Os resultados obtidos com o tratamento das células com o mesilato de imatinibe por até 24 horas, indicam que Bcr-Abl é capaz de manter o fenótipo de resistência à apoptose mesmo na ausência de sua atividade enzimática. Para observar se a molécula Bcr-Abl quinase-deficiente é capaz de conferir resistência à apoptose e comparar seus efeitos àqueles produzidos pela expressão de Bcr-Abl selvagem, foram estabelecidas diversas linhagens celulares expressando a versão de Bcr-Abl sem atividade enzimática. Essa versão de Bcr-Abl alterada origina-se de um gene bcr-abl com mutação pontual que culmina com a inativação da

função tirosina-quinase, sendo por isso denominada de Bcr-Abl-quinase deficiente. Além das linhagens expressando a oncoproteína de interesse, foram estabelecidas durante o estudo as respectivas linhagens com o vetor vazio e a versão selvagem de Bcr-Abl.

Como grande parte dos trabalhos do nosso grupo de pesquisa envolvem a comparação das linhagens HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl, decidimos em um primeiro momento focar no estabelecimento de uma linhagem de células HL-60 expressando a versão quinase-deficiente de Bcr-Abl. Inexplicavelmente em todas as tentativas de infecção foram selecionadas células HL-60 resistentes ao antibiótico de seleção, mas que não expressavam a proteína de interesse (Bcr-Abl/KR). Com base nos manuais de transfecção e em artigos relacionados, diversas alterações foram feitas no protocolo de transfecção e infecção, mas sem proporcionar o sucesso desejado. Dentre as alterações, destacam-se: a adição de cloroquina durante a transfecção de células 293T, visto que alguns trabalhos e manuais de transfecção sugerem que a cloroquina aumenta de duas a três vezes o título viral e que tal efeito está relacionado a sua ação neutralizante sobre a atividade lisossomal (Pear et al., 1993); mudanças no tempo de incubação do precipitado antes de ser adicionado às células 293T e o uso de diferentes doses de G418 (de 400 µg/mL a 1,25 mg/mL) para a seleção de células HL-60. Com a ferramenta da co-transfecção do plasmídeo retroviral pMX-IRES-EGFP com o pCL-ampho avaliamos a eficiência de infecção de células HL-60, a qual era muito baixa. Sabe-se que uma das coisas determinantes para a infecção viral é a proteína de envelope do vírus. Diversos grupos já mostraram que células HL-60 são altamente resistentes a transferência gênica mediada por retrovírus. O baixo nível de transdução tem sido atribuído a: dificuldades na seleção após a transfecção, inibição da transcrição reversa do genoma viral e baixos níveis de receptores para retrovírus (Collins, 1988; Sabatino et al., 1997). A proteína de envelope codificada pelo pCL-ampho é a glicoproteína gp70 que interage com moléculas receptoras presentes na superfície de células-alvo. A gp70 anfotrópica se liga a proteína PiT-2, sendo que a região de PiT-2 com a qual gp70 interage é bem conservada entre mamíferos, permitindo que as partículas virais anfotrópicas infectem diversas espécies. Em um estudo realizado por Sabatino e colaboradores, foi observado que células HL-60 apresentam baixos níveis de RNAm para PiT-2, o que estaria correlacionado com a baixa eficiência de transferência gênica mediada por retrovírus. Isso sugere que uma das barreiras para a infecção das células HL-60 pelo retrovírus é a quantidade de receptores para a proteína do envelope viral (Sabatino et al., 1997). Baseado nisso, decidimos testar um outro sistema de produção de retrovírus que envolve o uso de células 293 gag/pol e o plasmídeo pVSV-G, que carrega o gene para uma proteína de envelope, no caso, a glicoproteína G do vírus da estomatite vesicular-VSV. A grande vantagem que esse sistema oferecia para a infecção de células HL-60 é que, ao contrário da

gp70, proteína de envelope codificada pelo pCL-ampho, a glicoproteína G do VSV não utiliza um receptor específico para entrar na célula-alvo, mas sim fosfolipídios de membrana que propiciam a fusão do vírus com a membrana citoplasmática da célula-alvo. No entanto, infelizmente, essa abordagem também não rendeu resultados positivos.

Curiosamente os mesmos sobrenadantes utilizados para tentar infectar células HL-60 foram utilizados com sucesso na infecção de outras linhagens celulares. As primeiras linhagens obtidas foram estabelecidas a partir da infecção de células HeLa (HeLa.vetor, HeLa.Bcr-Abl e HeLa.Bcr-Abl/KR) e, interessante, nos ensaios de resistência à apoptose, as células que expressam Bcr-Abl/KR (quinase-deficiente) se comportam de maneira intermediária quando submetidas a indutores de morte, morrendo menos do que as linhagens controle (HeLa e HeLa.vetor) e mais do que as que expressam Bcr-Abl ativo. Quando foi comparado o perfil dessas células quanto a expressão de moléculas envolvidas no controle da apoptose, as quatro linhagens testadas não apresentaram diferenças na expressão de Bax, Bak, Bid, Bcl-x_L, A1, Crkl, XIAP, Mcl-1, Flip_L, caspase-3 e caspase-9. Sendo assim, a resistência à apoptose de células HeLa.Bcr-Abl/KR não pode ser explicada por alterações nessas proteínas. Células HeLa.Bcr-Abl apresentaram uma maior expressão de c-IAP1, o que pode colaborar para a sua resistência à apoptose, mas não a explica completamente, indicando que outras moléculas devem estar alteradas em resposta à expressão de Bcr-Abl. Esse aumento na expressão de c-IAP1 parece ser dependente da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl, uma vez que a versão quinase-deficiente não alterou os níveis dessa molécula anti-apoptótica. Diferente do que é observado em células HL-60, células HeLa já apresentam uma grande quantidade de proteínas fosforiladas em tirosina o que, possivelmente, explica o fato de não haver um ganho tão visível na expressão dessas proteínas em células HeLa.Bcr-Abl. Da mesma forma, células HeLa expressam muito Bcl-x_L e essa expressão se mantém nas demais linhagens. As células HeLa.Bcr-Abl/KR que foram selecionadas nesse trabalho expressam níveis altíssimos de Bcr-Abl, muito superiores ao observado em HeLa.Bcr-Abl. Como as proteínas testadas não explicam a resistência à apoptose induzida pela expressão de Bcr-Abl-quinase-deficiente, outras moléculas serão analisadas no futuro.

Como pôde ser visto no item Materiais e Métodos, nessa pesquisa, também foram estabelecidas diferentes linhagens celulares derivadas de Jurkat (Jurkat.vetor, Jurkat.Bcr-Abl e Jurkat.Bcr-Abl/KR) e THP-1 (THP-1.vetor, THP-1.Bcr-Abl e THP-1.Bcr-Abl/KR), expressando as proteínas de interesse. Em contraste com os resultados obtidos nas linhagens derivadas de HeLa, a expressão de Bcr-Abl-quinase-deficiente não induziu resistência à apoptose em células Jurkat. Todavia, as células Jurkat.Bcr-Abl foram mais resistentes aos agentes apoptogênicos testados do que células Jurkat controle, Jurkat.vetor e Jurkat.Bcr-

Abl/KR. Quando comparadas às células Jurkat, Jurkat.vetor e Jurkat.Bcr-Abl/KR, as células Jurkat.Bcr-Abl apresentam uma expressão maior das proteínas anti-apoptóticas survivina e c-IAP1. De acordo com o descrito na literatura, a expressão de Bcr-Abl ativo promoveu a diminuição de Bim nessas células, enquanto células Jurkat.Bcr-Abl/KR, mantiveram a mesma quantidade de Bim das células Jurkat e Jurkat.vetor, mostrando que a modulação dessa proteína por Bcr-Abl é dependente da sua atividade tirosina-quinase (Kuroda et al., 2006). Estranhamente, a expressão de Bcr-Abl induziu a superexpressão da molécula pró-apoptótica Bax. No entanto, o aumento de Bax também foi observado em células HL-60.Bcr-Abl, embora em uma proporção bem menor, o que pode estar relacionado com a quantidade de Bcr-Abl expressa por Jurkat.Bcr-Abl, que é bem superior à expressa por HL-60.Bcr-Abl. Contrariando o conceito bem estabelecido de que a expressão de Bcr-Abl promove resistência à apoptose, células THP-1.Bcr-Abl se mostraram susceptíveis à indução de morte por agentes apoptogênicos de maneira similar à verificada em células THP-1, THP-1.vetor e THP-1.Bcr-Abl/KR. Isso pode estar relacionado ao fato de Bcr-Abl não ter promovido nessas células, as alterações na expressão de moléculas reguladoras da apoptose que já foram descritas como alvos dessa oncoproteína, como a redução de Bim e o aumento de Bcl-x_L. Também não foram alteradas as expressões de Bcl-2, Bad, Bax, Bim, c-IAP1, XIAP, Apaf-1 e Flip. Somente survivina parece ter sofrido um aumento em decorrência da expressão da tirosina-quinase, mas isso não contribuiu para mudar a sensibilidade das células às drogas testadas. Entretanto, não podemos descartar que a expressão de Bcr-Abl tenha afetado outras propriedades celulares, visto que só abordamos nesse trabalho a resistência à apoptose.

O fato de Bcr-Abl não ter protegido as células THP-1 da indução de apoptose foi surpreendente e difere da grande maioria dos resultados publicados nessa área, que apontam essa molécula como uma das mais potentes proteínas anti-apoptóticas. No entanto, de maneira semelhante ao observado para as linhagens derivadas de THP-1, em um outro trabalho realizado em nosso laboratório foi mostrado que em células SKW6.4, uma linhagem linfóide humana, a expressão de Bcr-Abl também não promove resistência a apoptose (Brumatti, G., dados não publicados). Com base nesses dados, a célula THP-1 não parece uma linhagem adequada para o estudo dos efeitos anti-apoptóticos de Bcr-Abl independentes da atividade quinase. Os mecanismos responsáveis pela ausência de resistência à apoptose nessas duas linhagens positivas para Bcr-Abl estão sendo exploradas em estudos paralelos no nosso laboratório.

A versão de Bcr-Abl quinase-deficiente com a mutação K671R já foi utilizada em outros estudos para verificar a importância da atividade tirosina-quinase para os efeitos transformantes de Bcr-Abl.

Quando extratos de ovos de *Xenopus* são incubados à temperatura ambiente, o citocromo c é liberado da mitocôndria, resultando na ativação de caspases, clivagem dos substratos e fragmentação do núcleo, de modo independente de transcrição ou tradução de novos fatores. Kornbluth e colaboradores, utilizando extratos citosólicos de ovos de *Xenopus*, mostraram que o tratamento com Bcr-Abl recombinante é capaz de inibir esse programa de morte espontânea. Nesse mesmo sistema, foi observado que o tratamento com a proteína Bcr-Abl-quinase deficiente (K671R) causou um atraso na apoptose, sugerindo que alguns efeitos quinase-independentes contribuem para o potencial anti-apoptótico de Bcr-Abl (Deming et al., 2004). Por outro lado, a expressão da versão mutada de Bcr-Abl não protege da injeção de citocromo c direto no citoplasma, sugerindo que se existem sinais anti-apoptóticos independentes da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl eles provavelmente exercem seus efeitos acima ou na mitocôndria e que os efeitos de Bcr-Abl pós a liberação de citocromo-c são dependentes da atividade quinase.

A maioria dos trabalhos utilizando mutantes de Bcr-Abl quinase-deficientes foram feitos em linhagens de células dependentes de IL-3. Um exemplo foi o estudo feito por Cortez e colaboradores utilizando as linhagens murinas BaF3 e 32D. Nessas células, a expressão de Bcr-Abl ativo induziu independência de fatores de crescimento (IL-3) e resistência à apoptose pela retirada de IL-3 do meio. Já a expressão do Bcr-Abl quinase-deficiente não induz independência de IL-3, nem resistência à apoptose induzida pela remoção deste fator de crescimento. Sabe-se que a atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl é essencial para tornar as células independentes de fatores de crescimento, sendo assim é esperado que as células que expressam Bcr-Abl mutado morram quando IL-3 é removida do meio. Nesse trabalho, os autores mostram que nos ensaios utilizando como indutor de apoptose radiação gama, células BaF3 controle e BaF3.Bcr-Abl mutante (KR) morrem quando submetidas a irradiação, quando incubadas na ausência de IL-3. No entanto, na presença de IL-3 nenhuma das células morreu com a dose de irradiação gama utilizada, nem mesmo o controle, não permitindo analisar se o Bcr-Abl mutante protege de apoptose na presença de IL-3. Para isso deveria ter sido escolhida uma dose de irradiação capaz de matar as células controle na presença de IL-3 (Cortez et al., 1995). Neste mesmo estudo feito por Cortez e colaboradores, a expressão de Bcr-Abl-quinase deficiente, além de não ser capaz de induzir independência de IL-3, bloqueio da apoptose por retirada de fator de crescimento e não apresentar tumorigenicidade, não promoveu a ativação da via de Ras. A ativação de Ras é um componente central de diversas vias de sinalização, estando em muitos tumores anormalmente ativada. Uma das vias de ativação da via de Ras é através da interação do domínio SH2 da proteína adaptadora Grb2 com a tirosina fosforilada 177 de Bcr-Abl. Contrastando com o conceito bem estabelecido de que a tirosina 177 é o sítio

de autofosforilação da tirosina-quinase Abl, Warmuth e colaboradores observaram que, em células expressando a molécula Bcr-Abl quinase-deficiente, uma quantidade expressiva de Grb2 estava complexada com a proteína Bcr-Abl mutada. Nestas células, as quinases Src, especialmente Hck (quinase de células hematopoéticas) foram ativadas por um mecanismo independente da atividade enzimática de Bcr-Abl e foram capazes de fosforilar a tirosina 177 de Bcr-Abl (Warmuth et al., 1997). Apesar destes resultados, ainda não está claro se as quinases Src cooperam com Bcr-Abl para a ativação da via de Ras. No entanto, a inibição da quinase Hck parece bloquear alguns dos efeitos transformantes de Bcr-Abl (Lionberger et al., 2000). Quanto à ligação de Hck com Bcr-Abl, foram identificadas pelo menos quatro regiões de ligação independentes, uma em Bcr, uma entre os domínios SH2 e SH3 de Abl, uma em SH1 e uma na região C-terminal de Abl (Stanglmaier et al., 2003). Os domínios SH2 e SH3 de Bcr-Abl interagem com Hck, levando à estimulação da atividade catalítica de Hck, que quando ativada fosforila STAT5B na Tyr⁶⁹⁹, representando um passo inicial na estimulação de STAT5B. O mutante Hck quinase-deficiente e o inibidor de Hck (PP2) bloqueiam a ativação de STAT5 dependente de Bcr-Abl (Klejman et al., 2002).

Cada vez mais surgem na literatura, trabalhos apontando que os efeitos causados por Bcr-Abl não dependem somente de sua atividade enzimática e que, portanto, são vistos tanto na presença do inibidor mesilato de imatinibe, quanto de formas mutantes de Bcr-Abl quinase-deficientes. Essa idéia foi reforçada por um trabalho que, utilizando células primárias humanas CD34⁺ expressando Bcr-Abl quinase deficiente, mostrou que a atividade quinase de Bcr-Abl é necessária para a proliferação e sobrevivência anormais das células progenitoras da LMC, mas que a adesão e migração anormais dessas células contam com mecanismos independentes da atividade catalítica de Bcr-Abl (Ramaraj et al., 2004).

A análise do padrão de resistência/susceptibilidade à apoptose das linhagens estabelecidas nesse trabalho disponibiliza dados relevantes acerca da importância do contexto celular para os efeitos oncogênicos de Bcr-Abl. No caso das linhagens THP-1, a expressão de Bcr-Abl não foi capaz de induzir resistência a apoptose, contrastando com o conceito bem estabelecido e observado em células HL-60, HeLa e Jurkat, de que a expressão dessa oncoproteína geralmente está associada à inibição da apoptose. Da mesma forma a expressão de Bcr-Abl/KR induziu resistência à apoptose em células HeLa, mas não em células Jurkat. Essa diferença ainda pode estar relacionada às quantidades de Bcr-Abl expressas, considerando que as células HeLa.Bcr-Abl/KR expressam mais Bcr-Abl do que as células Jurkat.Bcr-Abl/KR.

Algumas hipóteses foram aventadas na tentativa de explicar porque na linhagem THP-1, a expressão de Bcr-Abl não promoveu resistência à apoptose. Uma delas especula que a

quantidade de Bcr-Abl expressa na população de THP-1.Bcr-Abl selecionada não seria o suficiente para bloquear a apoptose. De fato há trabalhos na literatura que sugerem que, enquanto baixas doses de Bcr-Abl são suficientes para tornar uma célula independente de fatores de crescimento (IL-3) e tumorigênica, somente doses altas dessa proteína são capazes de promover resistência à indução de morte celular por estímulos apoptogênicos (Cambier et al., 1998). Em um trabalho publicado pelo grupo da Dra Junia Melo foi demonstrado que alguns dos efeitos de Bcr-Abl, como alterações na adesão e na capacidade de induzir tumores, dependem diretamente da quantidade de Bcr-Abl expressa pela célula (Barnes et al., 2005). Se isso for verdadeiro, no nosso modelo as células THP-1 expressando quantidades maiores de Bcr-Abl poderiam ser menos susceptíveis à apoptose do que as células controle ou células da mesma linhagem expressando baixos níveis de Bcr-Abl. Essa explicação poderia ser testada com o estabelecimento de outra linhagem de THP-1.Bcr-Abl expressando uma maior quantidade de Bcr-Abl do que a linhagem estabelecida em nosso estudo. Uma segunda hipótese é que a ação de Bcr-Abl como uma potente molécula anti-apoptótica, depende diretamente da sua interação com outras moléculas intracelulares e que, nesse caso, não estariam presentes em células THP-1. Bcr-Abl não é capaz de transformar fibroblastos NIH 3T3, enquanto uma variante oncogênica de Abl contendo seqüências gag miristoiladas na porção N-terminal, consegue transformar essa linhagem (Daley et al., 1987). Recentemente foi mostrado por Arlinghaus e colaboradores que a expressão das cadeias α e β do receptor de IL-3 humano em NIH 3T3, tornou-as susceptíveis à transformação por Bcr-Abl e que enquanto Bcr-Abl era capaz de ativar Stat5, a ativação de Jak2 nessa linhagem só foi atingida quando o receptor de IL-3 foi expresso, mostrando a importância de um outro sinal no caso de NIH 3T3 para a transformação por Bcr-Abl (Tao et al., 2007). Sabe-se que parte dos efeitos anti-apoptóticos de Bcr-Abl são mediados pelo aumento da proteína anti-apoptótica Bcl-x_L. Células THP-1 já expressam níveis altos dessa molécula e a expressão de Bcr-Abl não parece gerar um aumento da expressão dessa proteína e nem alterar a expressão de outros membros da família Bcl-2. Como todas as linhagens aqui utilizadas são células tumorais, uma possibilidade é que algumas das alterações que seriam causadas por Bcr-Abl e importantes para seu efeito anti-apoptótico, já estão presentes em células THP-1 e, por isso, não é possível observar um ganho de resistência.

Outra possibilidade proposta seria de que o bloqueio da apoptose por Bcr-Abl é processo lento e gradual e, portanto, maior tempo de exposição das células aos efeitos de Bcr-Abl seria necessário para o estabelecimento do fenótipo de resistência à apoptose. Para testar essa última hipótese, as células THP-1, THP-1.vetor, THP-1.Bcr-Abl/KR e THP-1Bcr-Abl, foram mantidas em cultura por alguns meses, após os quais foram testadas novamente

quanto a resposta à estímulos apoptogênicos e avaliadas quanto ao perfil de expressão de algumas proteínas envolvidas no controle da apoptose. Apesar da maior exposição ao Bcr-Abl, as células THP-1.Bcr-Abl continuaram com a mesma resistência à apoptose de suas linhagens comparativas e a expressão de proteínas reguladoras da apoptose foi mantida.

Whetton e colaboradores mostraram que os efeitos de Bcr-Abl podem variar de acordo com o tempo de exposição da célula a essa oncoproteína. Esses autores observaram que, em células multi-potentes, a exposição de curta duração ao Bcr-Abl tem pouco efeito sobre a diferenciação e a expressão de marcadores de diferenciação, mas após uma exposição prolongada, as células adquirem independência de fatores de crescimento e alteram a resposta a estímulos promotores de diferenciação para macrófagos ou granulócitos, resultando em diferenciação anormal ou retardada (Smith et al., 2002). É importante destacar que, aparentemente, essa diferença de efeito de Bcr-Abl sobre a resistência à apoptose, não está relacionado com a origem das linhagens, uma vez que temos no laboratório tanto linhagens linfóides e mielóides que ficaram mais resistentes ou permaneceram sensíveis à morte com a expressão de Bcr-Abl. Contudo cabe aqui comentar que, até o momento, foram analisados somente os efeitos da expressão de Bcr-Abl sobre a resistência à apoptose, mas não sobre as demais características inerentes a transformação celular.

Os resultados obtidos com as linhagens de células HeLa indicam que a resistência à apoptose induzida por Bcr-Abl pode ocorrer na ausência de sua atividade enzimática. Esses resultados complementam os resultados obtidos com o mesilato de imatinibe, pois enquanto os estudos com o inibidor mostram que a manutenção da resistência à apoptose não requer uma atividade tirosina-quinase constante, os estudos com os mutantes quinase-deficientes são diferentes na medida em que as células que expressam a proteína Bcr-Abl mutante, nunca tiveram contato com a atividade enzimática dessa molécula e, portanto, não sofreram nenhuma das alterações decorrentes dela.

Os experimentos envolvendo a exposição prolongada das células ao mesilato de imatinibe indicam que a atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl é importante para uma re-estimulação dos sinais anti-apoptóticos. No entanto, quando comparamos esses dados com os resultados obtidos com a molécula Bcr-Abl quinase-deficiente, parece que atividade enzimática de Bcr-Abl é importante, principalmente, para a manutenção da resistência à apoptose quando ela já esteve presente e modificou a célula de uma certa maneira que a tornou dependente de sua ativação. Isso porque, a atividade tirosina-quinase é responsável pela ativação de diversas vias de sinalização, sendo responsável, por exemplo, pela independência de fatores de crescimento observada em células que expressam Bcr-Abl ativo. Sendo assim, quando se inibe esta atividade por um tempo mais longo com o uso do mesilato

de imatinibe, é difícil dissociar se as células estão morrendo por que a via de sinalização anti-apoptótica foi afetada ou se as células perderam algumas das características de transformação celular e voltaram, por exemplo, a ser dependentes de fator de crescimento. Outro argumento é se a dependência causada por Bcr-Abl está totalmente relacionada à sua atividade quinase, levantando a questão se a expressão de Bcr-Abl quinase-deficiente também é capaz de induzir certo grau de dependência. O fato das células HL-60.Bcr-Abl terem ficado dependentes da atividade enzimática de Bcr-Abl reforça a idéia de que uma vez presente, essa proteína é capaz de modificar totalmente uma célula.

Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que a resistência à apoptose conferida por Bcr-Abl possui componentes dependentes e independentes de sua atividade tirosina-quinase, indicando o envolvimento de outros domínios da molécula no controle da morte celular.

5.2 IMPACTO DA EXPRESSÃO DE BCR-ABL NO PROTEOMA DE CÉLULAS HL-60

Além da resistência à apoptose, outras alterações fenotípicas são observadas em células que expressam Bcr-Abl, como desregulação da proliferação, redução da dependência de fatores de crescimento, alterações no reparo do DNA e anormalidades nas interações com a matriz extracelular e com o estroma (Jagani et al., 2007). Com base no fato de que a maioria das vias ativadas por Bcr-Abl transmite sinais para as maquinarias de transcrição e tradução da célula transformada, é plausível que o fenótipo maligno de células positivas para Bcr-Abl possa ser explicado, pelo menos em parte, por alterações no padrão de expressão protéica global. Sabe-se que algumas das principais alterações moleculares desencadeadas por essa tirosina-quinase não resultam de modificações na transcrição gênica, ocorrendo diretamente no nível protéico (Unwin et al., 2005). Como exemplos dessas alterações podem ser citadas a redução da expressão de proteínas inibitórias de c-Abl por mecanismo mediado via proteassoma (Dai et al., 1998) e a regulação negativa de p53 por meio de alterações pós-transcricionais, associadas à superexpressão de mdm2 induzida por Bcr-Abl (Goetz et al., 2001).

Considerando essas possibilidades, optamos por adotar uma abordagem proteômica para identificar proteínas cuja expressão é modificada por Bcr-Abl. Para isso, analisamos e comparamos o padrão de expressão protéica global de células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl, focando em dois objetivos: 1) a identificação de substratos e moléculas-alvo da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl e 2) a identificação de proteínas diferencialmente expressas, como consequência da exposição prolongada à oncoproteína Bcr-Abl.

Como resultado dessa abordagem, foram obtidos os perfis de expressão de proteínas totais e de proteínas fosforiladas em tirosina de células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl (Figuras 40 e 41). Como os dois géis de cada linhagem eram supostamente iguais, nós esperávamos, por meio da sobreposição das imagens de proteínas totais e das proteínas fosforiladas em tirosina, encontrar e extrair do gel corado com azul de Coomassie os “spots” que correspondiam a proteínas fosforiladas em tirosina, para posterior identificação. Por meio da comparação dos “spots” que representavam proteínas fosforiladas em tirosina entre as duas linhagens, poderíamos identificar aqueles que estavam diferencialmente fosforilados e atribuir essa diferença à expressão de Bcr-Abl. Entretanto, não foi possível realizar uma sobreposição confiável das duas imagens. A diferença de sensibilidade dos dois métodos de detecção de proteínas (azul de Coomassie e Western-blot) resultou em pequenas diferenças no padrão de distribuição dos “spots” (Figuras 40 e 41). Como consequência da maior sensibilidade da marcação com o anticorpo anti-fosfotirosina, alguns “spots” só foram detectados com esse método. Além disso, heterogeneidades sutis nos géis de poliacrilamida também causaram diferenças no padrão de distribuição dos “spots” que, embora pequenas, foram suficientes para inviabilizar a comparação das imagens.

Optamos então por nos concentrar na comparação do perfil de expressão global de proteínas das linhagens HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl. De maneira geral, a análise comparativa da expressão protéica mostrou que a expressão de Bcr-Abl é capaz de alterar os níveis de expressão de proteínas envolvidas em uma grande variedade de processos celulares. Entre as proteínas diferencialmente expressas, encontramos chaperonas e moléculas envolvidas na resposta a estresse, proteínas estruturais, moléculas relacionadas à adesão e à mobilidade celular, ao metabolismo energético, ao processamento de RNA e controle da transcrição e tradução. Identificamos ainda proteínas associadas à transdução de sinais, transporte de substâncias, crescimento, proliferação e até mesmo morte celular (Tabelas 1, 2, 3 e 4). A associação de Bcr-Abl com a expressão diferencial de algumas dessas proteínas corrobora outros estudos, reforçando a idéia de que essa quinase pode afetar o funcionamento celular por meio de uma ampla gama de alterações. Outras proteínas que identificamos, contudo, ainda não foram estudadas a fundo; a investigação das vias em que estão envolvidas pode ser um caminho promissor para entender como Bcr-Abl promove a transformação celular.

A seguir, discutimos como algumas das proteínas que foram detectadas como diferencialmente expressas entre as duas linhagens podem estar relacionadas à transformação celular.

Proteínas de citoesqueleto - aspectos gerais

Microfilamentos de actina, filamentos intermediários e microtúbulos são os principais componentes do citoesqueleto de células eucarióticas e formam uma rede estrutural que interconecta as membranas celulares, as organelas citoplasmáticas e o núcleo (Leung et al., 1992). Essas proteínas estão envolvidas na regulação de diversos processos, como manutenção da morfologia, mobilidade celular, fagocitose, transporte intracelular, localização das organelas, e formação do fuso mitótico durante a divisão celular. Adicionalmente, o citoesqueleto também desempenha um papel importante no processo de crescimento e diferenciação, e pode estar envolvido na regulação da transdução de sinais. As diversas proteínas que compõem o citoesqueleto incluem: actina em microfilamentos, tubulina em microtúbulos, e um grupo heterogêneo de proteínas de filamentos intermediários que estão associadas aos diferentes tipos celulares (queratina nas células epiteliais, vimentina em fibroblastos, desmina em células musculares, proteína glial em células da glia e neurofilamento no tecido nervoso).

Em células HL-60, a expressão de Bcr-Abl parece ter modificado o balanço entre os diferentes componentes do citoesqueleto celular. Comparada às células HL-60.vetor, células HL-60.Bcr-Abl apresentam um aumento na expressão de vimentina, tubulina e citoqueratina, enquanto que apresentam uma diminuição da expressão de actina e lamina-B2. Dos três “spots” identificados como vimentina, dois estavam aumentados em HL-60.Bcr-Abl e um era exclusivo dessa linhagem. Também as citoqueratinas K8 e K18 foram identificadas em “spots” exclusivos de HL-60.Bcr-Abl. Essas observações são de especial importância, se considerarmos que as alterações das propriedades de adesão e mobilidade de células leucêmicas derivadas de LMC têm sido associadas ao seu escape prematuro da medula óssea e à perda da regulação pelo microambiente da medula (Unwin et al., 2005). Além disso, modificações nessa rede de proteínas têm consequências no controle do crescimento, invasão e metástase de tumores (Bernal e Stahel, 1985). É possível concluir, portanto, que a transformação celular mediada por Bcr-Abl provavelmente causa alterações significativas no citoesqueleto.

Vimentina

O aumento da expressão da vimentina induzida por Bcr-Abl também foi observado em um estudo proteômico que comparou os efeitos de 6 tirosina-quinases no proteoma de células BaF3 (Pierce et al., 2007). A vimentina é um dos principais componentes do citoesqueleto de leucócitos, possuindo um papel fundamental tanto na adesão ao endotélio vascular como na

migração dessas células através dele (Nieminen et al., 2006). Além disso, a vimentina interage com várias moléculas envolvidas na transdução de sinais, como Raf1, PKC e 14-3-3 (Janosch et al., 2000; Tzivion et al., 2000; Ivaska et al., 2005) e regula as funções de integrinas (Brakebusch e Fassler, 2003; Nieminen et al., 2006). A clivagem de vimentina por caspases representa um evento-chave durante a apoptose, contribuindo para as alterações morfológicas características desse processo (Byun et al., 2001). Outra possível função da vimentina é como regulador de transcrição, visto que essa proteína é capaz de interagir e sequestrar fatores que interferem na transcrição gênica, tais como p53 e menina (Ivaska et al., 2007). A habilidade de se ligar à p53 também levanta suspeitas sobre um possível efeito de vimentina na regulação da morte e sobrevivência celular. Em pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica (LLC), foram observadas anormalidades na mobilidade dos linfócitos relacionadas às alterações na expressão e no arranjo dos filamentos de vimentina (Stark et al., 1984). Posteriormente, a alta expressão de vimentina em LLC também foi associada à progressão da doença e a uma maior rigidez linfocítica, sugerindo que as células leucêmicas com maior expressão de vimentina seriam menos susceptíveis à ruptura, e, conseqüentemente, estariam associadas a um pior prognóstico (Nowakowski et al., 2007). Além disso, sabe-se que as funções da vimentina podem ser reguladas por meio de alterações no seu estado de fosforilação (Ivaska et al., 2007). Dado o número de processos biológicos dos quais os filamentos de vimentina participam e sua susceptibilidade à regulação por quinases, podemos imaginar que parte das alterações que Bcr-Abl promove na sinalização intracelular podem efetivamente estar associadas ao aumento da expressão de vimentina.

Citoqueratinas

De maneira semelhante à vimentina, também a expressão de citoqueratina foi incrementada em células HL-60.Bcr-Abl. As citoqueratinas (K), são proteínas de filamentos intermediários de células epiteliais e constituem a maior família de proteínas do citoesqueleto (K1-K22). Embora sejam típicas de epitélios, essas proteínas são expressas em outros tecidos e parecem modular o comportamento celular durante o desenvolvimento. Em trofoblastos, por exemplo, contribuem para a mobilidade celular (Lane et al., 1983); em células tumorais derivadas de vários epitélios, a persistência das queratinas K8 e K18 é uma marca associada à inúmeras características de células cancerosas, incluindo a habilidade de invasão (Hendrix et al., 1996; Galarneau et al., 2007). K8 e K18 já foram observadas em amostras de medula óssea, linfonodos, células de sangue periférico e linhagens celulares leucêmicas, inclusive a HL-60 (Traweek et al., 1993). Células K562, que possuem Bcr-Abl, expressam citoqueratina K8 e K18 e a exposição dessas células a indutores de diferenciação eritrocítica, reduz

drasticamente a expressão dessas proteínas, mostrando o impacto da diferenciação celular sobre a expressão dos filamentos intermediários. Com base nesses resultados, Jarvinen e colaboradores sugerem que a presença dessas queratinas em células K562, talvez represente uma diferenciação anormal ou retrodiferenciação na direção de células mesenquimais embrionárias (Jarvinen et al., 1990). A linhagem K562 é derivada de um paciente com LMC na crise blástica, uma fase que tem como característica justamente a perda da capacidade de diferenciação. Portanto, o aumento na expressão dessas proteínas associado à Bcr-Abl, conforme observado em células HL-60.Bcr-Abl, sugere que K8 e K18 possam contribuir para o bloqueio da diferenciação observado nas células leucêmicas na fase blástica.

Além da função estrutural, existem evidências de que as queratinas K8 e K18 exercem também funções não mecânicas. Filamentos intermediários de queratina têm um papel importante na adesão celular e nas interações entre células, atuando nas associações com desmossomos e hemidesmossomos (Ivaska et al., 2007). Hepatócitos nocauteados para K8 se aderem de maneira mais rápida, mas se espalham mais lentamente sobre a fibronectina e exibem uma transição G1/S mais eficiente do que os que possuem essa proteína (Galarneau et al., 2007). Além disso, hepatócitos que não expressam K8 e K18 são mais sensíveis à apoptose induzida por Fas e apresentam uma densidade aumentada de Fas na superfície celular e alterações na via de regulação da sinalização anti-apoptótica de Erk1/2 (Gilbert et al., 2001). Células L fibroblásticas transfectadas com K8 e K18 apresentam uma maior resistência a agentes quimioterápicos (Bauman et al., 1994), e a perturbação na expressão dessas queratinas aumenta a sensibilidade à indução de morte (Caulin et al., 2000). Essas evidências sugerem que, assim como Bcr-Abl, também K8 e K18 possuem ação anti-apoptótica. É possível, portanto, levantar a hipótese de que a maior expressão das citoqueratinas K8 e K18 observada nas células HL-60.Bcr-Abl, contribui para os efeitos de Bcr-Abl sobre a resistência à apoptose.

Arp3

Unwin e colaboradores observaram que a presença de Bcr-Abl em células BaF3 alterou a expressão de 32 proteínas, dentre as quais várias relacionadas ao citoesqueleto, incluindo a diminuição dos níveis de gelsolina, “adseverin” e Arp2 (“actin-related protein 2”) (Unwin et al., 2005). Gelsolina e “adseverin” são proteínas intimamente relacionadas com agregação e desagregação dos filamentos de actina e, portanto, estão envolvidas na mobilidade celular. Arp2 é parte do complexo Arp2/3 que está associado à formação de novos filamentos de actina (Mullins et al., 1998). Embora não tenhamos identificado especificamente nenhuma dessas três proteínas, também observamos alterações na expressão

de moléculas envolvidas no citoesqueleto, incluindo a diminuição da expressão de actina (Tabela 3). Um dos “spots” que está diminuído em células HL-60.Bcr-Abl é Arp3 que, como mencionado acima, forma complexo com Arp2 e está associada à formação de filamentos de actina (Machesky e Gould, 1999). A diminuição da expressão de Arp3 em células HL-60.Bcr-Abl pode estar associada à redução dos níveis de actina e às alterações na mobilidade celular. As diferenças entre as proteínas identificadas neste estudo e no de Unwin e colaboradores, podem estar vinculadas à linhagem celular estudada, às diferenças no tamanho e faixa de pH das tiras utilizadas ou no método de detecção de proteínas adotado (usamos azul de Coomassie, enquanto Unwin e colaboradores utilizaram marcação com prata).

14-3-3 épsilon

Observamos também que células HL-60.Bcr-Abl expressam quantidades maiores de 14-3-3 épsilon do que células HL-60.vetor (Tabela 1; Figura 51). O aumento da expressão dessa proteína também foi observado em células BaF3 com Bcr-Abl (Unwin et al., 2005). Os membros da família 14-3-3 são moléculas citoplasmáticas capazes de formar homo e hetero-dímeros e de interagir com outras proteínas, controlando diversos processos celulares por sequestrarem proteínas no citosol. As proteínas 14-3-3 podem se associar e serem fosforiladas por Bcr-Abl, estando envolvidas na regulação da progressão do ciclo celular, apoptose e transdução de sinais. Algumas evidências sugerem que essas proteínas podem interagir com Raf-1 e auxiliar na via de Ras, uma via de sinalização ativada por Bcr-Abl. Podem também inibir a morte celular, interagindo diretamente com reguladores da apoptose, como Bad e Bax, ou pela regulação das cascatas que envolvem MAP quinases (Nomura et al., 2003).

Inibidores da dissociação de Rho-GDI

Unwin e colaboradores observaram que a expressão de Bcr-Abl promove a desfosforilação do inibidor 1 da dissociação de Rho-GDI (Rho-GDI1, GDIR) (Unwin et al., 2005); embora não tenhamos informação sobre o status de fosforilação dessa proteína, observamos a diminuição de sua expressão, bem como de Rho GDI2, em células HL-60.Bcr-Abl (Tabelas 3 e 4; Figuras 53 e 54). As proteínas Rho GDI regulam a reação de troca de GDP/GTP de proteínas Rho, inibindo a dissociação do GDP dessas proteínas e impedindo, conseqüentemente, a sua ligação com GTP (Dovas e Couchman, 2005). Portanto, a associação de Rho GDI com proteínas Rho é capaz de mantê-las em uma forma citosólica inativa. A expressão de Bcr-Abl em células BaF3 promove a ativação constitutiva de Rho GTPase e a sinalização de Rho é importante para os efeitos celulares de Bcr-Abl, desempenhando um

papel fundamental no crescimento e desenvolvimento de leucemias (Unwin et al., 2005). Dessa forma, a menor expressão de Rho GDI1 e Rho GDI2 em células HL-60.Bcr-Abl, observada neste estudo, pode ser uma evidência da perda da atividade inibitória de Rho GDI, o que possivelmente contribui para a ativação da via de Rho nessa linhagem celular.

Fosfoproteína-1 induzida por estresse

Nossos resultados mostram o aumento da expressão de Hop associado à expressão de Bcr-Abl. A proteína Hop (“Hsp70/Hsp90 organizing protein”), também conhecida como fosfoproteína-1 induzida por estresse (STIP1) é uma proteína adaptadora co-chaperona que pode se ligar a Hsp70 e Hsp90 simultaneamente, regulando as funções dessas proteínas. Hsp90 é uma molécula modulada positivamente por Bcr-Abl, tendo sido identificada como um potencial alvo terapêutico em LMC, uma vez que se liga e protege Bcr-Abl da degradação pelo proteassoma (Blagosklonny et al., 2001; George et al., 2005). A proteína Hsp70, por sua vez, foi descrita como uma molécula com funções anti-apoptóticas, capaz de proteger da indução de morte tanto pela via intrínseca como pela via extrínseca (Ray et al., 2004). Com base no aumento da expressão dessa chaperona em células que expressam Bcr-Abl e são resistentes ao mesilato de imatinibe, foi sugerido um possível papel de Hsp70 no desenvolvimento de resistência a esse inibidor de tirosina-quinase (Pocaly et al., 2007). É plausível elaborar a hipótese, portanto, de que o aumento da expressão de Hop na linhagem HL-60.Bcr-Abl poderia auxiliar na estabilização do complexo formado com Hsp70 e Hsp90; isso poderia favorecer os efeitos anti-apoptóticos de Hsp70 e aumentar a proteção de Bcr-Abl contra a degradação pelo proteassoma.

Canais de cloreto intracelulares

Nossos dados trazem também a possibilidade de que as alterações celulares mediadas por Bcr-Abl estejam relacionadas ao transporte de íons, pois observamos aumento na expressão de CLIC1 (Tabela 1; Figura 51). Os membros da família CLIC de canais iônicos (“chloride intracellular channels”) podem existir na forma solúvel ou ligados à membrana plasmática ou de organelas (Cromer et al., 2002). O transporte de íons, como o cloreto, para formar e manter gradientes eletroquímicos, é um elemento importante da regulação das atividades celulares. Esse transporte, que é promovido por canais protéicos como o CLIC1, determina o potencial de membrana, mantém o pH intracelular e regula o volume da célula. Dessa forma, os canais intracelulares de cloreto contribuem para a regulação do ciclo celular,

apoptose, adesão e mobilidade celular (Jentsch et al., 2002; Suh e Yuspa, 2005). Não é surpreendente, portanto, que já tenha sido documentada a associação de canais CLIC e o câncer: foi observado, por exemplo, que CLIC1 está aumentado em cânceres de estômago e que sua expressão está fortemente correlacionada com metástase no linfonodo, invasão linfática e o estágio patológico; a associação de CLIC1 a esses casos é tão clara que essa proteína já foi sugerida como um potencial marcador de prognóstico para esse tipo de câncer (Chen et al., 2007). As funções celulares de CLIC1 ainda não são bem conhecidas, mas trabalhos sugerem o seu envolvimento na regulação do ciclo celular (Valenzuela et al., 2000). É possível, portanto, que algumas das alterações celulares mediadas por Bcr-Abl propaguem-se por vias em que haja a participação de canais de cloreto como o CLIC1. Todavia, estudos mais detalhados são necessários para esclarecer exatamente como se dá essa participação.

Ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas

Bcr-Abl parece também alterar vias relacionadas às ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas (hnRNPs), a julgar por nossos resultados que apontam para um incremento na expressão de hnRNPK na linhagem HL-60.Bcr-Abl (Tabela 1). As ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas são proteínas que se ligam ao RNAm ainda no núcleo, influenciando o metabolismo e transporte desses ácidos nucléicos; trata-se de proteínas indutoras de transcrição e reguladoras da tradução. Altos níveis de hnRNPs têm sido associados com progressão de tumores e resistência a indução de apoptose por quimioterapia em várias neoplasias (Mandal et al., 2001). Notari e colaboradores, por exemplo, mostraram que a presença de Bcr-Abl aumenta a expressão e a atividade de hnRNPK em linhagens transfectadas e em células primárias CD34⁺ de pacientes com LMC na crise blástica. Esse aumento de hnRNPK mediado por Bcr-Abl ocorre de maneira dose e quinase-dependente, por meio da ativação da via de MAPK (Erk1/2) (Notari et al., 2006). Nesse trabalho, os autores mostraram ainda que a inibição de hnRNPK ou de sua atividade reguladora da tradução bloqueia o potencial proliferativo independente de citocinas, o potencial clonogênico e a atividade leucemogênica in vivo de células positivas para Bcr-Abl. Tal fenômeno está relacionado com a diminuição da tradução do RNA de myc (Notari et al., 2006). Esses achados são consistentes com a interpretação de que, nas células HL-60.Bcr-Abl que estudamos, o aumento de hnRNPK contribui para os efeitos leucemogênicos dessa tirosina-quinase.

“Gluthatione S-transferase P”

Nossos resultados mostram uma associação entre a presença de Bcr-Abl e o aumento na expressão de “Glutathione S-transferase P”(GST). Trata-se de uma enzima citossólica envolvida na desintoxicação celular, expressa em um grande número de tecidos, incluindo placenta, mama, intestino e bexiga urinária. Essa enzima, e outras da mesma família, participam da remoção de produtos do estresse oxidativo, modulam a proliferação celular e as vias de sinalização apoptótica (Zhao et al., 2006). A superexpressão de GSTP1 tem sido associada ao processo de carcinogênese e ao desenvolvimento de diversos tipos de tumores humanos, sendo que, geralmente, a sua expressão está inversamente correlacionada com o prognóstico e com a sobrevivência dos pacientes. Além disso, essa proteína também parece estar envolvida na aquisição de resistência a drogas anti-tumorais; sua superexpressão foi observada em linhagens de câncer gástrico, e pode estar associada a um aumento do potencial metastático e invasivo induzido por TGF- β 1 (Wang et al., 2007). GSTP1 aparentemente exerce sua função anti-apoptótica inibindo a ativação de MEKK1 em resposta a agentes genotóxicos, como o etoposídeo (Zhao et al., 2006). É de especial importância o fato de que o aumento na expressão de GSTP1 já foi relacionado antes de nosso estudo a doenças mieloproliferativas (Wrobel et al., 2004), envolvendo inclusive a associação com Bcr-Abl, em células de pacientes com diferentes condições clínicas (Marche-Cova et al., 2000). O aumento de GSTP1 mediado por Bcr-Abl provavelmente está relacionado aos efeitos anti-apoptóticos dessa tirosina-quinase, uma vez que foi observado que inibidores de GST têm atividade pró-apoptótica sobre algumas células tumorais, incluindo a linhagem K562 (Turella et al., 2005).

Peroxiredoxinas

Peroxiredoxinas (PRDXs), que representam uma família de peroxidases anti-oxidantes dependentes de tioredoxina, também apareceram expressas em quantidade relativamente maior nas células HL-60.BcrAbl. PRDXs eliminam peróxidos gerados durante o metabolismo celular, protegendo contra estresse oxidativo, modulando a sinalização intracelular mediada por peróxido de hidrogênio e regulando a proliferação (Immenschuh e Baumgart-Vogt, 2005). PRDX1 e PRDX2 estão superexpressas em tumores de mama e podem ser importantes inibidores da morte celular durante a resposta ao estresse oxidativo (Bae et al., 2007). Da mesma forma, PRDX2 protege linhagens de câncer de cabeça e pescoço da indução de morte por radiação gama (Park et al., 2000), bem como células de câncer gástrico da morte induzida por cisplatina (Yo et al., 2002). PRDX4, que é expressa em diversas linhagens celulares humanas (incluindo as leucêmicas HL-60, K562 e MOLT-4), está envolvida na regulação da ativação do fator de transcrição NF κ B por peróxido de hidrogênio (Jin et al., 1997). Essas

evidências são congruentes com a expressão aumentada de PRDXs na linhagem HL-60.BcrAbl, pois PRDX2 e PRDX4, por exemplo, poderiam também estar contribuindo para os efeitos de Bcr-Abl sobre as vias de sinalização e bloqueio da morte celular. Alguns trabalhos sugerem que Bcr-Abl também poderia regular outras peroxiredoxinas, como PRDX1 e PRDX3. Li e colaboradores mostraram que c-Abl exerce um efeito negativo sobre a indução de PRDX1, uma proteína antioxidante com atividade supressora de tumor (Li, 2005). Por outro lado, o tratamento com mesilato de imatinibe promove o aumento na expressão de PRDX3, indicando que Bcr-Abl pode ter efeitos contrários sobre as diferentes peroxiredoxinas (Griffiths et al., 2007). Outra interpretação, contudo, também é possível: como a presença de Bcr-Abl está associada ao aumento da quantidade de ROS intracelular (Sattler et al., 2000), os altos níveis de expressão de PRDXs podem ser uma resposta ao estresse oxidativo, sendo mais uma reação aos efeitos de Bcr-Abl que propriamente parte da via de transformação celular.

SET

A proteína SET é um inibidor de PP2A (proteína fosfatase 2A, “protein phosphatase 2A”), uma serina/treonina-fosfatase que regula proliferação, sobrevivência e diferenciação celular e cuja perda de função tem sido associada à transformação celular em muitos sistemas. Nossos resultados indicam um aumento na expressão dessa proteína associado a Bcr-Abl, o que já foi detectado por outros estudos. A inativação de PP2A é mediada pela proteína SET, que tem sua expressão induzida por Bcr-Abl de maneira dose e quinase dependente, o que foi observado em linhagens positivas para Bcr-Abl e em células CD34⁺ de pacientes com LMC nas fases crônica e blástica (Neviani et al., 2005). A expressão de SET aumenta progressivamente durante a transição para a fase blástica e, como resultado desse aumento, ocorre a perda progressiva da atividade supressora de tumor de PP2A. A importância da regulação negativa de PP2A para os efeitos transformantes de Bcr-Abl foi reafirmada por estudos em que se observou que a reativação de PP2A suprimiu o crescimento, aumentou a apoptose e bloqueou o potencial clonogênico e leucemogênico de células que expressam Bcr-Abl (Neviani et al., 2005; Perrotti e Neviani, 2006). Isso parece estar associado à indução de desfosforilação e degradação de Bcr-Abl por PP2A, a qual ocorre de maneira dependente da ação de SHP-1, uma tirosina fosfatase (Perrotti e Neviani, 2006).

O aumento da atividade de PP2A, induzida pelo tratamento com mesilato de imatinibe ou redução da expressão de SET, diminuiu os níveis de Rb hiperfosforilado e suprimiu a expressão de Myc e a fosforilação de STAT5, ERK1/2, Akt, Bad e Jak2, sem afetar a

expressão dessas proteínas (Neviani et al., 2005). Esses resultados mostram que vários dos alvos de Bcr-Abl são compartilhados com PP2A e, dada a importância desses alvos para os efeitos de Bcr-Abl, pode-se considerar que a inativação de PP2A é uma das principais estratégias de Bcr-Abl para prevenir a inativação dos sinais mitóticos e de sobrevivência. Sendo assim, a maior expressão de SET observada nas células HL-60.Bcr-Abl está, portanto, de acordo com o que já se sabe sobre essas proteínas; nesse caso, restam poucas dúvidas de que SET contribui para os efeitos transformantes de Bcr-Abl e para seu potencial anti-apoptótico.

Proteína de choque térmico beta-1

A linhagem HL-60.Bcr-Abl apresentou também níveis aumentados da proteína de choque térmico beta-1 (HSPB1 ou Hsp27) em comparação à HL-60.vetor. Essa proteína está envolvida na resposta celular a situações de estresse e na organização do citoesqueleto de actina. Em células normais, é expressa em baixos níveis, mas a exposição a estresses fisiológicos e ambientais promove o seu acúmulo rapidamente; em células tumorais, entretanto, ela é expressa em altos níveis mesmo na ausência de estímulos de estresse. A alta expressão dessa proteína está associada a piores prognósticos em alguns tipos de câncer, o que está relacionado principalmente à proteção que essa proteína confere contra drogas anti-tumorais (Ciocca e Calderwood, 2005). Os trabalhos da literatura sugerem que Hsp27 desempenha dois papéis principais durante o estresse: 1) a manutenção do funcionamento normal das células, por meio da sua interação com proteínas do citoesqueleto (ex: actina e tubulina) e da facilitação do reparo ou remoção de proteínas danificadas e 2) a prevenção da apoptose, tanto por ligar-se e seqüestrar citocromo c e pró-caspase-3, quanto regular o conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (Concannon et al., 2003). Hsp27 parece desempenhar um papel crucial na regulação do balanço entre morte e sobrevivência celular, onde a sua superexpressão está associada com a supressão da apoptose, aumento da citoproteção e resistência a tratamentos (Kamada et al., 2007).

A hipótese de que o incremento na expressão de Hsp27 induzido por Bcr-Abl contribui para a resistência à apoptose em células HL-60.Bcr-Abl, torna-se bastante plausível se considerarmos o que se sabe sobre essa proteína. Hsp27 bloqueia a via de sinalização apoptótica em diversos pontos, incluindo inibição da formação do apoptossomo e, conseqüentemente, da ativação de caspases pelo seqüestro de citocromo c no citosol (Bruey et al., 2000), prevenção da ativação de Bid dependente de caspase-8, bloqueio da ativação de caspase-3 pela interação com pró-caspase-3, além de proteger da apoptose induzida por

radiação, por meio da supressão da produção de espécies reativas de oxigênio, a qual é mediada por proteína quinase C (PKC). Adicionalmente, Hsp27 modula a via de p53, protegendo da indução de senescência (O'callaghan-Sunol et al., 2007), e regula a ativação de Akt, promovendo a sobrevivência celular (Wu et al., 2007). Apesar de Hsp27 não prevenir a ativação de caspase por granzima B, sua expressão protege da indução de apoptose por uma variedade de estímulos, incluindo TNF- α , FasL, estresse oxidativo, estaurosporina e drogas citotóxicas (Bruey et al., 2000; Concannon et al., 2003). O aumento da expressão de Hsp27 tem ainda efeito positivo sobre a degradação de I- κ B α e, conseqüentemente, sobre a ativação de NF- κ B (Parcellier et al., 2003). Essas informações deixam claro que há efeitos celulares compartilhados entre a expressão de Bcr-Abl em células leucêmicas e a superexpressão de Hsp27 em diversos tipos de tumores. Nossos resultados indicam, portanto, que Hsp27 pode ser uma molécula-chave das vias afetadas por Bcr-Abl durante a transformação celular.

Considerações finais

Nossos resultados são compatíveis com a interpretação de que Bcr-Abl promove alterações em múltiplas funções celulares; a relação de proteínas discutidas acima não é e nem pretende ser exaustiva. O caráter exploratório deste estudo não permite extrair conclusões definitivas a respeito da exata influência de Bcr-Abl sobre cada proteína identificada como diferencialmente expressa e nem a contribuição de cada uma para a transformação celular. Em vez disso, ele procura apontar alterações de caráter geral causadas por Bcr-Abl e busca indicar vias possivelmente alteradas e que podem ser estudadas mais detalhadamente. Além disso, as proteínas identificadas neste trabalho podem contribuir tanto para o entendimento dos mecanismo moleculares envolvidos nos efeitos celulares de Bcr-Abl, quanto para a identificação de novos marcadores de prognóstico e alvos terapêuticos.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com a inibição farmacológica da atividade enzimática de Bcr-Abl sugerem que a resistência à apoptose induzida por essa tirosina-quinase não depende da manutenção constante dessa atividade, tampouco da presença momentânea de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina. Isto significa que não é a atividade enzimática *per se* a responsável pela inativação ou bloqueio da maquinaria apoptótica que se observa em células positivas para Bcr-Abl, mas sim algum(ns) evento(s) secundário(s) ao aparecimento desta atividade. Por outro lado, os resultados observados com as novas linhagens celulares expressando ectopicamente a forma mutada, quinase-deficiente de Bcr-Abl apontam para a existência de uma sinalização independente desta atividade, a qual contribui parcialmente para o fenótipo de resistência à apoptose.

Portanto, a resistência à apoptose observada em células Bcr-Abl-positivas é obra de uma somatória de fatores, dependentes e independentes da atividade tirosina-quinase dessa oncoproteína. Além disso, esta resistência é sujeita à presença de eventos/modificações secundárias à expressão de Bcr-Abl. Porém, a atividade tirosina-quinase dessa oncoproteína parece ser importante para a sobrevivência celular a longo prazo, uma vez que as células tratadas cronicamente com o inibidor farmacológico morrem. Neste sentido, podemos dizer que a expressão de Bcr-Abl induz uma “dependência” à sua atividade enzimática. É importante destacar que a análise da expressão de proteínas reguladoras do processo apoptótico sugere que a manutenção da resistência à morte na ausência da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl não está associada à expressão de nenhuma das moléculas analisadas, incluindo as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-x_L.

A comparação do proteoma de células HL-60.vetor e HL-60.Bcr-Abl revelou que a presença de Bcr-Abl é capaz de alterar profundamente o padrão de expressão de proteínas envolvidas em diversos processos celulares. Entre as proteínas diferencialmente expressas, encontramos chaperonas, proteínas envolvidas na resposta a estresse, proteínas estruturais, proteínas relacionadas à adesão e à mobilidade celular, ao metabolismo energético, ao processamento de RNA e ao controle da transcrição e tradução. Identificamos ainda proteínas associadas à transdução de sinais, transporte de substâncias, crescimento, proliferação e até mesmo à morte celular. Consultando a literatura, constatamos que algumas dessas proteínas já foram associadas à presença de Bcr-Abl, enquanto outras sabidamente estão envolvidas na fisiopatologia de outras neoplasias. Os achados deste trabalho ampliam o conhecimento sobre as moléculas-alvo de Bcr-Abl e trazem novas possibilidades de vias de atuação envolvidas na transformação celular mediada por essa molécula. Dessa forma, as proteínas identificadas neste trabalho podem contribuir tanto para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na transformação por Bcr-Abl, quanto para a identificação de novos marcadores de prognóstico e alvos terapêuticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aichberger, K. J.; M. Mayerhofer; M. T. Krauth; H. Skvara; S. Florian; K. Sonneck; C. Akgul; S. Derdak; W. F. Pickl; V. Wacheck; E. Selzer; B. P. Monia; R. Moriggl; P. Valent; C. Sillaber. Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of imatinib and mcl-1 antisense oligonucleotides. **Blood**, v.105, n.8, p.3303-11, 2005.
- Altieri, D. C.; P. C. Marchisio. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. **Lab Invest**, v.79, n.11, p.1327-33, 1999.
- Amarante-Mendes, G. P.; D. M. Finucane; S. J. Martin; T. G. Cotter; G. S. Salvesen; D. R. Green. Anti-apoptotic oncogenes prevent caspase-dependent and independent commitment for cell death. **Cell Death Differ**, v.5, n.4, p.298-306, 1998a.
- Amarante-Mendes, G. P.; T. Jascur; W. K. Nishioka; T. Mustelin; D. R. Green. Bcr - Abl-mediated resistance to apoptosis is independent of PI 3-kinase activity. **Cell Death Differ**, v.4, n.7, p.548-54, 1997.
- Amarante-Mendes, G. P.; A. J. McGahon; W. K. Nishioka; D. E. Afar; O. N. Witte; D. R. Green. Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL. **Oncogene**, v.16, n.11, p.1383-90, 1998b.
- Amarante-Mendes, G. P.; C. Naekyung Kim; L. Liu; Y. Huang; C. L. Perkins; D. R. Green; K. Bhalla. Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3. **Blood**, v.91, n.5, p.1700-5, 1998c.
- Antonsson, B.; J. C. Martinou. The Bcl-2 protein family. **Exp Cell Res**, v.256, n.1, p.50-7, 2000.
- Antonsson, B.; S. Montessuit; S. Lauper; R. Eskes; J. C. Martinou. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. **Biochem J**, v.345 Pt 2, p.271-8, 2000.
- Ashkenazi, A.; V. M. Dixit. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, v.281, n.5381, p.1305-8, 1998.
- Bae, J. Y.; S. J. Ahn; W. Han; D. Y. Noh. Peroxiredoxin I and II inhibit H₂O₂-induced cell death in MCF-7 cell lines. **J Cell Biochem**, v.101, n.4, p.1038-45, 2007.
- Barnes, D. J.; B. Schultheis; S. Adediji; J. V. Melo. Dose-dependent effects of Bcr-Abl in cell line models of different stages of chronic myeloid leukemia. **Oncogene**, v.24, n.42, p.6432-40, 2005.
- Bartova, E.; S. Kozubek; M. Kozubek; P. Jirsova; E. Lukasova; M. Skalnikova; K. Buchnickova. The influence of the cell cycle, differentiation and irradiation on the nuclear location of the abl, bcr and c-myc genes in human leukemic cells. **Leuk Res**, v.24, n.3, p.233-41, 2000.

Bartram, C. R.; A. De Klein; A. Hagemeijer; T. Van Agthoven; A. Geurts Van Kessel; D. Bootsma; G. Grosveld; M. A. Ferguson-Smith; T. Davies; M. Stone; Et Al. Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. **Nature**, v.306, n.5940, p.277-80, 1983.

Baskiewicz-Masiuk, M.; B. Machalinski. The role of the STAT5 proteins in the proliferation and apoptosis of the CML and AML cells. **Eur J Haematol**, v.72, n.6, p.420-9, 2004.

Bauman, P. A.; W. S. Dalton; J. M. Anderson; A. E. Cress. Expression of cytokeratin confers multiple drug resistance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.91, n.12, p.5311-4, 1994.

Baylin, S. B.; J. E. Ohm. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nat Rev Cancer**, v.6, n.2, p.107-16, 2006.

Bedi, A.; J. P. Barber; G. C. Bedi; W. S. El-Deiry; D. Sidransky; M. S. Vala; A. J. Akhtar; J. Hilton; R. J. Jones. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. **Blood**, v.86, n.3, p.1148-58, 1995.

Bedi, A.; B. A. Zehnbaauer; J. P. Barber; S. J. Sharkis; R. J. Jones. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. **Blood**, v.83, n.8, p.2038-44, 1994.

Belmokhtar, C. A.; J. Hillion; E. Segal-Bendirdjian. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. **Oncogene**, v.20, n.26, p.3354-62, 2001.

Benito, A.; M. Silva; D. Grillot; G. Nunez; J. L. Fernandez-Luna. Apoptosis induced by erythroid differentiation of human leukemia cell lines is inhibited by Bcl-XL. **Blood**, v.87, n.9, p.3837-43, 1996.

Ben-Neriah, Y.; G. Q. Daley; A. M. Mes-Masson; O. N. Witte; D. Baltimore. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. **Science**, v.233, n.4760, p.212-4, 1986.

Beran, M.; X. Cao; Z. Estrov; S. Jeha; G. Jin; S. O'brien; M. Talpaz; R. B. Arlinghaus; N. B. Lydon; H. Kantarjian. Selective inhibition of cell proliferation and BCR-ABL phosphorylation in acute lymphoblastic leukemia cells expressing Mr 190,000 BCR-ABL protein by a tyrosine kinase inhibitor (CGP-57148). **Clin Cancer Res**, v.4, n.7, p.1661-72, 1998.

Bernal, S. D.; R. A. Stahel. Cytoskeleton-associated proteins: their role as cellular integrators in the neoplastic process. **Crit Rev Oncol Hematol**, v.3, n.3, p.191-204, 1985.

Bertram, J. S. The molecular biology of cancer. **Mol Aspects Med**, v.21, n.6, p.167-223, 2000.

Blagosklonny, M. V. Cell immortality and hallmarks of cancer. **Cell Cycle**, v.2, n.4, p.296-9, 2003.

Blagosklonny, M. V. Do cells need CDK2 and ... Bcr-Abl? **Cell Death Differ**, v.11, n.3, p.249-51, 2004.

Blagosklonny, M. V.; T. Fojo; K. N. Bhalla; J. S. Kim; J. B. Trepel; W. D. Figg; Y. Rivera; L. M. Neckers. The Hsp90 inhibitor geldanamycin selectively sensitizes Bcr-Abl-expressing leukemia cells to cytotoxic chemotherapy. **Leukemia**, v.15, n.10, p.1537-43, 2001.

Blume-Jensen, P.; T. Hunter. Oncogenic kinase signalling. **Nature**, v.411, n.6835, p.355-65, 2001.

Brakebusch, C.; R. Fassler. The integrin-actin connection, an eternal love affair. **Embo J**, v.22, n.10, p.2324-33, 2003.

Breckenridge, D. G.; D. Xue. Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. **Curr Opin Cell Biol**, v.16, n.6, p.647-52, 2004.

Bruey, J. M.; C. Ducasse; P. Bonniaud; L. Ravagnan; S. A. Susin; C. Diaz-Latoud; S. Gurbuxani; A. P. Arrigo; G. Kroemer; E. Solary; C. Garrido. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. **Nat Cell Biol**, v.2, n.9, p.645-52, 2000.

Brumatti, G.; R. Weinlich; C. F. Chehab; M. Yon; G. P. Amarante-Mendes. Comparison of the anti-apoptotic effects of Bcr-Abl, Bcl-2 and Bcl-x(L) following diverse apoptogenic stimuli. **FEBS Lett**, v.541, n.1-3, p.57-63, 2003.

Bueno-Da-Silva, A. E.; G. Brumatti; F. O. Russo; D. R. Green; G. P. Amarante-Mendes. Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis is independent of constant tyrosine-kinase activity. **Cell Death Differ**, v.10, n.5, p.592-8, 2003.

Byun, Y.; F. Chen; R. Chang; M. Trivedi; K. J. Green; V. L. Cryns. Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. **Cell Death Differ**, v.8, n.5, p.443-50, 2001.

Cambier, N.; R. Chopra; A. Strasser; D. Metcalf; A. G. Elefanty. BCR-ABL activates pathways mediating cytokine independence and protection against apoptosis in murine hematopoietic cells in a dose-dependent manner. **Oncogene**, v.16, n.3, p.335-48, 1998.

Cardone, M. H.; N. Roy; H. R. Stennicke; G. S. Salvesen; T. F. Franke; E. Stanbridge; S. Frisch; J. C. Reed. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. **Science**, v.282, n.5392, p.1318-21, 1998.

Carlesso, N.; D. A. Frank; J. D. Griffin. Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. **J Exp Med**, v.183, n.3, p.811-20, 1996.

Carroll, M.; S. Ohno-Jones; S. Tamura; E. Buchdunger; J. Zimmermann; N. B. Lydon; D. G. Gilliland; B. J. Druker. CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. **Blood**, v.90, n.12, p.4947-52, 1997.

Carter, B. Z.; D. H. Mak; W. D. Schober; M. Cabreira-Hansen; M. Beran; T. Mcqueen; W. Chen; M. Andreeff. Regulation of survivin expression through Bcr-Abl/MAPK cascade: targeting survivin overcomes imatinib resistance and increases imatinib sensitivity in imatinib-responsive CML cells. **Blood**, v.107, n.4, p.1555-63, 2006.

- Caulin, C.; C. F. Ware; T. M. Magin; R. G. Oshima. Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. **J Cell Biol**, v.149, n.1, p.17-22, 2000.
- Chang, L.; M. Karin. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature**, v.410, n.6824, p.37-40, 2001.
- Chen, C. D.; C. S. Wang; Y. H. Huang; K. Y. Chien; Y. Liang; W. J. Chen; K. H. Lin. Overexpression of CLIC1 in human gastric carcinoma and its clinicopathological significance. **Proteomics**, v.7, n.1, p.155-67, 2007.
- Chinnaiyan, A. M.; K. O'rourke; M. Tewari; V. M. Dixit. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. **Cell**, v.81, n.4, p.505-12, 1995.
- Chopra, R.; Q. Q. Pu; A. G. Elefanty. Biology of BCR-ABL. **Blood Rev**, v.13, n.4, p.211-29, 1999.
- Ciocca, D. R.; S. K. Calderwood. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. **Cell Stress Chaperones**, v.10, n.2, p.86-103, 2005.
- Cirinna, M.; R. Trotta; P. Salomoni; P. Kossev; M. Wasik; D. Perrotti; B. Calabretta. Bcl-2 expression restores the leukemogenic potential of a BCR/ABL mutant defective in transformation. **Blood**, v.96, n.12, p.3915-21, 2000.
- Cohen, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochem J**, v.326 (Pt 1), p.1-16, 1997.
- Collins, K.; T. Jacks; N. P. Pavletich. The cell cycle and cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.94, n.7, p.2776-8, 1997.
- Collins, S. J. Different mechanisms account for the relative resistance of KG-1 and HL-60 cell lines to retrovirus infection. **J Virol**, v.62, n.11, p.4346-8, 1988.
- Collins, S. J.; R. C. Gallo; R. E. Gallagher. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. **Nature**, v.270, n.5635, p.347-9, 1977.
- Concannon, C. G.; A. M. Gorman; A. Samali. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. **Apoptosis**, v.8, n.1, p.61-70, 2003.
- Conte, E.; F. Stagno; P. Guglielmo; A. Scuto; C. Consoli; A. Messina. Survivin expression in chronic myeloid leukemia. **Cancer Lett**, v.225, n.1, p.105-10, 2005.
- Copland, M.; A. Hamilton; L. J. Elrick; J. W. Baird; E. K. Allan; N. Jordanides; M. Barow; J. C. Mountford; T. L. Holyoake. Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. **Blood**, v.107, n.11, p.4532-9, 2006.
- Cortez, D.; L. Kadlec; A. M. Pendergast. Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. **Mol Cell Biol**, v.15, n.10, p.5531-41, 1995.
- Cory, S.; J. M. Adams. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat Rev Cancer**, v.2, n.9, p.647-56, 2002.

Creagh, E. M.; H. Conroy; S. J. Martin. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. **Immunol Rev**, v.193, p.10-21, 2003.

Cromer, B. A.; C. J. Morton; P. G. Board; M. W. Parker. From glutathione transferase to pore in a CLIC. **Eur Biophys J**, v.31, n.5, p.356-64, 2002.

Dai, Z.; R. C. Quackenbush; K. D. Courtney; M. Grove; D. Cortez; G. W. Reuther; A. M. Pendergast. Oncogenic Abl and Src tyrosine kinases elicit the ubiquitin-dependent degradation of target proteins through a Ras-independent pathway. **Genes Dev**, v.12, n.10, p.1415-24, 1998.

Daley, G. Q.; D. Baltimore. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.85, n.23, p.9312-6, 1988.

Daley, G. Q.; J. Mclaughlin; O. N. Witte; D. Baltimore. The CML-specific P210 bcr/abl protein, unlike v-abl, does not transform NIH/3T3 fibroblasts. **Science**, v.237, n.4814, p.532-5, 1987.

Daley, G. Q.; R. A. Van Etten; D. Baltimore. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. **Science**, v.247, n.4944, p.824-30, 1990.

Danial, N. N.; S. J. Korsmeyer. Cell death: critical control points. **Cell**, v.116, n.2, p.205-19, 2004.

Darnell, J. E., Jr. STATs and gene regulation. **Science**, v.277, n.5332, p.1630-5, 1997.

Datta, S. R.; H. Dudek; X. Tao; S. Masters; H. Fu; Y. Gotoh; M. E. Greenberg. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. **Cell**, v.91, n.2, p.231-41, 1997.

Datta, S. R.; A. Katsov; L. Hu; A. Petros; S. W. Fesik; M. B. Yaffe; M. E. Greenberg. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. **Mol Cell**, v.6, n.1, p.41-51, 2000.

Debatin, K. M.; K. Stahnke; S. Fulda. Apoptosis in hematological disorders. **Semin Cancer Biol**, v.13, n.2, p.149-58, 2003.

Deininger, M. W.; J. M. Goldman; J. V. Melo. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood**, v.96, n.10, p.3343-56, 2000.

Deming, P. B.; Z. T. Schafer; J. S. Tashker; M. B. Potts; M. Deshmukh; S. Kornbluth. Bcr-Abl-mediated protection from apoptosis downstream of mitochondrial cytochrome c release. **Mol Cell Biol**, v.24, n.23, p.10289-99, 2004.

Dierov, J.; R. Dierova; M. Carroll. BCR/ABL translocates to the nucleus and disrupts an ATR-dependent intra-S phase checkpoint. **Cancer Cell**, v.5, n.3, p.275-85, 2004.

Donato, N. J.; J. Y. Wu; L. Zhang; H. Kantarjian; M. Talpaz. Down-regulation of interleukin-3/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor beta-chain in BCR-ABL(+)

human leukemic cells: association with loss of cytokine-mediated Stat-5 activation and protection from apoptosis after BCR-ABL inhibition. **Blood**, v.97, n.9, p.2846-53, 2001.

Dovas, A.; J. R. Couchman. RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. **Biochem J**, v.390, n.Pt 1, p.1-9, 2005.

Druker, B. J. Inhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase as a therapeutic strategy for CML. **Oncogene**, v.21, n.56, p.8541-6, 2002.

Druker, B. J.; S. Tamura; E. Buchdunger; S. Ohno; G. M. Segal; S. Fanning; J. Zimmermann; N. B. Lydon. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. **Nat Med**, v.2, n.5, p.561-6, 1996.

Duriez, P. J.; F. Wong; K. Dorovini-Zis; R. Shahidi; A. Karsan. A1 functions at the mitochondria to delay endothelial apoptosis in response to tumor necrosis factor. **J Biol Chem**, v.275, n.24, p.18099-107, 2000.

Ehrhardt, A.; G. R. Ehrhardt; X. Guo; J. W. Schrader. Ras and relatives--job sharing and networking keep an old family together. **Exp Hematol**, v.30, n.10, p.1089-106, 2002.

Elmaagacli, A. H.; D. W. Beelen; B. Opalka; S. Seeber; U. W. Schaefer. The amount of BCR-ABL fusion transcripts detected by the real-time quantitative polymerase chain reaction method in patients with Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia correlates with the disease stage. **Ann Hematol**, v.79, n.8, p.424-31, 2000.

Essafi, A.; S. Fernandez De Mattos; Y. A. Hassen; I. Soeiro; G. J. Mufti; N. S. Thomas; R. H. Medema; E. W. Lam. Direct transcriptional regulation of Bim by FoxO3a mediates STI571-induced apoptosis in Bcr-Abl-expressing cells. **Oncogene**, v.24, n.14, p.2317-29, 2005.

Fadok, V. A.; D. L. Bratton; A. Konowal; P. W. Freed; J. Y. Westcott; P. M. Henson. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **J Clin Invest**, v.101, n.4, p.890-8, 1998.

Fang, G.; C. N. Kim; C. L. Perkins; N. Ramadevi; E. Winton; S. Wittmann; K. N. Bhalla. CGP57148B (STI-571) induces differentiation and apoptosis and sensitizes Bcr-Abl-positive human leukemia cells to apoptosis due to antileukemic drugs. **Blood**, v.96, n.6, p.2246-53, 2000.

Felsher, D. W.; J. M. Bishop. Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, n.7, p.3940-4, 1999.

Fernandez-Luna, J. L. Bcr-Abl and inhibition of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells. **Apoptosis**, v.5, n.4, p.315-8, 2000.

Franke, T. F.; D. R. Kaplan; L. C. Cantley. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. **Cell**, v.88, n.4, p.435-7, 1997.

Galarneau, L.; A. Loranger; S. Gilbert; N. Marceau. Keratins modulate hepatic cell adhesion, size and G1/S transition. **Exp Cell Res**, v.313, n.1, p.179-94, 2007.

Gardai, S. J.; D. A. Hildeman; S. K. Frankel; B. B. Whitlock; S. C. Frasch; N. Borregaard; P. Marrack; D. L. Bratton; P. M. Henson. Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. **J Biol Chem**, v.279, n.20, p.21085-95, 2004.

George, P.; P. Bali; S. Annavarapu; A. Scuto; W. Fiskus; F. Guo; C. Sigua; G. Sondarva; L. Moscinski; P. Atadja; K. Bhalla. Combination of the histone deacetylase inhibitor LBH589 and the hsp90 inhibitor 17-AAG is highly active against human CML-BC cells and AML cells with activating mutation of FLT-3. **Blood**, v.105, n.4, p.1768-76, 2005.

Gesbert, F.; J. D. Griffin. Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. **Blood**, v.96, n.6, p.2269-76, 2000.

Gilbert, S.; A. Loranger; N. Daigle; N. Marceau. Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation. **J Cell Biol**, v.154, n.4, p.763-73, 2001.

Goetz, A. W.; H. Van Der Kuip; R. Maya; M. Oren; W. E. Aulitzky. Requirement for Mdm2 in the survival effects of Bcr-Abl and interleukin 3 in hematopoietic cells. **Cancer Res**, v.61, n.20, p.7635-41, 2001.

Golks, A.; D. Brenner; C. Fritsch; P. H. Krammer; I. N. Lavrik. c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. **J Biol Chem**, v.280, n.15, p.14507-13, 2005.

Gollin, S. M. Mechanisms leading to nonrandom, nonhomologous chromosomal translocations in leukemia. **Semin Cancer Biol**, v.17, n.1, p.74-9, 2007.

Gorre, M. E.; M. Mohammed; K. Ellwood; N. Hsu; R. Paquette; P. N. Rao; C. L. Sawyers. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. **Science**, v.293, n.5531, p.876-80, 2001.

Graham, S. M.; H. G. Jorgensen; E. Allan; C. Pearson; M. J. Alcorn; L. Richmond; T. L. Holyoake. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. **Blood**, v.99, n.1, p.319-25, 2002.

Griffiths, S. D.; J. Burthem; R. D. Unwin; T. L. Holyoake; J. V. Melo; G. S. Lucas; A. D. Whetton. The use of isobaric tag peptide labeling (iTRAQ) and mass spectrometry to examine rare, primitive hematopoietic cells from patients with chronic myeloid leukemia. **Mol Biotechnol**, v.36, n.2, p.81-9, 2007.

Groffen, J.; J. R. Stephenson; N. Heisterkamp; A. De Klein; C. R. Bartram; G. Grosveld. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. **Cell**, v.36, n.1, p.93-9, 1984.

Hanahan, D.; R. A. Weinberg. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, n.1, p.57-70, 2000.

Hantschel, O.; G. Superti-Furga. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.5, n.1, p.33-44, 2004.

Hehlmann, R.; A. Hochhaus; M. Baccarani. Chronic myeloid leukaemia. **Lancet**, v.370, n.9584, p.342-50, 2007.

- Hendrix, M. J.; E. A. Seftor; Y. W. Chu; K. T. Trevor; R. E. Seftor. Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v.15, n.4, p.507-25, 1996.
- Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, n.6805, p.770-6, 2000.
- Henkemeyer, M.; S. R. West; F. B. Gertler; F. M. Hoffmann. A novel tyrosine kinase-independent function of Drosophila abl correlates with proper subcellular localization. **Cell**, v.63, n.5, p.949-60, 1990.
- Herr, I.; K. M. Debatin. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. **Blood**, v.98, n.9, p.2603-14, 2001.
- Hingorani, S. R.; D. A. Tuveson. Targeting oncogene dependence and resistance. **Cancer Cell**, v.3, n.5, p.414-7, 2003.
- Holyoake, D. T. Recent advances in the molecular and cellular biology of chronic myeloid leukaemia: lessons to be learned from the laboratory. **Br J Haematol**, v.113, n.1, p.11-23, 2001.
- Horita, M.; E. J. Andreu; A. Benito; C. Arbona; C. Sanz; I. Benet; F. Prosper; J. L. Fernandez-Luna. 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-xL. **J Exp Med**, v.191, n.6, p.977-84, 2000.
- Hubbard, S. R. Protein tyrosine kinases: autoregulation and small-molecule inhibition. **Curr Opin Struct Biol**, v.12, n.6, p.735-41, 2002.
- Hubbard, S. R.; J. H. Till. Protein tyrosine kinase structure and function. **Annu Rev Biochem**, v.69, p.373-98, 2000.
- Huettnner, C. S.; P. Zhang; R. A. Van Etten; D. G. Tenen. Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1. **Nat Genet**, v.24, n.1, p.57-60, 2000.
- Hunter, T. A thousand and one protein kinases. **Cell**, v.50, n.6, p.823-9, 1987.
- Hunter, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. **Cell**, v.80, n.2, p.225-36, 1995.
- Hunter, T.; J. A. Cooper. Protein-tyrosine kinases. **Annu Rev Biochem**, v.54, p.897-930, 1985.
- Immenschuh, S.; E. Baumgart-Vogt. Peroxiredoxins, oxidative stress, and cell proliferation. **Antioxid Redox Signal**, v.7, n.5-6, p.768-77, 2005.
- Irish, J. M.; R. Hovland; P. O. Krutzik; O. D. Perez; O. Bruserud; B. T. Gjertsen; G. P. Nolan. Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. **Cell**, v.118, n.2, p.217-28, 2004.
- Ivaska, J.; H. M. Pallari; J. Nevo; J. E. Eriksson. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. **Exp Cell Res**, v.313, n.10, p.2050-62, 2007.

- Ivaska, J.; K. Vuoriluoto; T. Huovinen; I. Izawa; M. Inagaki; P. J. Parker. PKCepsilon-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility. **Embo J**, v.24, n.22, p.3834-45, 2005.
- Jagani, Z.; A. Singh; R. Khosravi-Far. FoxO tumor suppressors and BCR-ABL-induced leukemia: A matter of evasion of apoptosis. **Biochim Biophys Acta**, 2007.
- Janosch, P.; A. Kieser; M. Eulitz; J. Lovric; G. Sauer; M. Reichert; F. Gounari; D. Buscher; M. Baccarini; H. Mischak; W. Kolch. The Raf-1 kinase associates with vimentin kinases and regulates the structure of vimentin filaments. **Faseb J**, v.14, n.13, p.2008-21, 2000.
- Jarvinen, M.; L. C. Andersson; I. Virtanen. K562 erythroleukemia cells express cytokeratins 8, 18, and 19 and epithelial membrane antigen that disappear after induced differentiation. **J Cell Physiol**, v.143, n.2, p.310-20, 1990.
- Jentsch, T. J.; V. Stein; F. Weinreich; A. A. Zdebik. Molecular structure and physiological function of chloride channels. **Physiol Rev**, v.82, n.2, p.503-68, 2002.
- Jin, D. Y.; H. Z. Chae; S. G. Rhee; K. T. Jeang. Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF-kappaB activation. **J Biol Chem**, v.272, n.49, p.30952-61, 1997.
- Jordan, M.; F. Wurm. Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. **Methods**, v.33, n.2, p.136-43, 2004.
- Kamada, M.; A. So; M. Muramaki; P. Rocchi; E. Beraldi; M. Gleave. Hsp27 knockdown using nucleotide-based therapies inhibit tumor growth and enhance chemotherapy in human bladder cancer cells. **Mol Cancer Ther**, v.6, n.1, p.299-308, 2007.
- Kantarjian, H. M.; F. Giles; A. Quintas-Cardama; J. Cortes. Important therapeutic targets in chronic myelogenous leukemia. **Clin Cancer Res**, v.13, n.4, p.1089-97, 2007.
- Kawauchi, K.; T. Ogasawara; M. Yasuyama; S. Ohkawa. Involvement of Akt kinase in the action of STI571 on chronic myelogenous leukemia cells. **Blood Cells Mol Dis**, v.31, n.1, p.11-7, 2003.
- Keeshan, K.; T. G. Cotter; S. L. McKenna. High Bcr-Abl expression prevents the translocation of Bax and Bad to the mitochondrion. **Leukemia**, v.16, n.9, p.1725-34, 2002.
- Kerr, J. F.; A. H. Wyllie; A. R. Currie. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v.26, n.4, p.239-57, 1972.
- Kirchner, D.; J. Duyster; O. Ottmann; R. M. Schmid; L. Bergmann; G. Munzert. Mechanisms of Bcr-Abl-mediated NF-kappaB/Rel activation. **Exp Hematol**, v.31, n.6, p.504-11, 2003.
- Klejman, A.; L. Rushen; A. Morrione; A. Slupianek; T. Skorski. Phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors enhance the anti-leukemia effect of STI571. **Oncogene**, v.21, n.38, p.5868-76, 2002a.
- Klejman, A.; S. J. Schreiner; M. Nieborowska-Skorska; A. Slupianek; M. Wilson; T. E. Smithgall; T. Skorski. The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukemia cells. **Embo J**, v.21, n.21, p.5766-74, 2002b.

Kuroda, J.; H. Puthalakath; M. S. Cragg; P. N. Kelly; P. Bouillet; D. C. Huang; S. Kimura; O. G. Ottmann; B. J. Druker; A. Villunger; A. W. Roberts; A. Strasser. Bim and Bad mediate imatinib-induced killing of Bcr/Abl+ leukemic cells, and resistance due to their loss is overcome by a BH3 mimetic. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.103, n.40, p.14907-12, 2006.

Kurzrock, R.; H. M. Kantarjian; B. J. Druker; M. Talpaz. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. **Ann Intern Med**, v.138, n.10, p.819-30, 2003.

Lane, E. B.; B. L. Hogan; M. Kurkinen; J. I. Garrels. Co-expression of vimentin and cytokeratins in parietal endoderm cells of early mouse embryo. **Nature**, v.303, n.5919, p.701-4, 1983.

Lazebnik, Y. A.; S. H. Kaufmann; S. Desnoyers; G. G. Poirier; W. C. Earnshaw. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. **Nature**, v.371, n.6495, p.346-7, 1994.

Le Coutre, P.; L. Mologni; L. Cleris; E. Marchesi; E. Buchdunger; R. Giardini; F. Formelli; C. Gambacorti-Passerini. In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor. **J Natl Cancer Inst**, v.91, n.2, p.163-8, 1999.

Leung, M. F.; J. A. Sokoloski; A. C. Sartorelli. Changes in microtubules, microtubule-associated proteins, and intermediate filaments during the differentiation of HL-60 leukemia cells. **Cancer Res**, v.52, n.4, p.949-54, 1992.

Li, B. c-Abl in oxidative stress, aging and cancer. **Cell Cycle**, v.4, n.2, p.246-8, 2005.

Li, H.; H. Zhu; C. J. Xu; J. Yuan. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. **Cell**, v.94, n.4, p.491-501, 1998.

Li, P.; D. Nijhawan; I. Budihardjo; S. M. Srinivasula; M. Ahmad; E. S. Alnemri; X. Wang. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, v.91, n.4, p.479-89, 1997.

Li, Q. F.; W. R. Huang; H. F. Duan; H. Wang; C. T. Wu; L. S. Wang. Sphingosine kinase-1 mediates BCR/ABL-induced upregulation of Mcl-1 in chronic myeloid leukemia cells. **Oncogene**, 2007.

Li, S.; D. Li. Stem cell and kinase activity-independent pathway in resistance of leukaemia to BCR-ABL kinase inhibitors. **J Cell Mol Med**, v.11, n.6, p.1251-62, 2007.

Lim, Y. P. Mining the tumor phosphoproteome for cancer markers. **Clin Cancer Res**, v.11, n.9, p.3163-9, 2005.

Lindsten, T.; A. J. Ross; A. King; W. X. Zong; J. C. Rathmell; H. A. Shiels; E. Ulrich; K. G. Waymire; P. Mahar; K. Frauwirth; Y. Chen; M. Wei; V. M. Eng; D. M. Adelman; M. C. Simon; A. Ma; J. A. Golden; G. Evan; S. J. Korsmeyer; G. R. Macgregor, et al. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. **Mol Cell**, v.6, n.6, p.1389-99, 2000.

Lionberger, J. M.; M. B. Wilson; T. E. Smithgall. Transformation of myeloid leukemia cells to cytokine independence by Bcr-Abl is suppressed by kinase-defective Hck. **J Biol Chem**, v.275, n.24, p.18581-5, 2000.

Liu, X.; C. N. Kim; J. Yang; R. Jemmerson; X. Wang. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, v.86, n.1, p.147-57, 1996.

Luciano, F.; A. Jacquel; P. Colosetti; M. Herrant; S. Cagnol; G. Pages; P. Auberger. Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. **Oncogene**, v.22, n.43, p.6785-93, 2003.

Lugo, T. G.; A. M. Pendergast; A. J. Muller; O. N. Witte. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. **Science**, v.247, n.4946, p.1079-82, 1990.

Lugo, T. G.; O. N. Witte. The BCR-ABL oncogene transforms Rat-1 cells and cooperates with v-myc. **Mol Cell Biol**, v.9, n.3, p.1263-70, 1989.

Machesky, L. M.; K. L. Gould. The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. **Curr Opin Cell Biol**, v.11, n.1, p.117-21, 1999.

Mahon, F. X.; M. W. Deininger; B. Schultheis; J. Chabrol; J. Reiffers; J. M. Goldman; J. V. Melo. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. **Blood**, v.96, n.3, p.1070-9, 2000.

Mandal, M.; R. Vadlamudi; D. Nguyen; R. A. Wang; L. Costa; R. Bagheri-Yarmand; J. Mendelsohn; R. Kumar. Growth factors regulate heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K expression and function. **J Biol Chem**, v.276, n.13, p.9699-704, 2001.

Marche-Cova, A.; M. T. Salles-Manuel; M. M. Santamaria-Torres; A. A. Fernandez-Ortiz; P. Sobrevilla-Calvo; R. Rivas-Gonzalez; R. Mendez-Martinez; E. Velazco-Escobar. GST-pi expression in BCR-ABL+ and BCR-ABL- cells from CML patients. **Rev Invest Clin**, v.52, n.3, p.266-74, 2000.

Mauro, M. J.; B. J. Druker. STI571: targeting BCR-ABL as therapy for CML. **Oncologist**, v.6, n.3, p.233-8, 2001.

Mcgahon, A.; R. Bissonnette; M. Schmitt; K. M. Cotter; D. R. Green; T. G. Cotter. BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. **Blood**, v.83, n.5, p.1179-87, 1994.

Mclaughlin, J.; E. Chianese; O. N. Witte. In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the P210 BCR/ABL oncogene product of the Philadelphia chromosome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.84, n.18, p.6558-62, 1987.

Mclaughlin, J.; E. Chianese; O. N. Witte. Alternative forms of the BCR-ABL oncogene have quantitatively different potencies for stimulation of immature lymphoid cells. **Mol Cell Biol**, v.9, n.5, p.1866-74, 1989.

Mcwhirter, J. R.; D. L. Galasso; J. Y. Wang. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. **Mol Cell Biol**, v.13, n.12, p.7587-95, 1993.

Meier, P.; A. Finch; G. Evan. Apoptosis in development. **Nature**, v.407, n.6805, p.796-801, 2000.

Melo, J. V. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. **Blood**, v.88, n.7, p.2375-84, 1996.

Melo, J. V.; D. J. Barnes. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. **Nat Rev Cancer**, v.7, n.6, p.441-53, 2007.

Melo, J. V.; M. W. Deininger. Biology of chronic myelogenous leukemia--signaling pathways of initiation and transformation. **Hematol Oncol Clin North Am**, v.18, n.3, p.545-68, vii-viii, 2004.

Melo, J. V.; T. P. Hughes; J. F. Apperley. Chronic myeloid leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p.132-52, 2003.

Muller, A. J.; J. C. Young; A. M. Pendergast; M. Pondel; N. R. Landau; D. R. Littman; O. N. Witte. BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. **Mol Cell Biol**, v.11, n.4, p.1785-92, 1991.

Mullins, R. D.; J. A. Heuser; T. D. Pollard. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95, n.11, p.6181-6, 1998.

Murphy, B. M.; E. M. Creagh; S. J. Martin. Interchain proteolysis, in the absence of a dimerization stimulus, can initiate apoptosis-associated caspase-8 activation. **J Biol Chem**, v.279, n.35, p.36916-22, 2004.

Nagar, B.; O. Hantschel; M. A. Young; K. Scheffzek; D. Veach; W. Bornmann; B. Clarkson; G. Superti-Furga; J. Kuriyan. Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. **Cell**, v.112, n.6, p.859-71, 2003.

Neshat, M. S.; A. B. Raitano; H. G. Wang; J. C. Reed; C. L. Sawyers. The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and Raf. **Mol Cell Biol**, v.20, n.4, p.1179-86, 2000.

Neviani, P.; R. Santhanam; R. Trotta; M. Notari; B. W. Blaser; S. Liu; H. Mao; J. S. Chang; A. Galletta; A. Uttam; D. C. Roy; M. Valtieri; R. Bruner-Klisovic; M. A. Caligiuri; C. D. Bloomfield; G. Marcucci; D. Perrotti. The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. **Cancer Cell**, v.8, n.5, p.355-68, 2005.

Nicholson, D. W.; N. A. Thornberry. Caspases: killer proteases. **Trends Biochem Sci**, v.22, n.8, p.299-306, 1997.

Nicoletti, I.; G. Migliorati; M. C. Pagliacci; F. Grignani; C. Riccardi. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J Immunol Methods**, v.139, n.2, p.271-9, 1991.

Nieborowska-Skorska, M.; G. Hoser; P. Kossev; M. A. Wasik; T. Skorski. Complementary functions of the antiapoptotic protein A1 and serine/threonine kinase pim-1 in the BCR/ABL-mediated leukemogenesis. **Blood**, v.99, n.12, p.4531-9, 2002.

Nieminen, M.; T. Henttinen; M. Merinen; F. Marttila-Ichihara; J. E. Eriksson; S. Jalkanen. Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. **Nat Cell Biol**, v.8, n.2, p.156-62, 2006.

Nomura, M.; S. Shimizu; T. Sugiyama; M. Narita; T. Ito; H. Matsuda; Y. Tsujimoto. 14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. **J Biol Chem**, v.278, n.3, p.2058-65, 2003.

Notari, M.; P. Neviani; R. Santhanam; B. W. Blaser; J. S. Chang; A. Galletta; A. E. Willis; D. C. Roy; M. A. Caligiuri; G. Marcucci; D. Perrotti. A MAPK/HNRPK pathway controls BCR/ABL oncogenic potential by regulating MYC mRNA translation. **Blood**, v.107, n.6, p.2507-16, 2006.

Nowakowski, G. S.; J. D. Hoyer; T. D. Shanafelt; S. M. Geyer; B. R. Laplant; T. G. Call; D. F. Jelinek; C. S. Zent; N. E. Kay. Using smudge cells on routine blood smears to predict clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia: a universally available prognostic test. **Mayo Clin Proc**, v.82, n.4, p.449-53, 2007.

Nowell, P. C.; D. A. Hungerford. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. **J Natl Cancer Inst**, v.25, p.85-109, 1960.

O'callaghan-Sunol, C.; V. L. Gabai; M. Y. Sherman. Hsp27 modulates p53 signaling and suppresses cellular senescence. **Cancer Res**, v.67, n.24, p.11779-88, 2007.

O'connor, L.; A. Strasser; L. A. O'reilly; G. Hausmann; J. M. Adams; S. Cory; D. C. Huang. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. **Embo J**, v.17, n.2, p.384-95, 1998.

Oda, T.; C. Heaney; J. R. Hagopian; K. Okuda; J. D. Griffin; B. J. Druker. Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. **J Biol Chem**, v.269, n.37, p.22925-8, 1994.

Pane, F.; F. Frigeri; M. Sindona; L. Luciano; F. Ferrara; R. Cimino; G. Meloni; G. Saglio; F. Salvatore; B. Rotoli. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). **Blood**, v.88, n.7, p.2410-4, 1996.

Parcellier, A.; E. Schmitt; S. Gurbuxani; D. Seigneurin-Berny; A. Pance; A. Chantome; S. Plenchette; S. Khochbin; E. Solary; C. Garrido. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. **Mol Cell Biol**, v.23, n.16, p.5790-802, 2003.

Park, S. H.; Y. M. Chung; Y. S. Lee; H. J. Kim; J. S. Kim; H. Z. Chae; Y. D. Yoo. Antisense of human peroxiredoxin II enhances radiation-induced cell death. **Clin Cancer Res**, v.6, n.12, p.4915-20, 2000.

- Pavlov, E. V.; M. Priault; D. Pietkiewicz; E. H. Cheng; B. Antonsson; S. Manon; S. J. Korsmeyer; C. A. Mannella; K. W. Kinnally. A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. **J Cell Biol**, v.155, n.5, p.725-31, 2001.
- Pear, W. S.; G. P. Nolan; M. L. Scott; D. Baltimore. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.90, n.18, p.8392-6, 1993.
- Pendergast, A. M.; L. A. Quilliam; L. D. Cripe; C. H. Bassing; Z. Dai; N. Li; A. Batzer; K. M. Rabun; C. J. Der; J. Schlessinger; Et Al. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. **Cell**, v.75, n.1, p.175-85, 1993.
- Perrotti, D.; B. Calabretta. Post-transcriptional mechanisms in BCR/ABL leukemogenesis: role of shuttling RNA-binding proteins. **Oncogene**, v.21, n.56, p.8577-83, 2002.
- Perrotti, D.; P. Neviani. ReSETting PP2A tumour suppressor activity in blast crisis and imatinib-resistant chronic myelogenous leukaemia. **Br J Cancer**, v.95, n.7, p.775-81, 2006.
- Perrotti, D.; F. Turturro; P. Neviani. BCR/ABL, mRNA translation and apoptosis. **Cell Death Differ**, v.12, n.6, p.534-40, 2005.
- Pierce, A.; R. D. Unwin; C. A. Evans; S. Griffiths; L. Carney; L. Zhang; E. Jaworska; C. F. Lee; D. Blinco; M. J. Okoniewski; C. J. Miller; D. A. Bitton; E. Spooncer; A. D. Whetton. Eight-channel iTRAQ enables comparison of the activity of 6 leukaemogenic tyrosine kinases. **Mol Cell Proteomics**, 2007.
- Pocaly, M.; V. Lagarde; G. Etienne; J. A. Ribeil; S. Claverol; M. Bonneu; F. Moreau-Gaudry; V. Guyonnet-Duperat; O. Hermine; J. V. Melo; M. Dupouy; B. Turcq; F. X. Mahon; J. M. Pasquet. Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v.21, n.1, p.93-101, 2007.
- Putcha, G. V.; K. L. Moulder; J. P. Golden; P. Bouillet; J. A. Adams; A. Strasser; E. M. Johnson. Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. **Neuron**, v.29, n.3, p.615-28, 2001.
- Puthalakath, H.; A. Strasser. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. **Cell Death Differ**, v.9, n.5, p.505-12, 2002.
- Qi, X. J.; G. M. Wildey; P. H. Howe. Evidence that Ser87 of BimEL is phosphorylated by Akt and regulates BimEL apoptotic function. **J Biol Chem**, v.281, n.2, p.813-23, 2006.
- Quackenbush, R. C.; G. W. Reuther; J. P. Miller; K. D. Courtney; W. S. Pear; A. M. Pendergast. Analysis of the biologic properties of p230 Bcr-Abl reveals unique and overlapping properties with the oncogenic p185 and p210 Bcr-Abl tyrosine kinases. **Blood**, v.95, n.9, p.2913-21, 2000.
- Quintas-Cardama, A.; H. Kantarjian; J. Cortes. Flying under the radar: the new wave of BCR-ABL inhibitors. **Nat Rev Drug Discov**, v.6, n.10, p.834-48, 2007.

- Raitano, A. B.; J. R. Halpern; T. M. Hambuch; C. L. Sawyers. The Bcr-Abl leukemia oncogene activates Jun kinase and requires Jun for transformation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.92, n.25, p.11746-50, 1995.
- Ramaraj, P.; H. Singh; N. Niu; S. Chu; M. Holtz; J. K. Yee; R. Bhatia. Effect of mutational inactivation of tyrosine kinase activity on BCR/ABL-induced abnormalities in cell growth and adhesion in human hematopoietic progenitors. **Cancer Res**, v.64, n.15, p.5322-31, 2004.
- Ravandi, F.; H. M. Kantarjian; M. Talpaz; S. O'brien; S. Faderl; F. J. Giles; D. Thomas; J. Cortes; M. Andreeff; Z. Estrov; M. B. Rios; M. Albitar. Expression of apoptosis proteins in chronic myelogenous leukemia: associations and significance. **Cancer**, v.91, n.11, p.1964-72, 2001.
- Ray, S.; Y. Lu; S. H. Kaufmann; W. C. Gustafson; J. E. Karp; I. Boldogh; A. P. Fields; A. R. Brasier. Genomic mechanisms of p210BCR-ABL signaling: induction of heat shock protein 70 through the GATA response element confers resistance to paclitaxel-induced apoptosis. **J Biol Chem**, v.279, n.34, p.35604-15, 2004.
- Reed, J. C. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. **Nature**, v.387, n.6635, p.773-6, 1997.
- Ren, R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. **Nat Rev Cancer**, v.5, n.3, p.172-83, 2005.
- Reuther, J. Y.; G. W. Reuther; D. Cortez; A. M. Pendergast; A. S. Baldwin, Jr. A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. **Genes Dev**, v.12, n.7, p.968-81, 1998.
- Riccardi, C.; I. Nicoletti. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nat Protoc**, v.1, n.3, p.1458-61, 2006.
- Robinson, D. R.; Y. M. Wu; S. F. Lin. The protein tyrosine kinase family of the human genome. **Oncogene**, v.19, n.49, p.5548-57, 2000.
- Rowley, J. D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature**, v.243, n.5405, p.290-3, 1973.
- Sabatino, D. E.; B. Q. Do; L. C. Pyle; N. E. Seidel; L. J. Girard; S. K. Spratt; D. Orlic; D. M. Bodine. Amphotropic or gibbon ape leukemia virus retrovirus binding and transduction correlates with the level of receptor mRNA in human hematopoietic cell lines. **Blood Cells Mol Dis**, v.23, n.3, p.422-33, 1997.
- Sakahira, H.; M. Enari; S. Nagata. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. **Nature**, v.391, n.6662, p.96-9, 1998.
- Salles, S.; C. M. Verfaillie. BCR/ABL: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. **Oncogene**, v.21, n.56, p.8547-59, 2002.
- Samali, A.; A. M. Gorman; T. G. Cotter. Role of Bcr-Abl kinase in resistance to apoptosis. **Adv Pharmacol**, v.41, p.533-52, 1997.

- Sambrook, J.; E. F. Fritsch; T. Maniatis. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989. 3 v. p.
- Sattler, M.; M. G. Mohi; Y. B. Pride; L. R. Quinnan; N. A. Malouf; K. Podar; F. Gesbert; H. Iwasaki; S. Li; R. A. Van Etten; H. Gu; J. D. Griffin; B. G. Neel. Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. **Cancer Cell**, v.1, n.5, p.479-92, 2002.
- Sattler, M.; S. Verma; G. Shrikhande; C. H. Byrne; Y. B. Pride; T. Winkler; E. A. Greenfield; R. Salgia; J. D. Griffin. The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. **J Biol Chem**, v.275, n.32, p.24273-8, 2000.
- Savill, J.; V. Fadok; P. Henson; C. Haslett. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. **Immunol Today**, v.14, n.3, p.131-6, 1993.
- Sawyers, C. L.; J. Mclaughlin; O. N. Witte. Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene. **J Exp Med**, v.181, n.1, p.307-13, 1995.
- Sexl, V.; R. Piekorz; R. Moriggl; J. Rohrer; M. P. Brown; K. D. Bunting; K. Rothhammer; M. F. Roussel; J. N. Ihle. Stat5a/b contribute to interleukin 7-induced B-cell precursor expansion, but abl- and bcr/abl-induced transformation are independent of stat5. **Blood**, v.96, n.6, p.2277-83, 2000.
- Shachaf, C. M.; D. W. Felsher. Rehabilitation of cancer through oncogene inactivation. **Trends Mol Med**, v.11, n.7, p.316-21, 2005.
- Sharma, S. V.; P. Gajowniczek; I. P. Way; D. Y. Lee; J. Jiang; Y. Yuza; M. Classon; D. A. Haber; J. Settleman. A common signaling cascade may underlie "addiction" to the Src, BCR-ABL, and EGF receptor oncogenes. **Cancer Cell**, v.10, n.5, p.425-35, 2006.
- Shimizu, S.; M. Narita; Y. Tsujimoto. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. **Nature**, v.399, n.6735, p.483-7, 1999.
- Shinjyo, T.; R. Kuribara; T. Inukai; H. Hosoi; T. Kinoshita; A. Miyajima; P. J. Houghton; A. T. Look; K. Ozawa; T. Inaba. Downregulation of Bim, a proapoptotic relative of Bcl-2, is a pivotal step in cytokine-initiated survival signaling in murine hematopoietic progenitors. **Mol Cell Biol**, v.21, n.3, p.854-64, 2001.
- Sirard, C.; P. Laneuville; J. E. Dick. Expression of bcr-abl abrogates factor-dependent growth of human hematopoietic M07E cells by an autocrine mechanism. **Blood**, v.83, n.6, p.1575-85, 1994.
- Skorski, T.; P. Kanakaraj; M. Nieborowska-Skorska; M. Z. Ratajczak; S. C. Wen; G. Zon; A. M. Gewirtz; B. Perussia; B. Calabretta. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. **Blood**, v.86, n.2, p.726-36, 1995.
- Skorski, T.; M. Nieborowska-Skorska; P. Wlodarski; M. Wasik; R. Trotta; P. Kanakaraj; P. Salomoni; M. Antonyak; R. Martinez; M. Majewski; A. Wong; B. Perussia; B. Calabretta. The SH3 domain contributes to BCR/ABL-dependent leukemogenesis in vivo: role in adhesion, invasion, and homing. **Blood**, v.91, n.2, p.406-18, 1998.

Slee, E. A.; C. Adrain; S. J. Martin. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. **Cell Death Differ**, v.6, n.11, p.1067-74, 1999.

Slee, E. A.; C. Adrain; S. J. Martin. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. **J Biol Chem**, v.276, n.10, p.7320-6, 2001.

Smith, D. L.; C. A. Evans; A. Pierce; S. J. Gaskell; A. D. Whetton. Changes in the proteome associated with the action of Bcr-Abl tyrosine kinase are not related to transcriptional regulation. **Mol Cell Proteomics**, v.1, n.11, p.876-84, 2002.

Smith, K. M.; R. A. Van Etten. Activation of c-Abl kinase activity and transformation by a chemical inducer of dimerization. **J Biol Chem**, v.276, n.26, p.24372-9, 2001.

Sonoyama, J.; I. Matsumura; S. Ezoe; Y. Satoh; X. Zhang; Y. Kataoka; E. Takai; M. Mizuki; T. Machii; H. Wakao; Y. Kanakura. Functional cooperation among Ras, STAT5, and phosphatidylinositol 3-kinase is required for full oncogenic activities of BCR/ABL in K562 cells. **J Biol Chem**, v.277, n.10, p.8076-82, 2002.

Stanglmaier, M.; M. Warmuth; I. Kleinlein; S. Reis; M. Hallek. The interaction of the Bcr-Abl tyrosine kinase with the Src kinase Hck is mediated by multiple binding domains. **Leukemia**, v.17, n.2, p.283-9, 2003.

Stark, R. S.; L. F. Liebes; M. L. Shelanski; R. Silber. Anomalous function of vimentin in chronic lymphocytic leukemia lymphocytes. **Blood**, v.63, n.2, p.415-20, 1984.

Steelman, L. S.; S. C. Pohnert; J. G. Shelton; R. A. Franklin; F. E. Bertrand; J. A. Mccubrey. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. **Leukemia**, v.18, n.2, p.189-218, 2004.

Suh, K. S.; S. H. Yuspa. Intracellular chloride channels: critical mediators of cell viability and potential targets for cancer therapy. **Curr Pharm Des**, v.11, n.21, p.2753-64, 2005.

Taagepera, S.; D. McDonald; J. E. Loeb; L. L. Whitaker; A. K. Mcelroy; J. Y. Wang; T. J. Hope. Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95, n.13, p.7457-62, 1998.

Tao, W. J.; H. Lin; T. Sun; A. K. Samanta; R. Arlinghaus. BCR-ABL oncogenic transformation of NIH 3T3 fibroblasts requires the IL-3 receptor. **Oncogene**, 2007.

Ten Hoeve, J.; V. Kaartinen; T. Fioretos; L. Haataja; J. W. Voncken; N. Heisterkamp; J. Groffen. Cellular interactions of CRKL, and SH2-SH3 adaptor protein. **Cancer Res**, v.54, n.10, p.2563-7, 1994.

Thiesing, J. T.; S. Ohno-Jones; K. S. Kolibaba; B. J. Druker. Efficacy of STI571, an abl tyrosine kinase inhibitor, in conjunction with other antileukemic agents against bcr-abl-positive cells. **Blood**, v.96, n.9, p.3195-9, 2000.

Thornberry, N. A. Caspases: key mediators of apoptosis. **Chem Biol**, v.5, n.5, p.R97-103, 1998.

- Thornberry, N. A.; Y. Lazebnik. Caspases: enemies within. **Science**, v.281, n.5381, p.1312-6, 1998.
- Traweek, S. T.; J. Liu; H. Battifora. Keratin gene expression in non-epithelial tissues. Detection with polymerase chain reaction. **Am J Pathol**, v.142, n.4, p.1111-8, 1993.
- Turella, P.; C. Cerella; G. Filomeni; A. Bullo; F. De Maria; L. Ghibelli; M. R. Ciriolo; M. Cianfriglia; M. Mattei; G. Federici; G. Ricci; A. M. Caccuri. Proapoptotic activity of new glutathione S-transferase inhibitors. **Cancer Res**, v.65, n.9, p.3751-61, 2005.
- Tybulewicz, V. L.; C. E. Crawford; P. K. Jackson; R. T. Bronson; R. C. Mulligan. Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. **Cell**, v.65, n.7, p.1153-63, 1991.
- Tzivion, G.; Z. J. Luo; J. Avruch. Calyculin A-induced vimentin phosphorylation sequesters 14-3-3 and displaces other 14-3-3 partners in vivo. **J Biol Chem**, v.275, n.38, p.29772-8, 2000.
- Unwin, R. D.; D. W. Sternberg; Y. Lu; A. Pierce; D. G. Gilliland; A. D. Whetton. Global effects of BCR/ABL and TEL/PDGFRbeta expression on the proteome and phosphoproteome: identification of the Rho pathway as a target of BCR/ABL. **J Biol Chem**, v.280, n.8, p.6316-26, 2005.
- Valenzuela, S. M.; M. Mazzanti; R. Tonini; M. R. Qiu; K. Warton; E. A. Musgrove; T. J. Campbell; S. N. Breit. The nuclear chloride ion channel NCC27 is involved in regulation of the cell cycle. **J Physiol**, v.529 Pt 3, p.541-52, 2000.
- Van Etten, R. A.; P. Jackson; D. Baltimore. The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. **Cell**, v.58, n.4, p.669-78, 1989.
- Verfaillie, C. M.; J. B. McCarthy; P. B. Mcglave. Mechanisms underlying abnormal trafficking of malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia. Decreased adhesion to stroma and fibronectin but increased adhesion to the basement membrane components laminin and collagen type IV. **J Clin Invest**, v.90, n.4, p.1232-41, 1992.
- Vigneri, P.; J. Y. Wang. Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. **Nat Med**, v.7, n.2, p.228-34, 2001.
- Vlahovic, G.; J. Crawford. Activation of tyrosine kinases in cancer. **Oncologist**, v.8, n.6, p.531-8, 2003.
- Vogelstein, B.; K. W. Kinzler. The multistep nature of cancer. **Trends Genet**, v.9, n.4, p.138-41, 1993.
- Wang, J. Y. Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. **Oncogene**, v.19, n.49, p.5643-50, 2000.
- Wang, J. Y. Controlling Abl: auto-inhibition and co-inhibition? **Nat Cell Biol**, v.6, n.1, p.3-7, 2004.

Wang, K.; J. Li; C. Zhen; J. Zhou; D. Xiao; J. Liu; Y. Liu; H. Jiang; C. Chen; J. Wen. Enhanced invasive and metastatic potential induced by transforming growth factor-beta1 might be correlated with glutathione-S-transferase-pi, cofilin and heat shock protein 27 in SGC-7901 gastric cancer cells. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v.39, n.7, p.520-6, 2007.

Warmuth, M.; M. Bergmann; A. Priess; K. Hauslmann; B. Emmerich; M. Hallek. The Src family kinase Hck interacts with Bcr-Abl by a kinase-independent mechanism and phosphorylates the Grb2-binding site of Bcr. **J Biol Chem**, v.272, n.52, p.33260-70, 1997.

Wei, M. C.; W. X. Zong; E. H. Cheng; T. Lindsten; V. Panoutsakopoulou; A. J. Ross; K. A. Roth; G. R. Macgregor; C. B. Thompson; S. J. Korsmeyer. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. **Science**, v.292, n.5517, p.727-30, 2001.

Weinstein, I. B. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. **Science**, v.297, n.5578, p.63-4, 2002.

Wertheim, J. A.; K. Forsythe; B. J. Druker; D. Hammer; D. Boettiger; W. S. Pear. BCR-ABL-induced adhesion defects are tyrosine kinase-independent. **Blood**, v.99, n.11, p.4122-30, 2002.

Wong, S.; O. N. Witte. The BCR-ABL story: bench to bedside and back. **Annu Rev Immunol**, v.22, p.247-306, 2004.

Wrobel, T.; G. Mazur; P. Dziegiel; P. Surowiak; K. Kuliczowski; M. Zabel. Expression of metallothionein (MT) and glutathione s-transferase pi (SGTP) in the bone marrow of patients with myeloproliferative disorders (MPD). **Folia Morphol (Warsz)**, v.63, n.1, p.129-31, 2004.

Wu, R.; H. Kausar; P. Johnson; D. E. Montoya-Durango; M. Merchant; M. J. Rane. Hsp27 regulates Akt activation and polymorphonuclear leukocyte apoptosis by scaffolding MK2 to Akt signal complex. **J Biol Chem**, v.282, n.30, p.21598-608, 2007.

Wyllie, A. H.; J. F. Kerr; A. R. Currie. Cell death: the significance of apoptosis. **Int Rev Cytol**, v.68, p.251-306, 1980.

Yamaguchi, H.; H. G. Wang. The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. **Oncogene**, v.20, n.53, p.7779-86, 2001.

Yang, E.; J. Zha; J. Jockel; L. H. Boise; C. B. Thompson; S. J. Korsmeyer. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. **Cell**, v.80, n.2, p.285-91, 1995.

Yo, Y. D.; Y. M. Chung; J. K. Park; C. M. Ahn; S. K. Kim; H. J. Kim. Synergistic effect of peroxiredoxin II antisense on cisplatin-induced cell death. **Exp Mol Med**, v.34, n.4, p.273-7, 2002.

Zhao, X.; Y. Fan; J. Shen; Y. Wu; Z. Yin. Human glutathione S-transferase P1 suppresses MEKK1-mediated apoptosis by regulating MEKK1 kinase activity in HEK293 cells. **Mol Cells**, v.21, n.3, p.395-400, 2006.

Zhelev, Z.; R. Bakalova; H. Ohba; A. Ewis; M. Ishikawa; Y. Shinohara; Y. Baba. Suppression of bcr-abl synthesis by siRNAs or tyrosine kinase activity by Glivec alters different

oncogenes, apoptotic/antiapoptotic genes and cell proliferation factors (microarray study). **FEBS Lett**, v.570, n.1-3, p.195-204, 2004.

Zhu, J.; P. M. Nabissa; B. Hoffman; D. A. Liebermann; S. K. Shore. Activated abl oncogenes and apoptosis: differing responses of transformed myeloid progenitor cell lines. **Blood**, v.87, n.10, p.4368-75, 1996.

ANEXOS

LISTA DE PUBLICAÇÕES

Bueno-da-Silva, AEB; Brumatti, G; Russo, FO; Green, DR; Amarante-Mendes, GP (2003). “Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis is independent of constant tyrosine-kinase activity”. Cell Death and Differentiation, 10 (5): 592-8.

Ramos, MG; Rabelo, FL; Brumatti, G; Bueno-da-Silva, AEB; Amarante-Mendes, GP; Alvarez-Leite, JL (2004). “Butyrate increases apoptosis induced by different antineoplastic drugs in monocytic leukemia cells”. Chemotherapy, 50: 221-228.

Silva, SO; Rodrigues, MR; Ximenes, VF; Bueno-da-Silva, AEB; Amarante-Mendes, GP; Campa, A (2004). “Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines effects on cytokine release”. Journal of Neuroimmunology, 156: 146-152.

Castro, FA; Jacysyn, JF; Bueno-da-Silva, AEB; Hamerschlak, N; Amarante-Mendes, GP (2005). “Apoptosis resistance in chronic myelogenous leukemia”. Einstein (Publicação do Instituto de Ensino e Pesquisa Albert Einstein), 3 (3): 207-212.

Brumatti, G; Yon, M; Castro, FA; Bueno-da-Silva, AEB; Jacysyn, JF; Brunner, T; Amarante-Mendes, GP (2008). “Conversion of CD95 (Fas) Type II into Type I signaling by sub-lethal doses of cycloheximide”. Experimental Cell Research 314(3): 554-63.