Janine Marie Gisele Leroy

**Controle da expressão de TRAIL, OSM,
FAIM e NIPA pelo oncogene *bcr-abl***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Imunologia
do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

São Paulo
2008

Janine Marie Gisele Leroy

**Controle da expressão de TRAIL, OSM,
FAIM e NIPA pelo oncogene *bcr-abl***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Imunologia
do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Imunologia

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

São Paulo

2008

Aos meus pais, Guy e Leny,

Vocês foram o estímulo do início, e uma ajuda constante, concreta e infatigável ao longo dos anos.

Como muito do que fiz na vida tenho a esperança de que tudo isto sirva para lhes mostrar não ter sido completamente perdida a educação que se esforçaram por me proporcionar.

Aos meus amigos

Para as pessoas que fazem meu coração sorrir...
que sempre estiveram junto até mesmo quando eu não estava
disposta.... que me deram um força quando eu não estava muito
animada... que fizeram a diferença em minha vida... que quando
olho para trás, sinto muitas saudades... que me aconselharam
quando me senti sozinha, e me ajudaram a entender que não
importa em quantos pedaços meu coração tenha se partido, pois o
mundo não irá parar para que eu o conserte. Para as pessoas que
amei...Para as pessoas que abracei...Para as pessoas que encontro
apenas em meus sonhos...Para as pessoas que encontro todos os
dias e não tenho a chance de dizer tudo o que sinto olhando nos
olhos...Para mim...o que importa não é O QUE eu tenho na vida,
mas QUEM eu tenho na vida...
Por isso...Guardo todas as pessoas importantes da minha vida em
uma caixinha dentro do meu coração...

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Na história de elaboração de uma tese são muitas as pessoas que vêm contribuir para o seu desenvolvimento, seja por um curto período de tempo ou durante todo o processo. Sem elas, a realização desse desafio não seria possível, nem tampouco tão desejado.

Ao Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante-Mendes, sou grata pelo empenho em me garantir uma formação de qualidade e pelo apoio para vencer todas as etapas durante meu mestrado. Obrigada não só por ter aceito ser orientador desta tese, mas também pela confiança depositada no meu trabalho e nas minhas capacidades.

Aos Drs Carlos Alberto Moreira Filho, Sonia Jancar do Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo e Sara Teresinha Olalla Saad da UNICAMP, pelas sugestões e análise crítica deste trabalho durante o exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Moreira Filho e grupo de pesquisa, pela colaboração e resultados de “microarray”.

Ao Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo e grupo de pesquisa (Lú, Alê, Jean, Tati, Nathi, Julie e Cris), obrigado por darem o verdadeiro sentido a palavra Anexo!

A Profa. Dra. Ises de Almeida Abrahamsohn, por disponibilizar seu laboratório e sistema de captura de imagens.

Ao Thi, virei a esquerda na esquina da Axpicuelta e encontrei vc!!!! Obrigada pelo modo como me aturou quando eu estava, e, sobretudo como aceitou que, muitas vezes, eu não estivesse...Muitas histórias juntos ainda estão por vir!

As meninas, Paty e Lella, pela amizade e companheirismo. Obrigada pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Aos meus amigos de laboratório, Aninha (sempre o melhor astral possível... o que seria de mim sem vc!), Clau (tenho certeza que nossas sextas-feiras iram manter essa grande amizade), Daniel

(obrigada pela colaboração), Fabs (simplesmente o melhor exemplo pessoal e profissional que uma pessoa poderia ter), Jackie (ainda bem que vc possui mil e uma habilidades... sem sua ajuda na disso seria possível!), Júlia e Mayra (Boa sorte! Tenho certeza que vcs irão se sair muito bem), Moki (não sei como tanto caráter e personalidade cabem dentro dessa pessoinha... Obrigada pelo acompanhamento constante e sábios conselhos), Ricardo (meu parceiro de forró e um amigo para todas as horas) e Welbert (uma pessoa de vários talentos, obrigado por tornar nossos dias mais alegres com boa música e inúmeras risadas).

Aos amigos que passaram, Axel e Gabi (a convivência com vocês foi enriquecedora), Bruks (sem suas historias nossos dias não seriam iguais), Marcita (pode parecer brava as vezes mas é uma das pessoas mais divertidas que já conheci).

À Aurea, técnica do Departamento de Imunologia, pela ajuda no dia a dia e pelos cafês.

À Jotelma Leite Ribeiro e Amarildo Utíama, da Secretaria do Departamento de Imunologia, obrigada por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos funcionários do ICB, Milton, Otacílio, Moisés e todo o pessoal da segurança do departamento.

Às meninas da Faísca, obrigada por manterem sempre em ordem nosso laboratório e o departamento (mesmo depois das festas!).

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas, pela eficiência de seus serviços e tratamento amável dado aos alunos.

Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim. Não tenho como agradecer o incentivo constante, carinho e amor. Muito obrigada por sempre estarem por perto!!!!

À FAPESP, pela bolsa de mestrado concedida.

“O câncer traz em si um fardo enorme, mas que desafio maior que esse poderia existir? Sem dúvida, é uma doença triste e desalentadora, mas, mesmo quando não consigo curar as pessoas, pelo menos estou sempre conseguindo ajudá-las. Se não consigo obter sucesso pelo no tratamento, ao menos ensino as pessoas a tentar controlar a doença, viver com ela. Isso causa uma ligação, uma conexão entre as pessoas. Na oncologia acontecem mais momentos humanos do que em qualquer área que eu conheço. Você nunca se acostuma, nunca se entedia, e sempre se surpreende com a força que as pessoas têm ao lidar com o câncer”

Lance Armstrong

*“Fazer da queda um passo de dança,
do medo uma escada, do sono uma ponte, da
procura um encontro”*

Fernando Sabino

RESUMO

LEROY, JMG. **Controle da expressão de TRAIL, OSM, FAIM e NIPA pelo oncogene *bcr-abl***. Mestrado-Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A busca por novos tratamentos mais específicos e menos tóxicos para o câncer tem sido intensificada nos últimos anos. As alterações gênicas que ocorrem nesse grupo de doenças são objeto de intensas pesquisas médicas em todo o mundo sendo que as alterações envolvendo genes que regulam a morte celular estão presentes em muitos tipos de cânceres e ressaltam a importância da resistência à apoptose no processo de carcinogênese. Nesse contexto, o objetivo do trabalho é o estudo dos mecanismos envolvidos na resistência à morte por apoptose das células Bcr-Abl positivas, característica da leucemia mielóide crônica, e a identificação de alterações gênicas que podem orientar um estudo mais aprofundado de novos alvos terapêuticos. Para isso foi adotada uma abordagem genômica para identificar alterações no padrão de expressão gênica global associadas ao Bcr-Abl. Utilizando essa técnica obtivemos dados que demonstram a expressão diferencial de inúmeros genes, dentre esses alguns envolvidos na hematopoese, ativação celular, proliferação celular e apoptose. Dentre os vários genes que tiveram sua expressão modulada por Bcr-Abl escolhemos quatro para um estudo mais aprofundado. Os genes que codificam as proteínas *FAIM* (“Fas apoptotic inhibitory molecule”) e *NIPA* (“nuclear interacting partner of anaplastic lymphoma kinase”) foram escolhidos por apresentarem uma modulação positiva de sua expressão nas células Bcr-ABL-positivas. Por outro lado, foram escolhidos os genes *OSM* (“Oncostatin M”) e *TRAIL* (também chamado *TNFSF10* - “tumor necrosis ligand superfamily, member 10”), pela modulação negativa exercida por Bcr-Abl na expressão desses genes. Sendo dado a *trail* um maior enfoque por sua relevância nos mecanismos envolvidos na resistência a morte conferida por Bcr-Abl. Os resultados obtidos nesse projeto contribuem para uma melhor compreensão da fisiopatologia da LMC.

Palavras-chave: Bcr-Abl, Apoptose, Expressão gênica, *Trail*.

ABSTRACT

LEROY, JMG. ***bcr-abl* regulation of TRAIL, OSM, FAIM and NIPA expression.** Master thesis-Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The search for new, more specific and less toxic treatments for cancer has been intensified in recent years. Some genes' alterations that occur in many kinds of cancers are object of intense medical research in the whole world. And the fact that the main alterations involving genes occurs in the process of regulating the cell death in many types of cancers stand out the importance to understand the mechanism involved in resistance to apoptosis. Our aim was to analyze alterations in global gene expression in Bcr-Abl expressing cells to guide a deepened study of new therapeutical targets. For this purpose we used a genomic approach to identify changes in gene expression patterns associated with Bcr-Abl. Data obtained from microarray analysis showed that Bcr-Abl interfered on the expression of a great variety of genes, amongst these, some were involved in hematopoiesis, cellular activation, cellular proliferation and apoptosis. The genes that codify for FAIM ("FAS apoptotic inhibitory molecule") and NIPA ("nuclear interacting to partner of anaplastic lymphoma kinase") proteins had been chosen for this study because they presented a positive modulation of its expression in Bcr-ABL-positive cells. On the other hand, genes for OSM ("Oncostatin M") and TRAIL (also called TNFSF10 - "tumor necrosis ligand superfamily, to member 10"), showed a significant negative modulation by Bcr-Abl. In this work *trail* regulation was focused given its relevance in the mechanisms involved in the resistance to cell death conferred by Bcr-Abl. The findings of this work improve the understanding of the physiopathology of CML.

Key words: Bcr-Abl, Apoptosis, Gene expression, *Trail*.

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

Abl – Abelson leukemia

AIF – “Apoptosis Inducing Factor”

ALK- “Anaplastic lymphoma kinase”

Apaf-1 – “Apoptotic protease activating factor-1”

ATP – Trifosfato de adenosina

Bcl-2 – “B-cell lymphoma”

Bcr – “Breakpoint cluster region”

BD- “Binding domain”

BH3 – “Bcl-2 homology”

BSA – Albumina de soro bovino

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

CDK – “Cyclin-Dependent Kinase”

CO₂ – Dióxido de carbono

Ct-“Threshold cycle”

DcR- “Decoy receptors”

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)

ECL- “Enhanced chemiluminescence”

EDTA – Ácido etileno-diaminotetraacético

ERK- “Extracellular sinal-regulated kinase”

FAIM- “Fas apoptotic inhibitory molecule”

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”

Grb2 – “Growth Factor Receptor-Bound protein 2”

HL-60.BA- HL-60.Bcr-Abl

HLA- “Human leukocyte antigen”

HeLa.BA- HeLa.Bcr-Abl

HEPES – Hidroxietilpiperazina

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

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

IFN- α – Interferon alfa

Ig-imunoglobulina

I- κ B – Inibidor de NF- κ B

IL – Interleucina

JNK- “jun NH2-terminal kinase”

KCL – Cloreto de potássio

kDa – KiloDaltons

LIF- Leukemia inhibitory factor

LLA – Leucemia Linfocítica Aguda

LMC – Leucemia Mielóide Crônica

LNC – Leucemia Neutrofílica Crônica

MAPK – “Mitogen Activated Protein Kinase”

MCL-1 – “Myeloid Cell Leukemia-1”

MM – Massa molecular

NaCl – Cloreto de sódio

NIPA-“Nuclear interacting partner of anaplastic lymphoma kinase”

NK- “Natural killer”

NLS- “Nuclear localization sinal”

NF- κ B – “Nuclear Factor kappa B”

NPM- “Nucleophosmin”

OSM- “Oncostatin M”

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

PI – Iodeto de propídeo

PI3-k – Fosfatidil Inositol-3-quinase

PCR- Reação em cadeia da polimerase

PVDF – Difluorido Polividileno

RNA- Ácido ribonucleico

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SH – “Src-homology (domain)”

SMAC – “Second Mitochondria-derived Activator of Caspases”

SSC – “Side Scatter”

STAT – “Signal transducer and activator of transcription”

STI571 – “Signal Transduction Inhibitor 571”

TAE – “Tris Acetate EDTA”

TBS – Salina tamponada com Tris

TE – Tris EDTA

TNF – Fator de necrose tumoral

TNFR- Receptor para fator de necrose tumoral

TNFSF10- “TNF-related apoptosis inducing ligand member 10”

TRADD- “Tumor necrosis factor receptor-associated death domain”

TRAIL – “TNF-related apoptosis inducing ligand”

Tris HCl – Tris hidrocloreídrico

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Câncer: Considerações Gerais	22
1.2 Apoptose.....	23
1.3 Leucemia Mielóide Crônica.....	27
1.4 Vias de sinalização.....	31
1.5 Bcr-Abl e expressão gênica	33
2 OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo geral	42
2.2 Objetivos específicos.....	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 Linhagens celulares	44
3.2 Isolamento de células mononucleares dos pacientes	44
3.3 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	45
3.4 RT-PCR e Real-Time PCR.....	45
3.5 Tratamento das linhagens celulares com mesilato de imatinibe (STI571)	48
3.6 Eletroforese de proteínas e “Western-blot”	48
3.7 Técnicas para avaliação e quantificação de morte celular por citometria de fluxo	49
3.8 Cálculo da expressão gênica relativa e análises estatísticas.....	50
4 CASUÍSTICA	53
5 RESULTADOS	57
5.1 Escolha dos genes pela sua expressão diferencial em células Bcr-Abl positivas.....	57
5.2 Caracterização das linhagens celulares	60
5.3 Validação dos resultados do “microarray”	63
5.3.1 Análise da expressão de <i>trail</i>.....	63
5.3.1.1 Expressão de <i>trail</i> em HL-60 x HL-60.BA.....	63
5.3.1.2 Expressão de <i>trail</i> em linhagens <i>bcr-abl</i> positivas.....	64
5.3.1.3 Expressão de <i>trail</i> em pacientes com LMC	66
5.3.1.4 Correlações entre a expressão de <i>trail</i> em pacientes e dados clínico-laboratoriais	67
5.3.1.5 Análise da expressão de <i>trail</i> em diferentes linhagens celulares tratadas com STI571	70
5.3.1.6 Análise da expressão protéica de TRAIL em diferentes linhagens <i>bcr-abl</i> negativas e positivas	74
5.3.2 Análise da expressão dos receptores de morte DR4 e DR5	76
5.3.2.1 Expressão dos receptores DR4 e DR5 em HL-60 x HL-60.BA	76
5.3.2.2 Expressão dos receptores DR4 e DR5 em diferentes linhagens <i>bcr-abl</i> positivas	76
5.3.2.3 Expressão dos receptores DR4 e DR5 em pacientes com LMC	80
5.3.2.4 Análise da expressão protéica dos receptores DR4 e DR5 em diferentes linhagens <i>bcr-abl</i> negativas e positivas.....	82
5.3.3 Análise da expressão de <i>osm</i>	83
5.3.3.1 Expressão de <i>osm</i> em HL-60 x HL-60.BA	83
5.3.3.2 Expressão de <i>osm</i> em linhagens <i>bcr-abl</i> positivas	84
5.3.3.3 Expressão de <i>osm</i> em pacientes com LMC	85
5.3.3.4 Correlações entre a expressão de <i>osm</i> em pacientes e dados clínico-laboratoriais	87
5.3.3.5 Análise da expressão de <i>osm</i> em diferentes linhagens celulares tratadas com STI571	89
5.3.4 Análise da expressão da expressão de <i>faim</i>	90
5.3.4.1 Expressão de <i>faim</i> em HL-60 x HL-60.BA	90
5.3.4.2 Expressão de <i>faim</i> em diferentes linhagens <i>bcr-abl</i> positivas	90
5.3.4.3 Expressão de <i>faim</i> em pacientes com LMC	92
5.3.4.4 Correlações entre a expressão de <i>faim</i> em pacientes e dados clínico-laboratoriais	93
5.3.4.5 Análise da expressão de <i>faim</i> em diferentes linhagens celulares tratadas com STI571	95
5.3.5 Análise da expressão de <i>nipa</i>	96
5.3.5.1 Expressão de <i>nipa</i> em HL-60 x HL-60.BA	96

5.3.5.2 Expressão de nipa em diferentes linhagens bcr-abl positivas	97
5.3.5.3 Expressão de nipa em pacientes com LMC	99
5.3.5.4 Correlações entre a expressão de nipa em pacientes e dados clínico-laboratoriais	100
5.3.5.5 Análise da expressão de nipa em diferentes linhagens celulares tratadas com STI571.....	102
6 DISCUSSÃO	104
7 CONCLUSÕES.....	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
ANEXOS	133

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer: Considerações Gerais

O câncer é um grupo de doenças caracterizadas por um crescimento e proliferação anormal de células transformadas. A carcinogênese pode ser vista como um processo que envolve mudanças celulares nas quais genes que controlam a proliferação, diferenciação e apoptose tornam-se descontrolados (HANAHAAN e WEINBERG, 2000; SUN *et al.*, 2004). A ocorrência dessas alterações gênicas em tumores é objeto de intensas pesquisas na área biomédica, com a finalidade de melhorar a compreensão sobre uma das doenças mais freqüentes em todo o mundo. Segundo a Sociedade Americana de Câncer a expectativa para o ano de 2008 está por volta de 1,5 milhões de novos casos diagnosticados. E segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) em 2008 no Brasil, são esperados 231.860 casos novos de câncer para o sexo masculino e 234.870 para sexo feminino. Algumas das alterações genéticas detectadas no câncer são herdadas, conferindo a seus portadores uma maior predisposição a determinados tipos de câncer em comparação aos indivíduos cujos genes estão inalterados. Porém, a maioria das mutações que originam o câncer é considerada esporádica e aparece espontaneamente como consequência de um dano ao DNA, culminando na alteração da função de genes cruciais para o correto desenvolvimento celular (BERTRAM, 2000). A transformação de uma célula normal em tumoral é um processo multifatorial e as alterações no DNA de células somáticas incluem mutações, amplificações, deleções e translocações (HANAHAAN e WEINBERG, 2000). Esses eventos são comuns em diferentes tipos de tumores e levam a um desbalanço da homeostase com a ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumores (SHACHAF e FELSHER, 2005; COLLINS e BARKER, 2007; GREENMAN *et al.*, 2007). De todos os casos de cânceres, 80 a 90% estão associados a fatores externos, como agentes químicos, físicos ou virais, que atuam modificando a estrutura genética das células.

As informações advindas do projeto genoma e as novas tecnologias desenvolvidas nesse campo da genômica e também na proteômica, favoreceram os estudos para o desenvolvimento de novas drogas que atuem diretamente nas alterações envolvidas na transformação celular (LIM, 2005). Nesse contexto vários trabalhos ressaltam o fato que a célula tumoral seria resultante não

apenas de alterações genéticas, mas também de alterações epigenéticas (BAYLIN e OHM, 2006). Dentre diversas abordagens terapêuticas utilizadas, a eliminação das células tumorais com uso de drogas anti-tumorais, radiação gama, inclusão de genes suicidas ou imunoterapia, apresentam como principal mecanismo de ação a potencialização da apoptose nas células alvo (DEBATIN, 2004).

1.2 Apoptose

A observação de que a morte celular por apoptose faz parte do desenvolvimento normal dos organismos foi feita a mais de 150 anos, porém o interesse nessa área continua até os dias de hoje (DEGTEREV *et al.*, 2003). Isso porque a apoptose é um mecanismo fisiológico e conservado evolutivamente de morte celular pelo qual o organismo elimina células que não são mais úteis ou desejadas, ocorrendo durante o desenvolvimento embrionário, remodelamento e homeostase tecidual, regulação imunológica e regressão de tumores (SCHULZE-OSTHOFF *et al.*, 1998).

Como a apoptose é um mecanismo geneticamente regulado, alterações bioquímicas que tornam uma célula mais ou menos susceptível a esse tipo de morte podem afetar sua sensibilidade aos agentes anti-tumorais. Defeitos nesse mecanismo têm um papel central na patogênese e progressão da maioria dos cânceres, e também na resistência aos tratamentos anti-tumorais (REED e PELLECCIA, 2005). Outras doenças como autoimunidade e desordens neuro-degenerativas também estão associadas a anormalidades no mecanismo de morte celular, ressaltando a importância da apoptose na homeostase de organismos multicelulares (OPFERMAN, 2008).

O fenótipo apoptótico é resultado da ativação intracelular de certos membros da família das caspases, proteases que possuem uma cisteína no seu sítio ativo e são capazes de clivar proteínas após um ácido aspártico (KAUFMANN e EARNSHAW, 2000; DEGTEREV *et al.*, 2003). O fato das caspases ativarem umas às outras pela clivagem em seqüências específicas resulta na amplificação de sua atividade por uma cascata de proteases (FULDA e DEBATIN, 2004). As caspases foram inicialmente classificadas em três classes: iniciadoras, tais como as caspases 2, 4, 8, 9 e 10, responsáveis pelo início do processo apoptótico e executoras, tais como as caspases 3, 6, e 7, responsáveis diretas pelas alterações morfológicas e bioquímicas associadas a apoptose (AMARANTE-MENDES e GREEN, 1999) e inflamatórias, como as caspases 1, 5 e 11

(MARTINON e TSCHOPP, 2007; PETRILLI *et al.*, 2007). Porém sabe-se que algumas distinções em membros da mesma família devem ser levadas em consideração (DEGTEREV e YUAN, 2008). Por exemplo, as caspases ativadoras possuem papéis distintos dependendo dos complexos de ativação que elas recrutam. A caspase-8 especificamente contribui para a sinalização dos receptores de morte e a proliferação normal de linfócitos (SU *et al.*, 2005). Já a caspase-2 medeia a morte induzida por estresses genóxicos (LASSUS *et al.*, 2002) e a caspase-4 a morte devido ao estresse de retículo endoplasmático (HITOMI *et al.*, 2004). Portanto, uma melhor divisão de acordo com a função de cada caspase pode contribuir para um melhor entendimento de como organismos multicelulares detectam e respondem diferentemente aos diversos estímulos recebidos (DEGTEREV e YUAN, 2008).

As caspases estão envolvidas nas mudanças que ocorrem na célula durante a apoptose e podem ser ativadas por duas vias: pela via extrínseca induzida pelos receptores de morte e pela via intrínseca a qual depende de eventos mitocondriais (HU e KAVANAGH, 2003). Nesse sentido, pelo menos em mamíferos, a maioria dos sinais de estresse que levam a célula a morrer por apoptose, como a retirada de fatores de crescimento, dano ao DNA, inibidores de síntese protéica, glicocorticóides, entre outros, converge para a mitocôndria, que em resposta pode então liberar fatores apoptogênicos para o citosol. Talvez o mais importante deles seja citocromo c, pois ele é necessário para a formação de um complexo, junto com Apaf-1, chamado de “apoptossomo executor” (BUDIHARDJO *et al.*, 1999). Esse complexo sustenta a ativação da caspase-9 que, quando clivada, ativa a caspase-3 efetora, resultando na degradação de substratos e subsequente morte celular (GREEN, 2005). A liberação do citocromo c é regulada por proteínas pró e anti-apoptóticas da família Bcl-2 (“B-cell lymphoma”), sendo A1, Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 alguns membros anti-apoptóticos e, destacando-se dentre os membros pró-apoptóticos, as proteínas Bad, Bid, Bak, Bax, Noxa e Puma (SHARPE *et al.*, 2004) (Figura 1). A “superexpressão” de Bcl-2 não está limitada à malignidade de linfócitos B, mas também é frequentemente encontrada em diferentes tipos de cânceres humanos de origem hematológica ou não (FISCHER e SCHULZE-OSTHOFF, 2005). Algumas mutações ou a expressão alterada das proteínas dessa família podem modificar drasticamente a resposta a certas drogas em sistemas experimentais. Alguns estudos clínicos reforçam a idéia de que o alto nível de expressão das proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 confere um fenótipo de resistência à morte clinicamente importante no que se refere ao tratamento quimioterápico em de pacientes (DEBATIN, 2004).

A outra via de ativação de caspases está ligada aos receptores de morte, essa via envolve membros da superfamília do receptor para fator de necrose tumoral (TNFR) que inclui TNF-R1, CD95 (Fas) ou DRs (“Death receptors”) 3 a 6, que se associam ao TNF α , FasL e TRAIL (LAVRIK *et al.*, 2005). Estes receptores são caracterizados por possuírem domínios extracelulares ricos em cisteína e domínio citoplasmático de aproximadamente 80 aminoácidos, chamados de domínios de morte (“death domain”) que têm um papel central em transmitir sinais de morte da superfície celular para as vias de sinalização intracelulares (Figura 2). Esses receptores-alvos estão localizados na membrana plasmática e são ativados por ligantes extracelulares que estão na superfície da própria célula, de uma célula efetora ou mesmo solúveis. Essa via extrínseca pode ser amplificada pela ativação da via intrínseca, uma vez que a molécula Bid seja ativada pela clivagem mediada pela caspase-8. Uma vez ativado, o Bid truncado sofre translocação para a mitocôndria e induz liberação de citocromo c, SMAC (“second mitochondrial activator of caspases”) e Omi/HtrA2 contribuindo com a indução dos principais fenótipos apoptóticos (FISHER *et al.*, 2005).

Figura 1- Vias de indução da apoptose (HENGARTNER, 2000).

Figura 2- Ativação de caspases pelos receptores de morte. Adaptado de (RATHMELL e THOMPSON, 1999).

Já está bem definido que a morfologia adquirida pela célula em apoptose é determinada pela clivagem de uma variedade de proteínas pelas caspases. Podemos identificar algumas modificações características que ocorrem durante a apoptose. As células que iniciaram o processo de morte perdem contato com as células vizinhas e se soltam do tecido. Ocorre uma condensação do núcleo e do citoplasma causando uma diminuição do tamanho da célula e a quebra do envoltório nuclear e do nucléolo acontece com a condensação da cromatina. A abertura de poros é responsável pela perda do potencial da membrana da mitocôndria. A membrana plasmática também sofre dobramentos que são responsáveis pela formação dos corpos apoptóticos. As células sinalizam seu estado apoptótico para as outras células do tecido externalizando, dentre outras coisas, a molécula de fosfatidilserina e com isso, tornam possível seu reconhecimento pelos fagócitos. A fagocitose dos corpos apoptóticos e sua degradação dentro dos lisossomos contribui para o perfil não-inflamatório desse processo de morte ao contrário da necrose (RATHMELL e THOMPSON, 1999).

1.3 Leucemia Mielóide Crônica

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa de células hematopoéticas pluripotentes resultante da expansão clonal de células tronco que carregam uma anormalidade cromossômica responsável pelo aparecimento do cromossomo Filadélfia (Ph) (HEHLMANN *et al.*, 2007). A LCM é uma doença rara com uma incidência rara de 1 a 2 casos a cada 100.000 pessoas por ano (HEHLMANN *et al.*, 2007) e cuja a frequência, segundo a Associação Brasileira de Linfomas e Leucemias aumenta com a idade passando de aproximadamente um caso a cada 1 milhão de crianças nos primeiros dez anos de vida, a um caso em cada 100 mil indivíduos aos 50 anos e a um caso em cada 10 mil indivíduos acima de 80 anos.

A doença apresenta um curso bifásico ou trifásico com fases denominadas crônica, acelerada e blástica. A fase inicial, denominada crônica, é caracterizada pela expansão maciça de precursores mielóides e células maduras que deixam a medula óssea prematuramente, porém preservam a sua capacidade de diferenciação. É nessa fase inicial que a maioria dos pacientes é diagnosticada sendo que muitas vezes o início da doença é insidioso e os principais achados clínicos são: o aumento do tamanho do baço, fadiga e perda de peso. No sangue periférico desses pacientes é observada uma leucócitose com valores de 150.10^9 células/L (valores normais estão por volta de 5.10^9 células/L) com predominância de basófilos e eosinófilos e os blastos representam menos de 2% das células em circulação. A progressão da doença costuma ser muito lenta e permanece estável por longos períodos, por esse motivo muitos estudos são direcionados a essa fase para verificar as mudanças que ocorrem nas células que levam a sua transformação no fenótipo mais agressivo da crise blástica (MELO e BARNES, 2007). A fase crônica é seguida por uma fase intermediária conhecida por fase acelerada, na qual o paciente sofre um aumento maior do número de leucócitos circulantes e os blastos representam de 10 a 20% dos leucócitos circulantes. Essa fase é caracterizada por um aumento do baço e os pacientes começam a ficar refratários ao tratamento devido às novas anormalidades genéticas que aparecem (SAWYERS, 2004; MELO e BARNES, 2007). Os eventos moleculares que levam à evolução da doença para a crise blástica não são completamente conhecidos (SHET *et al.*, 2002). Nessa fase, os pacientes apresentam uma piora no estado clínico e os sintomas incluem cansaço excessivo, infecções constantes, sangramentos e hematomas que estão relacionados à trombocitopenia, anemia e aumento do baço (MELO e BARNES, 2007). Segundo a Organização Mundial da Saúde a crise blástica é diagnosticada quando a medula óssea apresenta

mais de 20% de células blásticas. Nessa fase a maioria das células circulantes no sangue periférico do paciente é de blastos imaturos (GARCIA-MANERO *et al.*, 2003).

De acordo com a Sociedade Americana do Câncer a estimativa para 2008 é de 44.270 novos casos diagnosticados, com um maior número de casos na fase crônica (19.940) do que na fase blástica (18.720). O diagnóstico da doença é realizado de maneira direta e na maioria dos casos é feito com base nas contagens das células sanguíneas. Primeiramente é feito um hemograma e a contagem das células do sangue já aponta a existência da doença ao evidenciar um número muito aumentado de glóbulos brancos com acúmulo de células jovens (blásticas) anormais. Outro exame, o mielograma, serve para confirmar o diagnóstico. Nesse exame o líquido da medula óssea é analisado para a identificação das células presentes. A investigação costuma prosseguir com recursos mais sofisticados como identificação do cromossomo Filadélfia por citogenética ou detecção dos transcritos de Bcr-Abl por RT-PCR (HEHLMANN *et al.*, 2007).

A patogênese da LMC tem sido extensamente estudada uma vez que essa doença é um paradigma das neoplasias induzidas por uma translocação cromossômica que resulta na expressão de uma nova proteína. A anormalidade citogenética descrita por Nowell e Hungerford (NOWELL e HUNGERFORD, 1960) como cromossomo Filadélfia (Ph), que está presente em aproximadamente 90% dos pacientes portadores de LMC, demorou algumas décadas para ser caracterizada como consequência de uma translocação entre o cromossomo 9 e 22 $t(9;22)(q34;q11)$ que promove a fusão do gene *bcr* com o gene *abl* (CHALANDON e SCHWALLER, 2005) (Figura 3).

Figura 3- Cromossomo Filadélfia. Figura adaptada de Siteman Cancer Center.

O proto-oncogene *c-abl* codifica uma proteína tirosina-quinase de 145 kDa presente preferencialmente no núcleo onde está envolvida com mecanismos de reparo no DNA, mas também pode estar no citoplasma associada à filamentos de actina (AMARANTE-MENDES e GREEN, 1999); (WANG, 2000). A regulação dessa proteína envolve os diversos domínios com homologia a domínios existentes na proteína Src, denominados SH (“Src homology”). A extremidade N-terminal de *abl* contém três domínios SH: um domínio onde se localiza o sítio catalítico responsável pela atividade tirosina-quinase (SH1), um de ligação a resíduos de fosfotirosina (SH2) e um de reconhecimento de seqüências ricas em prolina (SH3) (AMARANTE-MENDES *et al.*, 1997; AMARANTE-MENDES e GREEN, 1999) (Figura 4). Como atividade tirosina-quinase de c-Abl é baixa em relação a variantes oncogênicas como Bcr-Abl, devido a uma fina regulação da ativação dessa molécula que tem suas funções relacionadas com indução de morte por agentes genotóxicos, reparo de DNA, progressão do ciclo celular para a fase S, e adesão celular mediada por integrinas (RAITANO *et al.*, 1997).

Figura 4- Esquema da estrutura de c-Abl. NLS, sinal de localização celular; pppp, seqüência rica em prolina; BD, domínio de ligação (RAITANO *et al.*, 1997).

O gene *bcr* (“breakpoint cluster region”) por sua vez, codifica uma proteína de 160 kDa que contém vários domínios diferentes, incluindo um domínio serina/treonina quinase e dois domínios SH2. A homo-oligomerização de *bcr-abl* é possível, pois a proteína Bcr contém em seus primeiros 63 aminoácidos uma seqüência “coiled-coil” que permite a formação de dímeros e tetrâmeros (CHOPRA *et al.*, 1999) (Figura 5).

Figura 5- Esquema da estrutura de c-Bcr. BD, domínio de ligação (RAITANO *et al.*, 1997).

Após a translocação é formado o neogene *bcr-abl*, que codifica uma proteína tirosina-quinase constitutivamente ativa que aumenta a proliferação dos clones celulares afetados (GADZICKI *et al.*, 2005). Dependendo do local da quebra do gene *bcr* a proteína Bcr-Abl pode ser expressa em tamanhos diferentes de 190 kDa, de 210 ou de 230, que estão presentes na LLA (Leucemia Linfocítica Aguda), na LMC e na LNC (Leucemia Neutrofílica Crônica), respectivamente (CHOPRA *et al.*, 1999). Esses locais de quebra também estão associados com a agressividade da doença (SESSIONS, 2007). Sabe-se que a isoforma de 190 kDa de Bcr-Abl possui uma maior atividade tirosina-quinase quando comparada à isoforma de 210 kDa, estando também associada a um tipo de leucemia mais agressivo (KANTARJIAN *et al.*, 2006).

As tirosinas-quinases são enzimas que transferem grupos fosfatos das moléculas de ATP para o grupo hidroxila de resíduos de tirosina presentes em moléculas envolvidas principalmente na transdução de sinais. A regulação da atividade das tirosina-quinases é fundamental, pois essas enzimas são responsáveis pelo controle da maioria dos processos celulares essenciais como ciclo celular, proliferação, diferenciação, mobilidade e morte ou sobrevivência celular. Entretanto, o aumento do “pool” circulante de células Bcr-Abl-positivas em relação às células normais não é devido somente ao excesso de proliferação, mas também à desregulação da apoptose nessas células. Em células tumorais ocorre a ativação excessiva de determinadas tirosina-quinases, como a proteína quimérica Bcr-Abl, o que mantém algumas vias de transdução de sinais em um estado de ativação constante que é essencial para a indução do fenótipo da LMC (GARCIA-MANERO *et al.*, 2003; VLAHOVIC e CRAWFORD, 2003). Diversas moléculas efetoras envolvidas no controle da proliferação como RAS, RAF, MYC e STAT estão ativadas na presença de Bcr-Abl, que também é responsável por bloquear a apoptose pela expressão de proteínas da família Bcl-2 e ativação de

RAS, PI3K e Akt (AMARANTE-MENDES; MCGAHON *et al.*, 1998; AMARANTE-MENDES; NAEKYUNG KIM *et al.*, 1998; SALESSE e VERFAILLIE, 2002).

1.4 Vias de sinalização

A via RAS/RAF/MEK/ERK desempenha um papel central na transdução de sinais, enviando sinais a partir dos múltiplos receptores na superfície celular até os fatores de transcrição no núcleo. Essa via envolve a ativação de membros da família MAPK (“Mitogen-activated protein kinase”), sendo ativada por uma variedade de estímulos, tais como fatores de crescimento e estresse celular. Dentro da família MAPK, três membros em particular, ERK (“Extracellular signal-regulated kinase”), JNK (“c-Jun NH2-terminal kinase”) e p38 MAPK têm características particulares. ERK é ativada em resposta a fatores de crescimento, citocinas e ésteres de forbol por meio de uma variedade de moléculas de sinalização e tem um papel importante na regulação do crescimento celular e diferenciação. Por outro lado, JNK e p38 MAPK são ativadas em resposta ao fator de necrose tumoral α (TNF- α), radiação ultravioleta e estresse celular tendo sua ativação relacionada com indução de apoptose (WEI *et al.*, 2005). A via das MAPK pode ser ativada por RAS, uma proteína pequena que se ativa com a ligação de GTP, estimulando a translocação de RAF. A estimulação de RAF ativa MEK1 e ERK resultando na fosforilação de fatores de transcrição, proliferação e inibição da apoptose (STEELMAN *et al.*, 2004). Pendergast e colaboradores mostraram que Bcr-Abl ativa a via de RAS pela ligação de uma molécula adaptadora chamada Grb2 (*growth receptor binding protein-2*), cuja interação com Bcr-Abl depende de um resíduo de tirosina fosforilada (Y177) localizada na porção Bcr da proteína quimérica (PENDERGAST *et al.*, 1993). Além de Grb2 outras moléculas adaptadoras, como SHC e CRKL podem ser responsáveis pela ativação de RAS para a transformação hematopoética (CHOPRA *et al.*, 1999). Como a via das MAPK não só promove a proliferação celular, mas também medeia a sobrevivência celular e tem sua atividade aumentada em células cancerosas, o controle desta via se torna um alvo importante para novas terapias anti-tumorais.

A ativação, por meio de fosforilação, da família de fatores de transcrição STAT (“Signal transducer and activator of transcription”) por tirosina-quinases, consiste em um processo

minuciosamente regulado que ocorre de maneira transitória em células normais. Uma vez fosforiladas, as STATs são translocadas para o núcleo onde induzem a expressão de genes específicos (SATTLER e SALGIA, 1997). A ativação constitutiva de STATs que ocorre nas células tumorais Ph-positivas deve-se à ação da atividade persistente de tirosina-quinases, inclusive da proteína Bcr-Abl, que participam da ontogênese pelo aumento da expressão de genes que codificam inibidores da apoptose, como Bcl-x_L (AMARANTE-MENDES; MCGAHON *et al.*, 1998) e de moléculas que regulam o ciclo celular, como as ciclinas D1/D2 (BUETTNER *et al.*, 2002). Nieborowska-Skorska e colaboradores demonstraram que a maior parte das atividades de STATs mediadas por Bcr-Abl é executada pela STAT5, que tem os domínios SH3 e SH2 de Bcr-Abl envolvidos em sua ativação (NIEBOROWSKA-SKORSKA *et al.*, 1999).

A fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) é uma quinase lipídica composta por uma subunidade regulatória (p85) e outra catalítica (p110) que está envolvida em diversos processos em células normais como na sobrevivência, proliferação, diferenciação, metabolismo e motilidade (KHARAS e FRUMAN, 2005). A PI3K é responsável pela fosforilação da Akt, uma serina/treonina quinase, que por sua vez fosforila outras proteínas responsáveis pelo controle da sobrevivência celular. A forma ativada de Akt exerce seus efeitos anti-apoptóticos pela fosforilação e conseqüente inativação de substratos como Bad e caspase-9 (RYCHAHOU *et al.*, 2005). Porém, em células Bcr-Abl positivas, a fosforilação de Bad não é necessária para os sinais de sobrevivência dependentes de PI3K (KHARAS e FRUMAN, 2005). Além disto, embora a PI3K seja importante na transformação mediada por Bcr-Abl, ela não parece exercer efeito na resistência à apoptose nestas células (AMARANTE-MENDES *et al.*, 1997).

Além dos seus efeitos sobre Bad, Akt é capaz de suprimir a apoptose regulando a atividade das proteínas IκB (moléculas inibitórias do NF-κB). A fosforilação e subsequente degradação dessas proteínas levam a liberação das proteínas da família do NF-κB que são essenciais para a inflamação, imunidade, proliferação celular e apoptose (SONG *et al.*, 2005). O NF-κB ativo migra para o núcleo para regular a expressão de vários genes alvo (VIATOUR *et al.*, 2005). Além de suprimir a apoptose, o NF-κB pode estimular a transcrição de fatores de progressão do ciclo celular, de enzimas proteolíticas e de fatores angiogênicos contribuindo assim para o comportamento maligno das células (MCCARTY, 2004).

Diversos tratamentos têm sido empregados na tentativa de cura da LMC, porém o transplante de medula óssea ainda é a única forma terapêutica comprovadamente curativa, mas que tem sua aplicação limitada devido a sua alta morbi-mortalidade e por ser realizado apenas entre indivíduos HLA compatíveis e em indivíduos numa faixa etária menor de 55 anos. Dentre os tratamentos atualmente utilizados podemos ressaltar o mesilato de imatinibe (STI571) que revolucionou o tratamento e o prognóstico da LMC. O STI571 é um composto sintético que se liga a região de Bcr-Abl responsável pela ligação ao ATP e, com isso, suprime sua atividade enzimática impedindo o avanço da leucemia. Com a inibição da fosforilação dos resíduos de tirosina na própria Bcr-Abl e em outros substratos protéicos, o STI571 previne a ativação de vias de sinalização que são cruciais na leucemogênese. Contudo, a persistência de células Bcr-Abl positivas nos pacientes em tratamento com o STI571 indica que a inibição da atividade de tirosina-quinase de Abl talvez não seja suficiente para erradicar as células leucêmicas. Assim sendo, a identificação de outros componentes celulares e vias de sinalização ligados à patogênese da doença é uma estratégia fundamental para a escolha de novos alvos terapêuticos e conseqüente desenvolvimento de novos fármacos (GARCIA-MANERO *et al.*, 2003; GOLDMAN, 2004).

1.5 Bcr-Abl e expressão gênica

Este projeto está vinculado à linha geral de pesquisa do laboratório cujo objetivo é avaliar o impacto da expressão da molécula Bcr-Abl sobre a maquinaria apoptótica por meio de plataformas de genômica e proteômica. Recentemente foram realizadas pelo nosso grupo, análises de expressão gênica global (“microarray”) de linhagens que expressam ectopicamente a oncoproteína Bcr-Abl. Essas análises comparativas entre linhagens celulares selvagens e linhagens Bcr-Abl positivas mostraram a regulação transcricional de determinados genes, alguns dos quais parecem ter um papel direto na regulação da morte celular e que, na presença de Bcr-Abl, têm sua expressão diminuída (genes pró-apoptóticos) ou aumentada (genes anti-apoptóticos). Nessa análise genômica foram utilizados os seguintes pares celulares: HL-60/HL-60.Bcr-Abl, HELA.vetor/HELA.Bcr-Abl e SKW.6.4/SKW6.4.Bcr-Abl, sendo que apenas nesse último par a expressão de Bcr-Abl não conferiu resistência à morte. A escolha de alguns genes para o desenvolvimento deste projeto obedeceu aos seguintes critérios: fator de alteração da expressão e possível participação em

eventos biológicos envolvidos na patogênese da leucemia e na resistência à apoptose. Dentre os genes que se destacaram, escolhemos: OSM (“Oncostatin M”), TRAIL ou TNFSF10 (“tumor necrosis ligand superfamily, member 10”), FAIM (“Fas apoptotic inhibitory molecule”) e NIPA (“nuclear interacting partner of anaplastic lymphoma kinase”), os quais foram alvo de estudo no presente trabalho. É importante salientar que os dois primeiros tiveram sua expressão diminuída e os dois últimos estavam aumentados nas células resistentes.

Células mononucleares, incluindo linfócitos, células NK, e macrófagos são capazes de inibir o crescimento em diversos tipos de células tumorais. Essa supressão pode ocorrer diretamente por contato ou pela produção de fatores solúveis. Atualmente há um grande esforço para se elucidar os fatores que são produzidos pelas células mononucleares que agem na supressão do crescimento tumoral. Dentre esses fatores estão os interferons, fatores de necrose tumoral, linfotóxicos e interleucinas, dentre outros (ZARLING *et al.*, 1986). A oncostatina M é uma glicoproteína de aproximadamente 28 kDa produzida por monócitos e linfócito T ativados e é membro da subfamília de citocinas da IL-6 (ROSE e BRUCE, 1991). Trata-se de uma proteína extremamente resistente ao calor e pHs extremos que é produzida na sua forma precursora de 252 aminoácidos. A clivagem da porção C-terminal leva a forma completamente ativa (196 aminoácidos), sendo mantidos os dois sítios de glicosilação nessa forma da OSM (MALIK *et al.*, 1989). Horn e colaboradores identificaram sua capacidade de OSM inibir o crescimento de células derivadas de melanoma e outros tumores sólidos (HORN *et al.*, 1990). Dependendo do tipo celular, outras funções biológicas podem ser desempenhadas pela OSM como, por exemplo, estimulação da diferenciação celular, hematopoese e estimulação da liberação de citocinas por células que participam da reação inflamatória (GOMEZ-LECHON, 1999). Tais funções e a grande semelhança estrutural fizeram com que durante muito tempo a OSM fosse considerada como uma LIF (“leukemia inhibitory factor”) e a redundância funcional entre essas duas moléculas pode ser explicada pelo fato das duas moléculas compartilharem o mesmo receptor (TANAKA e MIYAJIMA, 2003). A ligação de OSM em seus receptores leva a ativação de duas importantes vias de sinalização: JAK-STAT e MAPK (AUGUSTE *et al.*, 1997). STAT5 é principal fator de transcrição utilizado por OSM para aumentar os níveis de BAX e diminuir a expressão de Bcl-2, controlando assim a via mitocondrial da morte celular por apoptose, em osteossarcomas (CHIPOY *et al.*, 2007). Porém, diversos estudos mostraram o papel anti-apoptótico de STAT5, levando a ontogênese quando ativado. Os diferentes efeitos desse fator de transcrição parecem depender do

seu grau e duração de fosforilação, levando à proliferação, diferenciação ou apoptose da célula (NOSAKA *et al.*, 1999).

TRAIL, também chamado TNFSF10 (“TNF-related apoptosis inducing ligand”) foi identificado em 1995-1996 por Willey e col. e Pitti e col., por sua capacidade de induzir apoptose rapidamente (WILEY *et al.*, 1995; PITTI *et al.*, 1996). Foi originalmente clonado em virtude de sua homologia com o ligante de Fas (FasL, TNFSF6) e com a superfamília de TNF (“tumor necrosis factor”). Trata-se de uma proteína transmembranar do tipo II, com um pequeno domínio citoplasmático (N-terminal) e um domínio extracelular longo (C-terminal) que se liga ao receptor (FALSCHLEHNER *et al.*, 2007).

TRAIL é secretada por células do sistema imune (linfócitos, NK, monócitos e células dendríticas) e interage com um complexo sistema de receptores composto por dois receptores de morte pró-apoptóticos (DR4/TRAIL-R1 e DR5/TRAIL-R2) e três receptores do tipo “decoy receptors” (DcR1/ TRAIL-R3, DcR2/ TRAIL-R4 e osteoprotegerina) que não induzem apoptose, pois não possuem domínios de morte funcionais. Os receptores DR4 e DR5 foram identificados em 1997, possuem 58% de homologia e até o momento não foi possível identificar nenhuma diferença de função entre esses dois receptores (PAN; NI *et al.*, 1997; PAN; O'ROURKE *et al.*, 1997; SCREATON *et al.*, 1997). O domínio citoplasmático desses receptores possui significativa homologia com CD95 e TNF-R1 e é onde se localiza o domínio de morte, comum a esse tipo de receptores. Algumas mutações em DR4, localizadas no domínio de interação com o ligante, já foram associadas com determinados tipos de câncer (KIMBERLEY e SCREATON, 2004).

Inúmeros estudos mostraram a participação de TRAIL na indução de apoptose em linhagens celulares derivadas de diversos tipos de neoplasias e que tal fenômeno, no entenato, não ocorre em células normais. Tal diferença na resposta de células normais e tumorais à indução de morte por TRAIL seria devido à expressão dos receptores do tipo “decoy receptors” que foi inicialmente identificada como restrita às células normais, fato que explicaria a seletividade de TRAIL (PAN; NI *et al.*, 1997). Dentre esses receptores temos o TRAIL-R3 (DcR1) e o TRAIL-R4 (DcR2), que possuem um domínio extracelular com alta homologia com os receptores que são capazes de induzir morte. O receptor TRAIL-R3 não possui os domínios intracelular nem o citoplasmático e sua ancoragem na membrana é feita por um resíduo de GPI. Esse receptor difere dos outros receptores por sua expressão ser restrita em linfócitos de sangue periférico (DEGLI-ESPOSTI;

SMOLAK *et al.*, 1997; PAN; NI *et al.*, 1997; MACFARLANE *et al.*, 2002). Por outro lado o TRAIL-R4 é amplamente expresso e possui um domínio citoplasmático com um domínio de morte truncado, que não é capaz de transmitir o sinal de morte (DEGLI-ESPOSTI; DOUGALL *et al.*, 1997) (Anexo 1). Esses dois receptores quando “superexpressos”, são capazes de inibir a morte de células sensíveis a TRAIL (KIMBERLEY e SCREATON, 2004). Além do mais, esses receptores decóicos seriam capazes de seqüestrar TRAIL nas células normais, mantendo o ligante longe dos receptores de morte. Portanto, a ausência dos receptores decóicos em células tumorais pode contribuir para a maior sensibilidade dessas células à morte induzida por TRAIL (CHEN *et al.*, 2003; HERBEUVAL *et al.*, 2003; DANIELS *et al.*, 2005) (Figura 6). A possível regulação na expressão de TRAIL por oncogenes pode contribuir para o fenótipo de resistência característico dessas células tumorais. Por isso um estudo mais aprofundado da interação entre essas moléculas e as vias de sinalização envolvidas se torna interessante para uma maior compreensão dos mecanismos de resistência envolvidos na LMC.

Figura 6- Esquema da sinalização de TRAIL (FALSCHLEHNER *et al.*, 2007).

A molécula inibitória de apoptose mediada por Fas (FAIM) foi identificada como um antagonista de Fas e o gene que codifica essa molécula foi originalmente caracterizado por “differential display” sendo “superexpresso” em células B resistentes à morte por Fas (SCHNEIDER *et al.*, 1999) (Figura 7). Trata-se de uma molécula altamente conservada evolutivamente desde *Caenorhabditis elegans* até humano e que está expressa em diversos tecidos, sugerindo então uma grande importância dessa molécula (ROTHSTEIN, 2000). Em camundongos foram identificadas duas formas de FAIM, a forma longa (FAIM-L) e a curta (FAIM-S) que diferem quanto a sua expressão nos tecidos, sendo que FAIM-S está amplamente expressa enquanto FAIM-L é tecido específico, estando presente somente em cérebro e testículos (ZHONG *et al.*, 2001). Em humanos foram identificadas três isoformas (isoformas a, b e c) que possuem grande homologia com as formas de FAIM-S e FAIM-L presentes em camundongos. Dentre as isoformas, a isoforma c é mais homóloga à forma FAIM-S e a isoforma a também possui os 22 aminoácidos extras presentes na forma longa do FAIM murino (Anexo 2). Por enquanto, não foram identificados domínios efetores conhecidos na sequência codificada de aminoácidos de FAIM, ou seja, o mecanismo pelo qual FAIM inibe a apoptose permanece desconhecido. A participação de FAIM na resistência à apoptose parece estar restrita a via de Fas, uma vez que foi mostrado que células estavelmente transfectadas com *faim* não se tornam mais resistentes a morte induzida por quimioterápicos ou radiação UV (SCHNEIDER *et al.*, 1999). Visto que a apoptose mediada pela via de Fas/FasL na interação entre linfócitos T citotóxicos com células imaturas é um importante mecanismo de vigilância imunológica da leucemia, a existência de uma molécula inibitória dessa via que está “superexpressa” em células Bcr-Abl positivas destaca tal molécula como possível alvo para novas estratégias terapêuticas.

Figura 7- Esquema da apoptose mediada por receptores de morte e possível papel de FAIM. Adaptado de (WONG *et al.*, 2006).

A translocação t(2;5)(p23;q35) que funde os genes *nucleophosmin (NPM)* com *anaplastic lymphoma kinase (ALK)* leva a expressão de uma tirosina-quinase oncogênica constitutivamente ativa e presente em mais de um terço dos linfomas anaplásicos de células grandes. O mecanismo pelo qual NPM/ALK medeia a transformação maligna das células não está bem definido e apesar dessa proteína ser capaz de fosforilar diversas moléculas adaptadoras como SHC e Grb2, não se correlacionou tal capacidade com sua ação transformante (SLUPIANEK *et al.*, 2001). Foi descrita a participação da proteína NPM/ALK na proliferação celular e regulação da apoptose. Bai e colaboradores demonstraram que a NPM/ALK ativa constitutivamente a fosfolipase C conferindo a essa proteína uma função pró-mitogênica, que também aparece em outras proteínas oncogênicas como Bcr-Abl (BAI *et al.*, 2000). Slupianek e colaboradores (2001) mostraram a importância da ativação da via PI3K/Akt na transformação maligna mediada por NPM/ALK. Dentre os diversos alvos de NPM/ALK foi identificada uma proteína de 60 kDa expressa em diversos tecidos humanos, denominada NIPA (“Nuclear Interacting Partner of AKL”). Essa proteína é encontrada exclusivamente no núcleo (BASSERMANN; VON KLITZING *et al.*, 2005), o que está associado à presença de um sinal de translocação presente no C-terminal que a direciona para esse compartimento celular. A interação de NIPA com NPM/ALK é dependente do estado de fosforilação NIPA. Sabendo que NPM/ALK é uma tirosina-quinase e que NIPA apresenta fosforilação em resíduos de tirosina e principalmente em resíduos de serina, sua fosforilação depende uma serina-quinase ainda não identificada (Anexo 3). Ouyang e colaboradores mostraram também que em células BAF3 a expressão de NIPA é capaz de proteger da morte por privação de

IL-3 e que sua correta localização nuclear é necessária para essa sua função anti-apoptótica, embora não se saiba ao certo os mecanismos envolvidos (OUYANG *et al.*, 2003).

Bassermann e colaboradores (2005) caracterizaram NIPA como uma proteína “F-box” que define um tipo de ubiquitina E3 ligase (“SCF-type ubiquitin E3 ligase”). Esse complexo é formado por quatro subunidades: Skp1, Cul1, Roc1 e uma proteína F-Box intercambiável, que determina a especificidade do substrato. As proteínas F-Box são proteínas que contêm pelo menos um domínio F-Box, que possibilita a interação entre proteínas. Esse tipo de proteína já foi associado com diversas funções como sinalização celular e regulação do ciclo celular. NIPA foi identificada como parte do complexo SCF, que medeia a ubiquitinação de proteínas sinalizadas para degradação pelo proteossomo. A fosforilação de NIPA ocorre de maneira dependente da fase do ciclo celular iniciando em G2 e tem como consequência sua dissociação do complexo SCF que parece ser de fundamental importância na progressão do ciclo de G2/M (Figura 8).

Figura 8- Modelo da atividade do complexo SCF-NIPA no ciclo celular. Adaptado de (BASSERMANN; VON KLITZING *et al.*, 2005).

Doenças malignas são definidas pelas suas características morfológicas, fenotípicas, genotípicas e clínicas. A complexidade das mudanças envolvidas durante a transformação maligna da célula tem representado um desafio permanente, pois tem a participação de uma série de anomalias moleculares. Os avanços da biotecnologia representados pela crescente capacidade em detectar a presença de oncogenes e, mais recentemente, a possibilidade de se avaliar a expressão concomitante de outros genes pela técnica do microarray, têm revelado as diferenças que ocorrem nas células tumorais e que podem ter impacto na biologia e caracterização da doença. Nesse contexto, os dados obtidos nesse trabalho visam a melhor compreensão de como alterações na expressão de determinados genes contribui para a patologia da LMC. Dentre os vários genes que tiveram sua expressão alterada por Bcr-Abl, os genes de *OSM*, *TNFSF10*, *FAIM* e *NIPA* foram escolhidos por seu papel em processos fundamentais para a sobrevivência e resistência à quimioterapia encontrada em na LMC.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a modulação da expressão dos genes *osm*, *trail*, *nipa* e *faim* em diferentes linhagens celulares pelo oncogene BCR-ABL e em células de pacientes portadores de Leucemia Mielóide Crônica nas diferenças fases da doença.

2.2 Objetivos específicos

- Validar os resultados de expressão gênica global, obtidos anteriormente em nosso laboratório através da técnica de “microarray” utilizando células transfectadas com o oncogene *bcr-abl*, conforme descrito acima. Assim, a expressão dos genes escolhidos foi determinada por Real-Time PCR, em linhagens Bcr-Abl positivas disponíveis em nosso laboratório;
- Definir se a expressão dos genes estudados depende da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl através da utilização do inibidor específico STI571 (gleevec/STI571);
- Avaliar a expressão dos genes escolhidos (citados no objetivo geral) em células de pacientes portadores de LMC, em diferentes fases da doença;
- Associar a expressão dos genes investigados com os dados clínico-laboratoriais dos pacientes com LMC, para checar o potencial uso desses genes como marcadores de prognóstico;

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas no trabalho as linhagens celulares HL-60 (linhagem humana derivada de leucemia promielocítica aguda) e HL-60.Bcr-Abl (AMARANTE-MENDES; MCGAHON *et al.*, 1998; AMARANTE-MENDES; NAEKYUNG KIM *et al.*, 1998) estabelecida por meio do plasmídeo retroviral pSR α MSNtkneo.p185Bcr-Abl. Para os ensaios de transfecção e produção de partículas retrovirais recombinantes foi utilizada a linhagem 293T (derivada de epitélio renal humano). Além disso, utilizamos as linhagens K562, KCL22, LAMA-84, BV173, KBM5 e KBM7 derivadas de pacientes com LMC na fase blástica, que expressavam o *bcr-abl* constitutivamente.

Com o objetivo de avaliar o efeito da expressão de Bcr-Abl em diferentes contextos celulares também foram utilizadas outras linhagens celulares transfectadas/infectadas com o gene *bcr-abl* como a THP-1 (linhagem monocítica) estabelecida pela Doutorada Gabriela Brumatti (2005). A linhagem SKW6.4 (linfócito B humano) e a Jurkat (linfócito T derivado de paciente com leucemia linfoblástica aguda) também foram transfectadas com *bcr-abl*, estas linhagens celulares foram estabelecidas pela Doutora Ana Elisa B. Bueno assim como a linhagem Jurkat.KR resultante da infecção das células com retrovírus presentes no sobrenadante de células 293T transfectadas com o plasmídeo que contém uma mutação pontual que promove a inibição da atividade quinase de Bcr-Abl. A descrição detalhada das células utilizadas está no Anexo 4.

O cultivo das linhagens celulares supracitadas foi realizado em meio RPMI1640 completo (suplementado com 10% soro bovino fetal, 2 mM glutamina, 100 μ g/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomicina e 25 mM HEPES), com exceção das linhagens 293T que foram cultivadas em meio DMEM completo.

3.2 Isolamento de células mononucleares dos pacientes

O sangue periférico dos pacientes foi submetido à separação das células mononucleares pelo método de Ficoll-Hypaque conforme técnica descrita por Boyum em 1977 (BOYUM, 1977). O sangue foi diluído em solução fisiológica e aplicado delicadamente às paredes dos tubos de

polipropileno de 15 ml, contendo Ficoll-Hypaque 1,077, na proporção de 4 para 1 partes em volume, respectivamente. Após centrifugação a 500 g durante 20 minutos, as células foram retiradas da interface plasma-Ficoll-Hypaque e lavadas 2x com solução fisiológica. As células mononucleares na concentração de 5×10^6 foram ressuspensas em 0,5 ml de Trizol[®] (Invitrogen Life technologies) para posterior realização da extração de RNA. Essas amostras estão sendo utilizadas em diferentes projetos de pesquisas do laboratório

3.3 Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração do RNA total das células das linhagens foi realizada pelo método do Trizol, de acordo com o protocolo do fabricante. Em linhas gerais, $4,0 \times 10^6$ células foram lisadas com 0,5ml de Trizol e, após precipitação e lavagem do RNA, os precipitados foram ressuspensos em 30 μ l de água livre de RNases. A concentração de RNA total foi detectada por espectrofotometria ($\lambda=260\text{nm}$) e foi usada a concentração de 3 μ g de RNA para a conversão em cDNA. O RNA convertido em cDNA com o emprego da enzima Superscript III conforme protocolo do fabricante. Todos os produtos utilizados foram adquiridos da empresa Invitrogen, Life Technologies. Para verificação da qualidade dos cDNAs sintetizados foi feita uma reação de RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa) para detecção da expressão do “housekeeping” β -actina.

3.4 RT-PCR e Real-Time PCR

Para avaliar a expressão dos genes estudados foram utilizados oligonucleotídeos específicos para sua amplificação por Real-Time PCR (qPCR). A reação de qPCR avalia o acúmulo do produto da reação de amplificação em sua fase logarítmica, o qual está diretamente relacionado à quantidade de molde existente no início da reação, sendo atualmente um método considerado bastante preciso e reprodutível para quantificação da expressão gênica. Para as reações de qPCR foi utilizado o kit Platinum SYBR Green qRT-PCR Supermix-UDG da Invitrogen. O reagente SYBR Green utilizado possui afinidade pela dupla fita de DNA e emite fluorescência no comprimento de onda de 520nm. Uma vez ligado à dupla fita tem a intensidade de sua fluorescência aumentada em até 100 vezes, permitindo assim a detecção do produto da reação

(LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). A padronização dessa metodologia exige bastante cuidado uma vez que o fluorocromo se intercala a qualquer molécula de dupla fita presente na reação. A confirmação da especificidade da amplificação é realizada por meio da análise da curva de dissociação. Nessa curva, o aumento contínuo da temperatura possibilita a determinação da temperatura de fusão de cada fragmento (Figura 9). Os oligonucleotídeos foram desenhados por meio das seqüências de cDNA obtidas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e sintetizados pela Invitrogen, Life Technologies. Todos os oligonucleotídeos desenhados foram avaliados quanto a sua qualidade, temperatura de anelamento, formação de dímeros, “hairpins” e seqüências repetidas pelos programas PRIMER3 e Jellyfish. Por fim, verificamos as seqüências dos oligonucleotídeos com os dados no banco de dados NCBI para confirmarmos seu específico anelamento com nosso gene de interesse. Como controle interno de reação foi utilizado o gene *gapdh* e cada reação era composta por 6,25µl de SYBR (Invitrogen), 4,25µl H₂O DNase/RNase free, 0,5µl de cada oligonucleotídeo e 1µl de cDNA (previamente diluído 1:10). O ciclo básico de amplificação utilizado foi: 95°C/15min, 50x (94°C/30s, TA/20s, 70°C/30s), sendo TA a temperatura de anelamento estimada para cada par de oligonucleotídeo.

Para a padronização da temperatura de anelamento foi calculado o T_m (Temperatura de “melting”) teórico no programa proligo (<http://www.proligo.com/Calculation/calculation.html>). Assim, inicialmente, se usou 4°C abaixo do T_m calculado como temperatura de anelamento e 25 segundos como tempo de anelamento padrão.

Figura 9- Exemplo de curva de amplificação (A) e de dissociação (B) para *gapdh*. Os gráficos mostram o Ct (“Cycle Threshold”) para as células HL-60 em azul, HL-60.BA em vermelho e para o controle interno da reação sem DNA (branco) em verde.

Foram utilizados os seguintes pares de oligonucleotídeos para avaliar da expressão gênica sendo que no caso dos genes *trail* e *osm* foi necessária a elaboração de um segundo par de oligonucleotídeos (Tabela 1).

Tabela 1: Sequência de oligonucleotídeos humanos utilizados

Gene	Sequencia (5' 3')	#NCBI	Tm (°C)
TRAIL F TRAIL R	AAGGCTCTGGGCCGCAAATAAAC GCCAACTAAAAAGGCCCGAAAAA	NM_003810.2	59
OSM F OSM R	CCACCCCTGCCTCGGATGCTTTTC AGGGCCTGGTGGGGGCTGTGTCT	NM_020530.3	63
FAIM F FAIM R	GGAGCTGCAAAGACAAAAGC ACAACTCACCCGCTGTCTC	NM_018147.2	59
NIPA F NIPA R	ACCTCCAGCTTCCTTCCCTA GCATGGATTCCAAAGAGGAA	NM_016478.2	59
DR4 F DR4 R	AGAGAGAAGGTCCCTGCACCA GTCACTCCAGGGCGTACAAT	NM_003844	56
DR5 F DR5 R	AAGACCCTTGTGCGTGTTGT CAGGTGGACACAATCCCTCT	NM_147187	57
GAPDH F GAPDH R	GGAGAAGGCTGGGGCTCAT GTCCTTCCACGATACCAAAGTT	NM_002046	60
β -ACTINA F β -ACTINA R	GTGGGCATGGGTCAGAAG GGCCATCTCTTGCTCGAA	NM_001101	58

Para a eletroforese de DNA foram preparados géis de agarose de concentrações de 1 a 2% em tampão tris-acetato-EDTA, TAE 1X (40mM Tris-Base, 0,1% ácido acético glacial e 1mM EDTA). As corridas foram realizadas em cubar de eletroforese submetidas a voltagem constante (40-60V). Para a verificação do tamanho dos fragmentos de DNA, foram utilizados os seguintes padrões da GIBCO BRL: 1KB e 100pB Ladder.

3.5 Tratamento das linhagens celulares com mesilato de imatinibe (STI571)

Foram plaqueadas $3,0 \times 10^6$ células em placas de 6 poços sendo colocados 3 ml de RPMI 10% por poço. A cada poço foi adicionado STI571 na concentração final de $10 \mu\text{M}$ e as células foram mantidas em estufa a 37°C , a 5% CO_2 por 8 e 24 horas. Após o tempo determinado as células foram retiradas e processadas para a obtenção de amostras para cDNA para o Real-Time PCR e lisado protéico para Western-blot.

3.6 Eletroforese de proteínas e “Western-blot”

Para a análise da expressão e fosforilação de proteínas utilizamos o extrato protéico obtido de 1×10^6 células das linhagens celulares utilizadas no estudo. As células são centrifugadas 240g por 5min a 4°C e ressuspensas em 100 μl de tampão de amostra (1x SDS, “Sodium Dodecyl Sulphate”). Em sequência, foram aquecidas a 100°C por 5min e rapidamente resfriadas em gelo. O estoque destas amostras foi mantido a -20°C e foram aplicados de 20 a 30 μl da amostra por raia do gel. A análise das proteínas foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS em diferentes concentrações (8% a 12%). Enquanto as amostras estavam no gel de empacotamento a voltagem aplicada foi de 80V, sendo que quando as amostras passaram para o gel de corrida, aumentou-se a voltagem para 100V. Após a eletroforese, as proteínas do gel são transferidas por corrente elétrica ($200\text{mA}/\text{cm}^2$) para uma membrana de $0,45 \mu\text{m}$ de PVDF (“Polyvinylidene Difluoride”) da PIERCE com auxílio do sistema da Bio-Rad de 4 a 5 horas. Após a transferência, a membrana foi bloqueada durante 12 horas para impedir marcações inespecíficas dos anticorpos à membrana. Para a marcação com a maioria dos anticorpos utilizados no decorrer do projeto, o bloqueio foi feito com uma solução 5% leite desnatado em pó em TBS-Tween (150 mM NaCl; 50 mM Tris-Cl; 0,05% Tween 20), 0,1% Azida, com exceção das membranas marcadas com anticorpo anti-fosfotirosina, que foram bloqueadas com uma solução de 5% BSA (“Bovine Serum Albumin”) em TBS-Tween, 0,1% Azida. A marcação das membranas com os anticorpos foi feita durante 12 horas com anticorpo primário desejado a 4°C . Após esse processo a membrana é lavada 3x em TBS-Tween e incubada por 1 hora no anticorpo secundário apropriado (anti-IgG espécie-específico) conjugado com peroxidase, a temperatura ambiente. Após essa marcação a membrana é lavada 3 vezes com tampão TBS-Tween. A detecção dos imunocomplexos foi feita pelo método de quimioluminescência ECL (Amersham) e

subseqüente exposição a um filme auto-radiográfico (Kodak co.). O tempo de exposição das membranas ao filme dependeu da intensidade da marcação e variou de 10s a 30 min.

3.7 Técnicas para avaliação e quantificação de morte celular por citometria de fluxo

Foram utilizados dois protocolos para a verificação da morte celular através da leitura no citômetro de fluxo (FACS).

Análise do conteúdo de DNA

Uma amostra da ordem de 10^5 células é submetida a centrifugação por 5min/210 g e após o descarte do sobrenadante, as células são ressuspensas em 300 µl de solução fluorocrômica (HFS, hypotonic fluorochromic solution - 0,1% citrato de sódio, 0,1% Triton X-100, 50 µg/ml iodeto de propídeo) para a determinação do nível de fragmentação do DNA, através da análise do ciclo celular por citometria de fluxo de acordo com o protocolo descrito por NICOLETTI e colaboradores (1991). Os núcleos definidos como apoptóticos, são hipodiplóides e, por isso, quando é analisado o ciclo celular, se encontram à esquerda do pico G0-G1.

Externalização de resíduos de fosfatidilserina

As anexinas compreendem um grupo de proteínas que se ligam a fosfolipídios de membrana na presença de Ca^{2+} . Como a AnexinaV se liga com alta afinidade e especificidade à fosfatidilserina, molécula cuja translocação para a face externa da membrana celular parece ser uma característica universal de células em apoptose, muitos ensaios vêm utilizando-a como um parâmetro para a quantificação da taxa de apoptose. Para esse procedimento uma alíquota contendo 1×10^5 células é centrifugada por 5min/210g. Após desprezar o sobrenadante, as células são ressuspensas em 1 ml de tampão HEPES (10 mM Hepes; 150mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM $MgCl_2$; 1,8 mM $CaCl_2$) para que seja removido todo o meio. A suspensão é novamente centrifugada, só que desta vez é ressuspensa em 100 µl de solução de Anexina V-FITC em tampão HEPES e deixada no escuro por 30 minutos. Após este tempo, adiciona-se mais 400 µl de tampão Anexina e 40 µl de iodeto de propídeo (PI) e em seguida, as amostras são lidas no citômetro de fluxo.

Através deste protocolo podemos determinar a porcentagem de células viáveis, reconhecidas por serem negativas para as duas marcações, células apoptóticas por serem positivas para anexina V e negativas para PI e células necróticas ou em necrose secundária, que apresentam as duas marcações.

3.8 Cálculo da expressão gênica relativa e análises estatísticas

Duas análises podem ser utilizadas para quantificar a expressão gênica, a quantificação absoluta e quantificação relativa. Os métodos de comparação de Ct foram utilizados neste trabalho para comparar a expressão relativa dos genes estudados. Para os cálculos de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi levado em consideração que durante a reação de qPCR, a fluorescência aumenta a cada ciclo e atinge um limiar (“threshold”) no qual as amostras podem ser comparadas. Quanto maior o número inicial de fitas molde, mais cedo a fluorescência poderá ser observada. Para cada amostra o “threshold cycle” (Ct) obtido na fase exponencial da reação, foi analisado para os genes de interesse assim como para um controle interno com expressão que não apresente diferença estatística, no caso o *gapdh*. A diferença entre os valores dos Ct (ΔCt) foi calculada para cada gene e a normalização para as células transfectadas com *bcr-abl* foi feita utilizando as células selvagens como referência. Para a obtenção dos valores de $\Delta\Delta Ct$ faz-se a subtração dos valores de ΔCt das células selvagens dos ΔCt das transfectadas. Finalmente o valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ é calculado para a obtenção da relação entre cada célula e sua respectiva amostra de referência. Esse valor representa quantas vezes o gene está aumentado ou diminuído (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Os dados apresentados para as linhagens celulares foram obtidos pela média dos Cts obtidos nas duplicatas de cada amostra e são representativos de três experimentos.

O método de quantificação absoluta implica na construção de uma curva padrão para determinar a eficiência da reação. Essa curva é feita a partir de diluições de uma amostra de cDNA (1:10, 1:100 e 1:1000) que sabidamente expressa o gene de interesse. Em seguida, calcula-se a eficiência da curva através da fórmula $E = 10^{(-1/\text{coeficiente angular})}$. Posteriormente, o valor E é elevado ao ΔCt da amostra, sendo este valor chamado pelo software de “Quantity”. A razão do “Quantity” do gene de interesse pelo “Quantity” do gene constitutivo *gapdh* fornece o valor de expressão relativa (FLEIGE *et al.*, 2006). Este valor foi utilizado na apresentação dos resultados referentes às correlações feitas nas amostras de pacientes LMC estudados.

Para as análises estatísticas entre os grupos de pacientes foi utilizado o método *One-way* ANOVA com teste Kruskal-Wallis que é um método não paramétrico para se testar a igualdade entre as medianas de populações entre grupos. Trata-se de uma extensão do teste de Mann-Whitney U para três ou mais grupos. Como é um método não paramétrico o teste não assume normalidade entre a população, porém supõe que as variabilidades entre os grupos são iguais. Os dados apresentados para os pacientes são representativos de dois experimentos independentes e têm a mediana de cada grupo representada nos gráficos, com valores de $p \leq 0,05$ considerados estatisticamente significativos. Para a obtenção da correlação entre a expressão de dois genes nos pacientes foi calculado o coeficiente de correlação de Spearman, o valor de p “two-tailed”, com intervalo de confiança de 95%. Esse teste foi escolhido, pois possibilita verificar correlações entre variáveis intervalares absolutas com distribuição não paramétrica.

O índice de Sokal é um sistema de prognóstico que classifica os pacientes com LMC em grupos de baixo, intermediário e alto risco. Esse índice é calculado por meio de uma fórmula baseada nas seguintes características clínico-laboratoriais dos pacientes ao diagnóstico: idade do paciente, dimensões do baço, percentagem de blastos no sangue periférico e medula óssea e número de plaquetas. Os pacientes com valores baixos, possuem uma sobrevida média de aproximadamente de 8 anos, enquanto que os pacientes com valores altos, possuem em média cerca de 3 a 4 anos de vida (SOKAL *et al.*, 1984).

O índice de Sokal é calculado com base na seguinte fórmula:

$$\text{Sokal} = \text{EXP}(0,0116 * (\text{idade} - 43,4) + 0,0345 * (\text{tamanho do baço} - 7,51) + 0,188 * (\text{potência}((\text{plaquetas por litro} / 700); 2) - 0,563) + 0,0887 * (\% \text{blastos SP} - 2,1))$$

CASUÍSTICA

4 CASUÍSTICA

Foram incluídas no estudo amostras de sangue periférico 40 pacientes com LMC, sendo 11 pacientes na fase crônica, 10 na fase acelerada, 10 na fase blástica e 9 em remissão citogenética completa. O grupo de pacientes é composto por 20 homens e 20 mulheres, com idade média de 40 anos (Tabela 3). Os pacientes avaliados nesse estudo foram selecionados com base no diagnóstico da doença, realizado por meio de achados clínicos e laboratoriais. O diagnóstico de LMC foi confirmado por meio da detecção do *bcr-abl* pela técnica de RT-PCR e/ou identificação do cromossomo Filadélfia por citogenética. Os dados clínico-laboratoriais e de terapêutica utilizada nos pacientes foram obtidos a partir da revisão dos prontuários arquivados em cada hospital de procedência dos pacientes. Os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) autorizando a obtenção e utilização das amostras de sangue para desenvolvimento desse estudo. Para a utilização de amostras de pacientes, que já tínhamos em nosso laboratório, obtidas para um projeto paralelo em desenvolvimento, os pacientes foram contatados e assinaram um novo termo de consentimento. O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein (cep/Einstein número 06/404) e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEP/ICB parecer 723).

O grupo controle foi formado por 10 indivíduos, com idade média de 41 anos, sendo 5 do sexo masculino e 5 do feminino. Todos também assinaram o TCLE antes da colheita de 40 mL de sangue periférico (Tabela 2).

Tabela 2- Caracterização demográfica dos controles

Identificação	Sexo	Idade	Raça	Procedência
CTRL1	F	35	B	ICB-USP
CTRL2	M	44	B	ICB-USP
CTRL3	M	40	B	ICB-USP
CTRL4	F	48	B	ICB-USP
CTRL5	F	67	B	ICB-USP
CTRL6	M	40	B	ICB-USP
CTRL7	M	36	B	ICB-USP
CTRL8	M	71	B	ICB-USP
CTRL9	F	32	B	ICB-USP
CTRL10	F	50	B	ICB-USP

ICB-USP, Instituto de Ciências Biomédicas-Universidade de São Paulo

Os pacientes na fase crônica não tomaram medicação, os na fase acelerada e blástica quando colhemos haviam feito uso de hidrêia no início e depois Glivec (400mg/dia). As amostras desses últimos foram colhidas antes da instituição de 800 mg de Glivec/dia.

Tabela 3- Características gerais dos pacientes, índice de prognóstico (Sokal) e procedência.

Fase	Identificação	Sexo	Idade	Raça	Sokal	Procedência
Fase Crônica 11	C1	M	57	A	1.908059138	HB
	C2	M	47	B	0.675441691	HCFMRP
	C3	M	39	B	1.031673272	HB
	C4	F	34	N	1.046130312	HB
	C5	M	28	B	0.566671524	HSM
	C6	F	70	B	1.134430889	HB
	C7	F	59	B	0.713526669	HB
	C8	M	47	B	0.772965602	HB
	C9	M	24	B	1.065832691	HB
	C10	F	29	B	2.025419296	HB
	C11	F	35	B	0.986983131	HB
Fase Acelerada 10	A1	M	30	N	0.664945438	HSM
	A2	F	54	B	2.134740875	HB
	A3	M	54	B	1.212953484	HB
	A4	F	62	B	0.832360862	HB
	A5	M	34	B	0.937032884	HSM
	A6	M	67	B	0.927786637	HSM
	A7	M	63	B	1.769699213	HB
	A8	F	31	N	1.945022313	HB
	A9	M	52	B	0.439915827	HB
	A10	M	23	B	13.93147961	HB
Fase Blástica 10	B1	F	36	B	1.156298746	EPM
	B2	F	56	B	0.789015747	HB
	B3	M	32	B	0.627957829	HSM
	B4	F	77	B	1.230020702	HB
	B5	M	50	B	0.70806975	HSM
	B6	F	39	B	2.674547437	HB
	B7	M	19	B	0.680417295	HCFMRP
	B8	M	67	B	1.03569324	HSM
	B9	F	54	B	2.134740875	HB
	B10	M	23	B	13.93147961	HB
	B11	F	29	B	0.780337313	HIAE
Remissão 9	R1	F	51	B	0.774084902	HB
	R2	M	33	B	0.833321022	HB
	R3	F	23	B	0.606119203	HIAE
	R4	F	53	B	0.422127026	HIAE
	R5	F	22	B	0.874820383	HB
	R6	M	19	B	0.63133304	HB
	R7	F	19	B	0.693490049	HB
	R8	F	46	B	0.791900917	HB
	R9	M	47	B	0.772965602	HB

F, feminino; M, masculino

A, asiático; B, branco; N, negro

HCFMRP, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto;

HSM, Hospital Santa Marcelina;

HIAE, Hospital Israelita Albert Einstein;

HB, Hospital Brigadeiro

EPM, Escola Paulista de Medicina

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Escolha dos genes pela sua expressão diferencial em células Bcr-Abl positivas

O estudo de expressão gênica foi realizado pelo nosso grupo em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Carlos Alberto Moreira Filho no Instituto de Ensino e Pesquisa (IEP) do Hospital Israelita Albert Einstein, com CodeLink™ Bioarray Chips (GE Health Care). Esses chips utilizados eram compostos por oligonucleotídeos representando cerca de 20.000 genes humanos distintos, com seqüências catalogadas em banco de dados (Human Unigene, NCBI). A estratégia utilizada para esse estudo de “microarray” foi a expressssão ectópica de Bcr-Abl em diferentes linhagens celulares para comparação do perfil gênico dessas células em comparação com as linhagens parentais. Inicialmente foram analisados os genes expressos diferencialmente em células Bcr-Abl-positivas (HL-60.Bcr-Abl, HeLa.Bcr-Abl e SKW6.4.Bcr-Abl) em comparação as respectivas linhagens controle (HL-60, HeLa e SKW6.4) foram identificados pelas razões dos valores de intensidade de fluorescência obtidos a partir de amostras teste e controle, pelo programa CodeLink Expression v.2.3 (GE Health Care). Posteriormente os genes modulados por Bcr-Abl foram estudados em linhagens celulares derivadas de pacientes que expressam naturalmente Bcr-Abl e em células mononucleares de pacientes com LMC.

Ao comparar o padrão de expressão gênica global de células HL-60 com o de células HL-60.Bcr-Abl observou-se que a expressão de Bcr-Abl alterou a expressão de 2.218 genes, dos quais 1.300 tiveram a expressão aumentada e 918 foram regulados negativamente. Em células HeLa um número maior de genes foi modulado pela expressão de Bcr-Abl, 7.442 genes, tendo sido observados 4.809 genes aumentados e 2.633 reprimidos nas células que expressam esta oncoproteína. No entanto, ao analisarmos as células SKW6.4.Bcr-Abl, notamos que a quantidade de genes que estavam diferencialmente expressos em relação à célula SKW6.4 era muito menor, 167 genes, sendo que 115 genes tiveram a expressão aumentada e 52 genes foram modulados negativamente.

Como um dos principais interesses do nosso grupo de pesquisa visa compreender como Bcr-Abl altera a maquinaria apoptótica e induz resistência a indução de morte, o primeiro grupo de genes analisados corresponde àqueles que foram modulados tanto em células HL-60.Bcr-Abl como HeLa.Bcr-Abl, mas que não foram alterados em células SKW6.4.Bcr-Abl. O intuito dessa análise foi identificar se a diferença na quantidade de genes que foram modulados em células HL-

60.Bcr-Abl, HeLa.Bcr-Abl e SKW6.4.Bcr-Abl poderia explicar porque nas duas primeiras a expressão de Bcr-Abl foi capaz de induzir resistência a apoptose, enquanto que na linhagem SKW6.4.Bcr-Abl, que apresentou um número menor de genes diferencialmente expressos não foi observada alteração na resposta a drogas apoptogênicas.

Nesse grupo foram identificados 465 genes regulados positivamente e 70 genes que estão reprimidos nas células Bcr-Abl positivas (Figura 10, área destacada em azul).

Figura 10- Número de genes que são modulados pela expressão de Bcr-Abl nas células HL-60, HeLa e SKW.6.4.

Embora as células HeLa e HeLa.Bcr-Abl tenham sido utilizadas para a análise de “microarray” nosso enfoque será dados as alterações que ocorrem em HL-60 e HL-60.Bcr-Abl uma vez que essa linhagem apresenta um “background” genético mais parecido com as linhagens transformadas na LMC. Dentre os genes escolhidos como objeto de estudo nessa dissertação, o *faim* e o *nipa* apresentaram uma alta expressão nas células HL-60.BA sendo calculada a diferença de sua expressão pela razão entre HL-60.BA e HL-60. Neste caso, o gene *faim* teve sua expressão aumentada em 13,5 vezes e *nipa* em 2,3 vezes com a expressão de Bcr-Abl. Os genes de *trail* e *osm* apresentaram uma diminuição bastante significativa pelo “microarray”. A análise desses dados mostrou que *trail* teve sua expressão diminuída em 12,5 vezes e *osm* em 13 vezes (tabela 4).

Tabela 4- Identificação dos genes escolhidos diferencialmente expressos no “microarray”

#NCBI	Gene	Aumento *
NM_018147.2	Fas Apoptotic Inhibitory Molecule (FAIM)	13,547925
NM_016478.2	Nuclear Interacting Partner of Anaplastic Lymphoma Kinase (NIPA)	2,345669898
NM_003810.2	Tumor Necrosis Factor (ligand) Superfamily, member 10 (TNFSF10); TRAIL	0,081899588
NM_020530.3	Oncostatin M (OSM)	0,076946526

* Os dados correspondem a quantas vezes o gene está “superexpresso” em HL-60 BA em relação a HL-60.

Os genes modulados por Bcr-Abl e diferencialmente expressos do grupo 6 (genes modulados em HL-60.BA e HeLA.BA) foram associados aos processos biológicos celulares aos quais estão associados e foram organizados com base nas categorias fornecidas pelo *Gene Ontology* (GO, <http://www.geneontology.org>), a fim de entender quais funções biológicas podem ter modificadas devido a presença de Bcr-Abl. É importante ressaltar que cada gene pode participar de mais de um processo biológico e, por isso foram agrupados em mais de um grupo de processo biológico. Tais categorias incluem: metabolismo, transdução de sinais, proliferação, ciclo celular, adesão e morte celular (Figura 11 e 12).

A

Figura 11- Categoria dos genes up-regulados nas células Bcr-Abl positivas.

B

Figura 12- Categoria genes down-modulados nas células Bcr-Abl positivas.

Dentre os genes estudados, *faim* está contido na categoria de morte celular, assim como *trail*, que por sua vez também se encaixa nas categorias de transdução de sinais e resposta imune. Já *osm* está incluído em diversas categorias como desenvolvimento, proliferação celular, resposta imune e transdução de sinais. Por outro lado, *nipa* não se encaixou em nenhum processo conhecido, provavelmente por se tratar de molécula recentemente identificada.

5.2 Caracterização das linhagens celulares

A seguir serão descritas algumas características observadas nas linhagens após a expressão de Bcr-Abl. Uma maior atenção foi dada as células HL-60, pois nesse estudo ela foi utilizada como modelo para as validações dos resultados de “microarray”. Originalmente as células HL-60 foram derivadas de um paciente com leucemia pró-mielocítica e podem ser induzidas a diferenciação *in vitro* para diferentes tipos celulares (monócitos, granulócitos e macrófagos). As células HL-60 são capazes de proliferar continuamente em cultura, com tempo de duplicação de 36 a 48 horas. Essa capacidade de multiplicação *in vitro* tornou essa linhagem um excelente modelo para diferentes estudos (COLLINS, 1987).

As células HL-60 transfectadas com *bcr-abl* (HL-60.Bcr-Abl) expressam a proteína Bcr-Abl de tamanho 195 kDa e possuem uma grande quantidade de proteínas fosforiladas (Figura 13A). No que diz respeito à morfologia as células HL-60.BA são maiores em tamanho, apresentam uma aderência à placa de cultura e uma tendência à formação de grumos quando comparadas com as células HL-60 (Figura 13B).

Figura 13- Caracterização das células HL-60 e HL-60.Bcr-Abl. (A) Lisado celular total das células HL-60 e HL-60.Bcr-Abl foram analisados por “Western-Blot” ($0,2 \times 10^5$ células/amostra) com anticorpos anti-C-Abl, anti-fosfotirosina (pY) e anti-actina (como controle). (B) Diferenças morfológicas das células quando observadas ao microscópio óptico (foto das células em cultura em aumento de 200x).

Assim como observado em HL-60, outras linhagens celulares a proteína quimérica Bcr-Abl somente é expressa nas células transfectadas com o gene, apresentando uma alta atividade fosfotirosina. Para a linhagem celular Jurkat também foi estudada as células transfectadas com o gene com uma mutação pontual que leva a uma deficiência na atividade fosfotirosina da proteína, para avaliar a influencia da atividade tirosina-quinase na expressão dos genes estudados (Figura 14A, B e C).

Figura 14- Caracterização de diferentes linhagens transfectadas com Bcr-Abl. O lisado celular total das células THP1 e THP1.Bcr-Abl (A), SKW e SKW.BA (B) e Jurkat.vetor, Jurkat.BA e Jurkat.KR (C) foram analisados por “Western-Blot” ($0,2 \times 10^5$ células/amostra) com anticorpos anti-C-Abl, anti-fosfotirosina (pY) e anti-actina (como controle).

Assim como para a HL-60, as células Jurkat transfectadas com Bcr-Abl também apresentaram algumas mudanças morfológicas. As células Jurkat vetor possuem uma forma bem arredondada e crescem em cachos. E essas mesmas características foram observadas para as células Jurkat.KR. Por outro lado, as Jurkat.BA possuem um formato mais afinado e têm uma menor quantidade de células agrupadas em cachos. Já para as células THP1 e SKW não foi observada nenhuma mudança significativa em sua morfologia após a expressão de Bcr-Abl.

Assim como as células que expressam ectopicamente Bcr-Abl, estabelecidas em nosso laboratório, as células K562, LAMA e KCL22 também possuem uma alta atividade tirosina-quinase e expressam a forma de 210 kDa de Bcr-Abl, característico da LMC.

5.3 Validação dos resultados do “microarray”

5.3.1 Análise da expressão de *trail*

5.3.1.1 Expressão de *trail* em HL-60 x HL-60.BA

Com os resultados obtidos por microarray, o primeiro passo consistiu na validação desses resultados, uma vez que a qualidade dos dados de expressão gênica obtida por essa metodologia pode variar de acordo com a plataforma e os procedimentos utilizados. De acordo com a literatura, o método mais utilizado para esse tipo de validação é por Real-Time RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) (MOREY *et al.*, 2006). Como a linhagem HL-60 é uma linhagem pró-mielocítica e que, portanto, apresenta um background genético mais parecido com as linhagens-alvo da transformação por Bcr-Abl em LMC, foi inicialmente feita a validação dos genes em células HL-60.Bcr-Abl. A expressão dos genes foi então analisada e calculada nas células HL-60.BA com relação às células HL-60 para confirmação do aumento ou da diminuição da expressão dos genes estudados.

No caso de *trail*, um dos genes modulados negativamente nas células Bcr-Abl positivas, confirmamos a diminuição de aproximadamente 22 vezes em seus níveis nas células HL-60.BA com relação à HL-60 (Figura 15).

Figura 15- Diminuição da expressão de *trail* em HL-60.BA com relação à HL-60. A expressão gênica de *trail* da linhagem HL-60 foi usada como calibrador. Os dados de qPCR foram obtidos pelo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, a barra representa o erro padrão de dois experimentos independentes.

5.3.1.2 Expressão de *trail* em linhagens *bcr-abl* positivas

Uma vez verificada a modulação da expressão dos genes nas células HL-60 transfectadas com *bcr-abl*, verificamos a influência de Bcr-Abl na expressão de *trail* em outros tipos celulares. Os resultados mostram que a diminuição da expressão do gene também ocorreu nas células SKW6.4.BA quando comparadas com as células não transfectadas com *bcr-abl* (Figura 16B), sendo essa diminuição de 2 vezes no valor de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. E não foi observada nenhuma mudança no perfil de expressão em THP1.BA comparando com THP1 (Figura 16A).

Figura 16- Diminuição da expressão de *trail* em SKW6.4.BA com relação a SKW6.4 (A) e THP1.BA com relação a THP1 (B). A expressão gênica de *trail* da linhagem HL-60 foi usada como calibrador. Os dados de qPCR foram obtidos pelo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, a barra representa o erro padrão de dois experimentos independentes.

Para a Jurkat, outra linhagem celular transfectada com Bcr-Abl, também foi possível observar uma diminuição nos níveis de expressão de *trail*, que teve seu valor de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ praticamente zerado nas Jurkat.BA. Para essa linhagem celular também foi analisada a expressão de *trail* nas células transfectadas com uma construção de Bcr-Abl deficiente no domínio quinase (Jurkat.KR). Nesse caso, as células Jurkat.Bcr-Abl.KR não apresentaram essa mudança de expressão (Figura 17).

Figura 17- Expressão relativa de *trail* em Jurkat.BA e Jurkat.KR com relação a Jurkat vetor. A expressão gênica de da linhagem transfectada com o vetor foi usada como calibrador. Os dados de qPCR foram obtidos pelo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, a barra representa o erro padrão de dois experimentos independentes.

Para ter uma melhor idéia de como Bcr-Abl está regulando a expressão dos genes, utilizamos as células Bcr-Abl positivas derivadas de pacientes com LMC como a K562, LAMA84 e KCL22, KBM5 e KBM7. A diminuição da expressão de *trail* também foi observada nessas linhagens celulares quando comparadas com a expressão de *trail* em um indivíduo saudável (Figura 18), sendo que nessas células os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ obtidos para *trail* se tornaram praticamente nulos. Isso porque indivíduos normais apresentam altos níveis de *trail*. As células HL-60 quando comparadas com a expressão de *trail* em um indivíduo saudável também apresentam valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ baixos, da ordem de 1×10^{-5} (dados não mostrados).

Figura 18- Expressão de *trail* em K562, LAMA, KCL22, KBM5 e KBM7 com relação a um indivíduo saudável. A expressão de *trail* em um indivíduo saudável foi usada como calibrador e os valores obtidos para as linhagens são relativos ao mesmo. Os dados de qPCR foram obtidos pelo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, a barra representa o erro padrão de dois experimentos independentes.

5.3.1.3 Expressão de *trail* em pacientes com LMC

A fim de verificar se a diminuição da expressão de mRNA de TRAIL observada em linhagens celulares também ocorre em células primárias provenientes de pacientes com LMC, analisamos células mononucleares de pacientes nas diferentes fases da doença. Foi observada uma diminuição significativa nos níveis de expressão de *trail* nos pacientes com LMC com relação aos indivíduos controles ($p < 0,001$) sendo que os indivíduos em remissão citogenética completa possuem uma expressão de *trail* com valores semelhantes aos indivíduos controles (Figura 19).

Figura 19- Diminuição da expressão relativa da *trail* em pacientes com LMC. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, estando os dados representados em log10 e mostrada a mediana de cada grupo.

Dentre os pacientes com LMC foi analisada a expressão de *trail* nas diferentes fases da doença comparativamente, incluindo os pacientes em remissão a fim de verificar se há correlação da expressão desse gene com as fases da doença. Nossos resultados mostram quando analisada a expressão relativa de *trail* nas diferentes fases da doença, ocorre uma diminuição progressiva da expressão do gene no decorrer da progressão da doença. As principais diferenças obtidas quanto aos níveis da expressão gênica foram entre o grupo controle e a fase blástica ($p < 0,001$) e entre a fase blástica e a remissão ($p < 0,05$) (Figura 20).

Figura 20- Diminuição da expressão relativa da *trail* com a progressão da doença em pacientes com LMC. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, estando os dados representados em log10 e mostrada a mediana de cada grupo.

5.3.1.4 Correlações entre a expressão de *trail* em pacientes e dados clínico-laboratoriais

Como os níveis de *trail* estavam associados à progressão da doença, avaliamos a possível correlação entre os níveis de *trail* e de *bcr-abl* dos pacientes. A Figura 22A mostra que foi possível estabelecer uma correlação significativa entre a expressão de *trail* e *bcr-abl* ($r = -0,3907$, $p < 0,005$). Por outro lado, não foi possível correlacionar os níveis de *trail* com o índice de Sokal ($r = -0,1382$, $p = 0,3890$) (Figura 21B), que é um sistema de prognóstico proposto por Sokal e col. (1980), que não relata diretamente o quanto a doença está avançada, mas que mede a agressividade da doença.

Figura 21- Correlação entre os níveis de expressão de *trail* e *bcr-abl* (A) e os níveis de *trail* com índice de Sokal (B) em pacientes nas diferentes fases da LMC. Os dados de qPCR foram obtidos pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e os valores de *trail* foram colocados em log10. A correlação estatística foi obtida pela aplicação do teste estatístico de Spearman.

Foram verificadas correlações para a expressão de *trail* com outros dados clínico-laboratoriais. Dentre elas, foi possível observar uma correlação negativa entre os níveis de *trail* e o tamanho do baço (Figura 22A). Ou seja, quanto menor a expressão de *trail* maior o tamanho do baço dos pacientes, embora tal correlação não esteja relacionada com alguma fase específica da doença. E também foi possível fazer uma correlação negativa com o número de leucócitos no sangue periférico nos pacientes com LMC ao diagnóstico (Figura 22B).

Figura 22- Correlação negativa entre os níveis de expressão de *trail* e o tamanho do baço (A) e entre os níveis de *trail* e o número de leucócitos circulantes (B) dos pacientes nas diferentes fases da LMC. Os dados de qPCR foram obtidos pelo método de “quantity” e os valores de *trail* foram colocados em log10. A correlação estatística foi obtida pela aplicação do teste estatístico de Spearman.

Tentou-se também correlacionar o número de blastos de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) com a expressão de *trail*, porém não foi possível estabelecer nenhuma correlação com a expressão de *trail* (Figura 23A e B). Zamaí e colaboradores sugeriram que TRAIL, assim como FasL estaria correlacionado com a regulação negativa da eritropoese normal (ZAMAI *et al.*, 2000). Por esse motivo avaliamos se havia correlação entre a expressão de *trail* e a concentração de hemoglobina nos pacientes. Porém não foi vista nenhuma correlação entre eles (Figura 23C).

Figura 23- Correlação entre os níveis de expressão de *trail* e a percentagem de blastos presentes no sangue periférico (A) e na medula óssea (B) e os níveis de *trail* e concentração de hemoglobina (C) dos pacientes nas diferentes fases da LMC. Os dados de qPCR foram obtidos pelo método de “quantity” e os valores de *trail* foram colocados em log10. A correlação estatística foi obtida pela aplicação do teste estatístico de Spearman.

Tecchio e colaboradores mostraram que neutrófilos e células monoclulares de LMC após a incubação com doses terapêuticas de IFN- α são capazes de liberar a forma solúvel de TRAIL nos mesmos níveis que leucócitos normais (TECCHIO *et al.*, 2004). Portanto, também seria interessante saber como o tratamento com STI571 influencia nesse aspecto.

5.3.1.5 Análise da expressão de trail em diferentes linhagens celulares tratadas com STI571

A atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl é de grande relevância para os efeitos dessa oncoproteína no contexto intracelular. Para verificar a influência dessa atividade sobre a regulação da expressão dos genes escolhidos nas células Bcr-Abl positivas, nós submetemos as linhagens celulares HL-60, HL-60 BA e K562 a tratamentos com o inibidor específico de tirosina-quinase STI571. Utilizamos para esses experimentos as células HL-60 e HL-60.BA, pois foi o par escolhido para durante a validação dos nossos resultados e a linhagem K562 para termos um exemplo de linhagem na qual o Bcr-Abl está expresso naturalmente. As células foram cultivadas em placas de 6 poços, num total de 3×10^6 células/poço, e tratadas com $10 \mu\text{M}$ de STI571 por 8, 12 e 24 horas

Uma vez que o tratamento com STI571 é capaz de induzir a morte em determinadas linhagens celulares fomos analisar a viabilidade das células nos períodos escolhidos para a análise da expressão gênica. Para melhor analisar os efeitos do STI571 sobre as linhagens celulares utilizadas realizamos um tratamento por períodos de tempo mais prolongados para avaliar os diferentes efeitos do STI571 nas linhagens Bcr-Abl positivas e negativas. Observamos que para as células HL-60 a incubação com STI571 por até 72 horas não é capaz de induzir nenhuma alteração. Por outro lado, aproximadamente 20% das células HL-60.BA está morta depois de 48 horas e o total de células mortas está por volta de 75% com 72 horas (Figura 24). As células K562 não foram avaliadas nesses experimentos.

Figura 24- Morte celular em resposta ao STI571. Após o tratamento com $10 \mu\text{M}$ de STI571 pelos intervalos de tempo indicados as células foram lisadas em tampão HFS contendo PI (5.000 eventos/duplicata) e analisadas em citômetro de fluxo (FacsCalibur.Becton&Dickinson). Barras lisas representam as células controles e as barras hachuradas às células tratadas com STI571. Resultado representativo de dois experimentos independentes.

Uma análise mais cuidadosa foi realizada para os tempos de incubação escolhidos para a análise da expressão gênica. Após a incubação por 8, 12 ou 24 horas com 10 μ M de STI571 em placas de 96 poços, em duplicatas (0,5x10⁵ células por poço) as amostras foram ressuspensas em tampão HFS e os núcleos analisados em citômetro de fluxo quanto ao conteúdo de DNA, assim como foi realizado para a Figura 24. Como por esse ensaio pode-se subestimar a morte da população estudada uma vez que células em necrose podem apresentar conteúdo de DNA equivalente ao de uma célula normal também avaliamos os efeitos do tratamento com STI571 por outro método. Nesse segundo método utilizado é possível a distinção entre dois tipos de morte, apoptose e necrose. Para esse método, após o tratamento, as células foram recuperadas e marcadas com Anexina V-FITC, para a verificação da externalização de fosfatidilserina, e PI, para análise da integridade da membrana. Essa dupla marcação possibilita diferenciar células apoptóticas (positivas para Anexina V e negativas para PI), células em necrose (positivas para as duas marcações) e células vivas (negativas para ambos os marcadores). Verificamos que não houve nenhuma alteração na viabilidade das células no período analisado de 12 e 24 horas pelos dois métodos utilizados (Figura 25 A e B).

Nesses experimentos também observamos que o tratamento com STI571 provoca uma parada das células HL-60.BA e K562 na fase G1 do ciclo celular já a partir de 12hs (Figura 25).

B

Figura 25- Apoptose das células HL-60, HL-60.BA e K562 tratadas com STI571. As células foram incubadas com 10 μ M de STI571 por 12hs (A) e 24hs (B) e lisadas em tampão HFS contendo PI (5.000 eventos/duplicata) ou incubadas com AnexinaV-PI (10.000 eventos /duplicata) e analisadas em citômetro de fluxo (FacsCalibur.Becton&Dickinson). FL1-H: AnexinaV; FL3-H: PI e FL2-H: log PI fluorescência. Os valores representam a média $\pm$ DP das duplicatas. Resultado representativo de três experimentos independentes.

Verificamos também se o tratamento com STI571 seria capaz de diminuir os níveis de Bcr-Abl e conseqüentemente diminuir a atividade de fosforilação de proteínas observada em lisados celulares de células Bcr-Abl positivas. Após o tratamento as células foram centrifugadas a 210g/5min/4°C, ressuspensas em tampão de amostra para “Western-Blot” na concentração de 1×10^7 /mL, fervidas por 5min a 100°C e congeladas a -20°C. Verificamos primeiramente por “Western-Blot” a presença de Bcr-Abl nas três linhagens celulares analisadas com um anticorpo anti-C-Abl, sendo possível verificar a ausência da banda para Bcr-Abl nas células HL-60 (Figura 26). A seguir foi verificada a eficiência do tratamento com o inibidor STI571 pela diminuição da atividade fosforilativa de Bcr-Abl nas células tratadas sem que haja diminuição dos níveis da proteína (Figura 26). A marcação com anti-actina foi realizada como controle.

Figura 26- “Western-blot” de extrato protéico das linhagens celulares HL-60, HL-60 BA e K562 cultivadas na presença (+) ou ausência (-) de 10µM de STI571 por 12 e 24hs. Lisado celular total das células HL-60 e HL-60.Bcr-Abl foram analisados por “Western-Blot” ($0,2 \times 10^5$ células/amostra) com anticorpos anti-C-Abl, anti-fosfotirosina (pY) e anti-actina (como controle).

Após o estabelecimento das melhores condições de inibição de Bcr-Abl com STI571 fomos avaliar a expressão de *trail* nas células que foram tratadas. No tratamento por 12 e 24 horas, foi observado um aumento na expressão relativa de *trail* nas células HL-60.BA tratadas com relação às células não tratadas principalmente em 12 horas (Figura 27). O aumento observado para as células HL-60.BA foi principalmente em 12hs enquanto que para K562 o aumento é mais expressivo em 24hs. Para análise da expressão de *trail* após o tratamento é considerada a célula HL-60 controle (sem STI571) de cada tempo para normalização dos valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Figura 27- Expressão de *trail* em HL-60, HL-60.BA e K562 cultivadas na presença (+) ou ausência (-) de 10 μ M de STI571 por 12 e 24hs. A expressão de *trail* em HL-60 não tratada foi usada como calibrador e, portanto os resultados de qPCR foram dados em expressão relativa pelo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. A barra representa o erro padrão de dois experimentos independentes.

5.3.1.6 Análise da expressão protéica de TRAIL em diferentes linhagens bcr-abl negativas e positivas

Após analisarmos a expressão de mRNA de TRAIL, fomos verificar a expressão da proteína traduzida nas mesmas condições citadas nos experimentos anteriores. Porém, durante a padronização do anticorpo para TRAIL comprado para o projeto foram encontradas algumas dificuldades na padronização do “Western-Blot”. Nas condições especificadas pelo fabricante (R&D Systems) de tampão de amostra redutor e não-redutor não obtivemos bandas claras nos tamanhos esperados. Para as amostra não-reduzidas esperávamos obter três bandas

correspondentes às formas monomérica, dímera e trímera de TRAIL. Porém apenas podemos visualizar uma banda de aproximadamente 60 kDa na K562, que seria o equivalente a forma dímera de TRAIL. E nas amostras de Jurkat (reduzidas ou não-reduzidas) não conseguimos observar nenhuma marcação. Outro fato observado é que nas amostras reduzidas não obtínhamos uma redução 100% eficiente, utilizamos então o DTT como agente redutor, mas os resultados ficaram bem semelhantes então continuamos com o β -mercaptoetanol que já era rotineiramente feito no laboratório, tomando cuidado para sempre ter um tampão de amostra novo.

Passamos também a utilizar a proteína recombinante TRAIL como controle para saber se o anticorpo estava mesmo funcionando. Podemos observar na Figura 28 que o anticorpo é capaz de reconhecer a proteína recombinante em dois tamanhos, 25 e 60 kDa, equivalentes ao monômero e dímero de TRAIL. Nas linhagens celulares HL-60, HL-60.BA, Jurkat e K562 apenas a banda de 60 kDa é visível, e apenas na célula HL-60 é possível ver uma banda mais fraca por volta de 31kDa, que seria equivalente a forma monomérica. A diferença de tamanho entre a banda obtida na proteína recombinante e na linhagem celular deve-se ao fato de a proteína recombinante não ser a porção N-terminal inteira da proteína, mas somente a porção compreendida entre Thr95-Gly281. Esses resultados mostram que o anticorpo estava funcionando, mas que as linhagens utilizadas não expressam TRAIL em uma concentração que seja detectável por esse método.

Figura 28- “Western-blot” de diferentes linhagens celulares marcado para TRAIL em condições redutoras, (*) amostra não fervida proteína recombinante. Lisado celular total das células HL-60, HL-60.BA, Jurkat e K562 foram analisados por “Western-Blot” ($0,2 \times 10^5$ células/amostra) com anticorpos anti-TRAIL.

5.3.2 Análise da expressão dos receptores de morte *DR4* e *DR5*

5.3.2.1 Expressão dos receptores *DR4* e *DR5* em *HL-60* x *HL-60.BA*

Com os resultados obtidos para a expressão de *trail*, nos interessamos por avaliar a expressão de *DR4* e *DR5* nas linhagens celulares estudadas e a diferença de expressão desses receptores entre as linhagens Bcr-Abl positivas e negativas. A análise de mRNA nas células *HL-60.BA* em comparação com a célula *HL-60* mostrou que ocorre uma maior expressão de *DR4* e *DR5* nas linhagens transfectadas com o oncogene. Para os dois genes obtivemos um aumento de aproximadamente 5 vezes da expressão em *HL-60.BA* (Figura 29A e B).

Figura 29- Aumento da expressão relativa de *DR4* em *HL-60.BA* com relação a *HL-60* (A) e *DR5* *HL-60.BA* com relação a *HL-60* (B). A expressão gênica da linhagem *HL-60* foi usada como calibrador. Os dados de qPCR foram obtidos pelo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, a barra representa o erro padrão de dois experimentos independentes.

5.3.2.2 Expressão dos receptores *DR4* e *DR5* em diferentes linhagens *bcr-abl* positivas

Após verificarmos o aumento da expressão de mRNA dos receptores nas células *HL-60.BA* que foram utilizadas para validação dos demais genes estudados no projeto, passamos para a avaliação da expressão desses genes nas demais linhagens celulares Bcr-Abl positivas estudadas. No caso de *DR4*, observamos uma diminuição pela metade na expressão de mRNA em células *THP1.BA* quando comparada com as células não transfectadas com Bcr-Abl (Figura 30A) e uma diminuição não significativa em células *SKW.BA* em relação a *SKW6.4* (Figura 30B).

Figura 30- Expressão relativa de *DR4* em THP1.BA com relação a THP1 (A) e em SKW6.4.BA em relação a SKW6.4 (B). A expressão gênica de da linhagem selvagem foi usada como calibrador. Os dados de qPCR foram obtidos pelo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, a barra representa o erro padrão de dois experimentos independentes.

Já para a Jurkat observamos uma grande diminuição da expressão de *DR4* nas Jurkats.BA e não foi observada essa mudança de expressão nas Jurkats.KR (Figura 31).

Figura 31- Expressão relativa de *DR4* em Jurkat.BA e Jurkat.KR com relação a Jurkat vetor. A expressão gênica de da linhagem transfectada com o vetor foi usada como calibrador. Os dados de qPCR foram obtidos pelo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Para *DR5*, não foi observada nenhuma mudança significativa na sua expressão em THP1.BA em relação a THP1 (Figura 32A). Por outro lado, as células SKW.BA mostraram uma grande diminuição na expressão, tendo seu valor para $2^{-\Delta\Delta C_t}$ praticamente zerado (Figura 32B).

Figura 32- Expressão relativa de *DR5* em THP1.BA com relação a THP1 (A) e em SKW6.4.BA em relação a SKW6.4 (B). A expressão gênica de da linhagem selvagem foi usada como calibrador. Os dados de qPCR foram obtidos pelo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, a barra representa o erro padrão de dois experimentos independentes.

Para a Jurkat também foi observada uma grande diminuição da expressão nas Jurkats.BA e enquanto as células Jurkats.KR apresentaram níveis de expressão de *DR5* semelhantes às células transfectadas com o vetor (Figura 33).

Figura 33- Expressão relativa de *DR5* em Jurkat.BA e Jurkat.KR com relação a Jurkat vetor. A expressão gênica de da linhagem transfectada com o vetor foi usada como calibrador. Os dados de qPCR foram obtidos pelo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Como os resultados obtidos para os receptores se mostraram bastante heterogêneos achamos de fundamental importância a avaliação dos níveis de *DR4* e *DR5* nas linhagens derivadas de pacientes com LMC, como a K562, LAMA84, KCL22, KBM5 e KBM7. Para *DR4*

observamos aumento de mais de duas vezes na expressão dos genes em todas as linhagens (Figura 34).

Figura 34- Expressão de *DR4* em K562, KCL22, LAMA, KBM5 e KBM7 com relação a um indivíduo saudável. A expressão de *DR4* em um indivíduo saudável foi usada como calibrador e os valores obtidos para as linhagens são relativos ao mesmo. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e os valores apresentados estão em log10. A barra representa o erro padrão de dois experimentos independentes.

No caso de *DR5* também observamos um aumento da expressão desse receptor em todas as linhagens Bcr-Abl positivas derivadas de pacientes (Figura 35).

Figura 35- Expressão de *DR5* em K562, KCL22, LAMA, KBM5 e KBM7 com relação a um indivíduo saudável. A expressão de *DR5* em um indivíduo saudável foi usada como calibrador e os valores obtidos para as linhagens são relativos ao mesmo. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e os valores apresentados estão em log10. A barra representa o erro padrão de dois experimentos independentes.

5.3.2.3 Expressão dos receptores DR4 e DR5 em pacientes com LMC

Para *DR4*, foi possível observar uma diminuição da expressão desse gene em células mononucleares de pacientes com LMC com relação aos pacientes controles e em relação aos indivíduos em remissão citogenética completa ($p < 0,05$) (Figura 36).

Figura 36- Diminuição da expressão relativa de *DR4* em pacientes com LMC. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, estando representada a mediana de cada grupo e os valores apresentados estão em $\log_{10}$.

A partir dos resultados obtidos fomos avaliar se a diminuição observada na expressão de *DR4* estava relacionada com as diferentes fases da doença. O resultado obtido foi que a diminuição mais expressiva está na fase blástica da doença na qual a expressão do gene diminuiu com relação ao grupo de pacientes em remissão ($p < 0,05$). Também podemos observar que na fase blástica ocorre uma diminuição da expressão com relação às outras fases da doença e com relação ao grupo controle, embora não obtivemos diferença estatística nesses dois casos (Figura 37).

Figura 37- Diminuição da expressão relativa de *DR4* na fase blástica em pacientes com LMC. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, estando representada a mediana de cada grupo e os valores apresentados estão em $\log_{10}$.

A análise da expressão de *DR5* nos pacientes com LMC também mostrou que ocorre uma diminuição da expressão gênica desse receptor. No caso de *DR5*, a diminuição da expressão em pacientes com LMC é estatisticamente mais significativa quando comparada com os indivíduos controles ($p<0,01$) do que em relação ao grupo em remissão ($p<0,05$) (Figura 38).

Figura 38- Diminuição da expressão relativa de *DR5* em pacientes com LMC. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, estando representada a mediana de cada grupo e os valores apresentados estão em $\log_{10}$.

A análise dos pacientes nas diferentes fases da doença mostrou que a diminuição da expressão está correlacionada com a progressão da doença, estando diminuída principalmente nas fases aceleradas e blástica ($p<0,05$) (Figura 39).

Figura 39- Diminuição da expressão relativa de *DR5* nas diferentes fases da LMC. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, estando representada a mediana de cada grupo e os valores apresentados estão em $\log_{10}$.

5.3.2.4 Análise da expressão protéica dos receptores DR4 e DR5 em diferentes linhagens bcr-abl negativas e positivas

Inicialmente foi comprado um clone de anticorpo anti-DR4 que funcionava para SDS-PAGE não redutor. Foram feitos inúmeros testes para esse anticorpo com diferentes tampões de amostras diferentes linhagens celulares, diferentes números de células, diferentes concentrações do anticorpo e em nenhuma condição foi possível observar alguma banda. O fabricante foi então contatado e depois de mostrados todos os resultados que obtivemos ao fabricante, nos foi enviado um novo clone de anti-DR4 e o antigo foi inclusive descontinuado seu uso para Westen-Blot pela R&D Systems (Anexo 6). Porém também não conseguimos nenhuma marcação satisfatória para o novo clone (Figura 40).

Figura 40- “Western-blots” de diferentes linhagens celulares marcados para DR4. “Western-Blot” realizado em condições redutoras.

O maior problema encontrado é que quando fazemos o bloqueio da membrana e a marcação apenas com o anticorpo secundários anti-cabra na concentração de 1:2000, utilizada durante os ensaios, observamos que ocorrem marcações inespecíficas no tamanho da banda esperada para DR4 de aproximadamente 55 kDa (dados não mostrados).

Para DR5 ocorreu o mesmo problema de marcações inespecíficas e mesmo as maiores concentrações do anticorpo não foi possível observar a marcação esperada de DR5 por volta de 55 kDa (Figura 41). Para esse anticorpo foram testadas condições redutoras e não-redutoras e em nenhuma delas foi obtivemos um resultado satisfatório.

Figura 41- “Western-blot” redutor de diferentes linhagens celulares marcados para DR5

5.3.3 Análise da expressão de *osm*

5.3.3.1 Expressão de *osm* em HL-60 x HL-60.BA

Em contraste com os outros três genes estudados, *osm* não teve seu resultado validado por qRT-PCR, pois sua down-modulação por Bcr-Abl observada no “microarray” não foi confirmada em três experimentos independentes. Nas células HL-60.BA foi observado um aumento de duas vezes na expressão de *osm* quando comparada com a expressão em HL-60 (Figura 42).

Figura 42- Aumento da expressão relativa de *osm* em HL-60.BA com relação a HL-60. A expressão gênica de *osm* da linhagem HL-60 foi usada como calibrador. Os dados de qPCR foram obtidos pelo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, a barra representa o erro padrão de dois experimentos independentes.

5.3.3.2 Expressão de *osm* em linhagens *bcr-abl* positivas

Apenas as células THP1.BA mostraram uma diminuição relativa nos níveis de *osm* com relação a THP1 (Figura 43A). E as células SKW6.4.BA não mostraram diferença significativa nos níveis de *osm* com relação SKW6.4 (Figura 43B).

Figura 43- Expressão relativa de *osm* em THP1.BA com relação a THP1 (A) e em SKW6.4.BA em relação a SKW6.4 (B). A expressão gênica de da linhagem selvagem foi usada como calibrador. Os dados de qPCR foram obtidos pelo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, a barra representa o erro padrão de dois experimentos independentes.

Para as Jurkats observamos uma diminuição na expressão de *osm* nas células transfectadas com Bcr-Abl e um aumento de duas vezes na expressão desse gene nas células transfectadas com Bcr-Abl.KR (Figura 44).

Figura 44- Expressão relativa de *osm* em Jurkat.BA e Jurkat.KR com relação a Jurkat vetor. A expressão gênica de da linhagem transfectada com o vetor foi usada como calibrador. Os dados de qPCR foram obtidos pelo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

O aumento observado nos níveis de *osm* em determinadas linhagens deve ser analisado com cuidado, uma vez que quando utilizamos um indivíduo saudável para normalizar os valores das células Bcr-Abl⁺ provenientes de pacientes portadores de LMC, observamos uma expressão inferior nessas células (Figura 45).

Figura 45- Expressão de *osm* em K562, LAMA, KCL22, KBM5 e KBM7 com relação a um indivíduo saudável. A expressão de *osm* em um indivíduo saudável foi usada como calibrador e os valores obtidos para as linhagens são relativos ao mesmo. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, a barra representa o erro padrão de dois experimentos independentes e os valores apresentados estão em log10.

5.3.3.3 Expressão de *osm* em pacientes com LMC

Foram feitas análises para avaliar os níveis de expressão de *osm* em pacientes com LMC. Verificamos uma diminuição da expressão desse gene estatisticamente significativa nos pacientes com relação ao grupo controle, com $p < 0,05$ (Figura 46).

Figura 46- Diminuição da expressão relativa de *osm* em pacientes com LMC. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, estando representada a mediana de cada grupo.

Com os resultados obtidos, fomos avaliar se a diminuição da expressão de *osm* estava relacionada com a progressão da doença. O que observamos foi uma diminuição de *osm* principalmente na fase crônica em relação aos indivíduos controles, com $p < 0,05$ (Figura 47).

Figura 47- Diminuição da expressão relativa de *osm* na fase crônica em pacientes com LMC. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, estando representada a mediana de cada grupo.

5.3.3.4 Correlações entre a expressão de *osm* em pacientes e dados clínico-laboratoriais

Assim como feito anteriormente para *trail* e para os receptores de mortes, avaliamos a expressão de *osm* com os diferentes dados clínico-laboratoriais obtidos para os pacientes. Para *osm* não foi obtida nenhuma correlação entre os níveis de *osm* e *bcr-abl* ($r = -0,1718$, $p = 0,3916$) (Figura 48A). Tampouco foi observada uma correlação com o índice de Sokal ($r = -0,03274$, $p = 0,8410$) (Figura 48B).

Figura 48- Correlação entre os níveis de expressão de *osm* e *bcr-abl* (A) e de *osm* com o índice de Sokal (B) em pacientes nas diferentes fases da LMC. Os dados de qPCR foram obtidos pelo método de “quantity” e os valores de *osm* foram colocados em LOG na base 10. A correlação estatística foi obtida pela aplicação do teste estatístico de Spearman.

Analisando os demais dados clínico-laboratoriais dos pacientes não observamos nenhuma correlação desses com a expressão de *osm*. As alterações que normalmente são observadas nos pacientes com LMC, como aumento do tamanho do baço e do número de leucócitos, não estão correlacionadas com a maior ou menor expressão de *osm* (Figura 49A e B), assim como a percentagem de blastos (Figura 49C e D) e concentração de hemoglobina (Figura 50).

Figura 47: Correlação entre os níveis de expressão de *osm* e tamanho do baço (A), de número de leucócitos circulantes (B), de percentagem de blastos no sangue periférico (C) e percentagem de blastos na medula óssea (D) de pacientes nas diferentes fases da LMC. Os dados de qPCR foram obtidos pelo método de “quantity” e os valores de *osm* foram colocados em LOG na base 10. A correlação estatística foi obtida pela aplicação do teste estatístico de Spearman.

Figura 50- Correlação entre os níveis de expressão de *osm* e a concentração de hemoglobina de pacientes nas diferentes fases da LMC. Os dados de qPCR foram obtidos pelo método de “quantity” e os valores de *osm* foram colocados em LOG na base 10. A correlação estatística foi obtida pela aplicação do teste estatístico de Spearman.

5.3.3.5 Análise da expressão de *osm* em diferentes linhagens celulares tratadas com STI571

O mesmo tratamento com STI571 utilizado para verificar a influência da atividade fosfotirosina de Bcr-Abl na expressão de *trail* foi utilizado para avaliar o impacto da inibição dessa atividade de Bcr-Abl na expressão de *osm*. Em dois experimentos independentes feitos por 12 e 24 horas as células HL-60.BA e K562 não apresentaram nenhuma mudança significativa da expressão desse gene. (Figura 51).

Figura 51- Expressão de *osm* em HL-60, HL-60.BA e K562 cultivadas na presença (+) ou ausência (-) de 10 μ M de STI571 por 8 e 24hs. A expressão de *osm* em HL-60 não tratada foi usada como calibrador e, portanto os resultados de qPCR foram dados em expressão relativa pelo o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

5.3.4 Análise da expressão da expressão de *faim*

5.3.4.1 Expressão de *faim* em HL-60 x HL-60.BA

Assim como foi feito pra *trail* e *osm*, os dois genes que tiveram uma diminuição de sua expressão no “microarray”. Também fomos validar a expressão dos genes que tiveram sua expressão aumentada. O par de células HL-60 e HL-60.BA foi inicialmente avaliado. Os resultados mostram que a expressão de *faim* em HL-60.BA é extremamente aumentada em relação à HL-60 (Figura 52). Devemos levar em consideração que o erro padrão desse gene é sempre muito grande, pois a expressão de *faim* em HL-60 é praticamente zero.

Figura 52- Aumento da expressão de *faim* em HL-60.BA com relação à HL-60. A expressão gênica de *faim* da linhagem HL-60 foi usada como calibrador. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, a barra representa o erro padrão de dois experimentos independentes.

5.3.4.2 Expressão de *faim* em diferentes linhagens *bcr-abl* positivas

Uma vez verificada a modulação da expressão do gene nas células HL-60 transfectadas com *bcr-abl*, utilizamos outras linhagens celulares transfectadas estabelecidas em nosso laboratório, dentre elas a THP1, SKW6.4 e Jurkat, para averiguar a influência de Bcr-Abl na expressão de *faim*, em diferentes contextos celulares.

Quando observados os demais pares de células, a THP1.BA apresentou um pequeno aumento na expressão de *faim* com relação a THP1. Na SKW6.4.BA não ocorreu nenhuma mudança significativa na expressão (Figura 53 A e B).

Figura 53- Expressão de *faim* em THP1.BA com relação a THP1 (A), em SKW6.4.BA com relação a SKW6.4 (B). A expressão gênica de *faim* da linhagem HL-60 foi usada como calibrador. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, a barra representa o erro padrão de dois experimentos independentes.

Para a Jurkat.BA observamos um aumento superior a duas vezes nos níveis de *faim* com relação a Jurkat. Por outro lado, as células Jurkats.KR não tiveram essa mudança na sua expressão (Figura 54).

Figura 54- Expressão relativa de *faim* em Jurkat.BA e Jurkat.KR com relação a Jurkat vetor. A expressão gênica de da linhagem transfectada com o vetor foi usada como calibrador. Os dados de qPCR foram obtidos pelo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Quando avaliada a expressão de *faim* nas células derivadas de pacientes, foram verificados diferentes níveis de expressão, sendo a maior expressão verificada em KCL22 e KBM7, depois em um nível intermediário na K562 e por último a LAMA84 e KBM5 apresentaram uma baixa expressão quando comparadas a expressão mediana de células mononucleares do grupo controle (Figura 55).

Figura 55- Expressão de *faim* em K562, LAMA, KCL22, KBM5 e KBM7 com relação a um indivíduo saudável. A expressão em um indivíduo saudável foi usada como calibrador e os valores obtidos para as linhagens são relativos ao mesmo. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e a barra representa o erro padrão de dois experimentos independentes.

5.3.4.3 Expressão de *faim* em pacientes com LMC

A análise dos dados de expressão de *faim* obtidos nos pacientes com LMC não mostrou nenhuma diferença estatística significativa, quando a comparação foi realizada entre o grupo controle e os pacientes (Figura 56).

Figura 56- Expressão relativa de *faim* em pacientes com LMC. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, estando representada a mediana de cada grupo.

Com esse resultado era esperado que também não obtivéssemos nenhuma relação da expressão de *faim* quando analisados os pacientes nas diferentes fases da doença (Figura 57).

Figura 57- Expressão relativa de *faim* em pacientes nas fases diferentes da LMC. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, estando representada a mediana de cada grupo.

5.3.4.4 Correlações entre a expressão de *faim* em pacientes e dados clínico-laboratoriais

Assim como não foi possível correlacionar a expressão de *faim* com a progressão da doença também não foi possível fazer nenhuma correlação significativa entre a expressão dos genes *bcr-abl* e *faim* ($r = -0,3430$, $p = 0,0863$) (Figura 58).

Figura 58- Correlação entre os níveis de expressão de *bcr-abl* e *faim* de pacientes nas diferentes fases da LMC. Os dados de qPCR foram obtidos pelo método de “quantity” e os valores de *faim* foram colocados em log10. A correlação estatística foi obtida pela aplicação do teste estatístico de Spearman.

Também não foi possível correlacionar a expressão de *faim* com o índice de Sokal ($r = -0,170$, $p = 0,307$) (Figura 58), nem com qualquer outro dado clínico-laboratorial analisado (Figuras 59 e 60).

Figura 58- Correlação entre os níveis de *faim* e o índice de Sokal de pacientes nas diferentes fases da LMC. Os dados de qPCR foram obtidos pelo método de “quantity” e os valores de *faim* foram colocados em log10. A correlação estatística foi obtida pela aplicação do teste estatístico de Spearman.

Figura 59- Correlação entre os níveis de *faim* e tamanho do baço (A) e de *faim* com o número de leucócitos circulantes (B) de pacientes nas diferentes fases da LMC. Os dados de qPCR foram obtidos pelo método de “quantity” e os valores de *faim* foram colocados em log10. A correlação estatística foi obtida pela aplicação do teste estatístico de Spearman.

Figura 60- Correlação entre os níveis de *faim* e a percentagem de blastos no sangue periférico (A) e a percentagem de blastos na medula óssea (B) e entre os níveis de *faim* e a concentração de hemoglobina (C) de pacientes nas diferentes fases da LMC. Os dados de qPCR foram obtidos pelo método de “quantity” e os valores de *faim* foram colocados em $\log_{10}$. A correlação estatística foi obtida pela aplicação do teste estatístico de Spearman.

5.3.4.5 Análise da expressão de *faim* em diferentes linhagens celulares tratadas com STI571

Para *faim* o tratamento com STI571 por 12 e 24 horas mostrou uma diminuição na expressão desse gene nas células HL-60.BA para os dois tempos analisados. Por outro lado para a linhagem K562 não ocorreu nenhuma mudança significativa nesse tratamento (Figura 61).

Figura 61- Expressão de *faim* em HL-60, HL-60.BA e K562 cultivadas na presença (+) ou ausência (-) de 10 μ M de STI571 por 12 e 24hs. A expressão de *faim* em HL-60 não tratada foi usada como calibrador e, portanto os resultados de qPCR foram dados em expressão relativa pelo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os dados são representativos de um experimento.

5.3.5 Análise da expressão de *nipa*

5.3.5.1 Expressão de *nipa* em HL-60 x HL-60.BA

A superexpressão de *nipa* observada nos resultados de “microarray” foi confirmada quando analisada a expressão de mRNA por qRT-PCR. Quando observada a expressão em HL-60.BA com relação à HL-60. Nesse caso foi obtido um aumento de 5 vezes na expressão de *nipa* (Figura 62).

Figura 62- Aumento da expressão de *nipa* em HL-60.BA com relação a HL-60. A expressão gênica de *nipa* da linhagem HL-60 foi usada como calibrador. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, a barra representa o erro padrão de dois experimentos independentes.

5.3.5.2 Expressão de *nipa* em diferentes linhagens *bcr-abl* positivas

A diminuição pela metade da expressão de *nipa* em SKW6.4.BA com relação a SKW6.4 pode ser explicada pela diferença no comportamento dessas células com a transfecção de *bcr-abl* (Figura 63B). Em resultados já obtidos pelo nosso laboratório a transfecção de *bcr-abl* torna as células HL-60 extremamente resistentes à morte por apoptose com diversos quimioterápicos, enquanto as células SKW6.4 transfectadas com o mesmo gene não mostram nenhuma alteração na sua resistência à morte. Isso sugere que possíveis diferenças na maquinaria celular podem influenciar o comportamento das células. Para as células THP1.BA não obtivemos nenhuma mudança de expressão com relação às células selvagens correspondentes (Figura 63A).

Figura 63- Aumento da expressão de *nipa* em THP1.BA com relação a THP1 (A), em SKW6.4.BA com relação a SKW6.4 (B). A expressão gênica de *nipa* da linhagem HL-60 foi usada como calibrador. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, a barra representa o erro padrão de dois experimentos independentes.

No caso da expressão de *nipa* em Jurkat observamos uma diminuição da expressão do gene nas células transfectadas com Bcr-Abl e por outro lado na expressão não foi alterada nas células Jurkat.KR (Figura 64).

Figura 64- Expressão relativa de *nipa* em Jurkat.BA e Jurkat.KR com relação a Jurkat vetor. A expressão gênica de da linhagem transfectada com o vetor foi usada como calibrador. Os dados de qPCR foram obtidos pelo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Nas linhagens celulares derivadas de pacientes foi possível observar um aumento na expressão de *nipa* apenas nas linhagens KBM5 e KBM7 que tiveram uma expressão de mais de 100 vezes maior que o controle. Por outro lado, as outras linhagens celulares derivadas de pacientes estudadas não mostraram diferença de expressão, com exceção da LAMA84 para a qual foi observada uma pequena diminuição de expressão quando comparados os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ dessa linhagem com o valor mediano obtido para o grupo controle (Figura 64).

Figura 64- Expressão de *nipa* em K562, LAMA, KCL22, KBM5 e KBM7 com relação a um indivíduo saudável. A expressão de *nipa* em um indivíduo saudável foi usada como calibrador e os valores obtidos para as linhagens são relativos ao mesmo. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, a barra representa o erro padrão de dois experimentos independentes.

5.3.5.3 Expressão de *nipa* em pacientes com LMC

A análise estatística dos dados obtidos para os pacientes não mostrou nenhuma diferença significativa entre o controle e os pacientes com LMC (Figura 65), nem houve nenhuma correlação com as diferentes fases da doença para os genes *nipa* (Figura 66).

Figura 65- Expressão relativa de *nipa* em pacientes com LMC. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, estando representada a mediana de cada grupo.

Figura 66- Expressão relativa de *nipa* em pacientes com LMC nas diferentes fases da doença. Os dados de qPCR foram obtidos segundo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, estando representada a mediana de cada grupo.

5.3.5.4 Correlações entre a expressão de *nipa* em pacientes e dados clínico-laboratoriais

Assim como não foi possível correlacionar a expressão de *nipa* com as diferentes fases da doença, também não foi possível estabelecer nenhuma correlação significativa entre os níveis de expressão *nipa* e *bcr-abl* (Figura 67A), nem com o índice de Sokal (Figura 67B), embora esse gene tenha mostrado uma modulação por Bcr-Abl nas células transfectadas.

Figura 67- Correlação entre os níveis de *bcr-abl* e *nipa* (A) e os níveis de *nipa* com o índice de Sokal (B) de pacientes nas diferentes fases da doença. Os dados de qPCR foram obtidos pelo método de “quantity” e os valores de *nipa* foram colocados em $\log_{10}$ para a correlação com o índice de Sokal. A correlação estatística foi obtida pela aplicação do teste estatístico de Spearman.

Os demais dados clínicos-laboratoriais analisados, tamanho do baço, número de leucócitos circulantes, percentagem de blastos no sangue periférico e na medula óssea e a concentração de hemoglobina também não apresentaram nenhuma correlação com a expressão de *nipa* nos pacientes (Figura 68).

Figura 68- Correlação entre os níveis de *nipa* e tamanho do baço (A) e de *nipa* com o número de leucócitos circulantes (B), entre os níveis de *nipa* e a percentagem de blastos no sangue periférico (C) e na medula óssea (D) e entre os níveis de *nipa* e a concentração de hemoglobina (E) de pacientes nas diferentes fases da LMC. Os dados de qPCR foram obtidos pelo método de “quantity”. A correlação estatística foi obtida pela aplicação do teste estatístico de Spearman.

5.3.5.5 Análise da expressão de *nipa* em diferentes linhagens celulares tratadas com STI571

O tratamento realizado com STI571 por 12 e 24hs se mostrou pouco eficiente na modulação da expressão de *nipa*. No tempo de 24 horas foi possível observar uma pequena diminuição da expressão do gene nas células K562 tratadas (Figura 69).

Figura 69- Expressão de *nipa* em diferentes linhagens celulares cultivadas na presença (+) ou ausência (-) de 10 μ M de STI571 por 12 e 24hs. A expressão de *nipa* em HL-60 não tratada foi usada como calibrador e, portanto os resultados de qPCR foram dados em expressão relativa pelo o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os dados são representativos de um experimento.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O termo câncer sempre foi amplamente utilizado para definir uma doença, mas na realidade trata-se de um grupo de diferentes doenças que tem em comum, a proliferação e o crescimento descontrolados de células transformadas (ALTUCCI *et al.*, 2007). O câncer é uma doença genética complexa relacionada a alterações fisiológicas na célula, a partir de mudanças no padrão de expressão gênica, como por exemplo, mutações gênicas e aumento e diminuição da expressão de proto-oncogenes e genes supressores de tumor. Dentre as alterações descritas na literatura relacionadas à tumorigênese, mutações que levam ativação constitutiva de tirosina-quinases estão freqüentemente associadas à aparição de tumores, já que essas moléculas possuem o potencial de acionar múltiplas cascatas de sinalização importantes para o funcionamento celular, como ciclo celular, sobrevivência, reparo de DNA, proliferação e adesão (KOLIBABA e DRUKER, 1997).

Dentre as proteínas tirosina-quinases envolvidas na tumorigênese e leucemogênese estão as proteínas do tipo receptor como a família EGF (“epidermal growth factor”) e VEGF (“vascular endothelial growth factor”), assim como proteínas do tipo não receptor, as CDK (“cyclin-dependent kinases”) (FABBRO e GARCIA-ECHEVERRIA, 2002; LIM, 2005). Uma das proteínas que se destaca dentro do grupo não receptor destaca-se a Bcr-Abl devido à íntima relação dessa tirosina-quinase com a patogênese da Leucemia Mielóide Crônica (LMC), que é o foco de estudo do nosso grupo de pesquisa.

Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na transformação das células pelo Bcr-Abl não estão completamente esclarecidos, mas sabe-se que a inibição da apoptose é uma consequência da expressão deste oncogene, levando ao aumento da sobrevivência das células hematopoéticas leucêmicas e à resistência destas células à quimioterapia. Assim sendo, esta proteína é considerada uma das mais potentes moléculas anti-apoptóticas descritas (AMARANTE-MENDES; FINUCANE *et al.*, 1998; AMARANTE-MENDES; MCGAHON *et al.*, 1998; AMARANTE-MENDES; NAEKYUNG KIM *et al.*, 1998; QUACKENBUSH *et al.*, 2000), mesmo quando comparada à moléculas anti-apoptóticas como o Bcl-2 e Bcl-x_L (BRUMATTI *et al.*, 2003; SAYERS e MURPHY, 2006).

Várias estratégias experimentais têm sido aplicadas na investigação do efeito da expressão de Bcr-Abl na maquinaria apoptótica das células. Uma delas é a determinação de seu efeito na expressão gênica pela técnica de microarranjos (“microarray”) de DNA. Assim sendo, empregando um sistema *in vitro* com HL-60 e HL-60.Bcr-Abl, a expressão gênica diferencial ocasionada pela proteína Bcr-Abl foi determinada por nosso grupo de pesquisa. Dentre os genes diferencialmente expressos detectamos alguns envolvidos na regulação da hematopoese, ativação celular, proliferação, apoptose e em processos celulares ainda desconhecidos. Quatro dos genes diferencialmente expressos foram escolhidos para serem analisados mais profundamente devido às suas relevâncias em mecanismos moleculares relacionados à resistência à morte celular. Os genes escolhidos foram os que codificam as proteínas OSM (“Oncostatin M”), TRAIL (também chamado TNFSF10 - “Tumor Necrosis ligand Superfamily, member 10”), FAIM (“Fas Apoptotic Inhibitory Molecule”) e NIPA (“Nuclear Interacting Partner of Anaplastic lymphoma kinase”).

Em uma primeira etapa, os resultados obtidos pelo “microarray” foram validados por meio da técnica de Real-Time PCR (qPCR), principal método utilizado para essa finalidade, de acordo com a literatura. É importante ressaltar que as discrepâncias na expressão relativa obtidas pelas duas técnicas podem ser atribuídas à diferença na sensibilidade e cinética desses dois métodos. Geralmente as mudanças relativas de expressão por qPCR são mais evidentes quando comparadas com a análise do “microarray”, principalmente para os genes que foram notavelmente super-expressos. Tal fato pode ser explicado pela maior sensibilidade e confiabilidade do qPCR com relação ao “microarray”, o qual possui o inconveniente da saturação dos sinais de fluorescência.

A quantificação da expressão dos genes escolhidos foi analisada e, sabendo-se que as diferenças poderiam ter significância quanto à tumorigênese, os resultados obtidos foram associados com a expressão do oncogene *bcr-abl* e com os dados clínicos-laboratoriais e fisiopatologia da Leucemia Mielóide Crônica.

O aumento da expressão de *faim* observado na análise do “microarray” foi confirmado em diferentes linhagens celulares Bcr-Abl-positivas. De modo geral, foi observado aumento da expressão desse gene em células que expressavam Bcr-Abl ectopicamente e constitutivamente. Esse aumento da expressão foi verificado nas células HL-60.BA (utilizadas para as análises de

expressão global) quando comparada à expressão nas células HL-60 e também em outras linhagens transfectadas com o oncogene, como a THP1.BA e Jurkat.BA com relação às células transfectadas com o vetor vazio. Observamos maior expressão de *faim* em linhagens celulares derivadas de pacientes com LMC, como as células K562, KCL22 e KBM7 quando comparamos à expressão desse gene nessas linhagens ao valor mediano obtido na análise do grupo controle utilizado nesse estudo (indivíduos saudáveis).

Para *faim* a atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl parece ser importante, pois o aumento da expressão desse gene observado nas células Jurkat.BA não ocorreu nas células Jurkat.KR. A diminuição da expressão de *faim* na células HL-60.BA após o tratamento por 12 e 24 horas de STI571 corroboram para essa hipótese. Porém, como somente um experimento foi realizado, não podemos afirmar se a regulação da expressão desse gene é dependente, pelo menos em parte, pela atividade fosfotirosina de Bcr-Abl.

Embora tenhamos obtido esses resultados de aumento da expressão de *faim* para diferentes linhagens celulares que expressam Bcr-Abl, não observamos o aumento da expressão de *faim* nos pacientes com LMC estudados seja em relação a indivíduos controles ou em relação aos pacientes em remissão citogenética. Quando analisamos os pacientes nas diferentes fases da LMC a expressão de *faim* não foi alterada na progressão da doença. Tendo em vista que a maior expressão de Bcr-Abl está associada com as fases mais avançadas da doença (MICHOR, 2007), esperávamos encontrar uma maior expressão de *faim* nessa fase, o que não ocorreu. Neste sentido, não houve tampouco relação entre a expressão de *faim* e as fases da doença, como também não houve correlação entre a expressão do gene com os níveis de Bcr-Abl. Para os dados clínico-laboratoriais analisados que são levados em consideração para determinar o prognóstico dos pacientes com LMC, como índice de Sokal, por exemplo, também não foi verificada correlação desse índice com a expressão de *faim*. É importante destacar que baixos níveis de Fas foram associados a um pior prognóstico para os pacientes com LMC (SELLERI e MACIEJEWSKI, 2000; RAVANDI *et al.*, 2001). Nesse contexto, imaginávamos que o aumento da proteína bloqueadora da via de Fas poderia contribuir ainda mais para o pior prognóstico. Porém nossos dados, até o momento, não permitiram comprovar essa hipótese.

O fato de não detectarmos diferença na expressão de *faim* nas amostras de pacientes, não permite descartarmos a hipótese de que esse gene seria relevante para fisiopatologia da LMC, como também de outros tipos de cânceres, pois o mesmo pode estar relacionado ao escape

tumoral à resposta do sistema imune. Foi descrito um mecanismo pelo qual células tumorais podem responder contra o sistema imune induzindo apoptose das células efetoras, por meio da expressão de ligantes dos receptores de morte, tais como FasL, TRAIL e TNF- α (SAYERS e MURPHY, 2006). Esse mecanismo foi chamado de “the Fas counter attack” e tem sido demonstrado para diversas linhagens tumorais como as de adenocarcinoma, melanoma, dentre outras (HAHNE *et al.*, 1996; O'CONNELL *et al.*, 1999). Na mesma linha de raciocínio, determinados tumores e linhagens tumorais co-expressam Fas e FasL sem entrar, no entanto, em apoptose, o que sugere que essas células apresentam características intracelulares que impedem a ativação dessa via. Este mecanismo, além de impedir a ação autócrina de seu FasL, conduz a resistência à ação dos linfócitos FasL-positivos (WALKER *et al.*, 1997). No caso de *faim*, observamos uma expressão bem superior nas células HL-60 transfectadas com Bcr-Abl em relação a células HL-60. Resultados anteriores obtidos pela Dra Gabriela Brumatti durante sua tese de doutorado (2005) em nosso laboratório mostram que as células HL-60.BA são resistentes à morte quando estimuladas com o anticorpo anti-Fas, ou seja, indicam que a presença do oncogene é capaz de bloquear a via extrínseca da apoptose. Os resultados obtidos para a expressão de *faim* em outras linhagens Bcr-Abl positivas que expressam ectopicamente esse oncogene, como a THP1.BA e a Jurkat.BA, assim como as linhagens derivadas de pacientes K562, KCL22, e KBM7, podem estar associados aos mecanismos envolvidos no bloqueio da via de Fas por de Bcr-Abl. Nesse contexto, a maior expressão de *faim* contribui para esse perfil de resistência visto que essa molécula parece impedir a formação do DISC (WONG *et al.*, 2006), porém o mecanismo envolvido nesse processo ainda não foi completamente elucidado.

Bassermann e colaboradores (2005) caracterizaram NIPA como uma proteína “F-box” que define um tipo de ubiquitina E3 ligase e esse tipo de proteína já foi associado com diversas funções como sinalização celular e regulação do ciclo celular. Durante a proliferação celular, a progressão correta das células de uma fase do ciclo para a seguinte é mediada pela ativação de determinados complexos de ciclinas e Cdks (quinases dependente de ciclinas). O controle da ciclina B1 na mitose é feito por uma E3 ubiquitina ligase formada por um complexo promotor de anáfase/ciclossomo. Esse complexo multiprotéico leva a ciclina B1 para degradação proteossômica nas fases avançadas da mitose e possibilita o avanço da célula no ciclo (SUN, 2003). Outro complexo capaz de mediar a destruição da ciclina B1 são as ubiquitinas ligases

pertencentes a família SCF (Skp1 Cullin F-box) de ubiquitinas. Uma das principais características desse complexo é sua habilidade de atuar como controlador do ciclo celular. A atividade dessas ubiquitinas está mantida durante a interfase e a fosforilação de NIPA, uma das integrantes dessa família, na fase G2 do ciclo leva a sua inativação até a entrada da célula na fase G1. A inibição de NIPA com siRNA resultou na entrada prematura na mitose com uma parada na prometáfase. Sabe-se que a entrada adiantada em mitose pode aumentar os riscos de defeitos na replicação do DNA, com isso especula-se a possibilidade de que um defeito na sinalização de NIPA pode favorecer a instabilidade genômica envolvida na transformação tumoral das células (BASSERMANN; PESCHEL *et al.*, 2005).

Em relação aos resultados da análise do gene *nipa*, os resultados deste trabalho mostram um aumento da sua expressão nas células HL-60.BA, o que validou os resultados obtidos no “microarray”. Porém, quando verificado nas diferentes linhagens celulares transfectadas com Bcr-Abl, seus níveis de RNAm se mostraram heterogêneos. Nas linhagens celulares como a THP1 e a SKW6.4, a expressão ectópica de Bcr-Abl não altera a expressão de *nipa*. Já em células Jurkat, a transfecção com o oncogene ocasionou uma diminuição da expressão desse gene. Assim como as linhagens transfectadas, as linhagens derivadas de pacientes apresentaram diferentes níveis de *nipa*. Em algumas linhagens celulares como a KBM5 e KBM7 observamos altos níveis de *nipa* enquanto em K562, LAMA84 e KCL22 os níveis de expressão foram semelhantes ao controle.

Para *nipa* avaliamos a influência da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl na expressão desse gene. A diminuição da expressão de *nipa* observada em Jurkat.BA não ocorre nas células que possuem a versão deficiente do domínio quinase, as células Jurkat.KR. Porém esse indicativo da participação da atividade quinase de Bcr-Abl na regulação da expressão de *nipa* não foi confirmado nos experimento com STI571.

Não foi detectada diferença alguma de expressão desse gene nos pacientes analisados com relação ao grupo controle e os indivíduos em remissão pós-STI571, embora seja possível observar uma tendência dos pacientes apresentarem níveis de expressão de *nipa* menores que os grupos controle e em remissão. Quando analisados os pacientes nas diferentes fases da doença não foi possível correlacionar a expressão de *nipa* com nenhuma fase específica. O fato de não observarmos correlação da expressão desse gene com os níveis de Bcr-Abl, com o índice de Sokal e com outros dados clínico-laboratoriais que são utilizados na avaliação dos pacientes ao

diagnóstico, demonstram que a expressão de *nipa* não está correlacionada com a progressão da doença. Um fato importante que precisa ser destacado seja para *nipa* ou para qualquer outro dos genes estudados, é que nosso estudo utilizou principalmente a técnica de qPCR e, portanto, avaliou apenas a quantidade de RNAm nas diferentes células. Assim é possível que as diferenças na expressão protéica precisam ser estudadas e, portanto um papel funcional destas moléculas pode ter sido perdido no contexto de Bcr-Abl. No caso de NIPA isto é fundamental, uma vez que sua atividade está diretamente relacionada à modificações pós-transducionais, aspecto que não abordado nesse trabalho.

Na literatura, os efeitos pró-inflamatórios de OSM induzindo adesão e quimiotaxia de neutrófilos têm sido descritos, como a produção de quimiocinas por células endoteliais (MODUR *et al.*, 1997; KERFOOT *et al.*, 2001). OSM foi primeiramente identificada por sua capacidade de inibir o crescimento de diversos tipos de células tumorais (HORN *et al.*, 1990). Entretanto, atualmente sabe-se que é uma citocina com potente ação mitogênica, resultante da ativação da via das MAPK (IHN e TAMAKI, 2000). Nesse sentido, o efeito inibidor ou estimulador de OSM para o crescimento celular é específico para cada tipo célula. Em relação à expressão de *osm*, os resultados do “microarray” não foram confirmados em células HL-60 transfectadas com *bcr-abl*, porém foi possível observar a diminuição da sua expressão em outras linhagens transfectadas com o oncogene, como em células THP1 e Jurkat. A diminuição da expressão relativa de *osm* foi verificada nas linhagens K562, LAMA84, KCL22 e a KBM5. Esses resultados sugerem o fato do contexto celular ser importante no efeito da expressão do gene *bcr-abl*. Dentre as linhagens derivadas de pacientes, apenas a KBM7 não apresentou diminuição da expressão de *osm* o que indica que as células que expressam constitutivamente Bcr-Abl possuem comportamento mais homogêneo. Nesse sentido, a diminuição observada na expressão de *osm* nos pacientes estudados que estão na fase crônica da doença deve ser avaliada com cautela porque os pacientes nessa fase da doença possuem uma população celular mais heterogênea. Embora não tenha sido possível observar a diminuição de *osm* nas células Jurkat.KR como nas células Jurkat.BA, não podemos afirmar que a expressão desse gene está relacionada com a atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl, uma vez que o tratamento com STI571 não foi capaz de restaurar a expressão de *osm* nas células HL-60.BA e K562.

Esses resultados nos fazem hipotetizar que o aumento da expressão de *osm* possua papel relevante na progressão da LMC e que uma análise dos receptores para OSM talvez possa enriquecer posteriormente o estudo ou esclarecer a possível associação de OSM com a progressão da LMC.

Dada a relevância da participação de TRAIL e seus receptores no processo de indução de morte em diferentes tipos de câncer, essa molécula foi priorizada no presente trabalho. O foco principal foi o estudo da modulação de *trail* por Bcr-Abl, investigando sua participação no perfil de resistência ou susceptibilidade à morte das linhagens celulares estudadas.

A expressão de *trail* nos estudos de expressão gênica global e no qPCR estava diminuída na células HL-60.BA. Assim como foi feito na avaliação dos demais genes utilizamos outras linhagens celulares transfectadas estabelecidas em nosso laboratório para averiguar a influência de Bcr-Abl em diferentes contextos celulares. Níveis reduzidos de *trail* foram evidenciados nas células SKW6.4.BA e em Jurkat.BA quando comparadas com as células não transfectadas com *bcr-abl*. Por outro lado, não foi observada mudança no perfil de expressão em THP1.BA comparando com THP1.

Tendo em vista que, no sistema *in vitro*, o contexto celular tem papel fundamental no comportamento das diferentes células utilizadas, é possível que a transfecção do oncogene *bcr-abl* resulte em diferentes modificações fenotípicas, o que torna compreensível as diferenças observadas na modulação da expressão dos genes nas linhagens analisadas. Para descartar possíveis alterações derivadas do processo de transfecção das linhagens celulares com o oncogene, utilizamos as células Bcr-Abl-positivas derivadas de pacientes com LMC como a K562, LAMA84 e KCL22, KBM5 e KBM7 para avaliar a modulação exercida por Bcr-Abl na expressão de *trail*. A diminuição da expressão de *trail* foi verificada nessas linhagens celulares quando comparadas com a expressão mediana de *trail* no grupo controle (indivíduos saudáveis). Interessantemente para essas linhagens, os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ obtidos para *trail* se tornaram praticamente nulos, devido o fato de que indivíduos normais apresentaram altos níveis de *trail*. Os resultados obtidos para as diferentes linhagens celulares estudadas inferem que Bcr-Abl induz a redução da expressão de *trail*. Sabendo-se que TRAIL participa do processo de indução de morte em diversos tumores (SHANKAR e SRIVASTAVA, 2004), a diminuição da expressão do gene na presença de Bcr-Abl constitui provavelmente um mecanismo de escape à apoptose

mediada pela via extrínseca. Isso porque embora TRAIL seja um ligante associado à membrana celular, sua porção extracelular pode ser clivada e essa forma solúvel é capaz de exercer atividades anti-tumorais (SHANKAR e SRIVASTAVA, 2004). TRAIL está expresso como uma proteína do tipo II transmembranar em diferentes tipos celulares e assim como outros membros da família do TNF, ele sofre ação de determinadas proteases denominadas metaloproteases (LIABAKK *et al.*, 2002). A clivagem de TRAIL resulta na forma solúvel da proteína que quando trimerizada tem ação biológica (KIM e SEOL, 2003). Considerando que as atividades anti-tumorais de TRAIL solúvel podem ser exercidas de maneira autócrina, a diminuição da expressão de *trail* poderia ser um mecanismo das células Bcr-Abl-positivas de evitar a indução da apoptose em si.

A expressão de *trail* em células mononucleares isoladas de pacientes com LMC nas diferentes fases da doença mostrou diminuição da expressão desse gene nos pacientes com LMC e associação com a progressão da doença. A redução dos níveis de *trail* na fase blástica da doença são indicativos que *trail* possa ser utilizado como possível marcador de prognóstico ou que poderia estar associado aos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na progressão da LMC.

Dados similares de diminuição da expressão de TRAIL foram descritos para outros tipos de tumores durante a progressão da doença como para câncer de cólon, de esôfago, de pele e oral (STRATER *et al.*, 2002; STANDER e SCHWARZ, 2005; POPNIKOLOV *et al.*, 2006; VIGNESWARAN *et al.*, 2007).

Visto que baixos níveis de *trail* estavam associados com a progressão da doença, avaliamos se a expressão desse gene correlacionava-se aos diferentes níveis de *bcr-abl*. Foi possível estabelecer uma correlação negativa significativa entre a expressão de *trail* e *bcr-abl* nos pacientes nas diferentes fases da doença, mostrando que a diminuição de *trail* está intimamente relacionada a expressão do oncogene.

Diferentes dados clínico-laboratoriais foram analisados na tentativa de associar as características da LMC com a expressão de *trail*. Embora haja uma correlação entre os níveis de *trail* e de *bcr-abl* não foi possível correlacionar os níveis de *trail* com o índice de Sokal. Por outro lado alguns dados que são levados em consideração no cálculo do índice de Sokal mostram ter correlação com a expressão de *trail*. Dentre os dados clínico-laboratoriais obtidos dos pacientes ao diagnóstico, foi possível observar correlação negativa entre os níveis de *trail* e o

tamanho do baço. Ou seja, quanto menor a expressão de *trail* maior o tamanho do baço dos pacientes, embora tal correlação não esteja relacionada a fase específica da doença. Foi possível também fazer uma correlação negativa com o número de leucócitos no sangue periférico nos pacientes com LMC ao diagnóstico.

Tendo em vista que já foi descrita a participação da forma solúvel de TRAIL no mecanismo de morte induzida por excesso de ativação (AICD) de linfócitos ativados (MARTINEZ-LORENZO *et al.*, 1998), é possível que o aumento de leucócitos observado esteja relacionado com a diminuição da expressão de *trail*, e acúmulo de células que, a princípio, seriam eliminadas do sistema por AICD.

A expressão e a participação de TRAIL em mecanismos fisiológicos foram abordadas por diferentes metodologias a fim de se entender melhor a participação dessa molécula nos processos biológicos (SMYTH *et al.*, 2003) e com isso entender como a mesma poderia ser utilizada como promissor alvo molecular contra diferentes tipos de tumores. Dentre elas podemos destacar a utilização de anticorpos monoclonais neutralizadores da atividade de TRAIL (KAYAGAKI *et al.*, 1999), a utilização de proteínas recombinantes para DR5 (CHA *et al.*, 2000) e camundongos modificados para a expressão de TRAIL (CRETNEY *et al.*, 2002). Como foi verificada diferença de sensibilidade à morte induzida por TRAIL em diferentes tipos celulares tumorais, essas estratégias e outras possibilitaram verificar o papel de determinadas drogas anti-tumorais na expressão dessa proteína (DE JONG *et al.*, 2001). Estudos relataram que determinados tratamentos contribuem para o efeito anti-tumoral de TRAIL, como por exemplo, células NK têm uma maior expressão do ligante após utilização de determinadas drogas como o IFN- γ (SEKI *et al.*, 2003). Estudos utilizando a expressão ectópica de Bcr-Abl em HL-60 e constitutiva em K562 mostraram que o STI571 é capaz de sensibilizar essas células a indução de apoptose por TRAIL (NIMMANAPALLI *et al.*, 2001). Os mecanismos associados ao aumento da sensibilidade a TRAIL de determinados tumores induzido por certas drogas, como o STI571, ainda não foram completamente desvendados. Alguns trabalhos recentes sugerem que estejam associados à expressão das moléculas c-FLIP, a membros da família Bcl-2 e a ativação das caspases. O aumento da proporção Bax:Bcl-x_L, a maior translocação para a mitocôndria de Bax com relação a de Bcl-x_L/Bcl₂ e uma maior ativação de caspase-8 parecem estar envolvidos na sensibilização ao TRAIL (HAMAI *et al.*, 2006). Por outro lado, outros grupos não associaram essa maior sensibilidade à mudança de expressão dessas moléculas (NIMMANAPALLI *et al.*, 2001). Nesse

sentido, a utilização de TRAIL visa melhorar essa recente linha de tratamentos seletivos que se baseiam na restauração dos mecanismos de morte celular (REED, 2006) e sua utilização em associação com terapias convencionais parece promissora para diversos tipos de tumores.

Durante muito tempo o IFN- α foi utilizado como tratamento de pacientes com LMC que não eram candidatos ao transplante de medula óssea (KUJAWSKI e TALPAZ, 2007). Recentemente, o desenvolvimento de inibidores específicos de Bcr-Abl, tais como STI571 se mostraram muito mais eficazes do que o IFN- α , culminando em mudança no tratamento padrão de pacientes com LMC a partir de 2001. Porém, levando em consideração que o IFN- α induz à remissão de certos pacientes e que cada vez mais são descritos mecanismos de resistência à terapia com STI571, algumas combinações terapêuticas estão sendo testadas com o intuito de obter melhor eficácia do tratamento para os pacientes (KUJAWSKI e TALPAZ, 2007; BACCARANI *et al.*, 2008). Assim sendo, alguns trabalhos destacam a participação de determinados quimioterápicos, inclusive do próprio IFN- α , no aumento da expressão de TRAIL e a maior sensibilidade à morte induzida por esse ligante. Pacientes tratados com IFN- α e com STI571 apresentaram aumento nos níveis de TRAIL solúvel pós-terapia, sendo os neutrófilos desses pacientes os responsáveis por esse aumento de TRAIL intracelular secretado. Esses resultados indicam que um dos mecanismos do efeito anti-proliferativo do IFN- α pode estar associado aos níveis de TRAIL solúvel, o que evidencia a importância dessa molécula como adjuvante no tratamento da LMC (TANAKA *et al.*, 2007). Outro dado interessante é que linhagens celulares resistentes ao STI571 são eliminadas pelo tratamento com TRAIL e o contrário é verdadeiro, ou seja, a indução à morte pelo STI571 ocorre nas células que se mostraram pouco sensíveis à morte induzida por TRAIL recombinante. Esses dados descrevem portanto que essa abordagem conjunta atua de maneira sinérgica na eliminação dos clones leucêmicos resistentes nos pacientes com LMC (UNO *et al.*, 2003).

Os receptores de morte foram descritos por estarem presentes principalmente em células de diversos tipos de cânceres. Sendo que a diminuição de TRAIL e não de seus receptores justificam o uso de rTRAIL na indução de morte de células transformadas (VIGNESWARAN *et al.*, 2007). Outra estratégia terapêutica anti-tumoral, que se baseia na expressão desses receptores de morte para eliminar células neoplásicas é aquela que emprega anticorpos monoclonais agonistas dos receptores. Esse tipo de terapia está sendo testada, e um exemplo seria o estudo do

composto HGS-ETR1 (Mapatumumab da “Human Genome Sciences”, Rockville), o qual se liga especificamente ao TRAIL-R1 (DR4) e é empregado em testes clínicos de fase II para o tratamento de câncer de pulmão e colorretal. Além dele, outros agonistas de TRAIL-R2 (DR5), o HGSETR2 e HGS-TR2J (“Human Genome Sciences”) estão sendo utilizados em pesquisas clínicas, porém em fase I de testes (ROWINSKY, 2005; CARLO-STELLA *et al.*, 2007). Com base nesses dados, avaliamos a expressão dos receptores no contexto de Bcr-Abl. Nas células HL-60.BA, em comparação com a célula HL-60, houve maior expressão tanto de DR4 como de DR5. Nas outras linhagens transfectadas com *bcr-abl* como a THP1, SKW6.4 e Jurkat não foi possível observar o mesmo padrão de expressão dos receptores. Entretanto, quando foram analisadas linhagens celulares derivadas de pacientes foi verificado altos níveis da expressão dos dois genes em todas as células que foram avaliadas. Os resultados de aumento da expressão dos receptores nas células Bcr-Abl-positivas estão de acordo com dados descritos na literatura que relatam maior expressão dessas moléculas em outros tipos de células tumorais. Por exemplo, em células de adenomas e carcinomas foi descrita maior expressão de DR4 e DR5 em relação às células epiteliais adjacentes ao tumor (KOORNSTRA *et al.*, 2003). Como os receptores DR4 e DR5 são os receptores capazes de induzir a morte, avaliamos como estava sua expressões nas células mononucleares de pacientes com LMC para verificar o potencial uso de rTRAIL no tratamento desses pacientes. Os resultados obtidos mostraram que ambos os receptores estão diminuídos nos pacientes. Do mesmo modo que observamos essa diminuição dos receptores, estudo publicado e realizado em tumores de cabeça e pescoço mostrou por imunohistoquímica menor expressão desses receptores (TENG *et al.*, 2005). Em conjunto, esses dados salientam a importância da realização de estudos mais aprofundados antes de explorar o sistema TRAIL/receptores de morte como terapêutica em pacientes. Além disso, com base nas características do tumor e na expressão dessas moléculas poderia ser empregada uma terapia individualizada para cada paciente (DE JONG *et al.*, 2001). Além disso, deve-se considerar que a susceptibilidade a morte induzida por TRAIL nem sempre está correlacionada com a expressão dos receptores de morte e/ou dos receptores “decoy” e sim a mecanismos envolvendo moléculas efetoras de sinalização, atuantes em vias localizadas abaixo dos receptores descritos anteriormente (VIGNESWARAN *et al.*, 2007).

TRAIL está presente na maioria dos tecidos humanos, assim a caracterização de seu promotor (GONG e ALMASAN, 2000) e de seus receptores foi essencial para uma melhor

compreensão da sua função na apoptose induzida por diversos agentes terapêuticos e na regulação da sua expressão (KIRSHNER *et al.*, 2005; HENSON *et al.*, 2008). Com a caracterização dos promotores é possível entender a regulação da expressão desse ligante que, por exemplo, não é expresso em determinados órgãos (cérebro e fígado) e em determinadas células tumorais. Com a identificação dos sítios de ligação dos fatores de transcrição nesses promotores sabe-se que a expressão dos receptores de morte está influenciada pelos níveis de expressão de NF- κ B, que regula positivamente a expressão de *trail*, *DR4* e *DR5* aumentando a sensibilidade à morte induzida por TRAIL (NIMMANAPALLI *et al.*, 2001). Outro fator de transcrição, que regula a expressão de *trail* é o p53 (HENSON *et al.*, 2008). Como a presença de p53 é responsável por aumentar a expressão de *trail* (TENG *et al.*, 2005) e tendo em vista que na progressão da LMC para a crise blástica ocorrem mutações e até perda de p53 funcional nas células Bcr-Abl-positivas (DI BACCO *et al.*, 2000), é possível que o declínio da atividade de p53 possa contribuir para a diminuição de *trail* principalmente nessa fase da doença.

A capacidade de TRAIL induzir à morte determinadas células tumorais faz com que essa molécula seja um grande candidato no tratamento de diferentes tipos de tumores. Entretanto, nem todas as linhagens apresentam a mesma sensibilidade a essa via de indução à morte. A identificação dos mecanismos moleculares envolvidos na modulação da resposta a TRAIL mostrou a participação fundamental dos receptores DR4 e DR5, mas também revelou a importância dos receptores do tipo “decoy” (MERINO *et al.*, 2006). A presença desse tipo de receptores em células normais foi descrita como um dos mecanismos responsáveis pela proteção relativa que essas células apresentam na morte induzida por TRAIL (ZHAO *et al.*, 1999). O mecanismo molecular pelo qual DcR1 e DcR2 inibem a morte induzida por TRAIL difere para cada receptor. No caso do receptor DcR1, que está localizado em “lipid rafts” da membrana o que ocorre é uma competição com o ligante. Como esse tipo de receptor não possui um domínio efetor intracelular, não ocorre a formação do complexo DISC e com isso o sinal de indução à apoptose é interrompido. Já para DcR2, que possui um domínio de morte truncado, o que ocorre é sua associação com DR5 formando um complexo heteromérico. Nesse caso, ocorre a formação do DISC porém há ativação de caspase-8 e 10 por um mecanismo ainda não completamente elucidado (MERINO *et al.*, 2006). No caso das células tumorais muitos trabalhos atribuem à diminuição expressão dos receptores “decoy” como responsável da maior sensibilidade a morte por TRAIL (SHIVAPURKAR *et al.*, 2004; DELIGEZER e DALAY, 2007).

O silenciamento de genes pode ocorrer por mutações pontuais, exclusão alélica e metilação de promotores. Sendo este último um mecanismo epigenético envolvido no silenciamento de determinados genes, inclusive de DcR1 e DcR2, em diferentes tipos de tumores (SHIVAPURKAR *et al.*, 2004). Porém esses dados sobre a importância dos receptores “decoy” na resistência à morte por TRAIL ainda são controversos, uma vez que muitos estudos verificaram a expressão de RNAm dos receptores e não verificaram sua expressão protéica. A problemática envolvida nesses casos baseia-se no fato de muitas vezes esses receptores estarem localizados dentro das células e não na superfície (LEBLANC e ASHKENAZI, 2003) não sendo capaz de influenciar no processo de apoptose.

A análise da expressão do RNAm de *trail* e de seus receptores *DR4* e *DR5* contribui para a melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência a morte das células Bcr-Abl-positivas. Porém para confirmar a participação dessas moléculas no fenótipo de resistência da célula a apoptose faz-se necessária a análise funcional das proteínas codificadas por esses genes. Para avaliar a expressão protéica de TRAIL, DR4 e DR5 nas diferentes linhagens estudadas foram feitas diversas tentativas de padronização dos anticorpos sem nenhum resultado satisfatório. Vários trabalhos na literatura descrevem essa dificuldade em detectar TRAIL por “Western-Blot” e, em muitos, é feita a imunoprecipitação da proteína com anticorpos específicos (BELYANSKAYA *et al.*, 2007). Porém como nosso anticorpo não possibilita essa abordagem, mas pode ser utilizado para ensaios de ELISA a padronização dessa técnica já foi iniciada, porém os resultados não estavam prontos até a elaboração da tese.

Como o monitoramento do tratamento em nível molecular é essencial para a compreensão e planejamento da melhor forma de agir contra a doença, avaliamos a expressão de *trail* em linhagens tratadas com o STI571, inibidor da atividade quinase de Bcr-Abl. Essa abordagem é importante já que as principais transformações celulares na célula leucêmica na LMC são mediadas pela atividade quinase de Bcr-Abl (DEININGER *et al.*, 2005). A incubação das células HL-60.BA por 12 e 24 horas com STI572 foi capaz de aumentar a expressão de *trail* nessas células, embora os níveis de expressão de gene não tenham sido completamente restaurados se comparados a expressão da linhagem selvagem HL-60. Para as células K562 também analisadas nesse tratamento, o aumento da expressão de *trail* foi visualizado principalmente em 24 horas. O

resultado das Jurkat.KR corroboram para pensarmos que a regulação de *trail* é dependente da atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl, uma vez que nessas células deficientes da atividade quinase de Bcr-Abl não foi observada a diminuição da expressão de *trail* observada na Jurkat.BA.

Em conjunto, esses resultados sugerem que o fenótipo de resistência à apoptose característico das células leucêmicas pode ser em parte por causa da modulação negativa exercida por Bcr-Abl sobre *trail*, regulando assim a indução da morte celular pela via extrínseca da apoptose.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na análise da expressão gênica de células transformadas por *bcr-abl* mostraram que esse oncogene é capaz de alterar profundamente o padrão de expressão de genes envolvidos em diversos processos celulares.

Os dados obtidos para *faim*, *nipa* e *osm* contribuíram para uma melhor compreensão acerca de mudanças moleculares que ocorrem em células Bcr-Abl-positivas. Porém não foi possível estabelecer nenhuma correlação importante desses genes com a fisiopatologia da LMC.

Por outro lado a expressão de *trail* em linhagens celulares Bcr-Abl-positivas e em pacientes com LMC, ressaltou a importância desse gene no contexto Bcr-Abl e na progressão da doença. Levando em consideração essa diminuição da expressão de *trail* e as correlações obtidas dessa diminuição com dados clínico-laboratoriais como tamanho do baço e número de leucócitos indicam que essa molécula pode ser um bom marcador de prognóstico dos pacientes com LMC. E que quando utilizado em conjunto com os tratamentos convencionais de quimioterapia TRAIL é capaz de auxiliar na eliminação das células transformadas resistentes ao tratamento, sendo assim de fundamental importância no contexto bcr-Abl.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTUCCI, L. *et al.* Cancer therapy: new drugs are emerging based on molecular targeting but still many challenges. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.39, n.7-8, p.1278-9. 2007.
- AMARANTE-MENDES, G. P. *et al.* Anti-apoptotic oncogenes prevent caspase-dependent and independent commitment for cell death. **Cell Death Differ.**, v.5, n.4, Apr, p.298-306. 1998.
- AMARANTE-MENDES, G. P. ;GREEN, D. R. The regulation of apoptotic cell death. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.32, n.9, Sep, p.1053-61. 1999.
- AMARANTE-MENDES, G. P. *et al.* Bcr - Abl-mediated resistance to apoptosis is independent of PI 3-kinase activity. **Cell Death Differ.**, v.4, n.7, Oct, p.548-54. 1997.
- AMARANTE-MENDES, G. P. *et al.* Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL. **Oncogene**, v.16, n.11, Mar, p.1383-90. 1998.
- AMARANTE-MENDES, G. P. *et al.* 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, Mar 1, p.1700-5. 1998.
- AUGUSTE, P. *et al.* Signaling of type II oncostatin M receptor. **J. Biol. Chem.**, v.272, n.25, Jun 20, p.15760-4. 1997.
- BACCARANI, M. *et al.* Monitoring treatment of chronic myeloid leukemia. **Haematologica**, v.93, n.2, Feb, p.161-9. 2008.
- BAI, R. Y. *et al.* Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway. **Blood**, v.96, n.13, Dec 15, p.4319-27. 2000.
- BASSERMANN, F. *et al.* Mitotic entry: a matter of oscillating destruction. **Cell Cycle**, v.4, n.11, Nov, p.1515-7. 2005.
- BASSERMANN, F. *et al.* NIPA defines an SCF-type mammalian E3 ligase that regulates mitotic entry. **Cell**, v.122, n.1, Jul 15, p.45-57. 2005.
- BAYLIN, S. B. ;OHM, J. E. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nat. Rev. Cancer**, v.6, n.2, Feb, p.107-16. 2006.
- BELYANSKAYA, L. L. *et al.* TRAIL-induced survival and proliferation of SCLC cells is mediated by ERK and dependent on TRAIL-R2/DR5 expression in the absence of caspase-8. **Lung Cancer**, Dec 17. 2007.

- BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Mol. Aspects Med.**, v.21, n.6, Dec, p.167-223. 2000.
- BOYUM, A. Separation of lymphocytes, lymphocyte subgroups and monocytes: a review. **Lymphology**, v.10, n.2, Jun, p.71-6. 1977.
- BRUMATTI, G. *et al.* 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, Apr 24, p.57-63. 2003.
- BUDIHardJO, I. *et al.* Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu. Ver. Cell Dev. Biol.**, v.15, p.269-90. 1999.
- BUETTNER, R. *et al.* Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. **Clin. Cancer Res.**, v.8, n.4, Apr, p.945-54. 2002.
- CARLO-STELLA, C. *et al.* Targeting TRAIL agonistic receptors for cancer therapy. **Clin Cancer Res**, v.13, n.8, Apr 15, p.2313-7. 2007.
- CHA, S. S. *et al.* Crystal structure of TRAIL-DR5 complex identifies a critical role of the unique frame insertion in conferring recognition specificity. **J. Biol. Chem.**, v.275, n.40, Oct 6, p.31171-7. 2000.
- CHALANDON, Y. ;SCHWALLER, J. Targeting mutated protein tyrosine kinases and their signaling pathways in hematologic malignancies. **Haematologica**, v.90, n.7, Jul, p.949-68. 2005.
- CHEN, Q. *et al.* Role of Apo2L/TRAIL and Bcl-2-family proteins in apoptosis of multiple myeloma. **Leuk. Lymphoma**, v.44, n.7, Jul, p.1209-14. 2003.
- CHIPOY, C. *et al.* Sensitization of osteosarcoma cells to apoptosis by oncostatin M depends on STAT5 and p53. **Oncogene**, Apr 30. 2007.
- CHOPRA, R. *et al.* Biology of BCR-ABL. **Blood Rev.**, v.13, n.4, Dec, p.211-29. 1999.
- COLLINS, F. S. ;BARKER, A. D. Mapping the cancer genome. Pinpointing the genes involved in cancer will help chart a new course across the complex landscape of human malignancies. **Sci. Am.**, v.296, n.3, Mar, p.50-7. 2007.
- COLLINS, S. J. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. **Blood**, v.70, n.5, Nov, p.1233-44. 1987.
- CRETNEY, E. *et al.* Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. **J. Immunol.**, v.168, n.3, Feb 1, p.1356-61. 2002.
- DANIELS, R. A. *et al.* Expression of TRAIL and TRAIL receptors in normal and malignant tissues. **Cell Res.**, v.15, n.6, Jun, p.430-8. 2005.

- DE JONG, S. *et al.* Death receptor ligands, in particular TRAIL, to overcome drug resistance. **Cancer Metastasis Rev.**, v.20, n.1-2, p.51-6. 2001.
- DEBATIN, K. M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. **Cancer Immunol. Immunother.**, v.53, n.3, Mar, p.153-9. 2004.
- DEGLI-ESPOSTI, M. A. *et al.* The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. **Immunity**, v.7, n.6, Dec, p.813-20. 1997.
- DEGLI-ESPOSTI, M. A. *et al.* Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. **J. Exp. Med.**, v.186, n.7, Oct 6, p.1165-70. 1997.
- DEGTEREV, A. *et al.* A decade of caspases. **Oncogene**, v.22, n.53, Nov 24, p.8543-67. 2003.
- DEGTEREV, A. ;YUAN, J. Expansion and evolution of cell death programmes. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v.9, n.5, May, p.378-90. 2008.
- DEININGER, M. *et al.* The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. **Blood**, v.105, n.7, Apr 1, p.2640-53. 2005.
- DELIGEZER, U. ;DALAY, N. Expression of the TRAIL receptors in blood mononuclear cells in leukemia. **Pathol. Oncol. Res.**, v.13, n.4, p.290-4. 2007.
- DI BACCO, A. *et al.* Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. **Oncologist**, v.5, n.5, p.405-15. 2000.
- FABBRO, D. ;GARCIA-ECHEVERRIA, C. Targeting protein kinases in cancer therapy. **Curr. Opin. Drug Discov. Devel.**, v.5, n.5, Sep, p.701-12. 2002.
- FALSCHLEHNER, C. *et al.* TRAIL signalling: Decisions between life and death. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, Feb 14. 2007.
- FISCHER, U. ;SCHULZE-OSTHOFF, K. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. **Pharmacol. Rev.**, v.57, n.2, Jun, p.187-215. 2005.
- FISHER, A. M. *et al.* Breakpoints of variant 9;22 translocations in chronic myeloid leukemia locate preferentially in the CG-richest regions of the genome. **Genes Chromosomes Cancer**, v.43, n.4, Aug, p.383-9. 2005.
- FLEIGE, S. *et al.* Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. **Biotechnol. Lett.**, v.28, n.19, Oct, p.1601-13. 2006.
- FULDA, S. ;DEBATIN, K. M. Exploiting death receptor signaling pathways for tumor therapy. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1705, n.1, Dec 10, p.27-41. 2004.

- GADZICKI, D. *et al.* BCR-ABL gene amplification and overexpression in a patient with chronic myeloid leukemia treated with imatinib. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.159, n.2, Jun, p.164-7. 2005.
- GARCIA-MANERO, G. *et al.* Chronic myelogenous leukemia: a review and update of therapeutic strategies. **Cancer**, v.98, n.3, Aug 1, p.437-57. 2003.
- GOLDMAN, J. M. Chronic myeloid leukemia-still a few questions. **Exp. Hematol.**, v.32, n.1, Jan, p.2-10. 2004.
- GOMEZ-LECHON, M. J. Oncostatin M: signal transduction and biological activity. **Life Sci.**, v.65, n.20, p.2019-30. 1999.
- GONG, B. ;ALMASAN, A. Genomic organization and transcriptional regulation of human Apo2/TRAIL gene. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.278, n.3, Nov 30, p.747-52. 2000.
- GREEN, D. R. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. **Cell**, v.121, n.5, Jun 3, p.671-4. 2005.
- GREENMAN, C. *et al.* Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. **Nature**, v.446, n.7132, Mar 8, p.153-8. 2007.
- HAHNE, M. *et al.* Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. **Science**, v.274, n.5291, Nov 22, p.1363-6. 1996.
- HAMAI, A. *et al.* Imatinib enhances human melanoma cell susceptibility to TRAIL-induced cell death: Relationship to Bcl-2 family and caspase activation. **Oncogene**, v.25, n.58, Dec 7, p.7618-34. 2006.
- HANAHAN, D. ;WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, n.1, Jan 7, p.57-70. 2000.
- HEHLMANN, R. *et al.* Chronic myeloid leukaemia. **Lancet**, v.370, n.9584, Jul 28, p.342-50. 2007.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, n.6805, Oct 12, p.770-6. 2000.
- HENSON, E. S. *et al.* The role of TRAIL death receptors in the treatment of hematological malignancies. **Leuk. Lymphoma**, v.49, n.1, Jan, p.27-35. 2008.
- HERBEUVAL, J. P. *et al.* Macrophages from cancer patients: analysis of TRAIL, TRAIL receptors, and colon tumor cell apoptosis. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.95, n.8, Apr 16, p.611-21. 2003.
- HITOMI, J. *et al.* Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. **J. Cell Biol.**, v.165, n.3, May 10, p.347-56. 2004.

- HORN, D. *et al.* Regulation of cell growth by recombinant oncostatin M. **Growth Factors**, v.2, n.2-3, p.157-65. 1990.
- HU, W. ;KAVANAGH, J. J. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. **Lancet Oncol.**, v.4, n.12, Dec, p.721-9. 2003.
- IHN, H. ;TAMAKI, K. Oncostatin M stimulates the growth of dermal fibroblasts via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. **J. Immunol.**, v.165, n.4, Aug 15, p.2149-55. 2000.
- KANTARJIAN, H. M. *et al.* New insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and imatinib resistance. **Ann. Intern. Med.**, v.145, n.12, Dec 19, p.913-23. 2006.
- KAUFMANN, S. H. ;EARNSHAW, W. C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. **Exp. Cell Res.**, v.256, n.1, Apr 10, p.42-9. 2000.
- KAYAGAKI, N. *et al.* Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. **J. Immunol.**, v.163, n.4, Aug 15, p.1906-13. 1999.
- KERFOOT, S. M. *et al.* Exclusive neutrophil recruitment with oncostatin M in a human system. **Am. J. Pathol.**, v.159, n.4, Oct, p.1531-9. 2001.
- KHARAS, M. G. ;FRUMAN, D. A. ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors. **Cancer Res.**, v.65, n.6, Mar 15, p.2047-53. 2005.
- KIM, Y. ;SEOL, D. W. TRAIL, a mighty apoptosis inducer. **Mol. Cells**, v.15, n.3, Jun 30, p.283-93. 2003.
- KIMBERLEY, F. C. ;SCREATON, G. R. Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. **Cell Res.**, v.14, n.5, Oct, p.359-72. 2004.
- KIRSHNER, J. R. *et al.* Identification of TRAIL as an interferon regulatory factor 3 transcriptional target. **J. Virol.**, v.79, n.14, Jul, p.9320-4. 2005.
- KOLIBABA, K. S. ;DRUKER, B. J. Protein tyrosine kinases and cancer. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1333, n.3, Dec 9, p.F217-48. 1997.
- KOORNSTRA, J. J. *et al.* Expression of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) and its receptors in normal colonic mucosa, adenomas, and carcinomas. **J. Pathol.**, v.200, n.3, Jul, p.327-35. 2003.
- KUJAWSKI, L. A. ;TALPAZ, M. The role of interferon-alpha in the treatment of chronic myeloid leukemia. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.18, n.5-6, Oct-Dec, p.459-71. 2007.
- LASSUS, P. *et al.* Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. **Science**, v.297, n.5585, Aug 23, p.1352-4. 2002.
- LAVRIK, I. *et al.* Death receptor signaling. **J. Cell Sci.**, v.118, n.Pt 2, Jan 15, p.265-7. 2005.

- LEBLANC, H. N. ;ASHKENAZI, A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. **Cell Death Differ.**, v.10, n.1, Jan, p.66-75. 2003.
- LIABAKK, N. B. *et al.* Development, characterization and use of monoclonal antibodies against sTRAIL: measurement of sTRAIL by ELISA. **J. Immunol. Methods**, v.259, n.1-2, Jan 1, p.119-28. 2002.
- LIM, Y. P. Mining the tumor phosphoproteome for cancer markers. **Clin. Cancer Res.**, v.11, n.9, May 1, p.3163-9. 2005.
- LIVAK, K. J. ;SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v.25, n.4, Dec, p.402-8. 2001.
- MACFARLANE, M. *et al.* Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. **J. Biol. Chem.**, v.277, n.39, Sep 27, p.36611-6. 2002.
- MALIK, N. *et al.* Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M. **Mol. Cell Biol.**, v.9, n.7, Jul, p.2847-53. 1989.
- MARTINEZ-LORENZO, M. J. *et al.* Involvement of APO2 ligand/TRAIL in activation-induced death of Jurkat and human peripheral blood T cells. **Eur. J. Immunol.**, v.28, n.9, Sep, p.2714-25. 1998.
- MARTINON, F. ;TSCHOPP, J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. **Cell Death Differ.**, v.14, n.1, Jan, p.10-22. 2007.
- MCCARTY, M. F. Targeting multiple signaling pathways as a strategy for managing prostate cancer: multifocal signal modulation therapy. **Integr. Cancer Ther.**, v.3, n.4, Dec, p.349-80. 2004.
- MELO, J. V. ;BARNES, D. J. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v.7, n.6, Jun, p.441-53. 2007.
- MERINO, D. *et al.* Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. **Mol. Cell Biol.**, v.26, n.19, Oct, p.7046-55. 2006.
- MICHOR, F. Chronic myeloid leukemia blast crisis arises from progenitors. **Stem Cells**, v.25, n.5, May, p.1114-8. 2007.
- MODUR, V. *et al.* Oncostatin M is a proinflammatory mediator. In vivo effects correlate with endothelial cell expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules. **J. Clin. Invest.**, v.100, n.1, Jul 1, p.158-68. 1997.
- MOREY, J. S. *et al.* Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. **Biol. Proced Online**, v.8, p.175-93. 2006.

- NIEBOROWSKA-SKORSKA, M. *et al.* Signal transducer and activator of transcription (STAT)5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH)3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis. **J. Exp. Med.**, v.189, n.8, Apr 19, p.1229-42. 1999.
- NIMMANAPALLI, R. *et al.* Cotreatment with STI-571 enhances tumor necrosis factor alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL or apo-2L)-induced apoptosis of Bcr-Abl-positive human acute leukemia cells. **Clin. Cancer Res.**, v.7, n.2, Feb, p.350-7. 2001.
- NOSAKA, T. *et al.* STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. **Embo J.**, v.18, n.17, Sep 1, p.4754-65. 1999.
- NOWELL, P. C. ;HUNGERFORD, D. A. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.25, Jul, p.85-109. 1960.
- O'CONNELL, J. *et al.* Fas counter-attack--the best form of tumor defense? **Nat. Med.**, v.5, n.3, Mar, p.267-8. 1999.
- OPFERMAN, J. T. Apoptosis in the development of the immune system. **Cell Death Differ.**, v.15, n.2, Feb, p.234-42. 2008.
- OUYANG, T. *et al.* Identification and characterization of a nuclear interacting partner of anaplastic lymphoma kinase (NIPA). **J. Biol. Chem.**, v.278, n.32, Aug 8, p.30028-36. 2003.
- PAN, G. *et al.* An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. **Science**, v.277, n.5327, Aug 8, p.815-8. 1997.
- PAN, G. *et al.* The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. **Science**, v.276, n.5309, Apr 4, p.111-3. 1997.
- PENDERGAST, A. M. *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, Oct 8, p.175-85. 1993.
- PETRILLI, V. *et al.* The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v.19, n.6, Dec, p.615-22. 2007.
- PITTI, R. M. *et al.* Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. **J. Biol. Chem.**, v.271, n.22, May 31, p.12687-90. 1996.
- POPNIKOLOV, N. K. *et al.* Downregulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L in Barrett's esophagus with dysplasia and adenocarcinoma. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.**, v.14, n.2, Jun, p.161-5. 2006.
- QUACKENBUSH, R. C. *et al.* 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, May 1, p.2913-21. 2000.

- RAITANO, A. B. *et al.* Signal transduction by wild-type and leukemogenic Abl proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1333, n.3, Dec 9, p.F201-16. 1997.
- RATHMELL, J. C. ;THOMPSON, C. B. The central effectors of cell death in the immune system. **Annu. Rev. Immunol.**, v.17, p.781-828. 1999.
- RAVANDI, F. *et al.* Expression of apoptosis proteins in chronic myelogenous leukemia: associations and significance. **Cancer**, v.91, n.11, Jun 1, p.1964-72. 2001.
- REED, J. C. Drug insight: cancer therapy strategies based on restoration of endogenous cell death mechanisms. **Nat. Clin. Pract. Oncol.**, v.3, n.7, Jul, p.388-98. 2006.
- REED, J. C. ;PELLECCHIA, M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. **Blood**, v.106, n.2, Jul 15, p.408-18. 2005.
- ROSE, T. M. ;BRUCE, A. G. Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukemia-inhibitory factor, granulocyte colony-stimulating factor, and interleukin 6. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, n.19, Oct 1, p.8641-5. 1991.
- ROTHSTEIN, T. L. Inducible resistance to Fas-mediated apoptosis in B cells. **Cell Res.**, v.10, n.4, Dec, p.245-66. 2000.
- ROWINSKY, E. K. Targeted induction of apoptosis in cancer management: the emerging role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor activating agents. **J. Clin. Oncol.**, v.23, n.36, Dec 20, p.9394-407. 2005.
- RYCHAHOU, P. G. *et al.* Targeted RNA interference of PI3K pathway components sensitizes colon cancer cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). **Surgery**, v.138, n.2, Aug, p.391-7. 2005.
- SALESSE, S. ;VERFAILLIE, C. M. BCR/ABL: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. **Oncogene**, v.21, n.56, Dec 9, p.8547-59. 2002.
- SATTLER, M. ;SALGIA, R. Activation of hematopoietic growth factor signal transduction pathways by the human oncogene BCR/ABL. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.8, n.1, Mar, p.63-79. 1997.
- SAWYERS, C. Targeted cancer therapy. **Nature**, v.432, n.7015, Nov 18, p.294-7. 2004.
- SAYERS, T. J. ;MURPHY, W. J. Combining proteasome inhibition with TNF-related apoptosis-inducing ligand (Apo2L/TRAIL) for cancer therapy. **Cancer Immunol. Immunother.**, v.55, n.1, Jan, p.76-84. 2006.
- SCHNEIDER, T. J. *et al.* A novel gene coding for a Fas apoptosis inhibitory molecule (FAIM) isolated from inducibly Fas-resistant B lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v.189, n.6, Mar 15, p.949-56. 1999.

- SCHULZE-OSTHOFF, K. *et al.* Apoptosis signaling by death receptors. **Eur. J. Biochem.**, v.254, n.3, Jun 15, p.439-59. 1998.
- SCREATON, G. R. *et al.* TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. **Curr. Biol.**, v.7, n.9, Sep 1, p.693-6. 1997.
- SEKI, N. *et al.* Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis is an important endogenous mechanism for resistance to liver metastases in murine renal cancer. **Cancer Res.**, v.63, n.1, Jan 1, p.207-13. 2003.
- SELLERI, C. ;MACIEJEWSKI, J. P. The role of FAS-mediated apoptosis in chronic myelogenous leukemia. **Leuk. Lymphoma**, v.37, n.3-4, Apr, p.283-97. 2000.
- SESSIONS, J. Chronic myeloid leukemia in 2007. **J. Manag. Care Pharm.**, v.13, n.8 Suppl A, Oct, p.4-7. 2007.
- SHACHAF, C. M. ;FELSHER, D. W. Rehabilitation of cancer through oncogene inactivation. **Trends Mol. Med.**, v.11, n.7, Jul, p.316-21. 2005.
- SHANKAR, S. ;SRIVASTAVA, R. K. Enhancement of therapeutic potential of TRAIL by cancer chemotherapy and irradiation: mechanisms and clinical implications. **Drug Resist. Updat.**, v.7, n.2, Apr, p.139-56. 2004.
- SHARPE, J. C. *et al.* Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1644, n.2-3, Mar 1, p.107-13. 2004.
- SHET, A. S. *et al.* Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. **Leukemia**, v.16, n.8, Aug, p.1402-11. 2002.
- SHIVAPURKAR, N. *et al.* Aberrant methylation of trail decoy receptor genes is frequent in multiple tumor types. **Int. J. Cancer**, v.109, n.5, May 1, p.786-92. 2004.
- SLUPIANEK, A. *et al.* Role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase-mediated lymphomagenesis. **Cancer Res.**, v.61, n.5, Mar 1, p.2194-9. 2001.
- SMYTH, M. J. *et al.* Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. **Immunity**, v.18, n.1, Jan, p.1-6. 2003.
- SOKAL, J. E. *et al.* Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. **Blood**, v.63, n.4, Apr, p.789-99. 1984.
- SONG, G. *et al.* The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. **J. Cell Mol. Med.**, v.9, n.1, Jan-Mar, p.59-71. 2005.

STANDER, S. ;SCHWARZ, T. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is expressed in normal skin and cutaneous inflammatory diseases, but not in chronically UV-exposed skin and non-melanoma skin cancer. **Am. J. Dermatopathol.**, v.27, n.2, Apr, p.116-21. 2005.

STEELMAN, L. S. *et al.* JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. **Leukemia**, v.18, n.2, Feb, p.189-218. 2004.

STRATER, J. *et al.* Expression of TRAIL and TRAIL receptors in colon carcinoma: TRAIL-R1 is an independent prognostic parameter. **Clin. Cancer Res.**, v.8, n.12, Dec, p.3734-40. 2002.

SU, H. *et al.* Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. **Science**, v.307, n.5714, Mar 4, p.1465-8. 2005.

SUN, S. Y. *et al.* Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.96, n.9, May 5, p.662-72. 2004.

SUN, Y. Targeting E3 ubiquitin ligases for cancer therapy. **Cancer Biol. Ther.**, v.2, n.6, Nov-Dec, p.623-9. 2003.

TANAKA, H. *et al.* Treatment with IFNalpha in vivo up-regulates serum-soluble TNF-related apoptosis inducing ligand (sTRAIL) levels and TRAIL mRNA expressions in neutrophils in chronic myelogenous leukemia patients. **Eur. J. Haematol.**, v.78, n.5, May, p.389-98. 2007.

TANAKA, M. ;MIYAJIMA, A. Oncostatin M, a multifunctional cytokine. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v.149, p.39-52. 2003.

TECCHIO, C. *et al.* IFNalpha-stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells. **Blood**, v.103, n.10, May 15, p.3837-44. 2004.

TENG, M. S. *et al.* A study of TRAIL receptors in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.131, n.5, May, p.407-12. 2005.

UNO, K. *et al.* TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) frequently induces apoptosis in Philadelphia chromosome-positive leukemia cells. **Blood**, v.101, n.9, May 1, p.3658-67. 2003.

VIATOUR, P. *et al.* Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. **Trends Biochem. Sci.**, v.30, n.1, Jan, p.43-52. 2005.

VIGNESWARAN, N. *et al.* Repression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) but not its receptors during oral cancer progression. **BMC Cancer**, v.7, p.108. 2007.

VLAHOVIC, G. ;CRAWFORD, J. Activation of tyrosine kinases in cancer. **Oncologist**, v.8, n.6, p.531-8. 2003.

- WALKER, P. R. *et al.* Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back. **J. Immunol.**, v.158, n.10, May 15, p.4521-4. 1997.
- WANG, J. Y. Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. **Oncogene**, v.19, n.49, Nov 20, p.5643-50. 2000.
- WEI, X. D. *et al.* [MEKK2 regulates the production of interleukin 2]. **Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi**, v.26, n.5, May, p.296-8. 2005.
- WILEY, S. R. *et al.* Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. **Immunity**, v.3, n.6, Dec, p.673-82. 1995.
- WONG, D. C. *et al.* Targeting early apoptotic genes in batch and fed-batch CHO cell cultures. **Biotechnol. Bioeng.**, v.95, n.3, Oct 20, p.350-61. 2006.
- ZAMAI, L. *et al.* TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis. **Blood**, v.95, n.12, Jun 15, p.3716-24. 2000.
- ZARLING, J. M. *et al.* Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.83, n.24, Dec, p.9739-43. 1986.
- ZHAO, S. *et al.* Functional expression of TRAIL by lymphoid and myeloid tumour cells. **Br. J. Haematol.**, v.106, n.3, Sep, p.827-32. 1999.
- ZHONG, X. *et al.* An alternatively spliced long form of Fas apoptosis inhibitory molecule (FAIM) with tissue-specific expression in the brain. **Mol. Immunol.**, v.38, n.1, Jan, p.65-72. 2001.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1- Esquematização dos cinco receptores de TRAIL. Os domínios extracelulares estão representados em configuração oval destacando em amarelo o primeiro domínio rico em cisteína (CRD1); em vermelho estão os domínios de morte presentes apenas nos receptores DR4 e DR5 (KIMBERLEY e SCREATON, 2004).

	1	11	21	31	41	51	61	71	81
mouse short	-----				MTDLVAVWDVALSDGVHKIEFEHGTTSGKRVVYVDGKEEIRREWMFKLVGKETFFV				
hu isoform c	-----				MTDLVAVWDVALSDGVHKIEFEHGTTSGKRVVYVDGKEEIRREWMFKLVGKETFFV				
mouse long	-----MASGDDSPIFEDDE--				SPLYSLKMTDLVAVWDVALSDGVHKIEFEHGTTSGKRVVYVDGKEEIRREWMFKLVGKETFFV				
hu isoform b	-----MASGDDSPIFEDDE--				SPPYSLEKMTDLVAVWDVALSDGVHKIEFEHGTTSGKRVVYVDGKEEIRREWMFKLVGKETFFV				
hu isoform a	MLLPFIRTLPLLCYNHLLVSP				SATLSPPYSLEKMTDLVAVWDVALSDGVHKIEFEHGTTSGKRVVYVDGKEEIRREWMFKLVGKETFFV				
Consensus	d				sp	yslekmtdlvavwdvalsdgvhkiefehgttsgkrvvvyvdgkeeirkewmfklvgketfyv			
	91	101	111	121	131	141	151	161	171
mouse short	GAAKTKATINIDAI				SGFAYEYTLIDGKSLKKYME	NRSKTTSTVVLRLDGEDLRV	VLEKDTMDVWCNGQK	NETAGEFVDDGTETHFSVGN	
hu isoform c	GAAKTKATINIDAI				SGFAYEYTLIDGKSLKKYME	DRSKTTNTVVLHMDGEN	FRIVLEKAMDVWCNGK	KETAGEFVDDGTETHFSIGN	
mouse long	GAAKTKATINIDAI				SGFAYEYTLIDGKSLKKYME	NRSKTTSTVVLRLDGEDLRV	VLEKDTMDVWCNGQK	NETAGEFVDDGTETHFSVGN	
hu isoform b	GAAKTKATINIDAI				SGFAYEYTLIDGKSLKKYME	DRSKTTNTVVLHMDGEN	FRIVLEKAMDVWCNGK	KETAGEFVDDGTETHFSIGN	
hu isoform a	GAAKTKATINIDAI				SGFAYEYTLIDGKSLKKYME	DRSKTTNTVVLHMDGEN	FRIVLEKAMDVWCNGK	KETAGEFVDDGTETHFSIGN	
Consensus	gaaktkatinida				isgfayeyleingkslkkymedrsktntvvlhmdgenfrivlekdamdvwcngkkletagefvddgtethfsign				
	181	191	201	211	221	231	241	251	261
mouse short	HGCYIKAVSSGR				KRKEGIHTLI	VDNREIPE	ITQ		
hu isoform c	HDCYIKAVSSGR				KRKEGIHTLI	VDNREIPE	IAS		
mouse long	HGCYIKAVSSGR				KRKEGIHTLI	VDNREIPE	ITQ		
hu isoform b	HDCYIKAVSSGR				KRKEGIHTLI	VDNREIPE	IAS		
hu isoform a	HDCYIKAVSSGR				KRKEGIHTLI	VDNREIPE	IAS		
Consensus	hdcyikavssg				krkegihtli	vdnreipeias			

Anexo 2- Alinhamento das diferentes isoformas de FAIM murino e humano. Realizado através do programa Jellifish.

Human	M A A P C E G Q A F A V G V E K N W G A V V R S F E G T P Q K I R Q L I D E G I A P E E G S V D A K	90
Mouse	M A A T S E G P L F A A S I E K T W G S V V R S F E G T P Q K V R E L I D E G I V P E E G G T E F K	90
Human	D T S A T S Q S V N G S P Q A E Q P S L E S T S K E A F F S R V E T F S S L K W A G K P F E L S P L	100
Mouse	D T A A T F Q S V D G S P Q S E Q S P L E S T S K E A F F H R V E T F S S L K W A G K P F E L S P L	100
Human	V C A K Y G W V T V E C D M L K C S S C Q A F L C A S L Q P A F D F D R Y K Q R C A E L K K A L C T	150
Mouse	I C A K Y G W V T V E C D M L K C S S C Q A F L C A S L Q P T F D F G R Y K E R C A E L K K S L C S	150
Human	A H E K F C F W P D S P S P D R F G M L P L D E P A I L V S E F L D R F Q S L C H L D L Q L P S L R	200
Mouse	A H E K F C F W P D S P S P D R F G M L P L G E P A V L I S E F L D R F Q S L C H L D L Q L P S L R	200
Human	P E D L K T M C L T E D K I S L L L H L L E D E L D H R T D E R K T T I K L G S D I Q V H V T A C I	250
Mouse	P E D L K T M C L T E D A V S A L L H L L E D E L D F H A D D R K T T S K L G S D V Q V Q A T A C V	250
Human	L S V C G W A C S S L E S M Q L S L I T C S Q C M R K V G L W G F Q Q I E S S M T D L D A S F G L	300
Mouse	L S L C G W A C S S L E P T Q L S L I T C Y Q C M R K V G L W G F Q Q I E S S M T D L E A B F G L	299
Human	T S S P I P G L E G R P E R L P L V P E S P R R M M T R S Q D A T F S P G S E Q A E K S P G P I V S	350
Mouse	T S S P I P G V E G R P E H F P L V P E S P R R M M T R S Q D A T V S P G S E Q S E K S P G P I V S	349
Human	R T R S W D S S S P V D R P E P E A A S P T T R T R P V T R S M G T G D T P G L E V P S S P L R K A	400
Mouse	R T R S W E S S S P V D R P E L E A A S P T T R S R P V T R S M G T G D S A G V E V P S S P L R R T	399
Human	K R A R L C S S S S S D T S P S R S F F D P T S Q H R D W C P W V N I T L G K E S R E N G T E P D A	450
Mouse	K R A R L C S S S S S D T S P R S F F D P T S Q H R D W C P W V N I T L V K E T K E N G E T E V D A	449
Human	S A P A E P G W K A V L T I L L A H K Q S S Q P A E T D S M S L S E K S R K V F R I F R Q W E S L C	500
Mouse	C T P A E P G W K A V L T I L L A H K R S N Q P A E T D S M S L S E K S R K V F R I F R Q W E S S S	499
Human	S C 502	
Mouse	S S 501	

Anexo 3: Alinhamento das seqüências de aminoácidos de NIPA humano e camundongo. O domínio NLS de localização nuclear está sublinhado, as seqüências de resíduos de tirosina Tyr-105, Tyr-137 e o sítio de serina 354 de fosforilação estão indicados. (OUYANG *et al.*, 2003).

linhagem celular	Descrição
K562	Isolada de efusão pleural de uma paciente com 53 anos em fase terminal da crise blástica. Linhagem de origem hematopoiética, multipotente que se diferencia espontaneamente em precursores das séries eritrocítica, granulocítica e monocítica.
KCL22	Linhagem celular de leucemia mielóide crônica estabelecida da efusão pleural de uma paciente com 32 anos em crise blástica mielóide.
LAMA-84	Linhagem celular de leucemia mielóide crônica estabelecida do sangue periférico de uma paciente com 29 anos na fase blástica. Essa linhagem tem características morfológicas de blastos da linhagem megacariocítica
HL-60	Linhagem humana derivada de leucemia promielocítica aguda, que possui uma alta expressão de c-myc e é extremamente sensível à apoptose.
HL60.BcrAbl	HL60 infectada com o plasmídeo pSRaMSNtkneo.p185Bcr-Abl. Essa linhagem é extremamente resistente à apoptose.
HeLa	Linhagem epitelial humana isolada de carcinoma cervical, transformada pelo papilomavírus humano 18 (HPV18). A expressão de p53 nessa linhagem é baixa.
HeLa.BcrAbl	HeLa infectada com o plasmídeo pSRaMSNtkneo.p185Bcr-Abl. Resistente à apoptose.
SKW6.4	Linfócito B humano transformado pelo vírus Epstein-Barr (EBV).
SKW6.4.BcrAbl	SKW6.4 infectada com o plasmídeo pSRaMSNtkneo.p185Bcr-Abl. Essa linhagem é sensível à apoptose apesar da presença do Bcr-Abl.
THP1	Monócito humano derivado de leucemia monocítica aguda.
THP1.BcrAbl	THP1 infectada com o plasmídeo pSRaMSNtkneo.p185Bcr-Abl.
293T	Linhagem celular altamente transfectável, derivada de epitélio renal humano. Utilizada para produzir partículas retrovirais.

Anexo 4- Tabela com a descrição das linhagens celulares utilizadas.

Maria Amorim
LGC Scientific Supply, Inc.
Building C104
10411 NW 28TH Street
Doral, FL 33172

January 8, 2008

RE: Human TRAIL R1/TNFRSF10A Monoclonal Antibody (Clone 69036)

Dear Investigator:

Our records indicate that you recently purchased 1 vial(s) of Human TRAIL R1/TNFRSF10A Monoclonal Antibody (Clone 69036) (Catalog # MAB347), lot number(s) FPS016051 from purchase order number(s) 2757-6093. **If you are the end user of this product, please be aware of the following information. If you are not the end user, please provide the end user with a copy of this letter.**

As part of R&D Systems' commitment to quality and customer service, we would like to notify you of a potential problem with the above product. Through additional testing we determined that MAB347, Human TRAIL R1/TNFRSF10A MAb (Clone 69036) is not suitable for Western blotting. Specifically, when tested side-by-side with AF347 (Human TRAIL R1/TNFRSF10A Affinity Purified Polyclonal Antibody), MAB347 did not react with a ~55 kDa band detected by AF347 in natural samples. Consequently, we are removing Western blotting as a validated application for this antibody. This change does not impact the flow cytometry application of MAB347; tests performed at R&D Systems confirm that MAB347 will give reliable and specific cell-surface staining in flow cytometry. Competition experiments with other TRAIL R1 antibodies demonstrate that the staining observed with MAB347 is specific for TRAIL R1. If you used this antibody for Western blotting, we would like to offer AF347, as a replacement product. To obtain a vial of AF347 for Western blotting, or if you have additional questions about MAB347, please contact R&D Systems' Technical Service Department at 1-800-343-7475 or 1-612-379-2956.

We apologize for any inconvenience that this problem may have caused and look forward to serving you in the future.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink that reads 'Shelley Falvey'.

Shelley Falvey
Assistant Director, Quality and Regulatory Affairs

Reference: FN010808-MAB347