UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeito dos inibidores de tirosina-quinase sobre a *maquinaria*
apoptótica na leucemia mielóide crônica**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do
Título de Mestre em Biociências Aplicadas à
Farmácia Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Aline Fernanda Ferreira
Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Attié de
Castro

Ribeirão Preto
2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha Catalográfica

Ferreira, Aline Fernanda

Efeitos dos inibidores de tirosina-quinase sobre a *maquinaria apoptótica* na Leucemia Mielóide Crônica. Ribeirão Preto, 2007.

98 p. : il. ; 30cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Castro, Fabíola Attié.

1. Apoptose. 2. Leucemia Mielóide Crônica. 3. Inibidores de Tirosina-quinase. 4. Expressão gênica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aline Fernanda Ferreira

Efeitos dos inibidores de tirosina-quinase sobre a maquinaria apoptótica na Leucemia Mielóide Crônica.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador(a): Prof. Dra. Fabíola Attié de Castro

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho,

Primeiramente a Deus por ter me guiado em todos os momentos durante toda a minha formação;

Ao meu Pai Waldyr (in memorian), que certamente estaria muito orgulhoso por essa conquista;

À minha Mãe Ivone por sempre estar ao meu lado e ser um exemplo de vida, caráter e amor;

À minha irmã Silvia que tanto me incentivou e me apoiou para que eu chegasse até aqui;

Ao meu irmão Eduardo, que sempre me deu força e esteve presente em minha vida;

À minha orientadora Fabíola pelos ensinamentos, paciência e amizade.

Agradecimentos

Aos pacientes por terem doado as amostras, pois sem estas, seria impossível a realização deste trabalho;

À Prof. Dra. Fabíola Attié de Castro por sua atenção, ensinamentos, dedicação e disponibilidade durante o decorrer deste trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento dessa pesquisa (05/57746-8 e 06/50094-8).

À Dra. Simone Kashima Haddad pela amizade, colaboração e ensinamentos prestados durante todo o curso;

Ao Dr. Dimas Tadeu Covas, por ter permitido a realização dos experimentos de biologia molecular no Hemocentro de Ribeirão Preto, cuja instituição é presidente;

Às amigas e funcionárias Evandra e Rochele do laboratório de biologia molecular do Hemocentro-Ribeirão Preto pela amizade e auxílio prestado;

Às amigas Gislane, Elaine e Raquel do laboratório de hematologia da FCFRP pela amizade e colaboração;

Às amigas Paula, Ana Valéria e Lucila pela força e amizade;

Ao Sr. Luís do laboratório de transferência gênica do Hemocentro de Ribeirão Preto pelas sugestões e auxílios prestados;

A todos os amigos do laboratório de biologia molecular do Hemocentro de Ribeirão Preto pela amizade, incentivo e lealdade;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade que me foi concedida.

“A ciência é contínua, sem preconceitos, e um processo onde a liberdade é fundamental. Por isso erramos tanto. A possibilidade de erros é a condição da liberdade. A vontade de aprender com os erros, de prosseguir experimentando apesar das decepções repetidas fazem parte do verdadeiro espírito científico”. Eloi S. Garcia.

RESUMO

FERREIRA, Aline Fernanda. Efeitos dos inibidores de tirosina-quinase sobre a *maquinaria apoptótica* na Leucemia Mielóide Crônica. 2007. 98f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa, resultante da expansão clonal da célula-tronco hematopoética pluripotente. A fisiopatologia da LMC está associada a uma translocação entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, o que promove o aparecimento do neogene *bcr-abl*, cujo gene codifica uma proteína denominada Bcr-Abl. A oncoproteína Bcr-Abl possui atividade tirosina-quinase constitutiva que é a responsável pelo fenótipo maligno da célula, incluindo resistência à apoptose. O tratamento da LMC pode ser realizado com hidroxiuréia, IFN- α associado à citarabina, inibidores de TK (mesilato de imatinibe e dasatinibe) e transplante de medula óssea. O tratamento de escolha para pacientes com LMC na fase crônica é o inibidor de tirosina-quinase mesilato de imatinibe e para os refratários utiliza-se o dasatinibe. Apesar do conhecimento acerca do mecanismo de ação dos inibidores de TK, pouco se sabe sobre seu efeito na maquinaria apoptótica. Sendo assim, no presente trabalho foi detectada a expressão dos genes e proteínas anti- (A1, Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, C-Flip, Ciap-1, Ciap-2 e Mcl-1) e pró-apoptóticos (Bad, Bak, Bax, Bcl-X_S, Bid, Bik, Bimel, Bmf, Bok, Fas, Fasl, Noxa e Puma) em células mononucleares de 32 indivíduos saudáveis e 26 pacientes com LMC antes e após 12 meses da terapia com mesilato de imatinibe e dasatinibe. Dentre os 26 pacientes avaliados, 13 eram do sexo feminino e 13 do sexo masculino, três eram negros, um amarelo e 22 brancos, com idade média de 48 anos (faixa etária de 25 a 77 anos). O grupo controle foi composto por 32 indivíduos, 16 do sexo feminino e 16 do sexo masculino, 26 eram brancos, quatro negros e dois amarelos, com idade média de 45 anos (idade de 23 a 77 anos). O isolamento das células mononucleares foi realizado pelo método de Ficoll-Hypaque, a determinação da expressão gênica por PCR em tempo real e a protéica por *western-blot*. Os resultados foram expressos em unidade relativa de expressão (U.R.E.), comparados entre os diferentes grupos (controle e pacientes pré- e pós-tratamento), associados à resposta aos medicamentos e correlacionados ao índice de prognóstico de SOKAL. Na comparação dos dados de expressão gênica entre pacientes e controles, verificou-se que os pacientes apresentaram maior expressão dos genes *bcl-x_L*, *c-flip*, *mcl-1* e *fas* e níveis reduzidos de *bik*.

O mesilato de imatinibe modulou significativamente a transcrição dos genes *bcl-x_L*, *bok*, *mcl-1* e *noxa*, enquanto que o dasatinibe agiu sobre a expressão dos genes *a1*, *bmf*, *c-flip*, *ciap-1*, *ciap-2* e *mcl-1*. Os pacientes refratários ao mesilato de imatinibe apresentaram níveis elevados de expressão de *a1* e *c-flip* e reduzida expressão de *bcl-2*, *ciap-2*, *bak*, *bax*, *bid* e *fasl* em relação aos pacientes em remissão. A expressão protéica refletiu os dados da quantificação do RNAm dos genes. Os dados da presente investigação indicam que as células mononucleares dos pacientes com LMC apresentam desregulação do processo de apoptose celular. Essa alteração pode ser parcialmente associada ao fenótipo de resistência das células leucêmicas Bcr-Abl⁺ à apoptose e ausência de resposta aos inibidores de TK. Os dados revelam ainda que os inibidores de tirosina-quinase interferem na transcrição e tradução das moléculas envolvidas na regulação do processo de apoptose.

Palavras chave: Apoptose, Leucemia Mielóide Crônica, Inibidores de Tirosina-quinase e Expressão gênica.

ABSTRACT

FERREIRA, Aline Fernanda. The effect of tyrosine-kinase inhibitors on the apoptosis machinery in chronic myeloid leukemia. 2007. 98f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disease resultant of a clonal expansion of pluripotent hematopoietic stem cells. The CML physiopathology is associated with a translocation between chromosomes 9 and 22 long arms, promoting the formation of a *bcr-abl* neogene, which codifies the Bcr-Abl protein. The Bcr-Abl oncoprotein presents tyrosine-kinase activity that is responsible for the malign phenotype which includes apoptosis resistance. CML treatment may be performed with hydroxyurea, IFN- α plus cytarabine, tyrosine-kinase inhibitors (imatinib mesylate and dasatinib) and bone marrow transplantation. The standard treatment for CML patients in chronic phase is the tyrosine-kinase inhibitor imatinib mesylate (IM) and for IM-refractory patients dasatinib is employed. Despite of the knowledge related to the mechanism of action of tyrosine-kinase inhibitors, little is known about its effects on the apoptosis machinery. In this work we characterized both the mRNA and protein patterns of expression of the anti- (A1, Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, C-Flip, Ciap-1, Ciap-2 e Mcl-1) and pro-apoptotic (Bad, Bak, Bax, Bcl-X_s, Bid, Bik, Bimel, Bmf, Bok, Fas, Fasl, Noxa e Puma) regulators in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 32 healthy individual and 26 CML patients before and after 12 months of imatinib mesylate and dasatinib therapy. Thirteen patients were female and thirteen were male, three were black, one was japanese and 22 were white, the mean age was 48 years (varying from 25 to 77 years). The control group was composed of 32 individuals, 16 were female and 16 were male, 26 were white, four black and two japanese, the mean age was 45 years (varying from 23 to 77 years).

PBMC isolation was performed by Ficoll-Hypaque, gene expression was assessed by real time PCR and protein expression was carried out by *western-blot* methodology. Results were given by the relative expression, after comparison between the different groups (control and patients before and after treatment), associated with drug response and related to Sokal index. The comparison of gene expression profiles between patients and controls showed that CML patients present increased levels of *bcl-x_L*, *c-flip*, *mcl-1* and *fas* expression and reduced levels of *bik* gene expression. The imatinib mesylate significantly modulated the transcription of *bcl-x_L*, *bok*, *mcl-1* and *noxa*, whereas dasatinib affected the expression of *a1*, *bmf*, *c-flip*, *ciap-1*, *ciap-2* and *mcl-1*. IM-refractory patients present higher levels of *a1* and *c-flip* and lower levels of *bcl-2*, *ciap-2*, *bak*, *bax*, *bid* and *fasl* when compared to patients who achieved complete cytogenetic response. Overall, the patterns of protein expression agree with the profiles of mRNA expression. Taken together, the results described in this investigation indicate that PBMC from CML patients present deregulation in cell death pathways. These alterations could partly account for the apoptosis resistance phenotype observed in Bcr-Abl⁺ leukemic cells and for lack of response to tyrosine kinase inhibitors. Furthermore, our data also reveal that tyrosine kinase inhibitors interfere in the transcription and translation of molecules that regulate the apoptosis process.

Keywords: Apoptosis, Chronic Myeloid Leukemia, Tyrosine kinase inhibitors and gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1. Cariótipo de um paciente com LMC positivo para cromossomo Philadelphia	5
Figura 2. Translocação entre os cromossomos 9 e 22	6
Figura 3. Esquema da via extrínseca da apoptose	16
Figura 4. Esquema da via intrínseca da apoptose	17

Resultados

Figuras 1 a 4 - Expressão dos genes anti-apoptóticos <i>bcl-x_L</i> , <i>mcl-1</i> , <i>c-flip</i> e <i>ciap-2</i> nos controles e pacientes com LMC pré e pós-tratamento com mesilato de imatinibe	35
Figuras 5 a 11 - Expressão dos genes anti-apoptóticos <i>bcl-x_L</i> , <i>bcl-w</i> , <i>a1</i> , <i>mcl-1</i> , <i>c-flip</i> , <i>ciap-1</i> e <i>ciap-2</i> nos controles e pacientes com LMC pré e pós-tratamento com dasatinibe.....	37
Figuras 12 a 15 - Expressão dos genes pró-apoptóticos <i>bok</i> , <i>nox</i> , <i>bik</i> e <i>fas</i> nos controles e pacientes com LMC pré e pós-tratamento com mesilato de imatinibe	42
Figuras 16 a 19 - Expressão dos genes pró-apoptóticos <i>bok</i> , <i>bak</i> , <i>bik</i> e <i>bmf</i> nos controles e pacientes com LMC pré e pós-tratamento com dasatinibe	44
Figuras 20 a 24 - Expressão dos genes anti-apoptóticos <i>bcl-2</i> , <i>ciap-2</i> , <i>a1</i> , <i>mcl-1</i> e <i>c-flip</i> nos pacientes com LMC em remissão citogenética completa e refratários ao mesilato de imatinibe	47
Figuras 25 a 28 - Expressão dos genes pró-apoptóticos <i>bak</i> , <i>bax</i> , <i>bid</i> e <i>fasl</i> nos pacientes com LMC em remissão citogenética completa e refratários dasatinibe	50
Figuras 29 a 37 – Expressão protéica de A1, Bcl-x _L , Bcl-w, Bcl-2, c-Flip, Mcl-1 e Bad em quatro pacientes portadores de LMC antes e após o tratamento com mesilato de imatinibe.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização demográfica dos pacientes com LMC, medicamento utilizado, resposta ao tratamento e índice de Sokal	23
Tabela 2. Caracterização demográfica dos controles	24
Tabela 3. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos cDNAs dos pacientes, tamanho do fragmento amplificado por PCR em tempo real e temperatura de anelamento (TA) padronizada	28
Tabela 4. Expressão dos genes anti-apoptóticos nos grupos controle, pré e pós-tratamento com mesilato de imatinibe	37
Tabela 5. Expressão do gene anti-apoptótico <i>bcl-2</i> nos grupos controle, pré e pós-tratamento com dasatinibe	41
Tabela 6. Expressão dos genes pró-apoptóticos nos grupos controle, pré e pós-tratamento com dasatinibe.....	44
Tabela 7. Expressão dos genes pró-apoptóticos nos grupos controle, pré e pós-tratamento com mesilato de imatinibe	46
Tabela 8. Dados da expressão relativa dos genes obtidos por meio das análises estatísticas entre pacientes com LMC em remissão e refratários ao dasatinibe	49
Tabela 9. Valores da média e do p nas análises não significantes entre o grupo de pacientes com LMC em remissão e refratários ao mesilato de imatinibe	52
Tabela 10. Valores dos coeficientes de correlação de Spearman - URE x Sokal.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abl – *Abelson murine leukemia viral oncogene*
 AIF – *Apoptosis-Inducing Factor*
 AKT – *Serine/threonine-specific protein kinase*
 APAF-1 – *Apoptosis Protease-Activator Factor 1*
 ATP – *adenosina trifosfato*
 Bad – *Bcl-2 antagonist of the cell death*
 Bak – *Bcl-2 homologous antagonist/killer*
 Bax – *Bcl-2 associated X protein*
 Bcl-x – *Bcl-2 related gene*
 Bcl-w – *antiapoptotic bcl-2 family member*
 Bcl-2 – *B-cell CLL / Lymphoma 2*
 bcr-abl – *Philadelphia chromosome translocation t(9;22) (q34;q11)*
 BH domain – *Bcl-2 homology domain*
 Bid – *BH3-interacting domain agonist*
 Bik – *Bcl-2-interacting killer*
 Bim – *Bcl-2-interacting mediator*
 Bimel – *Bcl-2-like 11 (apoptosis facilitator)*
 BMF – *Bcl-2 modifying factor*
 Bok – *Bcl-2-related ovarian killer*
 Bcr – *“Breakpoint cluster region”*
 CASPASE – *Cysteine aspartic acid protease*
 c-DNA – *complementary DNA synthesized for reverse transcriptase*
 c-KIT – *stem cell factor receptor*
 c-IAP-1 – *Baculoviral IAP repeat-containing 2, apoptosis inhibitor 1*
 c-IAP-2 – *Baculoviral IAP repeat-containing 3, apoptosis inhibitor 2*
 Cyt c – *citocromo c*
 Ct – *cycle threshold*
 DD - *death domain*
 DED – *death effector domain*
 DIABLO – *Direct Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)- Binding Protein with Low PI*
 DAS - *dasatinibe*
 DISC – *Death Inducing Signaling Complex*

DNA - ácido desoxirribonucleico
DLI – *Donor lymphocyte infusion*
dNTP – desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DR – *Death receptor*
ECL- *enhanced chemiluminescent*
ERK1/2 – *Extracellular sinal-regulated kinases*
FADD – Fas-Associated Death Domain
Fas/CD95 – receptor de morte
FasL – *Fas ligand*
FISH – *Fluorescence in situ hybridization*
Flip – *Flice-inhibitory protein*
HLA – *human leukocyte antigen*
IAPs – *Inhibitory apoptosis proteins*
IFN- α - Interferon-alfa
IAP – proteína inibidora da apoptose
IL – Interleucina
JAK – tyrosine kinases of the Janus kinase family
kDa – kilodaltons
LLC – Leucemia Linfóide Crônica
LMA – Leucemia Mielóide Aguda
LMC – Leucemia Mielóide Crônica
MAPK – *Mitogen-activated protein-kinase*
Mcl-1 – *Myeloid cell leukemia*
MI – mesilato de imatinibe
NF- κ B – *Nuclear factor kappa B*
NOXA – *Proapoptotic BH3-only member of Bcl-2*
pM - picomol
Ph - Philadelphia
PBS – *Phosphate Buffered Saline*
PCR – *Polimerase Chain Reaction*
PI3K – *Phosphoinositide 3-kinase*
PUMA – *p53-up-regulated modulator of apoptosis*
RAS – *Ras association domain family*
RNA – ácido ribonucléico

RT-PCR – Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase

SMAC – *second mitochondria-derived activator of caspases*

STAT – *Signal transducer and activator of transcription*

TA – temperatura de anelamento do *primer*

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TK – tirosina quinase

TMO – Transplante de Medula Óssea

TRAIL – TNF related *apoptosis-inducing ligand*

TRADD – proteínas adaptadoras TNFR1 associada com DD

TNF – Fator de Necrose Tumoral

µg – Micrograma

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Leucemia Mielóide Crônica	2
1.1.1. Características Gerais	2
1.1.2. Bases Citogenéticas e Moleculares.....	3
1.1.3. Diagnóstico Clínico-laboratorial	6
1.1.4. Tratamento	7
1.2. Leucemia Mielóide Crônica e Apoptose	13
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Geral	19
2.2. Específicos	19
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	21
3.1. Casuística	21
3.2. Métodos.....	25
3.2.1. Isolamento das Células Mononucleares	25
3.2.2. Extração de RNA, Síntese de cDNA e PCR em Tempo Real Quantitativo	25
3.2.3. Extração de proteínas pelo método de Trizol [®]	29
3.2.4. <i>Western blot</i>	30
3.2.5. Cálculo do índice de Sokal	31
3.2.6. Análise estatística.....	31

4. RESULTADOS.....	34
4.1. Expressão dos genes anti-apoptóticos nos controles e pacientes com LMC pré e pós-tratamento com mesilato de imatinibe e dasatinibe	34
4.2. Análise da expressão dos genes pró-apoptóticos entre os grupos controle, pré- e pós-tratamento com mesilato de imatinibe e dasatinibe.....	41
4.3. Expressão dos genes anti-apoptóticos <i>a1</i> , <i>bcl-2</i> , <i>bcl-x_L</i> , <i>bcl-w</i> , <i>c-flip</i> , <i>ciap-1</i> , <i>ciap-2</i> e <i>mcl-1</i> nos grupos de pacientes com LMC em remissão citogenética e refratários após o tratamento com mesilato de imatinibe e dasatinibe	47
4.4. Expressão dos genes pró-apoptóticos nos grupos de pacientes com LMC em remissão citogenética e refratários após o tratamento com mesilato de imatinibe	50
4.5. Resultados dos experimentos de <i>western blot</i>	54
5. DISCUSSÃO	60
5.1. Discussão dos resultados da expressão dos genes anti-apoptóticos nos grupos controle, de pacientes pré- e pós-tratamento inibidores de tirosina-quinase.....	62
5.2. Discussão dos resultados da expressão dos genes pró-apoptóticos nos grupos controle, de pacientes pré- e pós-tratamento com inibidores de tirosina-quinase	68
5.3. Discussão dos resultados da expressão dos genes anti- e pró-apoptóticos de pacientes em remissão citogenética completa e refratários aos inibidores de TK.....	73
5.4. Discussão sobre a ausência de correlação do índice de Sokal com a expressão gênica	75
5.5. Discussão dos resultados obtidos por <i>western-blot</i>	76
6. CONCLUSÕES	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXO	94

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

I.1. Leucemia Mielóide Crônica

I.1.1. Características Gerais

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa, resultante da expansão clonal de uma célula hematopoética precursora (KANTARJIAN et al., 1995, FRAZER, et al., 2006; MELO, et al., 2007). Constitui 14% de todas as leucemias, com uma incidência anual de 1,2 casos por 100.000 pacientes, acomete principalmente os homens em relação às mulheres (na proporção de 2:1) e mais freqüentemente indivíduos na faixa etária entre 45 e 55 anos (FRAZER, et al., 2006). Segundo HEHLMANN e colaboradores (revisão 2007), nenhuma diferença étnica ou geográfica existe com relação à incidência ou freqüência em todo o mundo, porém, diferenças nas estratégias terapêuticas entre os países se dão devido à disponibilidade aos medicamentos de alto custo e modernas tecnologias de diagnóstico. A radiação ionizante em altas doses é o único fator de risco cuja e foi comprovada enquanto a exposição a agentes químicos e a predisposição genética parece exercer pouca influência no aparecimento e desenvolvimento da doença (DOLL & SMITH, 1968; D'ANTONIO, 2005; HEHLMANN, et al., 2007).

A LMC é uma doença trifásica, apresentando estágios de evolução distintos: fases crônica, acelerada e blástica. Alguns autores, como SHERBENOU e DRUKER (2007), consideram a fase acelerada e crise blástica como um estágio da doença, denominado fase acelerada. A definição precisa das fases da LMC ainda é motivo de debate entre os pesquisadores, mas o paciente que se apresenta em fase crônica possui melhor prognóstico em relação àqueles que se encaixam nas fases acelerada ou blástica (COTTA e BUESO-RAMOS, 2007).

A maioria dos pacientes com LMC é diagnosticada na fase crônica, fase em que os granulócitos maduros são produzidos normalmente e preservam suas funções e que as células progenitoras mielóides estão aumentadas no sangue periférico (MELO, et al., 2007; SHERBENOU e DRUKER, 2007). Na fase crônica grande parte dos pacientes é assintomática (20-40% dos casos) ou apresenta sinais e sintomas inespecíficos, tais como fadiga, anorexia, cansaço e sudorese.

A fase acelerada pode surgir em meses ou anos depois do diagnóstico da doença, dependendo principalmente da resposta do paciente ao tratamento instituído na fase crônica. Esta fase caracteriza-se pelo aumento do número de blastos e basófilos circulantes e alteração significativa na contagem de trombócitos. Na medula óssea há de blastos, porém a contagem fica abaixo de 20% (COTTA e BUESO-RAMOS, 2007). A progressão da fase acelerada para a blástica da LMC pode ser promovida pelo aparecimento de eventos adicionais de transformação celular como a duplicação do cromossomo Ph, trissomia do cromossomo 8, mutações ou deleções em genes supressores de tumor, como é o caso de p16 e p53 (MICHOR, 2007).

A fase blástica caracteriza-se pelo aumento de blastos (>20%) na medula óssea e sangue periférico, leucocitose e basofilia no sangue periférico, anemia e trombocitopenia (FADERL et al., 1999). Nessa fase, ocorre falha na maturação dos precursores mielóides malignos, que freqüentemente possuem anormalidades citogenéticas adicionais o que resulta na agudização LMC, a doença progride para uma leucemia linfóide ou mielóide aguda (HEANEY, et al., 2007).

I.1.2. Bases Citogenéticas e Moleculares

A LMC foi a primeira doença clonal maligna descrita como resultante de um processo de leucemogênese associado a uma lesão citogenética característica, o cromossomo "Philadelphia" (Ph) (RANDOLPH, 2005), descoberto em 1960 por Nowell e Hungerford (figura 1). O marcador citogenético da LMC foi identificado em 1973 como sendo resultante de uma translocação recíproca entre os cromossomos t(9;22)q(34;11) (NOWELL e HUNGERFORD, 1960). A proteína Bcr é uma serina/treonina quinase ativa que regula Ras-Raf-Mek-Erk (Mek – proteína quinase ativadora de mitógeno, Erk – quinase reguladora de sinal extracelular) sinalizando vias celulares por meio da fosforilação de AF-6, uma proteína ligante de Ras. O gene *bcr* é considerado um gene supressor de tumor por regular negativamente genes que promovem a proliferação celular (RESS e MOELLING, 2005). O gene *abl* está presente em células eucarióticas e codifica uma proteína com atividade tirosina-quinase nuclear com um importante papel na regulação da divisão e apoptose celular (JIN e WANG, 2007).

Segundo HEHLMANN e colaboradores (2007), a translocação entre os cromossomos 9 e 22 leva à justaposição do gene *abl* do cromossomo 9 e do gene *bcr* do cromossomo 22, o que culmina no aparecimento do neogene *bcr-abl* (KANTARJIAN, 1993; NEVIANI, et al., 2007).

O *bcr-abl* codifica a proteína Bcr-Abl que apresenta uma elevada e constitutiva atividade tirosina-quinase (TK). As TK exercem um controle crítico sobre o crescimento celular e diferenciação, dessa forma, sua desregulação pode levar ao aumento do potencial mitogênico da célula e à malignidade (DI BACCO et al., 2000; WEISBERG, et al., 2007; NEVIANI, et al., 2007).

A evidência de que a proteína quimérica Bcr-Abl estava associada ao desenvolvimento da LMC foi obtida em modelos *murinos* que mimetizavam a doença. Em um desses modelos, o camundongo após ter sido transplantado com medula óssea cujas células apresentavam um vetor retroviral com Bcr-Abl desenvolveu uma síndrome mieloproliferativa que possuía as características da LMC humana (DALEY, et al., 1990).

Na LMC, ao ocorrer a translocação dos cromossomos 9 e 22, dependendo do sítio de quebra do BCR, diferentes tamanhos de proteína podem ser originados, como o de p190, p210 e p230 kDa. A proteína p210 parece estar envolvida mais freqüentemente na patogênese da LMC e associada à indução de apoptose por drogas citostáticas e radiação ionizante (NISHII et al., 1996); a p190 está associada a um pior prognóstico da doença e a p230 à leucemia neutrofilica crônica (DI BACCO et al., 2000; NEVIANI, et al., 2007) (figura 2).

A expressão do neogene *bcr-abl* determina a transformação da célula progenitora hematopoética normal em maligna, gerada por meio de três mecanismos principais: alteração da adesão das células progenitoras às células estromais e à matriz extracelular, manutenção de um sinal mitogênico constante e resistência extrema a apoptose celular (DEININGER et al., 2000). Neste contexto, a célula progenitora escapa da regulação de seu processo de proliferação, já que a adesão à matriz extracelular e às células do estroma regula negativamente a proliferação. Por outro lado, a célula recebe um sinal de ativação mitogênica constante por meio da via RAS e MAP quinases, além de ter a sua susceptibilidade aos mecanismos apoptóticos diminuída. Estas alterações nos mecanismos reguladores da proliferação e morte da célula progenitora culminam com acúmulo de células leucêmicas Bcr-Abl positivas encontradas na LMC. (NEVIANI, et al., 2007).

A expressão de Bcr-Abl está envolvida no aparecimento da LMC em indivíduos na fase crônica da doença, por outro, os mecanismos celulares e moleculares que conduzem a progressão da doença para a fase acelerada e blástica ainda não foram elucidados (DEININGER et al., 2000). A instabilidade genética, consequência da translocação que originou o cromossomo Ph, provavelmente seria a responsável pelas aberrações cromossômicas adicionais ou mutações nas células leucêmicas e pela transformação da LMC.

Figura 1 – Cariótipo de um paciente com LMC positivo para cromossomo Philadelphia. As setas representam os cromossomos híbridos resultantes da translocação t(9;22).

Figura 2 – Translocação entre os cromossomos 9 e 22.

I.1.3. Diagnóstico Clínico-laboratorial

Os pacientes com LMC (85%) são diagnosticados na fase crônica da doença por exames laboratoriais hematológicos de rotina e 15% dos casos são diagnosticados quando o paciente se encontra na fase acelerada ou blástica (FADERL et al., 1999). Clinicamente, o paciente sintomático pode apresentar fadiga, perda de peso, sangramento, hepato-esplenomegalia, sudorese e desconforto abdominal.

Os exames laboratoriais realizados para diagnosticar pacientes com LMC são: hemograma, mielograma, biópsia medular, citogenética para detecção do cromossomo Ph e o método da reação em cadeia da polimerase para detecção do rearranjo *bcr-abl* (FADERL et al., 1999; HEHLMANN, et al., 2007). Os achados laboratoriais, hematológicos e citoquímicos característicos de um paciente portador de LMC na fase crônica são: hiperplasia granulocítica medular culminando com a proliferação exacerbada da série granulocítica no sangue periférico, presença de 5%

ou menos de blastos na medula óssea e atividade da fosfatase alcalina leucocitária diminuída.

A análise citogenética para detecção do cromossomo Ph é considerada o exame mais importante no diagnóstico diferencial da LMC com outras doenças mieloproliferativas. O Ph está presente em 95% dos pacientes, os demais 5% são diagnosticados pela demonstração do rearranjo *bcr-abl* pelo método da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e/ou FISH. A biologia molecular é extremamente útil nos casos em que a citogenética é incapaz de detectar nos pacientes o Ph ao diagnóstico e na pesquisa da doença residual mínima após tratamento com os inibidores da tirosina-quinase (BAO, et al., 2007).

Considera-se em remissão hematológica o paciente que apresentar as contagens globais de hemácias, leucócitos e plaquetas dentro do padrão de normalidade, associado à ausência de blastos, promielócitos e metamielócitos circulantes. A remissão citogenética menor é definida pelo encontro do Ph entre 34 a 66% das metáfases, a maior pelo encontro do Ph entre 1 e 33% das metáfases e a remissão completa pela ausência do Ph nas metáfases analisadas (KANTARJIAN et al., 1995). O critério laboratorial de remissão molecular é definido pela diminuição do número de cópias dos transcritos de *bcr-abl* ou pela ausência da detecção do rearranjo *bcr-abl*.

I.1.4. Tratamento

O tratamento da LMC pode ser realizado com hidroxiuréia, transplante de medula óssea (TMO) alogênico, infusão de linfócito do doador (DLI), interferon- α (IFN- α), IFN- α associado à citarabina e inibidores da enzima TK (FADERL et al., 1999, HAHN, et al., 2003, HEHLMANN, et al., 2005, HEHLMANN, et al., 2007).

Dentre essas formas de tratamento, a única curativa é o TMO, cujo sucesso depende de múltiplos fatores como idade, fase da doença, compatibilidade HLA, tempo do diagnóstico ao transplante e ocorrência da reação do enxerto contra o hospedeiro e da reação do enxerto contra a leucemia (SAWYERS, 1999; FADERL et al., 2000 & KALIDAS et al., 2001). Devido sua alta morbi-mortalidade, o TMO limita-se àqueles pacientes com menos de 55 anos e que possuem doadores HLA compatíveis (revisada em GOLDMAN, 2001 e em HEHLMANN, et al., 2007).

O TMO alogênico inclui necessariamente a indução de aplasia de medula do

receptor com o uso de quimioterápicos e posterior infusão das células-tronco. A quimioterapia erradica os clones leucêmicos dos pacientes e a medula óssea do receptor é *repopulada* pela medula do doador. Para que o sucesso do TMO seja atingido a nova medula óssea do doador deve induzir a reação do "enxerto-versus-leucemia" no receptor, processo em que as células leucêmicas são eliminadas ativamente pelas células imunes saudáveis provenientes do doador. O tratamento completo tem boas possibilidades de sucesso, mas apresenta risco muito grande para o paciente, pois envolve a eliminação das células do sistema imune por um período que podem perdurar várias semanas, durante o qual o paciente estará sujeito a infecções e outras complicações. Pacientes com LMC de baixo risco mostraram uma melhor resposta ao tratamento medicamentoso quando comparado ao TMO. Assim sendo, nesse grupo de pacientes, o tratamento com mesilato de imatinibe mostrou ser mais potente do que aqueles submetidos ao INF. Dessa forma, o TMO tem sido a segunda linha de tratamento após falha do mesilato de imatinibe (ausência de remissão hematológica após três meses de tratamento), exceto para pacientes de alto risco e àqueles em que o TMO seria de baixíssimo risco (HEHLMANN, et al., 2007). Em caso de recidiva da doença pós-TMO, os pacientes são submetidos à infusão de linfócitos do doador (DLI, "donor lymphocyte infusion") no receptor que induz a remissão da doença em 80% dos casos, porém, alguns pacientes não respondem ao DLI (ARCESSE et al., 1993; LEVENGA, et al., 2007).

A terapia com hidroxiuréia é paliativa na LMC e promove somente remissão hematológica. O uso da hidroxiuréia é associado a um pior prognóstico em comparação com os demais tratamentos (SILVER et al., 1999). Os benefícios provenientes do tratamento com este quimioterápico são limitados, uma vez que não conduz à remissão citogenética e molecular da doença, todavia é utilizado em pacientes idosos devido ao baixo custo, facilidade de ingestão e para diminuir os riscos inerentes à leucocitose (FADERL et al., 2000).

O tratamento da LMC com IFN- α , citarabina e inibidores da tirosina-quinase (mesilato de imatinibe, dasatinibe e nilotinibe) visa o reestabelecimento dos processos fisiológicos de proliferação, sobrevivência e maturação da célula progenitora.

O IFN- α era a terapia padrão para os casos de LMC em fase crônica antes da descoberta do mesilato de imatinibe. A associação de IFN- α com outras drogas

como hidroxiuréia e/ou baixas doses de citarabina mostrou melhor resposta citogenética quando comparada àquela observada nos pacientes que receberam somente o IFN- α , porém a combinação destes compostos não tem efeito no aumento da sobrevida dos pacientes (HEHLMANN, et al., 2007).

Os inibidores de TK normalizar os mecanismos de regulação da proliferação celular, diminuir a atividade mitogênica e induzir direta ou indiretamente a apoptose da célula progenitora leucêmica (MELO et al., 2007). Permite, em outras palavras, a proliferação da célula progenitora normal e promove a erradicação da célula progenitora maligna.

A LMC foi a primeira doença hematológica para a qual um projeto de uso racional de drogas delineou uma terapia com alvo molecular efetivo (mesilato de imatinibe) (MELO et al., 2007). Os inibidores da TK foram desenvolvidos após o melhor entendimento das bases moleculares da LMC, dentre eles podemos citar o mesilato de imatinibe que demonstrou ser mais potente do que IFN- α no controle da doença, o dasatinibe (BMS-354825) e o nilotinibe (AMN107). Essa terapia em pacientes com LMC tem como alvo a enzima tirosina kinase, Bcr-Abl, que é a responsável por grande parte dos eventos leucemogênicos na LMC. Anormalidades na sua estrutura conduzem atividade elevada e a alterações nos processos de sinalização celular que regulam o ciclo celular, diferenciação, migração, metabolismo e morte celular. Todas essas alterações são capazes de conduzir a célula à malignidade, como no caso das células leucêmicas da LMC. Essas células podem ter essas alterações revertidas ou sofrer apoptose pelo uso de inibidores da tirosina quinase, medicamentos que são promissores na terapia contra a LMC (MANASH, et al., 2004; SHAH, et al., 2004).

O mesilato de imatinibe inibe em concentração submicromolar diferentes proteínas tirosina-quinases, como a ABL, o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor receptor*: PDGFR-A e B), o receptor KIT e o receptor da ARG (*Abelson-related gene*) (BUCHDUNGER et al., 2000). O mesilato de imatinibe inibe com eficiência e especificidade a atividade quinase de Bcr-Abl (DEININGER et al., 1997; KANTARJIAN et al., 2002; GOLDMAN, 2004). Esse medicamento coíbe a progressão da LMC para a fase acelerada ou blástica, induz remissão hematológica em 98% dos pacientes e remissão citogenética completa em 76% dos casos após 12 meses de tratamento. O mesilato de imatinibe aumenta significativamente a percentagem de remissão citogenética

completa e molecular dos pacientes, contudo, o tempo de seguimento dos pacientes que o utilizam ainda é curto para definição de seu potencial curativo. Apesar dos avanços obtidos com sua utilização no tratamento dos pacientes com LMC, vários mecanismos de resistência das células leucêmicas a esse medicamento já foram descritos. As principais causas dessa resistência são: presença de mutações no sítio catalítico de Bcr-Abl, duplicação do cromossomo Philadelphia, *superexpressão* do gene *bcr-abl* e expulsão do composto pela célula leucêmica que apresenta elevado de glicoproteína P na membrana (DRUKER et al., 2000 e JOHN et al., 2004). De acordo com VAN-ETTEN (2004), a resistência a essa droga é mais freqüentemente observada nas fases avançadas da LMC, mas pode também ser verificada em mais de 7% dos pacientes na fase crônica.

Em pacientes portadores de leucemia linfóide aguda (LLA) e LMC refratários ao mesilato de imatinibe já foram descritas mais de 40 diferentes mutações (HUGHES et al., 2006) no gene *bcr-abl*. As mutações em pacientes resistentes ao mesilato de imatinibe acarretam uma mudança estrutural na enzima Bcr-Abl o que dificulta o deslocamento da ATP pelo mesilato de imatinibe no sítio de ação da proteína Bcr-Abl, enquanto preserva a atividade quinase da enzima. A primeira mutação descrita que confere resistência ao mesilato de imatinibe determina a troca do aminoácido treonina por uma isoleucina na posição 315 e denomina-se T315I. Essa mutação, T315I, é encontrada principalmente em pacientes com doença avançada e está associada ao pior prognóstico nos casos de LMC (GORRE, et al., 2001). Outras formas mutantes de Bcr-Abl são as Y253F, E255K, H396P (YOUNG, et al., 2006; WEISBERG, et al., 2007; PENSERGA et al., 2007).

Segundo WEISBERG e colaboradores (2007), a expansão de clones mutantes de Bcr-Abl em pacientes tratados com mesilato de imatinibe é freqüente já que ele pode selecionar clones resistentes que já existiam no paciente pré-tratado. O aumento desses clones resistentes acarretaria na recaída do paciente ou progressão da LMC.

As estratégias utilizadas para melhorar a sobrevida e prognóstico dos pacientes resistentes ao mesilato de imatinibe são: o aumento da dose administrada; associação com outros compostos que possuam atividade contra LMC ou emprego de outros inibidores de Bcr-Abl.

O aumento da dose do mesilato de imatinibe, apesar de gerar remissão em alguns pacientes pode conduzir ao aparecimento de efeitos adversos graves, em

particular mielossupressão, hipersensibilidade e retenção de líquidos. A associação desse medicamento a outras drogas está em teste e parece ser uma opção promissora (JOHN et al., 2004).

A persistência de células Bcr-Abl positivas nos pacientes em tratamento com o mesilato de imatinibe indica que a inibição da atividade de tirosina-quinase de Abl talvez não seja suficiente para erradicar todas as células leucêmicas, sendo assim, a identificação de outros componentes celulares ou vias de sinalização ligada à patogênese da doença seria necessária para o desenvolvimento de novos fármacos como uma única terapia ou associados ao mesilato de imatinibe sejam mais efetivos contra a tirosina quinase Bcr-Abl.

Segundo SHERBENOU e DRUKER (2007) outros inibidores de TK como o BMS-354825 e AMN107 têm mostrado resultados promissores nas triagens clínicas. O dasatinibe é mais potente que o mesilato de imatinibe (DOGGREL, 2005) e foi aprovado pelo FDA (*food and drug administration*) para ser administrado em pacientes com LMC resistentes a esse inibidor.

Esse composto gera remissão da doença em uma parcela de pacientes refratários ao mesilato de imatinibe. Seu mecanismo de ação é impedir a ativação das quinases da família SRC, incluindo FGR, FYN, HCK, LCK, LYN, YES e Bcr-Abl. Em contraste aos outros inibidores de TK (nilotinibe e mesilato de imatinibe), restringe a atividade de Bcr-Abl por se ligar à conformação ativa do domínio da Abl quinase (WEISBERG, et al., 2007).

Segundo LOMBARDO e colaboradores (2004), o dasatinibe induz o desaparecimento parcial da massa tumoral causada pela infusão de células K562 Bcr-Abl positivas em camundongos, após catorze dias de tratamento. Os resultados obtidos foram positivos quanto à especificidade desta droga sobre a enzima TK, ocasionando a remissão das células tumorais do camundongo, bem como a ausência de toxicidade e morte do animal, sugerindo que o dasatinibe possui potente atividade “in vivo” e alta margem de segurança.

SHAH e colaboradores (2004) avaliaram a atividade do dasatinibe contra 15 formas mutantes da proteína Bcr-Abl resistentes ao mesilato de imatinibe e verificaram que essa droga possuía ação contra 14 isoformas de Bcr-Abl resistentes ao mesilato de imatinibe.

Em conjunto, os dados publicados por Lombardo (2004) e SHAH e colaboradores (2004) sugerem que o inibidor da TK, dasatinibe, é uma boa opção

terapêutica para os pacientes portadores de LMC resistentes ao mesilato de imatinibe, mesmo não sendo eficaz para a isoforma de Bcr-Abl T315I. A isoforma mutante T315I acomete somente 15-20% dos casos de resistência ao mesilato de imatinibe, assim sendo, pelo menos uma fração dos pacientes com LMC pode ser beneficiada com o dasatinibe.

Além do dasatinibe ser utilizado na clínica em pacientes refratários ao mesilato de imatinibe, outro inibidor de TK denominado nilotinibe tem sido alvo de estudos pré-clínicos. A identificação das mutações no domínio da quinase Abl levou a indústria farmacêutica responsável pelo desenvolvimento do mesilato de imatinibe a desenhar novos fármacos que poderiam exercer ação contra as formas mutantes. O nilotinibe (AMN107) possui mecanismo de ação similar ao mesilato de imatinibe por se ligar na forma inativa da enzima e atua em diversas formas mutantes da TK. Nilotinibe é 30 vezes mais potente do que mesilato de imatinibe e é eficiente na maioria dos pacientes estudados, contudo não é capaz de agir nas células leucêmica Bcr-Abl+ que possuem a mutação T315I (OLAVARRIA, et al., 2007).

Nilotinibe e dasatinibe são terapias inovadoras, mas também não promovem a eliminação das células portadoras da mutação T315I. Dessa forma, outros inibidores de Src-Abl, como o AP23464 (Ariad Pharmaceuticals), o ONO12380 (Onconova Therapeutics) e o MK0457 (Merck & Co, Inc e Vertex Pharmaceuticals)] têm sido desenvolvidos e em breve serão testados em larga escala. quanto ao seu potencial de inibição da quinase Abl. O composto AP23464 mostrou efeito inibitório em uma série de linhagens Ph⁺ conhecidas por ter mutações no domínio da quinase Abl, porém também é potente contra células T315I positivas. ONO12380 é uma molécula pequena que não é afetada pela presença do ATP presente da estrutura da tirosina-quinase Bcr-Abl, o que sugere que esta droga não compete com o trifosfato, e se liga diretamente ao domínio de Abl. A principal vantagem deste composto é o fato de ser 10000 vezes mais potente contra a T315I quando comparado ao mesilato de imatinibe *in vitro*. Este novo inibidor está pronto para ser testado clinicamente em pacientes, uma vez que o perfil de segurança em camundongos pareceu ser satisfatório.

Outro composto que mostra atividade contra a mutação T315I é um inibidor da quinase Aurora, denominado MK0457. Essa droga na ordem de micromolar restringe a fosforilação de T315I em células Bcr-Abl positivas. Este composto já faz parte de ensaios clínicos em pacientes portadores de LMC refratários ao mesilato de

imatinibe, inclusive aqueles que apresentam a forma mutante T315I (OLAVARRIA, et al., 2007).

I.2. Leucemia Mielóide Crônica e Apoptose

A apoptose, processo fisiológico de morte celular programada, desempenha importante papel na homeostase dos diferentes tecidos, inclusive do sistema hematopoético. A resistência anormal à apoptose pode conduzir ao aparecimento de neoplasias e doenças auto-imunes, enquanto que sua exacerbação acarreta o surgimento de doenças neurodegenerativas (RATHMELL e THOMPSON, 2002).

A apoptose celular quando iniciada promove o desencadeamento de diversos eventos moleculares, que culminam na ativação de membros de uma família de proteases, denominadas caspases (AMARANTE-MENDES e GREEN, 1999). A cascata de ativação das caspases pode ser desencadeada por duas vias, a via extrínseca (figura 3) e a via intrínseca (figura 4).

A via intrínseca inicia-se pela ação de diferentes sinais de estresse intracelular, tais como irradiação, agentes quimioterápicos, vírus, bactérias e ausência de fatores de crescimento celular, os quais convergem para a mitocôndria. A ativação desta via depende da liberação de certos fatores mitocondriais para o citosol, como por exemplo, o citocromo c (SMAC/DIABLO), que, juntamente com a molécula APAF-1, promovem a ativação da caspase-9, que por sua vez, ativa as caspases-3, -6 e -7 gerando o fenótipo apoptótico. Algumas moléculas que atuam na mitocôndria são centrais no controle da apoptose pela via intrínseca, como as proteínas da família Bcl-2. Essa família apresenta membros que inibem a apoptose (Bcl-x_L, Mcl-1, A1, Bcl-2 e Bcl-w), regulando a translocação dos fatores apoptogênicos e membros que promovem ou sensibilizam a célula à morte celular (Bad, Bax, Bak, Bid, etc) (BORNER, 2003).

A via extrínseca é ativada pela interação de receptores localizados na superfície celular, denominados “Receptores de Morte” (“DR, Death Receptors”), aos seus específicos ligantes. Esses receptores incluem o Fas (CD95), TNFR1, DR3, DR4, DR5 e DR6. Esta via inicia-se pela trimerização dos DR, que, por exemplo, no caso de interação do Fas-FasL, permite o recrutamento de duas proteínas sinalizadoras, FADD e pró-caspase-8, formando o complexo DISC (“Death-inducing signaling complex”). A pró-caspase-8 é transformada em caspase-8 ativa e então é

liberada para o citoplasma, onde poderá agir na fase executora do processo ao ativar diretamente a caspase-3, ou então promover o desencadeamento da via intrínseca por meio da clivagem da molécula Bid, a qual se dirige à mitocôndria, induzindo liberação de citocromo c e SMAC (AMARANTE-MENDES e GREEN, 1999). Este recrutamento e ativação da pró-caspase-8 são alvos de proteínas anti-apoptóticas, como a proteína c-Flip (FADD-like ICE inhibitory proteins), que possui estrutura similar à caspase-8, porém sem domínio catalítico. Esta molécula pode se ligar ao complexo Fas-FADD, inibindo o recrutamento, conseqüente clivagem e ativação da pró-caspase-8, impedindo o desencadeamento do processo de apoptose (IRMLER et al., 1997).

A ausência ou diminuição da expressão das proteínas pró-apoptóticas estão associadas ao aparecimento de doenças hematológicas (linfomas e leucemias), autoimunes e resistência a drogas (SHARMA et al., 2000). Em contraste, a exacerbação dessa expressão obtida por meio da utilização de radioterapia, antineoplásicos, imunoterápicos no tratamento de tumores sólidos e leucemias conduz à cura de doenças (SHARMA et al., 2000). Exemplificando, em leucemias linfóides crônicas do tipo B (LLC-B) o antígeno Fas está expresso em níveis mais baixos do que o Bcl-2, enquanto que nas leucemias mielóides agudas dos tipos M2 e M3 (LMA-M2 e LMA-M3) é o antígeno Bcl-2 que está diminuído em relação ao Fas. Estes dados podem explicar, pelo menos em parte, porque os pacientes portadores de leucemias LMA-M2 e M3 têm uma alta taxa de remissão quando tratados (MOLICA et al., 1996).

É sabido que na LMC, as células precursoras hematopoéticas malignas são mais resistentes a apoptose do que as células normais devido à expressão da TK Bcr-Abl, que prolonga a sobrevivência da célula e é considerada uma das mais potentes moléculas anti-apoptóticas. A alta atividade enzimática de Bcr-Abl é essencial na indução do fenótipo das leucemias Bcr-Abl positivas, por estarem envolvidas na fosforilação de diversos substratos celulares e na ativação de diferentes vias de sinalização intracelular. O início das diversas vias de sinalização conduz ao aparecimento do fenótipo maligno da célula, alterando processos biológicos básicos, como controle da proliferação, diferenciação, adesão e sobrevivência celular (SALESSE et al., 2002; BRUMATI et al., 2003). A molécula Bcr-Abl é, portanto capaz de bloquear a apoptose das células hematopoéticas induzida pela retirada de

fatores de crescimento, pela luz ultravioleta, por quimioterápicos e pela ligação de Fas-FasL (PENDERGAST et al., 1993; CORTEZ et al., 1995).

A inibição farmacológica da TK Bcr-Abl com mesilato de imatinibe impede parcialmente seu papel anti-apoptótico, assim como sua capacidade transformante (BUENO-DA-SILVA et al., 2003), indicando que tanto a transformação celular como a resistência à apoptose induzida por Bcr-Abl apresentam elementos dependentes e independentes de sua atividade TK. AMARANTE-MENDES et al., (1999), descreveram em linhagens celulares Bcr-Abl positivas que a resistência à apoptose nessas células estava relacionada ao aumento da expressão da proteína Bcl- x_L e não da Bcl-2. GUTIERREZ-CASTELLANOS et al. (2004) também relataram que pacientes portadores de LMC apresentam altos níveis de *bcl-x_L*. Por outro lado, HANDA e colaboradores (1997), relataram que, na LMC, a expressão da proteína Bcl-2 aumenta com a progressão da doença, o que suporta a hipótese de que seja a expressão dessas proteínas, em altos níveis, que prolonga a sobrevivência da célula leucêmica e a torna resistente à apoptose. Assim, dados com relação à expressão de Bcl-2 em células Bcr-Abl positivas são controversos.

O antígeno Fas parece estar expresso em níveis normais nas células malignas dos pacientes portadores de LMC na fase crônica, mas devido a alta expressão do Bcl-2, as células malignas apresentam resistência à apoptose (RAVANDI et al., 2001). CASTRO e colaboradores (2004), também relataram, utilizando a técnica de RT-PCR semi-quantitativo, a expressão aumentada dos genes anti-apoptóticos *bcl-x_L* e *flip* em pacientes portadores de LMC. Esse mesmo trabalho mostrou que a expressão desses genes aumenta com a progressão da doença, o que contribuiria para a exacerbação da resistência das células leucêmicas à apoptose e refratariedade dos pacientes ao tratamento nas fases mais avançadas da LMC. Outros trabalhos utilizando linhagens celulares obtidas de pacientes portadores de LMC também mostraram que a oncoproteína Bcr-Abl aumenta a sobrevivência da célula leucêmica por meio da desregulação de moléculas envolvidas no processo de apoptose celular como a diminuição da expressão das proteínas pró-apoptóticas Bim, FasL e aumento da expressão de proteínas tais como survivina e Mcl-1, Bax e p53 (KURIBARA e cols., 2004; AICHBERGER et al., 2005 e KEESHAN et al., 2001).

Os mecanismos celulares e moleculares associados à propriedade de Bcr-Abl em induzir o aumento da expressão de genes anti-apoptóticos, e a redução dos

Figura 4 – Esquema da via intrínseca da apoptose (adaptado de www.sigmaaldrich.com.br).

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

II.1.Geral

Determinar o efeito dos inibidores de tirosina-quinase, mesilato de imatinibe e dasatinibe, sobre a expressão dos genes e proteínas anti e pró-apoptóticos na LMC.

II.2. Específicos

II.2.1. Avaliar nas células mononucleares dos pacientes com LMC antes e após 12 meses de tratamento com mesilato de imatinibe e dasatinibe:

- a) a expressão das proteínas A1, Bcl-x_L, Bcl-2, Bcl-w, c-Flip, Mcl-1 e Bad;
- b) o nível de expressão dos genes anti e pró-apoptóticos da família Bcl-2, receptores de morte e IAP.

II.2.2. Associar os resultados da expressão desses genes com a resposta dos pacientes aos medicamentos;

II.2.3. Correlacionar os resultados de expressão gênica com o índice de Sokal dos pacientes com LMC ao diagnóstico.

III. CASUÍSTICA E MÉTODOS

III. CASUÍSTICA E MÉTODOS

III. 1. Casuística

Foram estudados 26 pacientes com diagnóstico de Leucemia Mielóide Crônica (LMC), 20 procedentes do Hospital Brigadeiro de São Paulo e seis do Hospital Israelita Albert Einstein de São Paulo. Desses, 13 eram do sexo feminino e 13 do sexo masculino, três eram negros, um amarelo e 22 brancos, com idade média de 48 anos (faixa etária de 25 a 77 anos) (tabela 1). Dentre os 26 pacientes 17 foram tratados com mesilato de imatinibe e 12 com dasatinibe. Cabe aqui ressaltar que três pacientes foram investigados duas vezes, a primeira após utilização de MI e a segunda após tratamento com DAS. Todos pacientes avaliados estavam na fase crônica da doença e àqueles que usaram o dasatinibe foram refratários ao mesilato de imatinibe.

A inclusão destes pacientes no estudo baseou-se no diagnóstico da doença realizado por meio de achados clínicos e citológicos que caracterizam a doença, além da detecção do neogene *bcr-abl* pela técnica de RT-PCR e/ou identificação do cromossomo Philadelphia (Ph) mediante análise citogenética.

Foram inseridos no estudo somente pacientes portadores de LMC que fizeram o uso de mesilato de imatinibe na dose de 400 mg/dia e/ou dasatinibe na dose de 70 mg duas vezes ao dia e que aderissem ao tratamento.

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Albert Einstein de São Paulo no dia 03 de abril de 2006 (processo número 06/385, em anexo). Os pacientes foram subdivididos em dois grupos de acordo com a resposta ao tratamento: pacientes refratários ou em remissão. Essa divisão fez-se necessária para determinação da possível associação entre resultados da expressão gênica obtidos e a resposta citogenética dos pacientes pós-tratamento.

A remissão citogenética menor foi definida pelo encontro do Ph em 34 a 66% das metáfases, a maior (parcial) pelo encontro do Ph em 1 a 33% das metáfases e a remissão completa pela ausência do Ph nas metáfases analisadas (The Italian Cooperative Group, 1994 e 2000; KANTARJIAN et al., 1995).

A resistência ou refratariedade ao tratamento com inibidores de tirosina-quinase é determinada quando o paciente progride para fase blástica ou acelerada da doença ou perde a resposta hematológica ou citogenética maior ou ainda quando

os pacientes perdem a resposta citogenética completa com aumento da expressão de *bcr-abl*.

O grupo controle foi formado por 32 indivíduos normais, doadores de sangue do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto-HCFMRP-USP (tabela 2) com idade média de 45 anos (faixa etária entre 23 e 77 anos). O grupo controle foi constituído por 16 indivíduos do sexo feminino e 16 do sexo masculino, desses 26 eram brancos, quatro negros e dois amarelos (tabela 2).

As amostras de sangue foram colhidas somente após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) pelos de pacientes e controles.

Tabela 1 – Caracterização demográfica, medicamento utilizado, resposta aos tratamentos e índice de Sokal dos pacientes com LMC.

AMOSTRA	SEXO	RAÇA	IDADE	DROGA	RESPOSTA	SOKAL
1/1P	F	branca	77	MI	refratária	1,13
2/2P	F	branca	59	MI	refratária	2,13
3/3P	F	negra	40	MI	RCC	0,82
4/4P	F	branca	42	MI	RCC	0,58
5/5P	F	branca	30	MI	RCC	0,87
6/6P	M	branca	45	MI	RCC	1,29
8/8P	M	negra	65	MI	RCC	1,39
9/9P	F	branca	25	MI	RCC	1,28
10/10P	M	branca	54	MI	RCC	1,56
11/11P	M	branca	68	MI	refratária	1,03
12/12P	M	branca	35	Dasatinibe	RCC	0,98
13/13P	F	negra	30	MI	refratária	0,67
14/14P	M	amarela	57	MI	RCC	1,91
15/15P	M	branca	44	MI	refratária	1,28
16/16P	M	branca	30	MI	refratária	13,93
17/17P	M	branca	51	MI	RCC	0,77
18/18P	F	branca	54	MI	RCC	0,83
19/19P	F	branca	30	Dasatinibe	RCC	0,54
20/20P	F	branca	31	MI	RCC	1,01
22/22P	F	branca	77	Dasatinibe	RCC	1,13
23/23P	F	branca	36	Dasatinibe	refratária	0,85
24/24P	M	branca	59	Dasatinibe	refratária	1,79
27/27P	M	branca	57	Dasatinibe	RCC	1,94
28/28P	M	branca	63	Dasatinibe	refratária	0,91
32/32P	M	negra	65	Dasatinibe	RCC	1,39
33/33P	F	branca	66	Dasatinibe	RCC	1,04
34/34P	M	branca	68	Dasatinibe	RCC	1,03
36/36P	F	branca	52	Dasatinibe	RCC	1,05
37/37P	M	branca	52	Dasatinibe	RCC	0,76

M: sexo masculino; F: sexo feminino; P: pós-tratamento; MI: mesilato de imatinibe; RCC: resposta citogenética completa

Tabela 2 – Caracterização demográfica dos controles.

CONTROLE	IDADE	SEXO	RAÇA
1C	28	F	Branca
2C	58	M	Branca
3C	33	F	Branca
4C	23	M	Branca
5C	35	F	Branca
6C	28	F	Branca
7C	25	F	Negra
8C	29	F	Branca
9C	45	M	Branca
10C	53	M	Branca
11C	51	F	Branca
12C	52	M	Branca
13C	59	M	Branca
14C	44	F	Branca
15C	53	M	Branca
16C	35	F	Branca
17C	24	F	Branca
18C	33	F	Negra
19C	30	M	Branca
20C	39	F	Negra
21C	57	M	Branca
22C	54	F	Branca
23C	47	M	Amarela
24C	36	M	Branca
25C	63	M	Branca
26C	60	F	Branca
27C	50	M	Branca
28C	77	F	Branca
30C	44	M	Branca

CONTROLE	IDADE	SEXO	RAÇA
31C	57	M	Amarela
32C	65	M	Negra
33C	64	F	Branca

M: sexo masculino; F: sexo feminino e C: controle.

III.2. Métodos

III.2.1. Isolamento das Células Mononucleares

Foram colhidos 20 mL de sangue periférico dos pacientes com LMC antes e após 12 meses de tratamento com os inibidores de TK e dos indivíduos saudáveis (controles). As amostras de sangue foram submetidas ao protocolo de separação das células mononucleares pelo método de Ficoll-Hypaque[®] 1,077 (Sigma-Aldrich[®], EUA) conforme técnica descrita por Boyum em 1977. O sangue foi diluído em tampão salina fosfato (PBS) 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 mononucleares foram retiradas da interface plasma-Ficoll-Hypaque[®] e lavadas uma vez com PBS. Após nova centrifugação, a 200 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o botão de células mononucleares foi ressuspenso em um mL de PBS.

As células foram contadas e observadas quanto à viabilidade em câmara de Neubauer após diluição de 10µL da solução celular em 190µL de azul de tripan. Células na concentração de 5×10^6 a 1×10^7 células foram colocadas em um mL de trizol para extração de RNA e proteínas.

III.2.2. Extração de RNA, Síntese de cDNA e PCR em Tempo Real Quantitativo

Para a extração do RNA total, aproximadamente 10^7 células mononucleares foram lisadas com um mL de Trizol (Invitrogen Life Technologies, EUA). O RNA foi recuperado da fase aquosa pela adição de clorofórmio seguida de centrifugação. Em seguida, a fase aquosa contendo o RNA foi submetida à precipitação com isopropanol (Merck[®], Alemanha) e centrifugada a 13845g por 15 minutos. O RNA foi

lavado com etanol 70%, ressuspenso em 13µL de água livre de RNAses e quantificado em espectrofotômetro a 260 nm. Para obtenção do cDNA, dois µg de RNA foram incubados com os reagentes do *kit* High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems®, EUA) contendo transcriptase reversa, random primers e deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP). A mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos e, na seqüência, por duas horas a 37°C para que ocorresse a polimerização das novas fitas de cDNA.

Os cDNA foram utilizados nos ensaios de PCR em tempo real para quantificação da expressão dos genes pró e anti-apoptóticos.

Em todos os experimentos de real time PCR o *kit* utilizado para amplificação das seqüências gênicas foi o SYBR® GREEN PCR MASTER MIX (Applied Biosystems®, EUA), portanto o SYBR foi o fluorocromo utilizado para detecção e quantificação dos genes. Em cada teste, nos diferentes experimentos, pipetou-se 7,5 µL do reagente, quatro µL de água livre de RNAses, um 1 µL de *primer reverse* e *primer forward* (10 picomoles) e 1,5 µL do cDNA dos pacientes ou controles. Para amplificação dos genes anti-apoptóticos o número de ciclos de amplificação foi 45 e para os pró-apoptóticos 55 ciclos.

Os oligonucleotídeos específicos foram desenhados para a amplificação dos genes:

- a) anti-apoptóticos *a1*, *bcl-2*, *bcl-x_L*, *bcl-w*, *c-flip*, *ciap-1*, *ciap-2*, *mcl-1* e *survivina*;
- b) pró-apoptóticos: *bad*, *bak*, *bcl-x_s*, *bid*, *bik*, *bimel*, *bmf*, *bok*, *fas*, *fasl*, *nox*a e *puma*.

Foram empregados como *housekeeping* os genes *β-actina* e *gapdh*, os quais são expressos constitutivamente nas células humanas. A seqüência dos oligonucleotídeos (*primers*), o tamanho do produto da amplificação e a temperatura de anelamento estão relatados na tabela 3. Todos os oligonucleotídeos adquiridos foram sintetizados pela Invitrogen® (EUA).

Os resultados obtidos foram representados pela expressão relativa, razão entre a expressão do gene investigado pelo *housekeeping*. Essa última análise visa comparar os resultados da expressão dos genes obtidos nas células dos pacientes antes e após 12 meses de tratamento com os inibidores de TK (mesilato de imatinibe e dasatinibe).

Os cálculos para a obtenção dos valores de expressão relativa dos genes *a1*, *bcl-x_L*, *c-flip*, *bimel*, *mcl-1* e *nox*, *bcl-x_S*, para cada amostra foram feitos da seguinte forma:

$$\frac{\text{Média da expressão do gene alvo}}{\text{Média da expressão do *housekeeping*}}$$

Para determinar a expressão relativa os genes *bax*, *bcl-2*, *ciap-1*, *ciap-2*, *fas*, *fasl*, *bad*, *bak*, *bid*, *bik*, *bmf*, *puma* e *bcl-w* calculou-se:

$$\text{Delta Ct} = \text{média do Ct do gene alvo} - \text{média Ct do gene *housekeeping*}$$

$$\text{URE} = 10000/2^{\text{deltaCt}}$$

Ct (*threshold cycle*)

A curva-padrão foi traçada com cDNA de linhagens celulares hematopoéticas tumorais (LAMA84, SKW6.4, SKW6.4.Bcr-Abl e K562) em diferentes concentrações (puro, diluído 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000).

Tabela 3 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos cDNAs, tamanho do fragmento amplificado por PCR em tempo real e temperatura de anelamento.

Oligonucleotídeo	Sequências (5'→3')	Produto (pb)	TA (°C)
Bcl-x _s	F: ACA GCC CCG CGG TGA ATG CGA	196	62
	R: GAA CCA CGC CGG CCA CAG TCA T		
Bax	F: CCC TTT TGC TTC AGG GTT TC	500	56
	R: TCT TCT TCC AGA TGG TGA GTG		
Bad	F: CCG AGT GAG CAG GAA GAC TC	205	60
	R: GGT AGG AGC TGT GGC GAC T		
Bak	F: TTT TCC GCA GCT ACG TTT TT	249	60
	R: TGG TGG CAA TCT TGG TGA AGT		
Bid	F: GCT TCC AGT GTA GAC GGA GC	203	62
	R: GTG CAG ATT CAT GTG TGG ATG		
Bik	F: TCT GCA ATT GTC ACC GGT TA	193	60
	R: TTG AGC ACA CCT GCT CCT C		
Bok	F: TTT TCC GCA GCT ACG TTT TT	249	59
	R: TGG TGG CAA TCT TGG TGA AGT		
BimEL	F: TCT GCA ATT GTC ACC GGT TA	196	59
	R: AAG ATG AAA AGC GGG GCT CT		
Bmf	F: CCT GCC CCG TTC CTG TTC T	421	59
	R: GCC CCC TCA GCC GAC TTC		
Noxa	F: AGC TGG AAG TCG AGT GTG CT	167	54
	R: ACG TGC ACC TCC TGA GAA AA		
PUMA	F: GGA GCA GCA CCT GGA GTC	156	60
	R: TA CTG TGC GTT GAG GTC GTC		
Bcl-2	F: ACG AGT GGG ATG CGG GAG ATG TG	241	67
	R: GCG GTA GCG GCG GGA GAA GTC		
Bcl-w	F: AGT TCG AGA CCC GCT TCC	308	60
	R: CCC GTC CCC GTA TAG AGC		
Bcl-x _L	F: CTG AAT CGG AGA TGG AGA CC	211	60
	R: TGG GAT GTC AGG TCA CTG AA		
A1	F: GGC TGG CTC AGG ACT ATC	227	50
	R: CCA GTT AAT GAT GCC GTC		
Mcl-1	F: AGA AAG CTG CAT CGA ACC AT	183	56
	R: CC AGC TCC TAC TCC AGC AAC		
Fas	F: CAA GGG ATT GGA ATT GAG GA	203	55
	R: TGG AAG AAA AAT GGG CTT TG		
FasL	F: AGG AAA GTG GCC CAT TTA AC	176	55
	R: CAA GAT TGA CCC CGG AAG TA		

Oligonucleotídeo	Sequências (5'→3')	Produto (pb)	TA (°C)
c-FLIP	F: GCC GAG GCA AGA TAA GCA	464	54
	R: GCC CAG GGA AGT GAA GGT		
CIAP-1	F: AGT CTT GCT CGT GCT GGT TT	550	59
	R: ATG GAC AGT TGG GAA AAT GC		
CIAP-2	F: AGT CTT GCT CGT GCT GGT TT	432	58
	R: TGC TTT TGC CAG ATC TGT TG		
β-actina	F: GCC CTG AGG CAC TCT TCC A	192	58
	R: CCA GGG CAG TGA TCT CCT TCT		

T.A.: Temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos.

III.2.3. Extração de proteínas pelo método de Trizol®

As amostras de proteínas que foram utilizadas nos ensaios de *western blot* foram obtidas a partir da metodologia de extração seqüencial pelo Trizol® (Invitrogen Life Technologies, EUA). Diz-se extração seqüencial devido ao protocolo de extração de RNA, DNA e proteínas por meio do Trizol®. Dessa forma, após a extração de RNA, foram acrescentados 400 µL de etanol (Merck®, Darmstadt, Alemanha) gelado ao tubo com a amostra, o qual foi mantido em gelo por três minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 2000 g por 15 minutos a 4°C e ao *pellet* foram adicionados 1,5 mL de isopropanol gelado (Merck®, Darmstadt, Alemanha).

As proteínas precipitadas foram ressuspensas em dois mL de uma de solução de hidrocloreto guanidina (Promega®, Madison, EUA) 0,3M diluído em 95% de etanol (Merck®, Alemanha). O *pellet* protéico foi lavado na solução de guanidina três vezes, diluído em dois mL de etanol gelado e incubado em temperatura ambiente por 20 minutos. O tubo foi novamente centrifugado a 7500 g por cinco minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado por inversão.

A proteína foi seca em centrífuga à vácuo por dez minutos e na seqüência foram adicionados de 200 a 800 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma®, St. Louis, EUA) 1% ao *pellet*.

O tubo foi centrifugado a 10000g por 10 minutos a 4°C e a amostra de proteína armazenada a -80°C até ser utilizada nos ensaios de *western-blot*.

As proteínas foram concentradas até que o volume final alcançasse 15 μ L (correspondente a 20 μ g de proteínas) para aplicação no gel de poliacrilamida. O processo de concentração foi realizado com auxílio de centrífuga à vácuo modelo Speed Vac® Plus SC210A Savant®.

III.2.4. *Western-blot*

A técnica de *western-blot* foi realizada para determinar a expressão das proteínas A1, Bcl-x_L, Bcl-w, Bcl-2, c-Flip, Mcl-1 e Bad em células mononucleares de quatro pacientes antes e após o tratamento com mesilato de imatinibe.

Quatro amostras de proteínas de (lisado celular) de pacientes pré e pós-tratamento com mesilato de imatinibe foram retiradas do freezer -80°C e mantidas em gelo seco até o momento de prepará-las para a aplicação no gel de poliacrilamida. O preparo das amostras para a aplicação no gel de poliacrilamida foi feito por meio da adição de três microlitros do tampão de amostras (0,076 g de Tris-Hcl (pH6,8), 200 μ L de 2-mercaptoetanol, 0,4 g de dodecil sulfato de sódio, 0,5% de azul de bromofenol e cinco mL de glicerol) seguido de aquecimento a 100°C por 5 minutos. Os 15 μ L das amostras e 6 μ L do marcador de peso molecular foram aplicados ao gel de poliacrilamida e submetidos à eletroforese em tampão Tris-Glicina (pH 8,3) a 100 V (PowerPac 3000, Bio-Rad laboratories®, California, EUA) por três horas.

Após o término da eletroforese, as proteínas foram transferidas para a membrana de PVDF (PVDF Hybond-P, Amersham Biosciences®, Buckinghamshire, Reino Unido) com o tampão de transferência (pH 8,3) por 2 horas e 30 minutos.

Terminada a transferência, a membrana foi bloqueada *overnight* (12 horas) em um tampão tris-salina-Tween-20 (TBS-T) com 5% de leite desnatado e 0,1% de azida sódica. Na sequência, a membrana foi incubada *overnight* (12 horas) com os anticorpos primários policlonais anti-A1, anti-Bcl-x_L, anti-Bcl-w, anti-c-Flip e anti-Mcl-1 (Santa Cruz biotechnology, País) e monoclonais anti-Bcl-2 e Bad, (BD Transduction laboratories) na concentração de 1:1000. Posteriormente, a membrana foi lavada com TBS-T por três vezes de dez minutos e incubada por 45 minutos com o anticorpo secundário (camundongo, coelho ou cabra) marcados com peroxidase (GE Healthcare, Reino Unido) cuja concentração de uso variou de 1:1000 a 1:2000.

Após esse tempo, a membrana foi lavada da mesma forma que foi feita a lavagem do anticorpo primário. A membrana foi imersa em ECL (ECL Plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare®, Buckinghamshire, Reino Unido) em sala escura com revelador e fixador Kodak.

As bandas detectadas por quimioluminescência foram quantificadas por densitometria e os resultados expressos pela razão da I.D.V. (*integrated density value*) da proteína investigada pela I.D.V. da proteína endógena (tubulina ou beta-actina).

III.2.5. Cálculo do índice de Sokal

O índice de Sokal é utilizado como escore de prognóstico para pacientes com LMC. Este escore recebe essa denominação por ter sido descrito por Sokal e colaboradores em 1984 e leva em consideração a idade, o tamanho do baço, número de plaquetas e blastos circulantes e na medula óssea do paciente ao diagnóstico.

Com base nos valores obtidos pelo seu cálculo, os pacientes podem ser divididos em três grupos: risco baixo (valor <0,8), intermediário (0,8-1,2) ou alto risco (>1,2).

O valor do índice de SOKAL dos pacientes investigados nesse trabalho foi determinado por meio da aplicação da fórmula abaixo:

$$\lambda_i(t)/\lambda(t) = \text{EXP } 0.0116 (\text{idade} - 43,4) + 0.0345 (\text{fígado} - 7.51) \\ + 0.118 \left[\left(\frac{\text{Plaquetas}}{700} \right)^2 - 0.563 + 0.0887 (\text{blastos} - 2.10) \right]$$

III.2.6. Análise estatística

A análise estatística dos dados de expressão gênica entre os grupos controle e pacientes pré- e pós-tratamento com os inibidores de TK (mesilato de imatinibe e dasatinibe) foi realizada por meio da aplicação de um modelo de efeitos mistos. Os modelos lineares de efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos) são empregados na

análise de dados onde as respostas de um mesmo indivíduo estão agrupadas e a suposição de independência entre observações num mesmo grupo não é adequada (SCHALL, 1991).

A comparação dos grupos de pacientes com LMC em remissão citogenética e refratários aos medicamentos mesilato de imatinibe e dasatinibe foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. A análise dos níveis de expressão protéica das moléculas anti e pró-apoptóticas dos pacientes antes e após tratamento foram realizadas pelo teste de Wilcoxon.

A correlação entre o índice de Sokal e os resultados da expressão gênica dos pacientes pré-tratamento foi determinada pelo teste não paramétrico de Spearman.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor que 0,05.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1. Expressão dos genes anti-apoptóticos *a1*, *bcl-2*, *bcl-x_L*, *bcl-w*, *c-flip*, *ciap-1*, *ciap-2* e *mcl-1* nos controles e pacientes com LMC pré e pós-tratamento com mesilato de imatinibe e dasatinibe

As quantificações dos genes *a1*, *bcl-2*, *bcl-x_L*, *bcl-w*, *c-flip*, *ciap-1*, *ciap-2* e *mcl-1* estão relatadas por expressão relativa. As figuras de 1 a 4 referem-se às análises comparativas realizadas com os valores da expressão gênica dos grupos controle e pacientes pré e pós-tratamento que apresentaram significância estatística. Os valores da média dos demais dados obtidos, ou seja, das comparações que não apresentaram diferença estatística significativa estão mostrados nas tabelas 4 e 5.

A análise dos dados de expressão gênica foi realizada separadamente para pacientes tratados com mesilato de imatinibe e dasatinibe.

IV.1.1 Resultados do grupo de pacientes tratados com mesilato de imatinibe

A expressão dos genes anti-apoptóticos *a1*, *bcl-2*, *bcl-w*, e *ciap-1* não foi diferente para os grupos controle e de pacientes com LMC pré e pós-tratamento com mesilato de imatinibe (MI) (tabela 4). O mesilato de imatinibe não interferiu na expressão desses genes nos pacientes com LMC.

O gene *bcl-x_L* (figura 1) apresentou maior expressão no grupo de pacientes pré-tratamento com MI em relação ao grupo controle ($p=0,001$), contudo não houve diferença significativa dos níveis de *bcl-x_L* entre pacientes pré e pós-tratamento com mesilato de imatinibe ($p>0,05$). Após o tratamento com MI os níveis de expressão desse gene ficaram menores do que o controle ($p=0,001$).

Figura 1 - Expressão do gene anti-apoptótico *bcl-xL* no grupo controle e nos grupos de pacientes com LMC pré e pós-mesilato de imatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A análise estatística foi significativa entre os grupos controle e pré-tratamento; controle e pós-tratamento, ($p=0,005$ e $p=0,001$, respectivamente).

A expressão do gene *mcl-1* estava elevada no grupo de pacientes pré e pós-tratamento se comparada ao grupo controle ($p<0,0001$). Os níveis de RNAm de *mcl-1* entre os pacientes tratados e não-tratados com mesilato de imatinibe foi significativamente maior no grupo pós-tratamento ($p=0,03$) (figura 2).

Figura 2 - Expressão do gene anti-apoptótico *mcl-1* no grupo controle e nos grupos de pacientes com LMC pré e pós-mesilato de imatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A análise estatística foi significativa entre os grupos controle e pré-tratamento; controle e pós-tratamento e pré e pós-tratamento com MI ($p<0,001$ e $p=0,001$, respectivamente).

O gene anti-apoptótico *c-flip* apresentou maior expressão nos pacientes com LMC ($p<0,0001$), entretanto sua expressão manteve-se sem variações significativas após a terapia com MI ($p=0,92$) (figura 3).

Figura 3 – Expressão do gene anti-apoptótico *c-flip* no grupo controle e nos grupos de pacientes com LMC pré e pós-mesilato de imatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A análise estatística foi significativa entre os grupos controle e pré-tratamento; e controle e pós-tratamento, ($p<0,0001$ para ambas as análises).

A expressão do gene *ciap-2* (figura 4) foi diferente apenas no grupo de pacientes pós-tratamento em relação ao controle ($p=0,003$).

Figura 4 – Expressão do gene anti-apoptótico *ciap-2* no grupo controle e nos grupos de pacientes com LMC pré e pós-mesilato de imatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A análise estatística foi significativa entre os grupos controle e pós-tratamento ($p=0,003$).

Os resultados da expressão dos genes anti-apoptóticos (*a1*, *bcl-2*, *bcl-w* e *ciap-1*), cuja análise estatística não foi significativa estão relatados na tabela 4.

Tabela 4 – Expressão gênica dos grupos controle, pré e pós-tratamento com mesilato de imatinibe.

Grupos Genes	Controle (média)	Pré-MI (média)	Pós-MI (média)	C x Pré-MI (p valor)	C x Pós-MI (p valor)	Pré-MI x Pós-MI (p valor)
<i>a1</i>	246,5	229,0	98,0	0,7	0,9	0,6
<i>bcl-2</i>	156,0	151,0	16,8	0,6	0,3	0,6
<i>bcl-w</i>	3,1	2,8	0,6	0,5	0,2	0,4
<i>ciap-1</i>	120,6	12,4	12,3	0,2	0,1	0,9

MI: mesilato de imatinibe; C: grupo controle; Pré-MI: pacientes com LMC não-tratados com MI; Pós-MI: pacientes com LMC tratados com MI.

IV.1.2. Resultados do grupo de pacientes tratados com dasatinibe (DAS)

Os níveis de RNA da molécula anti-apoptótica *bcl-2* não apresentou diferença significativa entre os grupos controle, pré e pós-tratamento de pacientes com LMC com dasatinibe ($p < 0,05$).

A expressão do gene anti-apoptótico *bcl-x_L* foi maior nos grupos de pacientes pré e pós-dasatinibe (figura 5).

Figura 5 – Expressão do gene anti-apoptótico *bcl-x_L* no grupo controle e nos grupos de pacientes com LMC pré e pós-dasatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A análise estatística foi significativa entre os grupos controle, pré e pós-tratamento ($p < 0,05$).

A expressão do gene anti-apoptótico *bcl-w* foi maior nos controles do que nos pacientes ($p=0,06$ e $p=0,03$). *Bcl-w* apresentou níveis de expressão semelhante nos pacientes antes e após tratamento com DAS ($p=0,61$).

Figura 6 – Expressão do gene anti-apoptótico *bcl-w* no grupo controle e nos grupos de pacientes com LMC pré e pós-dasatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A análise estatística foi significativa entre os grupos controle e pós-tratamento ($p=0,03$).

A expressão do gene anti-apoptótico *a1* foi semelhante nos grupos controle e de pacientes. Os pacientes com LMC apresentaram diminuição dos níveis de RNA da molécula *a1* quando tratados pelo DAS (figura 7).

Figura 7 – Expressão do gene anti-apoptótico *a1* no grupo controle e nos grupos de pacientes com LMC pré e pós-dasatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A análise estatística foi significativa entre os grupos pré e pós-tratamento ($p=0,005$).

A expressão dos genes anti-apoptóticos *mcl-1* e *c-flip* foi maior nos grupos pré e pós-tratamento com dasatinibe quando comparada ao grupo controle. Houve diferença estatística significativa na expressão dos referidos genes entre os grupos pré e pós-tratamento (figuras 8 e 9).

Figura 8 – Expressão do gene anti-apoptótico *mcl-1* no grupo controle e nos grupos de pacientes com LMC pré e pós-dasatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A análise estatística foi significativa entre os grupos controle e pré e pós-tratamento ($p < 0,0001$).

Figura 9 – Expressão do gene anti-apoptótico *c-flip* no grupo controle e nos grupos de pacientes com LMC pré e pós-dasatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A análise estatística foi significativa entre os grupos controle e pré e pós-tratamento ($p = 0,0002$ e $p = 0,002$, respectivamente).

Os genes anti-apoptóticos *ciap-1* e *ciap-2* apresentaram redução de sua expressão pós-terapia com dasatinibe (figuras 10 e 11).

Figura 10 – Expressão do gene anti-apoptótico *ciap-1* no grupo controle e nos grupos de pacientes com LMC pré e pós-dasatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A análise estatística foi significativa entre os grupos controle e pós-tratamento e entre pré e pós-tratamento ($p=0,04$ e $p=0,01$, respectivamente).

Figura 11 – Expressão do gene anti-apoptótico *ciap-2* no grupo controle e os grupos de pacientes com LMC pré e pós-dasatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A análise estatística foi significativa entre os grupos controle e pós-tratamento e entre pré e pós-tratamento ($p=0,01$ e $p<0,0001$, respectivamente).

Os valores das médias de expressão do gene anti-apoptótico *bcl-2* nos grupos controle e no grupo de pacientes com LMC pré e pós-tratamento com dasatinibe cuja análise estatística apresentou $p>0,05$ estão na tabela 5:

Tabela 5 – Expressão do gene *bcl-2* nos grupos controle, pré e pós-tratamento com dasatinibe.

Grupo	Controle	Pré-DAS	Pós-DAS	C x Pré-DAS	C x Pós-DAS	Pré-DAS x Pós-DAS
	(média)	(média)	(média)	(p valor)	(p valor)	(p valor)
Gene						
<i>bcl-2</i>	156	5,80	10,06	0,11	0,05	0,68

DAS: dasatinibe; C: grupo controle; Pré-DAS: pacientes com LMC não-tratados com DAS; Pós-DAS: pacientes com LMC tratados com DAS.

IV.2. Análise da expressão dos genes pró-apoptóticos *bad*, *bak*, *bax*, *bcl-x_s*, *bid*, *bik*, *bimel*, *bmf*, *bok*, *fas*, *fasl*, *noxa* e *puma* nos grupos controle, pré- e pós-tratamento com mesilato de imatinibe e dasatinibe

A maioria dos genes pró-apoptóticos investigados no presente trabalho (*bad*, *bak*, *bax*, *bcl-x_s*, *bid*, *bmf*, *fasl* e *puma*) não apresentou diferença significativa de expressão entre os grupos controle e de pacientes pré e pós-tratamento com os inibidores de TK mesilato de imatinibe e dasatinibe.

Os resultados da expressão dos genes, cuja análise estatística mostrou significância estão mostrados nas figuras de 12 a 15. Os demais dados das médias das expressões gênicas, cujas análises estatísticas não detectaram significância estão mostradas nas tabelas 6 e 7.

IV.2.1. Resultados referentes ao grupo tratado com mesilato de imatinibe (MI)

A expressão dos genes pró-apoptóticos *bad*, *bak*, *bax*, *bcl-x_s*, *bid*, *bmf*, *fasl* e *puma* não foi diferente nos grupos analisados (controle, pré e pós-tratamento).

Os níveis de RNAm de *bok* e *noxa* estavam reduzidos nos pacientes pós-tratamento quando comparados ao controle (figuras 12 e 13).

Figura 12 – Expressão do gene pró-apoptótico *bok* no grupo controle e nos grupos de pacientes com LMC pré e pós-mesilato de imatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A análise estatística foi significativa entre os grupos controle e pós-tratamento ($p=0,01$).

Figura 13 – Expressão do gene pró-apoptótico *noxa* no grupo controle e nos grupos de pacientes com LMC pré e pós-mesilato de imatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A análise estatística foi significativa entre os grupos controle e pós-tratamento ($p=0,03$).

A expressão do gene pró-apoptótico *bik* foi menor nos grupos de pacientes pré e pós-tratamento em mesilato de imatinibe em relação aos indivíduos controles (figura 14).

Figura 14 – Expressão do gene pró-apoptótico *bik* no grupo controle e nos grupos de pacientes com LMC pré e pós-mesilato de imatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A análise estatística foi significativa entre os grupos controle e pré-tratamento e entre pré e pós-tratamento ($p=0,007$ e $p=0,003$, respectivamente).

A expressão do gene pró-apoptótico *fas* estava maior estatisticamente nos grupos de pacientes pré e pós-tratamento em mesilato de imatinibe do que no grupo controle. Não houve diferença entre os grupos de pacientes pré e pós-MI (figura 15).

Figura 15 – Expressão do gene pró-apoptótico *fas* no grupo controle e nos grupos de pacientes com LMC pré e pós-mesilato de imatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A análise estatística foi significativa entre os grupos controle e pré-tratamento; e controle e pós-tratamento ($p<0,0001$ e $p=0,0001$, respectivamente).

Os resultados da expressão dos genes *bad*, *bak*, *bax*, *bcl-x_s*, *bid*, *bimel*, *bmf*, *fasl* e *puma* nos grupos investigados, cuja análise estatística não foi significativa estão relatados na tabela 6.

Tabela 6 - Expressão gênica dos grupos controle, pacientes pré e pós-tratamento com mesilato de imatinibe.

Gene \ Grupos	Controle	Pré-MI	Pós-MI	C x Pré-MI	C x Pós-MI	Pré-MI x Pós-MI
	(média)	(média)	(média)	(p valor)	(p valor)	(p valor)
<i>bad</i>	0,10	0,58	0,30	0,05	0,17	0,53
<i>bak</i>	899,0	583,0	261,0	0,65	0,50	0,75
<i>bax</i>	15,80	8,74	5,89	0,74	0,82	0,87
<i>bcl-x_s</i>	2,51	5,15	12,95	0,22	0,44	0,57
<i>bid</i>	2988,0	1313,0	831,0	0,45	0,68	0,51
<i>bimel</i>	24,0	41,80	29,80	0,35	0,21	0,64
<i>bmf</i>	93,20	4,69	19,70	0,16	0,64	0,29
<i>fasl</i>	13,62	41,20	11,41	0,54	0,71	0,78
<i>puma</i>	4,05	1,88	1,83	0,20	0,20	0,66

MI: mesilato de imatinibe; C: grupo controle; Pré-MI: pacientes com LMC não-tratados com MI; Pós-MI: pacientes com LMC tratados com MI.

IV.2.2. . Resultados referentes ao grupo tratado com dasatinibe (DAS)

Os níveis de RNAm de *bok* e *bik* estavam menores nos pacientes pré e pós-tratamento com DAS quando comparado ao grupo controle (figuras 16 e 18).

Figura 16 – Expressão do gene pró-apoptótico *bok* no grupo controle e nos grupos de pacientes com LMC pré e pós-dasatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A análise estatística foi significativa entre os grupos controle e pré-tratamento; e controle e pós-tratamento, (p=0,03 e p=0,02 respectivamente).

O gene *bak* foi modulado por dasatinibe e apresentou redução dos níveis pós-DAS.

Figura 17 – Expressão do gene pró-apoptótico *bak* no grupo controle e nos grupos de pacientes com LMC pré e pós-dasatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A análise estatística foi significativa entre os grupos controle e pós-tratamento, ($p=0,03$).

Figura 18 – Expressão do gene pró-apoptótico *bik* no grupo controle e nos grupos de pacientes com LMC pré e pós-dasatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A análise estatística foi significativa entre os grupos controle e pré-tratamento, ($p=0,04$).

A expressão do gene pró-apoptótico *bmf* foi maior no grupo pós-tratamento tanto em relação ao pré-tratamento quanto em relação ao grupo controle (figura 19).

Figura 19 – Expressão do gene pró-apoptótico *bmf* no grupo controle e nos grupos de pacientes com LMC pré e pós-dasatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A análise estatística foi significativa entre os grupos controle e pós-tratamento, e pré e pós-tratamento, ($p=0,01$ e $p=0,004$, respectivamente).

Os resultados da expressão dos genes *bad*, *bak*, *bax*, *bcl-x_s*, *bid*, *bimel*, *bmf*, *fasl* e *puma* nos grupos investigados, cuja análise estatística não foi significativa estão relatados na tabela 7.

Tabela 7 - Expressão gênica nos grupos controle, pré e pós-tratamento com dasatinibe.

Grupo	Controle	Pré-DAS	Pós-DAS	C x Pré-DAS	C x Pós-DAS	Pré-DAS x Pós-DAS
	(média)	(média)	(média)	(p valor)	(p valor)	(p valor)
Gene						
<i>bad</i>	0,10	0,14	0,01	0,63	0,67	0,38
<i>bax</i>	15,8	49	0,04	0,87	0,30	0,10
<i>bcl-xs</i>	0,51	4,15	19,12	0,40	0,32	0,86
<i>bid</i>	2988	424	232,70	0,26	0,35	0,72
<i>bimel</i>	245	57,9	6376	0,36	0,72	0,43
<i>fas</i>	46,6	124,8	53,5	0,13	0,18	0,75
<i>fasl</i>	13,62	2,12	5,59	0,54	0,71	0,78
<i>noxa</i>	12,47	0,66	3,91	0,13	0,17	0,80
<i>puma</i>	4,05	75	5,02	0,88	0,49	0,31

DAS: dasatinibe; C: grupo controle; Pré-DAS: pacientes com LMC não-tratados com DAS; Pós-DAS: pacientes com LMC tratados com DAS

IV.3. Expressão dos genes anti e pró-apoptóticos *a1*, *bcl-2*, *bcl-x_L*, *bcl-w*, *c-flip*, *ciap-1*, *ciap-2* e *mcl-1* nos pacientes com LMC em remissão citogenética e refratários após o tratamento com mesilato de imatinibe

IV.3.1. Resultados referentes ao grupo tratado com mesilato de imatinibe (MI).

O grupo de pacientes refratários ao MI apresentou menor expressão de *bcl-2* e *ciap-2* e níveis de RNAm de *a1*, *mcl-1* e *c-flip* elevados quando comparados ao grupo de pacientes em remissão citogenética completa (figuras de 20 a 24).

Figura 20 – Expressão do gene anti-apoptótico *bcl-2* no grupo de pacientes com LMC em remissão citogenética e refratários ao tratamento com mesilato de imatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A expressão de *bcl-2* diminuiu significativamente no grupo de refratários, ($p=0,04$).

Figura 21 – Expressão do gene anti-apoptótico *ciap-2* no grupo de pacientes com LMC em remissão citogenética e refratários ao tratamento com mesilato de imatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A expressão de *ciap-2* diminuiu significativamente no grupo de refratários, ($p=0,0002$).

Figura 22 – Expressão do gene anti-apoptótico *a1* no grupo de pacientes com LMC em remissão citogenética e refratários ao tratamento com mesilato de imatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A expressão de *a1* aumentou significativamente no grupo de refratários ($p=0,01$).

Figura 23 – Expressão do gene anti-apoptótico *mcl-1* no grupo de pacientes com LMC em remissão citogenética e refratários ao tratamento com mesilato de imatinibe. As linhas horizontais representam os valores das medianas de cada grupo. A expressão de *mcl-1* aumentou significativamente no grupo de refratários, ($p=0,04$).

Figura 24 – Expressão do gene anti-apoptótico *c-flip* no grupo de pacientes com LMC em remissão citogenética e refratários ao tratamento com mesilato de imatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A expressão de *c-flip* aumentou significativamente no grupo de refratários ($p=0,006$).

Tabela 8 – Dados da expressão relativa dos genes obtidos por meio das análises estatísticas entre pacientes com LMC em remissão e refratários ao dasatinibe.

Gene	Remissão	Refratários	p valor
	(média)	(média)	
<i>a1</i>	54,08	25,76	0,43
<i>bcl-2</i>	13,19	1,33	0,30
<i>bcl-w</i>	0,09	0,10	0,07
<i>bcl-x_L</i>	8,13	4,79	0,36
<i>c-flip</i>	5,93	23,13	0,05
<i>ciap-1</i>	3,64	7,64	0,18
<i>ciap-2</i>	45,58	53,94	0,36
<i>mcl-1</i>	7,39	16,03	0,07
<i>bad</i>	0,01	0,00	0,36
<i>bak</i>	9,94	10,30	0,36
<i>bax</i>	0,02	0,08	0,36
<i>bcl-xs</i>	19,12	13,89	0,24
<i>bid</i>	221,00	267,80	0,30
<i>bik</i>	2,26	0,34	0,43
<i>bimel</i>	12,05	11,29	0,24
<i>bmf</i>	1,70	3,33	0,07
<i>bok</i>	21,59	11,65	0,30
<i>fas</i>	57,17	43,35	0,36
<i>fasl</i>	6,61	3,110	0,30
<i>nox</i>	0,20	0,36	0,14
<i>puma</i>	6,68	3,03	0,50

DAS: dasatinibe.

IV.4. Expressão dos genes pró-apoptóticos *bok*, *bak*, *bax*, *bcl-x_s*, *nox*, *puma*, *bik*, *bid*, *bmf*, *bcl-2*, *bcl-x_l*, *fas* e *fasl* nos grupos de pacientes com LMC em remissão citogenética completa e refratários pós-tratamento com mesilato de imatinibe

IV.4.1. Resultados referentes ao grupo tratado com mesilato de imatinibe (MI)

A expressão dos genes pró-apoptóticos *bak*, *bax*, *bid*, e *fasl* foi menor nos pacientes refratários ao mesilato de imatinibe (figuras 25 a 28).

Figura 25 – Expressão do gene pró-apoptótico *bak* no grupo de pacientes com LMC em remissão citogenética e refratários ao tratamento com mesilato de imatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A expressão de *bak* diminuiu significativamente no grupo de refratários, ($p=0,01$).

Figura 26 – Expressão do gene pró-apoptótico *bax* no grupo de pacientes com LMC em remissão citogenética e refratários ao tratamento com mesilato de imatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A expressão de *bax* diminuiu significativamente no grupo de refratários, ($p=0,006$).

Figura 27 – Expressão do gene pró-apoptótico *bid* no grupo de pacientes com LMC em remissão citogenética e refratários ao tratamento com mesilato de imatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A expressão de *bid* diminuiu significativamente no grupo de refratários, ($p=0,02$).

Figura 28 – Expressão do gene pró-apoptótico *fasl* no grupo de pacientes com LMC em remissão citogenética e refratários ao tratamento com mesilato de imatinibe. As linhas horizontais representam os valores das médias de cada grupo. A expressão de *fasl* diminuiu significativamente no grupo de refratários, ($p=0,02$).

O valor da significância (p) das análises estatísticas de expressão dos genes anti-apoptóticos *bcl-w*, *bcl-x_L* e *ciap-1* e pró-apoptóticos *bad*, *bcl-xs*, *bik*, *bimel*, *bmf*, *bok*, *fas*, *nox*a e *puma* que apresentaram níveis de RNAm similares nos pacientes refratários e em remissão citogenética completa pós-tratamento com mesilato de imatinibe estão mostrados na tabela 9:

Tabela 9 – Valores da média e do p nas análises não significantes entre o grupo de pacientes com LMC em remissão e refratários ao mesilato de imatinibe.

Gene	Remissão	Refratários	p valor
	(média)	(média)	
<i>bcl-w</i>	0,32	0,44	0,43
<i>bcl-x_L</i>	6,92	144,30	0,43
<i>ciap-1</i>	14,83	5,61	0,07
<i>bad</i>	0,41	0,02	0,16
<i>bcl-x_s</i>	13,61	14,12	0,37
<i>bik</i>	2,919	1,222	0,27
<i>bimel</i>	9,43	12,06	0,28
<i>bmf</i>	29,90	13,89	0,15
<i>bok</i>	4,99	13,03	0,25
<i>fas</i>	0,18	4,01	0,47
<i>nox</i>	0,26	2,95	0,24
<i>puma</i>	0,18	4,01	0,47

MI: mesilato de imatinibe.

A tabela 10 mostra a correlação de Spearman cujas variáveis são a unidade relativa de expressão dos genes em células de pacientes pré-tratamento com mesilato de imatinibe e dasatinibe e o índice de Sokal.

Tabela 10 – Valores dos coeficientes de correlação de Spearman - URE x Sokal

Gene	Pré-MI		Pré-DAS	
	r_s	p-valor	r_s	p-valor
<i>bok</i>	-0,25138	0,3304	-0,44755	0,1446
<i>a1</i>	-0,45371	0,0674	0,17483	0,5868
<i>bax</i>	0,01594	0,9516	-0,49650	0,1006
<i>bcl-x_L</i>	-0,21459	0,4082	-0,02797	0,9312
<i>bcl-x_S</i>	0,38589	0,1261	0,15385	0,6331
<i>mcl-1</i>	0,18761	0,4709	-0,02797	0,9312
<i>nox</i>	0,15083	0,5634	0,26573	0,4038
<i>fasL</i>	-0,11063	0,6725	0,19580	0,5419
<i>fas</i>	0,32393	0,2047	0,18182	0,5717
<i>puma</i>	0,26626	0,3016	-0,24476	0,4433
<i>bik</i>	-0,46268	0,0615	-0,71329	0,0092
<i>bid</i>	-0,26242	0,3089	-0,14011	0,6641
<i>bmf</i>	-0,27191	0,2911	0,02797	0,9312
<i>bimel</i>	-0,24233	0,3487	-0,11189	0,7292
<i>bcl-w</i>	-0,24459	0,3441	0,04627	0,8865
<i>ciap-1</i>	0,22864	0,3774	-0,45455	0,1377
<i>ciap-2</i>	0,03924	0,8811	-0,13986	0,6646
<i>bcl-2</i>	0,05706	0,8278	-0,09790	0,7621
<i>bak</i>	-0,13681	0,6006	-0,46853	0,1245
<i>bad</i>	-0,10061	0,7008	0,16813	0,6015
<i>c-flip</i>	0,10668	0,6836	0,11189	0,7292

URE: Unidade Relativa de Expressão; MI: mesilato de imatinibe; DAS: dasatinibe;
 r_s : correlação da expressão gênica versus índice de Sokal.

IV.5. Resultados dos experimentos de *western-blot*.

Neste trabalho foram avaliados os níveis das proteínas: A1, Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Flip-1 e Mcl-1 e do gene pró-apoptótico Bad.

Os experimentos de *western-blot* foram importantes para verificar se os níveis de proteínas eram proporcionais ao nível de expressão gênica.

Os dados obtidos confirmaram que há uma relação direta entre os níveis de expressão proteína e os de RNAm das moléculas relacionadas à apoptose investigadas.

Os resultados obtidos por meio de *western-blot* estão apresentados nas figuras 29 a 33, seguidas pelos gráficos referentes à quantificação das bandas das membranas por de 29 a 35. Os números que estão sobre a figura e abaixo dos gráficos representam o número das amostras dos pacientes.

Figura 29 – Expressão protéica de A1 em amostras de quatro pacientes com LMC pré e pós-tratamento com mesilato de imatinibe. As barras verdes e rosas correspondem aos valores pré-e pós-tratamento com MI, respectivamente.

Figura 30 - Expressão protéica de Bcl-x_L em amostras de quatro pacientes com LMC pré e pós-tratamento com mesilato de imatinibe. As barras verdes e rosas correspondem aos valores pré-e pós-tratamento com MI, respectivamente.

Figura 31 - Expressão protéica de Bcl-w em amostras de quatro pacientes com LMC pré e pós-tratamento com mesilato de imatinibe. As barras verdes e rosas correspondem aos valores pré-e pós-tratamento com MI, respectivamente.

Figura 32 - Expressão protéica de Bcl-2 em amostras de quatro pacientes com LMC pré e pós-tratamento com mesilato de imatinibe. As barras verdes e rosas correspondem aos valores pré-e pós-tratamento com MI, respectivamente.

Figura 33 - Expressão protéica de c-Flip em amostras de quatro pacientes com LMC pré e pós-tratamento com mesilato de imatinibe. As barras verdes e rosas correspondem aos valores pré-e pós-tratamento com MI, respectivamente.

Figura 34 - Expressão protéica de Mcl-1 em amostras de quatro pacientes com LMC pré e pós-tratamento com mesilato de imatinibe. As barras verdes e rosas correspondem aos valores pré-e pós-tratamento com MI, respectivamente.

Figura 35 - Expressão protéica de Bad em amostras de quatro pacientes com LMC pré e pós-tratamento com mesilato de imatinibe. As barras verdes e rosas correspondem aos valores pré-e pós-tratamento com MI, respectivamente.

Conforme mencionado em Casuística e Métodos, os controles endógenos utilizados na normalização dos valores da densidade das bandas das proteínas-alvo foram a actina e a tubulina, cujos exemplos de resultados do *western-blot* estão mostrados nas figuras 36 e 37.

Figura 36 - Expressão protéica de Actina em amostras de quatro pacientes com LMC pré e pós-tratamento com mesilato de imatinibe.

Figura 37 – Expressão protéica de Tubulina em amostras de quatro pacientes com LMC pré e pós-tratamento com mesilato de imatinibe.

V. DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

A LMC é uma doença mieloproliferativa, cuja fisiopatologia está associada à presença de uma translocação cromossômica recíproca entre os cromossomos t(9;22) nos pacientes. Essa translocação promove o aparecimento do neogene bcr-abl, o qual codifica uma proteína com atividade de tirosina-quinase (TK) de mesmo nome, Bcr-Abl (revisado em BERGANTINI, et al., 2005; HEHLMANN, et al., 2005; MELO; BARNES, 2007).

As enzimas tirosina-quinases são importantes ativadoras de diferentes cascatas bioquímicas de sinalização intracelular e participam de processos biológicos vitais da célula como divisão, diferenciação, metabolismo e morte (COOLS, et al., 2005). Tendo em vista sua relevância nos processos celulares supracitados, revisões recentes da literatura associam alterações das tirosina-quinases com a fisiopatologia de neoplasias e indicam as TK como potenciais alvos terapêuticos dessas doenças (MANASH; MUKHOPADHYAY, 2004; WADLEIGH, et al., 2005; HEHLMANN, et al., 2007; SCHIFFER, 2007; CABEBE, et al., 2007; MALUMBRES, et al., 2007).

A Bcr-Abl é uma tirosina-quinase ativada constitutivamente que desencadeia uma cascata de reações bioquímicas intracelulares, culminando na transformação maligna da célula precursora hematopoética. Segundo KEESHAN e colaboradores (2002), a proteína Bcr-Abl contribui para o desenvolvimento e progressão da LMC. A célula leucêmica Bcr-Abl positiva apresenta alterações na adesão ao estroma medular, na proliferação celular e resistência à indução da apoptose por quimioterápicos tradicionais (DEININGER, et al., 2000; BORNER, 2003; MELO, et al., 2004). Medicamentos desenvolvidos especificamente para o tratamento dessa doença e que visam à inibição da atividade enzimática de Bcr-Abl são o mesilato de imatinibe (Glivec[®]), o dasatinibe (BMS-354825) e o nilotinibe (AMN107).

O tratamento atual para LMC preconiza a utilização do mesilato de imatinibe como primeira linha de terapia, já que o mesmo promove altas taxas de remissão citogenética nos pacientes. Entretanto, alguns pacientes apresentaram refratariedade a esse medicamento, o que conduziu a utilização dos inibidores de TK de segunda geração (dasatinibe e nilotinibe) e apontou para a necessidade pesquisas e desenvolvimento de fármacos mais eficientes no combate a doença.

As evidências de que o Bcr-Abl seria o evento inicial da transformação celular fez com que pesquisadores centralizassem seus projetos de pesquisa na descrição de vias de sinalização que dessem origem a mieloproliferação e acúmulo das células leucêmicas. Diversos sinais de transdução e diferentes fatores de transcrição têm sido associados ao fenótipo de resistência à apoptose das células leucêmicas. Esses sinais modulam a expressão e/ou ativação dos genes reguladores da apoptose, dentre os quais se destacam alguns membros da família Bcl-2, tais como Bcl-x_L, Bcl-2, Bax e Bad (revisado em CASTRO et al., 2005).

Estudos de nosso grupo de pesquisa sugerem que a atividade de TK é responsável parcialmente pela transformação maligna da célula e pelo fenótipo de resistência a apoptose induzido pela proteína Bcr-Abl em células hematopoéticas (BUENO-DA-SILVA et al., 2003).

A oncoproteína Bcr-Abl protege as células da apoptose por meio da alteração de várias vias de indução de morte, incluindo a via do p53 (YAKOVLEV et al., 2004), via mitocondrial (intrínseca) e a via de receptores de morte (extrínseca) (RAVANDI et al., 2001; BRUMATTI, et al., 2003).

O presente trabalho investigou o efeito dos inibidores de TK na maquinaria apoptótica com o intuito de elucidar melhor seu mecanismo de ação e de checar qual a relação da atividade enzimática de Bcr-Abl e a resistência a apoptose.

Para tanto, a estratégia empregada foi avaliar a expressão de proteínas e genes das vias extrínseca e intrínseca da apoptose celular em células mononucleares de pacientes com LMC antes e após 12 meses de tratamento com inibidores da tirosina-quinase (mesilato de imatinibe e dasatinibe).

Assim sendo, as moléculas anti-apoptóticas (A1, Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, c-Flip, Ciap-1, Ciap-2 e Mcl-1) e pró-apoptóticas (Bad, Bak, Bax, Bcl-x_s, Bid, Bik, Bimel, Bok, Bmf, Fas, Fasl, Noxa e Puma) foram avaliadas nos pacientes com LMC e controles. Conforme as análises realizadas, os pacientes foram divididos em quatro grupos: 1) pacientes pré-tratamento; 2) pacientes 12 meses pós-tratamento; 3) pacientes em remissão citogenética completa e 4) refratários ao tratamento.

V.1. Discussão dos resultados da expressão dos genes anti-apoptóticos nos grupos controle, de pacientes pré- e pós-tratamento inibidores de tirosina-quinase.

As células mononucleares dos pacientes com LMC sem tratamento, em comparação ao grupo controle, apresentaram maior expressão dos genes anti-apoptóticos *bcl-x_L*, *c-flip* e *mcl-1* e redução do *bcl-w* somente nos pacientes submetidos ao tratamento com dasatinibe. A expressão dos demais genes anti-apoptóticos foi semelhante nos grupos supracitados.

Os genes *a1*, *bcl-x_L*, *bcl-w*, *bcl-2* e *mcl-1* pertencem a família Bcl-2, *c-flip* à família dos receptores de morte e *ciap-1* e *ciap-2* à família das proteínas inibidoras da apoptose. Os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 (KIM *et al.*, 2006), inibem a morte celular por seqüestrarem as proteínas pró-apoptóticas com domínio BH3 (Bim, Bid, Puma, Bak e Bax), enquanto que as proteínas inibidoras da apoptose (IAP) desativam as caspases efetoras culminando com a inibição da morte celular.

Os pacientes com LMC avaliados no presente trabalho apresentaram um desequilíbrio da expressão das moléculas pró e anti-apoptóticas. Os resultados indicaram a presença de desregulação das vias intrínseca (*mcl-1* e *bcl-x_L*) e extrínseca (*c-flip*) da apoptose celular nas células leucêmicas de pacientes com LMC. Esses achados podem explicar pelo menos em parte a resistência aumentada dessas células leucêmicas Bcr-Abl positivas à apoptose celular.

O aumento da expressão de *mcl-1* e *bcl-x_L* pode estar atrelado à ativação das vias de sinalização de Ras, JAK/STAT, NF- κ B, Raf/MEK/ERK e PI3K/Akt por Bcr-Abl (KAWAUCHI, *et al.*, 2003; STEELMAN, *et al.*, 2003).

Ras é uma proteína pequena que se liga a GTP e transmite sinais para moléculas como Raf1 e proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs, *mitogen-activated protein kinases*). A família MAPK inclui três serina-treonina-quinases: Erk, JNK/SAPK e p38. ERK é ativada por estímulos mitóticos levando a transformação e diferenciação celular, enquanto as outras duas são ativadas por estresse celular (CHANG, *et al.*, 2001).

Em células Bcr-Abl positivas a via de RAS está fortemente ativada conduzindo a transformação celular mediada pela intensificação da sinalização intracelular das vias de ERK e JNK (CHOPPRA, *et al.*, 1999).

A via de fosfatidilinositol-3 quinase (PI3-K) atua em diversos processos celulares e sua principal molécula-alvo é a Akt, uma serina treonina quinase, que atua na regulação de sinais de sobrevivência celular (CHOPPRA, et al., 1999). A sobrevivência celular mediada pela Akt envolve a inativação de componentes pró-apoptóticos do processo de morte celular e a regulação positiva do potencial de transativação de NFkB, o que aumenta a expressão de inibidores de apoptose como Bcl-x_L, A1, Mcl-1 e dos membros da família IAP (FERNANDEZ-LUNA, 2000).

Outra via de sinalização ativada por Bcr-Abl que apresenta papel inibitório sobre a apoptose é a via Jak/STATs. STATs são proteínas citoplasmáticas latentes que se tornam ativadas por fosforilação após o recrutamento para um complexo receptor. Os STATs ativos são translocados para o núcleo, onde se ligam a elementos responsivos de DNA específicos e induzem a expressão de alguns genes. Bcr-Abl induz a ativação de STAT5 em LMC e tal ativação induz a expressão de Bcl-x_L (HORITA, et al., 2000).

Os resultados aqui obtidos quanto a elevação da expressão das moléculas anti-apoptóticas *bcl-x_L*, e *mcl-1* nos pacientes podem ser explicados pela ativação constitutiva das vias bioquímicas citadas anteriormente pela oncoproteína Bcr-Abl. Ainda nessa linha de raciocínio, AMARANTE-MENDES et al. (1998) descreveram em linhagens celulares Bcr-Abl positivas que a resistência a apoptose nessas células estava relacionada ao aumento da expressão da proteína Bcl-x_L e não da Bcl-2. GUTIERREZ-CASTELLANOS e co-autores (2004) relataram que pacientes portadores de LMC apresentam altos níveis de *bcl-x_L*. Por outro lado, HANDA e colaboradores (1997) descreveram que na LMC, a expressão da proteína Bcl-2 aumenta com a progressão da doença, o que suporta a hipótese de que seja a expressão dessas proteínas, em altos níveis, que prolongaria a sobrevivência da célula leucêmica e a torna resistente a apoptose. Nossos dados mostram que a molécula Bcl-2 não está aumentada nos pacientes com LMC, assim, relatos da literatura com relação à expressão de Bcl-2 em células Bcr-abl positivas são controversos.

CASTRO e colaboradores (2004), em comunicação oral no congresso nacional de hematologia em 2004, relataram a expressão elevada dos genes anti-apoptóticos *bcl-x_L* e *c-flip* em pacientes portadores de LMC. Esse mesmo trabalho mostrou ainda que a expressão desses genes aumenta com a progressão da doença, o que contribuiria para a exacerbação da resistência das células leucêmicas

a apoptose e refratariedade dos pacientes ao tratamento nas fases mais avançadas da LMC.

Outros trabalhos utilizando linhagens celulares obtidas de pacientes portadores de LMC também divulgaram que a oncoproteína Bcr-Abl aumenta a sobrevivência da célula leucêmica por meio da desregulação de moléculas envolvidas no processo de apoptose celular como a diminuição da expressão das proteínas pró-apoptóticas Bim (KURIBARA, et al., 2004), FasL (RAVANDI, et al., 2001) e aumento da expressão de proteínas tais como survivina e Mcl-1 (MAYERHOFER, et al., 2005), Bax e p53 (KEESHAN, et al., 2001).

A inibição farmacológica da tirosina-quinase Bcr-Abl com mesilato de imatinibe e dasatinibe impede parcialmente seu papel anti-apoptótico, assim como sua capacidade transformante (WERTHEIM, et al., 2002; BUENO-DA-SILVA, et al., 2003) indicando que tanto a transformação celular como a resistência a apoptose induzida por Bcr-Abl apresentam elementos dependentes e independentes de sua atividade tirosina-quinase.

Analisando-se os dados aqui descritos concernentes aos efeitos dos inibidores de TK em Bcr-Abl observa-se que a atividade enzimática dessa oncoproteína parece não ser o único fator associado à *desregulação da maquinaria apoptótica* na LMC, já que esses medicamentos pouco modularam a expressão dos genes relacionados à apoptose.

A expressão de *a1* não foi diferente nos grupos de pacientes com LMC pré- e pós-MI. Entretanto, sua expressão diminuiu significativamente quando os pacientes foram tratados com dasatinibe, esse resultado sugere que o dasatinibe exerce um maior efeito sobre a transcrição de *a1* quando comparado ao mesilato de imatinibe. Segundo FERNANDEZ-LUNA, 2000, a proteína Akt ativada por Bcr-Abl pode suprimir a apoptose por regular a transcrição por meio de fatores como NF κ B que por sua vez tende a aumentar a transcrição de *a1* e *bcl-x_L*.

Estes dados permitem a formulação da hipótese de que dasatinibe age em Bcr-Abl e indiretamente em AKT e NF κ B promovendo dessa forma a normalização da expressão de *a1* nos pacientes com LMC pós-tratamento.

Como discutido anteriormente, o aumento da expressão de *bcl-x_L* pode ser explicado pela potencialização das vias bioquímicas de Ras e STAT5 por Bcr-Abl (HOOVER et al, 2001; STEELMAN et al., 2004).

Interessante observar que em nosso trabalho o mesilato de imatinibe e o dasatinibe não modularam negativamente a expressão desse gene, sugerindo que essas drogas não inibiram adequadamente a atividade enzimática de Bcr-Abl ou que outras vias bioquímicas independentes da atividade quinase poderiam contribuir para o aumento da transcrição de *bcl-x_L*.

Os resultados obtidos da análise da expressão gênica de *bcl-w* sugerem que o mesilato de imatinibe não modula sua expressão, já que após o tratamento esse gene não igualou sua expressão a verificada no grupo controle. Este resultado foi inesperado, uma vez que pacientes Ph⁺ tendem a apresentar elevação da expressão de genes anti-apoptóticos e os tratados expressão diminuída se regulados por inibidores de TK.

Segundo BAE e col. (2006), a *superexpressão* de *bcl-w* ativa a via de sinalização PI3K e Akt associada à indução da transcrição de genes anti-apoptóticos. Com base nesse dado, os nossos resultados sugerem que dasatinibe inibiu a via de sinalização PI3K e Akt com maior potência do que mesilato de imatinibe e devido a isso, os níveis de *bcl-w* foram menores no grupo de pacientes tratados com dasatinibe e mais elevados no grupo de pacientes tratados com MI.

O gene *bcl-2* manteve sua expressão constante, ou seja, não foi influenciado pela inibição da atividade enzimática de Bcr-Abl dos pacientes investigados. A maioria das vias de sinalização de morte celular é regulada por eventos mitocondriais no qual a molécula Bcl-2 e a Bcl-x_L participam prevenindo a ocorrência da perda do potencial de membrana mitocondrial, liberação do citocromo c, do SMAC/Diablo para o citosol e a morte da célula (FRIEDMAN, et al., 2001; BRUMATTI, et al., 2003; KIM, et al., 2006; ZINKEL, et al., 2006)

Essa investigação mostra que células mononucleares Bcr-Abl positivas mantêm sua resistência a apoptose independente dos níveis de Bcl-2 e que a expressão dessa molécula não está ligada a atividade quinase de Bcr-Abl.

Além dos genes anti-apoptóticos relacionados à família Bcl-2, a expressão do gene *c-flip* foi avaliada. A proteína c-FLIP possui um efeito pró-sobrevivência celular e atua na regulação da via extrínseca da apoptose.

Os níveis de *c-flip* modulam a ativação da caspase-8 e na ausência deste gene, a pró-caspase-8 se torna ativada e é liberada do DISC (*death-inducing signaling complex* - complexo sinalizador da indução de morte) iniciando as vias de apoptose por meio da clivagem de substratos citosólicos (IRMLER et al., 1997). Os

níveis de *c-flip* estavam bastante alterados quando comparamos os grupos estudados. Nos pacientes com LMC sem tratamento, o gene *c-flip* apresentou uma expressão aumentada em relação aos controles. Esse dado ressalta que a via extrínseca da apoptose celular está desregulada nesses pacientes. Contudo, devido a escassez de trabalhos da literatura que associam *c-flip* a tirosina-quinases e de dados quanto a regulação de sua expressão o porquê da elevação dos níveis de RNAm nos pacientes com LMC precisa ser melhor elucidado.

Com relação à comparação entre os grupos controle e pós-tratamento com dasatinibe os níveis de *c-flip* não foram significantes, enquanto que os pacientes tratados com mesilato de imatinibe apresentaram um aumento significativo nos níveis de *c-flip* ao serem comparados com o grupo controle. Os inibidores de TK investigados atuaram de modo paradoxal sobre a expressão de *c-flip*, ou seja, MI não alterou a transcrição desse gene, mas o dasatinibe fez com que os níveis de *c-flip* similar aos valores normais.

Estes resultados sugerem que o dasatinibe tem efeito maior sobre a expressão de *c-flip* do que o mesilato de imatinibe e, portanto, deve atuar em vias de sinalização e transcrição diferentes no caso desse gene. Isto que sugere que além de inibirem a TK Bcr-Abl por se ligarem ao sítio de ligação do ATP atuariam também em outras vias de sinalização e de transcrição que influenciariam a expressão de *c-flip* e conseqüentemente a regulação da via extrínseca da apoptose. É importante ainda lembrar que no grupo de pacientes pós-tratamento há indivíduos em remissão e refratários aos medicamentos e os últimos apresentam altos níveis de *c-flip*.

Os genes anti-apoptóticos *ciap-1* e *ciap-2* pertencem a família das IAP (proteínas inibidoras de apoptose) e estão envolvidos em diversos processos celulares, como regulação da divisão celular, sinalização das cascatas intracelulares e de processos de degradação protéica. Apesar das múltiplas funções atribuídas a essas moléculas, a propriedade mais bem conhecida é a habilidade que as IAP têm de prevenir que a célula entre em apoptose por inibir as caspases e por neutralizar SMAC/Diablo (WILKINSON, et al., 2004).

Os resultados obtidos na análise da expressão de *ciap-1* e *ciap-2* indicam que os níveis de expressão de *ciap-1* estão próximos à normalidade quando se compara o grupo controle e pacientes não-tratados, enquanto que os níveis de *ciap-2* estão aumentados no grupo de não-tratados pré-dasatinibe.

Novamente, o dasatinibe interferiu de forma mais contundente na expressão de *ciap-1* e *ciap-2* do que mesilato de imatinibe. Este resultado sugere que a via comum da apoptose está alterada nas células Ph⁺. A detecção das alterações na expressão das proteínas IAP (CIAP-1 e CIAP-2) nos pacientes com LMC faz dessas proteínas um curioso alvo a ser estudado a fim de desenvolver novas drogas que atuem inibindo-as especificamente, desencadeando a morte celular de uma célula neoplásica.

A expressão de *mcl-1* nos pacientes com LMC avaliados estava significativamente maior no grupo de pacientes pré-tratamento em relação ao controle. A expressão desse gene diminuiu somente após o tratamento com o inibidor de TK dasatinibe o que aponta para o fato de que sua transcrição seria influenciada pela atividade enzimática de Bcr-Abl.

O aumento da sobrevivência e acúmulo das células leucêmicas Bcr-Abl positivas em pacientes com LMC estão interligados à elevada expressão de *mcl-1* (AICHBERGER et al., 2005). A expressão de *mcl-1* nesses pacientes é dependente da atividade quinase de Bcr-Abl e envolve a via de transdução de sinais Ras/RAF/MEK/ERK e ativação de STAT5. Esses autores descreveram *mcl-1* como fator de prognóstico e/ou de indicador da resposta terapêutica ao mesilato de imatinibe em pacientes com LMC. Ainda nesse sentido, esses autores comprovam que o nível de expressão de *mcl-1* está associado a maior sensibilidade das células Bcr-Abl⁺ ao medicamento, ou seja, quanto menor a expressão maior resposta ao medicamento.

A inibição da atividade enzimática de Bcr-Abl por dasatinibe nos pacientes aqui investigados conduziu a diminuição dos níveis gênicos de *mcl-1*, portanto os resultados coincidiram com as observações obtidas por AICHBERGER e colaboradores (2005) quanto à relação da expressão de *mcl-1* e atividade quinase de Bcr-Abl. após mesilato de imatinibe. Por outro lado, no grupo de pacientes pós-imatinibe foi verificada o aumento do *mcl-1*, dado controverso, mas que poderia estar ligado a possibilidade do MI selecionar clones resistentes à apoptose ou ao fato desse grupo de pacientes conter indivíduos em remissão e refratários à droga.

O dasatinibe modulou de forma mais contundente a expressão de *mcl-1* do que o mesilato de imatinibe e, portanto, deve possuir maior efeito sobre as vias Ras/RAF/MEK/ERK e STAT5 em células Ph⁺ do que o mesilato de imatinibe.

V.2. Discussão dos resultados da expressão dos genes pró-apoptóticos nos grupos controle, de pacientes pré- e pós-tratamento com inibidores de tirosina-quinase.

As células mononucleares dos pacientes com LMC apresentaram maior expressão dos genes *fas* e menor expressão de *bak*, *bik* e *bok* em relação aos indivíduos normais. Os outros genes (*bad*, *bax*, *bcl-x_s*, *bid*, *bimel*, *bmf*, *fasl*, *noxa* e *puma*) foram semelhantes entre os grupos controle e de pacientes não-tratados.

A atividade fisiológica de Bad é regulada por meio de sua fosforilação nos resíduos de serina ou treonina. Segundo KEESHAN e colaboradores (2002), a fosforilação de Bad por AKT tem relevância para a atividade anti-apoptótica de Bcr-Abl, pois nessa situação essa molécula citoplasmática não transloca para a mitocôndria e nem se heterodimeriza com o Bcl-x_L (EKERT, et al., 2006).

Sabe-se que na sua forma fosforilada Bad se liga à proteína 14-3-3, formando um complexo que inibe a formação de heterodímero de Bad com Bcl-x_L, aumentando a sobrevivência celular (NIEMANTSVERDIET, et al., 2007).

Os níveis de RNAm de Bad não estavam diferentes nos grupos investigados nesse trabalho. Essa observação está de acordo com a literatura que aponta para o fato de que realmente o principal efeito da atividade de tirosina-quinase de Bcr-Abl⁺ sobre Bad seria a fosforilação e o bloqueio da translocação (EKERT, et al., 2006).

A expressão de *bak* e *bax* não foi modificada pela enzima Bcr-Abl, mas o dasatinibe a modulou negativamente. As proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak estão localizadas na membrana mitocondrial e participam da via intrínseca da apoptose, translocando para o citosol sob estímulo apoptogênico (KEESHAN, et al., 2002). A mobilização de Bax e Bak para o citoplasma celular é mediada por Bim, Bid e Puma, que regulam esse processo por se ligar diretamente a Bcl-2 e Bcl-x_L, dessa forma ocorre a liberação de Bak e Bax para ativar a maquinaria apoptótica (EKERT, et al., 2006).

A alta expressão de *bcl-x_L* na LMC diminui a transcrição e a migração de *bak* e *bax* para o citosol bloqueando o efeito pró-apoptótico. O aumento de *bak* pós-dasatinibe deve ter sido consequência dos altos níveis de *bcl-x_L* nos pacientes com LMC. O interessante foi a observação de interação desses dois eventos visto que ambos associam-se a resistência à apoptose e não a sensibilidade que seria o ideal de ocorrer pós-DAS.

De acordo com os resultados expostos a regulação da expressão de *bid* em pacientes com LMC é independente da atividade quinase Bcr-Abl e que sua expressão não tem relação com a fisiopatologia da doença. A proteína Bid é uma molécula pró-apoptótica da família Bcl-2 que possui o domínio BH3 e tem a função de conectar as vias intrínseca e extrínseca da apoptose celular (OH, et al., 2006). Bid é ativado pela caspase-8 e transloca-se para a mitocôndria induzindo oligomerização de Bak e Bax que permitem a liberação do citocromo c (YIN, 2005).

O gene *bik* é expresso em muitas células hematopoéticas, porém pouco se sabe sobre o padrão de sua expressão em humanos e camundongos, especialmente no sistema hematopoético (COULTAS, et al., 2004). O que se sabe é que *bik* promove apoptose por meio de uma via que associa as caspases com a mitocôndria. Segundo TONG et al. (2001), *bik* pode efetivamente induzir a apoptose e suprimir o crescimento tumoral tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Com base nas observações da literatura acerca das funções de *bik*, sua diminuição em pacientes com LMC contribui para a fisiopatologia da LMC, principalmente para o fenótipo de resistência aos quimioterápicos. A expressão de *bik* não é dependente da atividade de TK, assim, o mecanismo de ação de TK não está associado à modificação dessa proteína.

A via de dano ao DNA é intermediada por Noxa e Puma, que são alvos transcripcionais de p53 (ODA, et al., 2001; YU, et al., 2001). Camundongos nocautes para p53 e Puma apresentam células resistentes à apoptose mediada por radiação ionizante e quimioterápicos. Observamos menor expressão de *noxa* apenas no grupo de pacientes tratados com mesilato de imatinibe quando comparamos com o grupo controle.

HALLAERT e cols. (2007), descreveram em células de pacientes com LLC uma diferença na expressão de *noxa* entre as células tratadas e não-tratadas com um inibidor de quinase dependente de ciclina. Relataram que a diminuição de Noxa não afetou a porcentagem de apoptose das células por estímulos de morte como CD95 e estaurosporina. O aumento da expressão de *noxa* nos pacientes com LLC desliga Bak e Bax que, nessas situações não translocam para o citosol sob efeito apoptogênico (KIM, et al., 2006).

Novamente o resultado obtido em nosso estudo mostra diminuição de um gene pró-apoptótico após o tratamento com inibidor de TK. Apesar de ser paradoxal, essa detecção deixa claro que pacientes com LMC pré- ou pós-tratamento não

possuem um perfil de expressão gênica polarizado para moléculas envolvidas na apoptose celular e que os resultados devem ser analisados em conjunto.

Observamos que os níveis de RNAm de *puma* foram semelhantes nos controles e pacientes e que a inibição da quinase Bcr-Abl não modificou a expressão desse gene nas células dos pacientes tratados com mesilato de imatinibe e dasatinibe. Não há na literatura artigos que associem Puma, Noxa e Bcr-Abl, o nosso seria inédito.

Puma é uma proteína pró-apoptótica pertencente à família Bcl-2 que possui um papel essencial na apoptose desencadeada por danos ao DNA. Esta proteína interage com Bcl-2 e Bcl-x_L e é dependente de Bax para induzir a apoptose, geralmente é expressa em baixos níveis, tendo sua expressão aumentada quando as células são expostas aos agentes que causam danos ao DNA (MING, et al., 2006). Puma parece ser um gene supressor de tumor e sua desregulação promove transformação oncogênica e indução do oncogene *c-myc*. Este dado é interessante quando se aplica aos nossos resultados porque *puma* não se alterou nas células Ph⁺, sugerindo que sua atividade como gene supressor de tumor ainda poderia estar funcionando nessas células. A interação de Puma com Bcl-2 e Bcl-x_L também é um mecanismo que pode ser desencadeado nas células Ph⁺ que possuem níveis de *puma* similares ao normais, fato este que favorece o desencadeamento da apoptose. Recentemente a literatura mostrou (ALENZI et al., 2007) que p53 estava aumentado nos pacientes com LMC, principalmente na fase blástica da doença, enquanto que níveis de *noxa* e *puma* estariam normais. ALENZI e colaboradores (2007) comentam sobre a possibilidade da existência de uma mesma via regulatória da transcrição para Fas, APAF-1 e p53. Nossos achados de que *noxa* e *puma* apresentaram em níveis semelhantes aos controles estão de acordo com os relatos dessa publicação. O próximo passo seria avaliar portanto a expressão de p53 e APAF-1 em nossos pacientes e checar o efeitos dos inibidores de TK sobre esses genes.

Ao analisarmos os níveis de RNAm do gene *bimel* não detectamos diferenças significativas entre o grupo controle e os pacientes com LMC antes e após o tratamento com inibidores de TK. Bimel é uma proteína que pertence à família Bcl-2, presente predominante em linfócitos T e B, sendo o maior antagonista fisiológico da sobrevivência dessas células (CHEN; ZHOU, 2004). Bimel pode ser encontrada no seu estado fosforilado ou desfosforilado em células saudáveis e sua

clivagem pode contribuir para a amplificação do sinal apoptogênico tanto pela via extrínseca quanto mitocondrial, pois ocorre precocemente durante o curso da morte celular. YAMAGUCHI e WANG (2002) descreveram que Bimel é análoga de Bid truncado e uma vez translocada para a mitocôndria é capaz de desencadear a mudança conformacional em Bax e subsequente inserção na membrana mitocondrial, seguido da liberação do citocromo c e morte celular.

Os nossos resultados contrastam com os publicados por BELLOC e co-autores (2007) que demonstraram que nilotinibe e mesilato de imatinibe induzem após 48 horas de estímulo à apoptose nas células K562 e CD34+ de pacientes com LMC via acúmulo de BIMEL. Entretanto, o referido estudo foi realizado *in vitro* e não por meio do isolamento de células de pacientes LMC submetidos ao tratamento com esses medicamentos. Os dados de nosso trabalho indicam que a transcrição de *bimel* não é influenciada pela atividade TK de Bcr-Abl e por sua inibição. Neste contexto, especulamos que outros fatores, como a farmacocinética das drogas, fatores presentes no sangue dos pacientes poderiam influenciar o efeito dos inibidores de TK sobre as moléculas envolvidas na apoptose, como farmacocinética dos medicamentos, expressão da glicoproteína P e mutações da proteína Bcr-Abl.

Outra molécula avaliada nesse estudo foi a Bmf, a qual conforme os resultados obtidos parece não contribuir para a patogênese da LMC e ser independente da ativação da TK Bcr-Abl. A proteína Bmf é ligada à miosina V do citoesqueleto que quando liberada induz à apoptose. Esta molécula tem maior relevância nas células aderentes, pois aumenta sua expressão por deslocamento ou “anoikis” (PUTHALAKATH; STRASSER, 2002).

SCHMELZLE e colaboradores. (2007), demonstraram que a expressão de *bmf* é controlada pela adesão das células à matriz extracelular e pelas vias de sinalização. Esse gene é supressor de tumor epitelial, isso sugere que a desregulação de *bmf* atribui à célula uma resistência aumentada a apoptose. Este dado é interessante não só para tumores sólidos como é o caso dos epiteliais, mas também pode se aplicado na atividade pró-apoptótica de *bmf* nas leucemias. Estes autores descreveram que uma transformação oncogênica na via de transdução Ras ou a ativação das vias Erk ou Akt é suficiente para suprimir a expressão de *bmf*. Portanto, a regulação transcricional de *bmf* está sob o controle das duas vias de sinalização mais conhecidas por contribuir para a tumorigênese epitelial quando desreguladas (SCHMELZLE et al., 2007).

Apesar da transcrição de *bmf* ser regulada pelas vias de sinalização supracitadas, as quais sabidamente são moduladas por Bcr-Abl, não detectamos alteração dessa molécula no pacientes com LMC. Esse dado controverso pode ser em parte esclarecido pelo fato de estudarmos células de pacientes e não linhagens celulares transfectadas pelo gene Bcr-Abl e estimuladas *in vitro* pelos inibidores.

Nossos achados indicam que Bok não contribui para o fenótipo de resistência das células Bcr-Abl⁺ à apoptose, mas sugere que esse gene tem sua transcrição modulada pelos inibidores de TK.

Segundo YAKOVLEV e cols. (2004), *bok* é um gene regulado por p53 que é acumulado nas células após um dano ao DNA. A proteína Bok por si só é capaz de contribuir para a formação de poros mitocondriais e liberação do citocromo c. O esperado seria a diminuição de Bok pós-inibição de TK, mas ocorreu o inverso. Dado inexplicável e sem respaldo da literatura até o momento.

Os níveis de RNAm de *fas* foram maiores no grupo de pacientes com LMC antes e após o tratamento com MI do que no grupo controle. Os inibidores de TK mesilato de imatinibe e dasatinibe não exerceram efeito sobre os níveis de Fas e FasL nos pacientes Bcr-Abl⁺.

As proteínas Fas e FasL estão envolvidas na ativação da morte celular pela via extrínseca. Fas é expresso na maioria das células do organismo enquanto que seu ligante FasL apenas nas membranas das células citotóxicas da resposta imune, hepatócitos e linfócitos T ativados (SELLERI, et al., 1998; BERGANTINI, et al., 2005).

Fas elevado aumentaria a susceptibilidade das células leucêmicas à apoptose dos pacientes com LMC, contudo as células dos pacientes investigados por nós possuem altos níveis de c-Flip e, portanto a via extrínseca da apoptose está bloqueada por não ser possível a ativação da caspase 8.

Nossos dados corroboram com os BERGANTINI et al., (2005) e RAVANDI e cols. (2001) que estudaram a expressão de Fas e FasL nas células de um grande grupo de pacientes com LMC nas em fases crônica, acelerada e blástica tratados com IFN- α . A expressão de *fas* variou para cada fase da doença, sendo menor na fase crônica e maior na blástica, mas aumentada em relação aos indivíduos saudáveis. Esses autores sugerem que os níveis de *fas* e *fasl* poderiam ser utilizados na LMC como marcadores de resposta à terapia com os inibidores de TK e de prognóstico.

V.3. Discussão dos resultados da expressão dos genes anti- e pró-apoptóticos de pacientes em remissão citogenética completa e refratários aos inibidores de TK

Segundo WEI e co-autores (2006), a resistência ao MI pode ser definida como: (1) falha na obtenção de remissão hematológica completa; (2) ausência de resposta citogenética mínima (65 a 95% de metáfases Ph⁺) após seis meses de tratamento ou da resposta citogenética maior (menos de 35% de metáfases Ph⁺) aos 12 meses de tratamento e (4) perda da resposta citogenética mínima ou da hematológica completa. Os três primeiros itens definem resistência primária enquanto que o quarto define resistência adquirida ao MI.

A refratariedade ao MI está associada à presença de mutações ponto no sítio de ligação dos inibidores de TK à Bcr-Abl (BURCHER, et al, 2005), deleção no derivado do cromossomo 9 (HUNTLY et al., 2003; QUINTAS-CARDAMA et al., 2005), à duplicação do cromossomo Philadelphia, amplificação de Bcr-Abl e exacerbação de vias de sinalização que interagem com a TK Bcr-Abl como a PI3K/PTEN/AKT e a via Ras/Raf/MEK/ERK (McCUBREY, et al., 2006).

Nosso estudo detectou que o padrão de expressão das moléculas investigadas foi diferente para pacientes em remissão e refratários ao mesilato de imatinibe. Os pacientes refratários ao MI apresentaram alta expressão de *a1*, *c-flip* e *mcl-1* e baixos níveis de RNAm de *bak*, *bax*, *bid* e *fasl* em relação aos pacientes que obtiveram a RCC, portanto somente essas moléculas parecem estar relacionadas à resposta terapêutica dos pacientes com LMC.

A causa desse aumento dos genes anti-apoptóticos e diminuição dos pró-apoptóticos nos pacientes refratários, pelo menos em parte, está associada à manutenção da atividade quinase de Bcr-Abl e a sua amplificação nas células leucêmicas. Esses dados corroboram com os resultados de experimentos realizados por nosso grupo de pesquisa (dados não mostrados) que demonstraram que a atividade de TK é importante para indução e re-estimulação dos sinais anti-apoptóticos e, portanto, a deficiência na inibição de TK não interrompe essa re-estimulação. Nesse contexto, dados publicados por SHARMA e colaboradores (2006) comprovam que a atividade catalítica é imprescindível para a manutenção da resistência a apoptose quando ela já esteve presente e modificou a célula de certa maneira que a tornou dependente de sua ativação. Isto porque, como dito

anteriormente, a atividade de TK é a responsável pela ativação de diferentes vias de sinalização envolvida no controle do ciclo, morte e adesão celular.

Nossos achados foram interessantes visto que indicam um desequilíbrio da expressão dos genes anti e pró-apoptóticos nos pacientes com LMC. O perfil de expressão gênica do paciente refratário ao mesilato de imatinibe sugerem que as células leucêmicas desses pacientes devem ser mais resistentes à apoptose mediada por quimioterápicos e inibidores de TK, o que justificaria sua refratariedade. Essas observações recomendam a possibilidade dessas moléculas serem potenciais alvos terapêuticos da LMC.

A literatura é extensa sobre pesquisas que visam à descrição de novos alvos terapêuticos em pacientes com LMC resistentes ao MI, inclusive há alguns que indicam para essa finalidade drogas que atuam em moléculas envolvidas na maquinaria apoptótica como *bcl-x_L*, *bcl-2*, *mcl-1*, *bak* e *bimel* (NAM, et al., 2007; NGUYEN, et al., 2007; YU, et al., 2002).

Cabe aqui ressaltarmos que apesar do MI ser um medicamento que mudou a história clínica dos pacientes a busca de terapias mais potentes para a LMC continua.

Nesse sentido, pacientes refratários ao mesilato de imatinibe são tratados com os inibidores de TK de segunda geração (dasatinibe e nilotinibe) e a eficácia da associação do MI a outros medicamentos está sendo testada “in vitro” e em pacientes (HEHLMANN, 2007).

Em 2002, YU e colaboradores avaliaram a interação entre mesilato de imatinibe e antagonistas farmacológicos da quinase reguladora de sinal extracelular (MEK) em linhagens Bcr-Abl⁺ (K562 e LAMA). Estes autores observaram que mesilato de imatinibe em conjunto com o inibidor de MEK inibiu a ativação de MAPK *in vitro*, sendo assim, as células expostas a esses compostos demonstraram aumento na liberação do citocromo c mitocondrial e na ativação da pró-caspase-3. Esses autores sugerem que o MI associado ao inibidor de MEK exerce efeito sinérgico sobre Bcr-Abl⁺. A associação de mesilato de imatinibe com o inibidor de MEK aumenta a morte de K562 que expressam altos níveis de Bcr-Abl. YU e cols. (2002), mostraram que seus achados podem aumentar a possibilidade que o MI tem sobre a MAPK citoprotetora e que a inibição da via MEK está associada com o alto sinergismo na indução de danos mitocondriais e apoptose. Isto também indica que

no caso de células Bcr-Abl⁺, a interrupção simultânea das vias transdutoras de sinais pode representar uma estratégia anti-leucêmica.

Outras drogas utilizadas originalmente para tratar diferentes tipos de tumores estão sendo empregadas em conjunto com o MI em estudo “in vitro”, como o inibidor de farnesil-transferase que inibe a via Ras (DOWNWARD, 2003), a geldanamicina e o 17-AAG que inibem e degradam as formas mutantes de Bcr-Abl (GORRE et al., 2002) e o interferon-alfa que potencializa a resposta imune anti-leucêmica na LMC (HEHLMANN, 2007).

Os dados de expressão de genes e proteínas anti e pró-apoptóticos não foram associados à resposta dos pacientes à terapia com o dasatinibe. Portanto não detectamos diferenças no perfil de expressão das moléculas envolvidas na apoptose celular nos pacientes refratários e em remissão pós-dasatinibe. Provavelmente o pequeno número de pacientes refratários (n=3) a esse medicamento prejudicou a análise estatística e contribuiu para esse resultado. Somente foram resistentes a esse medicamento pacientes que apresentavam a mutação T315I em Bcr-Abl a qual é uma das principais causas de ausência de resposta dos pacientes ao MI e DAS.

Para finalizar, é necessário ressaltar que foi realizado no presente estudo uma investigação exclusivamente enfocada em transcrição gênica e expressão protéica. Nesse sentido, não foi objetivo exaurir as possibilidades de atuação de Bcr-Abl e dos inibidores de TK sobre o processo de apoptose celular. Contudo, a análise transcricional dos genes que controlam a morte celular, membros da família Bcl-2, IAP e receptores de morte, foi fundamental para melhor compreensão acerca da participação dessas moléculas no fenótipo de resistência das células Bcr-Abl⁺ à apoptose e do efeito dos inibidores de TK sobre as células leucêmicas dos pacientes com LMC.

V.4. Discussão sobre a ausência de correlação do índice de Sokal com a expressão gênica

O teste de correlação de Spearman aplicado para os dados de expressão gênica dos pacientes ao diagnóstico e os valores do índice de Sokal sugere que a expressão dos genes envolvidos na apoptose não acompanha a previsão da evolução da doença estabelecida por Sokal. Contudo, como foi detectada uma

expressão diferencial dos genes nos grupos de pacientes refratários e em remissão pós-MI seria interessante avaliar pacientes com LMC nas diferentes da doença.

Talvez a expressão de pelo menos um desses genes poderia ser utilizada como marcador de prognóstico independente de Sokal, o que será explorado por nosso grupo em estudos subseqüentes.

V.5. Discussão dos resultados obtidos por *western-blot*

Como explicitado no item Resultados, os dados de expressão protéica das moléculas anti-apoptóticas A1, Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, c-Flip, Mcl-1 e pró-apoptótica Bad refletiram os valores da quantificação dos genes avaliados nos diferentes grupos de sujeitos investigados. Sendo assim, a discussão concernente aos dados de expressão gênica pode ser aplicada aos resultados de expressão protéica.

VI. CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

1. As células mononucleares de pacientes com LMC pré-tratamento com mesilato de imatinibe apresentaram maior expressão dos genes *bcl-x_L*, *c-flip*, *mcl-1* e *fas* e menor expressão de *bik*;
2. Pacientes com LMC pré-dasatinibe possuem elevada expressão dos genes *bcl-x_L*, *c-flip*, *mcl-1* e reduzida dos pró-apoptóticos *bik* e *bok* no sangue periférico;
3. Os inibidores de TK modulam principalmente a transcrição de genes e tradução de proteínas que codificam moléculas da via intrínseca da apoptose celular;
4. O mesilato de imatinibe interferiu na expressão das moléculas BoK, Noxa e Mcl-1;
5. O dasatinibe agiu sobre os níveis de RNAm e de proteínas de A1, Bcl-x_L, Mcl-1, c-Flip, c-IAP-1, c-IAP-2 BaK e Bmf;
6. O inibidor de TK dasatinibe parece possui maior potencial modulador sobre a maquinaria apoptótica do que o mesilato de imatinibe. Tal fato pode estar relacionado à interação desse medicamento com vias de sinalização intracelular diferentes daquelas que o mesilato de imatinibe atua;
7. O perfil de expressão gênica das moléculas que regulam a apoptose é diferente nos pacientes em remissão e refratários ao mesilato de imatinibe;
8. Pacientes refratários ao mesilato de imatinibe têm expressão aumentada de *a1*, *mcl-1* e *c-flip* e reduzida de *bak*, *bax*, *bid* e *fasl* em relação aos em remissão;
9. Não houve correlação entre o índice de SOKAL e os valores da expressão dos genes envolvidos na apoptose celular nos pacientes com LMC ao diagnóstico.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AICHBERGER, K.J.; MAYERHOFER M.; KRAUTH M.T. et al. Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of imatinib and mcl-1 antisense oligonucleotides. **Blood**, New York, v.105, p.3303-3311, Apr. 2005.

ALENZI, F.Q.; WYSE, R.K.; TAMIMI, W.G.; BAMAGA, M.S.; LOFTY, M. A close link between Fas, p53 and Apaf-1 in chronic myeloid leukemia. **Saudi. Med. J.**, Riyadh, v.28, p.1119-21, Jul. 2007.

AMARANTE-MENDES G.P.; MCGAHON A.J.; NISHIOKA W.K.; AFAR D.E.; WITTE O.N.; GREEN D.R. Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-x_L. **Oncogene**, Basingstoke, v.16, p.1383-90, Mar. 1998.

AMARANTE-MENDES, G.P.; GREEN, D.R. The regulation of apoptotic cell death. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v.32, p.1053-1061, Sep. 1999.

ARCESE, W.; IORI, A.P.; DI NUCCI, G.; MARTINEZ-ROLON, J.; PINTO, R.M.; MANDELLI, F. What does one do for the chronic myelogenous leukemia patient in relapse after allogeneic bone marrow transplantation? **Leuk. Lymph.**, London, v.11, p. 213-219, 1993.

BAO, F.; MUNKER, R.; LOERY, C. et al. Comparison of FISH and Quantitative RT-PCR for the Diagnosis and Follow-Up of BCR-ABL-Positive Leukemias. **Mol. Diagn. Ther.**, Auckland, v.11, p.239-45, 2007.

BELLOC, F.; MOREAU-GAUDRY, F.; UHALDE, M. et al. Imatinib and nolitinib induce apoptosis of chronic myeloid leukemia cells through a bim-dependent pathway modulated by cytokines. **Cancer Biol. Ther.**, Georgetown, v.6, p.912-9, Jun 2007.

BERGANTINI, A.P.F.; CASTRO, F.A.; SOUZA, A.M.; FETT-CONTE, A.C. Leucemia Mielóide Crônica e o sistema Fas-FasL **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, Rio de Janeiro, v.27, p.120-125, 2005.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Mol. Immunol.**, Oxford, v.39, p.615-647, Jan. 2003.

BRUMATTI, G.; WEINLICH R.; CHEHAB, C.F.; YON M.; AMARANTE-MENDES, G.P. Comparison of the anti-apoptotic effects of Bcr-Abl, Bcl-2 e Bcl-x_L following diverse apoptogenic stimuli. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.541, p.57-63, Apr. 2003.

BUCHDUNGER, E.; CIOFFI, C.L.; LAW, N. et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v.295, p.139-45, Oct. 2000.

BUENO-DA-SILVA, A.E.B.; BRUMATTI, G.; RUSSO, F.O.; GREEN, D.R.; AMARANTE-MENDES G.P. Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis is independent of constant tyrosine-kinase activity. **Cell death and differ.**, London, v.10, p.592-598, May 2003.

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

CABEBE E.; FISHER G.A. Clinical trials of VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors in pancreatic cancer. **Expert Opin. Investig. Drugs**. London, v.6, p.467-76, Apr 2007.

CASTRO, F.A.; JACYSYN, J.F.; ULBRICH, A.G. et al. Upregulation of c-flip and bcl-xl mrna in chronic myelogenous leukemia patients. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, Rio de Janeiro, v.26, p.123, Nov. 2004.

CHANG L.; KARIN M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature**, London, v.410, p.37-40, Mar. 2001.

CHEN, D.; SHOU Q. Caspase cleavage of Bimel triggers a positive feedback amplification of apoptotic signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.101, p.1235-1240, Feb. 2004.

CHOPRA, R.; PU, Q.Q.; ELEFANTY, A.G. Biology of BCR-ABL. **Blood**, New York, v.13, p.211-229, Dec. 1999.

COOLS, J.; MAERTENS, C.; MARYNEN, P. Resistance to tyrosine kinase inhibitors: calling on extra forces. **Drug Resist. Updat.**, Philadelphia, v.8, p. 119-129, Apr. 2005.

CORTEZ, D.; KADLEC, L.; PENDERGAST, A.M. Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. **Mol. Cell Biol.**, Washington, v.15, p.5531-5541, Oct. 1995.

COTTA, C.V.; BUESO-RAMOS, C.E. New insights into the pathobiology and treatment of chronic myelogenous leukemia. **Ann. Diagn. Pathol.**, Philadelphia, v.11, p.68-78, 2007.

COULTAS, L.; BOUILLET, P.; STANLEY, E.G.; BRODNICKI, T.C.; ADAMS, J.M.; STRASSER, A. Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bik/Blk/Nbk is

expressed in hemopoietic and endothelial cells but is redundant for their programmed death. **Mol. Cell Biol.** Washington, v.24, p.1570-1581, Feb. 2004.

DALEY, G.Q.; VAN ETTEN, R.; BALTIMORE, D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philpadelphia chromosome. **Science**, Washington, v.247, p.824-30, 1990.

D'ANTONIO, J. Chronic myelogenous leukemia. **Clin. J. Oncol. Nurs.**, Pittsburgh, v.9, p.672, Dec. 2005.

DEININGER, M.W.N.; GOLDMAN, J.M.; LYDON, N. MELO, J.V. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. **Blood**, New York, v.90, p.3691-3698, Nov. 1997.

DEININGER, M.W.N.; GOLDAN, J.M.; MELO, J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood**, New York, v.96, p.3343-3356, Nov. 2000.

DEININGER M.W.; VIEIRA S.; MENDIOLA R.; SCHULTHEIS, B.; GOLDMAN, J.M.; MELO, J.V. BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. **Cancer Res.**, Baltimore, v.60, p.2049-55, Apr. 2000.

DI BACCO, A.; KEESHAN, K.; MCKENNA, S.L.; COTTER, T.G. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: Deregulation of cell growth and apoptosis. **Oncologist**, Dayton, v.5, p.405-415, Oct. 2000.

DOGGREL, S.A. BMS-354825: a novel drug with potential for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. **Expert Opin. Biol. Ther.**, London, v.305, p.399-401, Jan. 2005.

DOLL, R.; SMITH, P.G. The long-term effects of x-radiation in patients treated for metrophatia haemorrhagica. **Br. J. Radiol.**, London, v.41, p.362-368, May 1968.

DOWNWARD, J. Targeting RAS signaling pathways in cancer therapy. **Nat. Rev. Cancer**, London, v.3, p.11-22, Jan. 2003.

DRUKER, B.J.; LYDON, N.B. Lessons learned from the development of abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.105, p.3-7, Jan. 2000.

EKERT, P.G.; JABBOUR, A.M.; MANOHARAN, A. et al., Cell death provoked by loss of interleukin-3 signaling is independent of Bad, Bim, and PI3 kinase, but depends in part on Puma. **Blood**, New York, v.108, p.1461-1468, Sep. 2006.

FADERL, S.; TALPAZ, M.; ESTROV, Z.; KANTARJIAN, H. Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.131, p. 207-291, Aug. 1999.

FADERL, S.; KANTARJIAN, H.M.; TALPAZ, M.; O'BRIEN, S.. New treatment approaches for chronic myelogenous leukemia. **Semin. Oncol.**, New York, v.27, p.578-586, Oct. 2000.

FERNANDEZ-LUNA, J.L. Bcr-Abl and inhibition of apoptosis in chronicmyelogenous leukemia cells. **Apoptosis**, London, v.5, p.315-318, 2000.

FRAZER, R.; IRVINE, A.E.; McMULLIN, M.F. Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century. **Ulster Med. J.**, Belfast, v.76(1), p.8-17, November 2006.

FRIDMAN, S.J.; PARSELS, J.; REHEMTULLA, A.; MAYBAUM, J. Cytochrome c depletion upon expression of Bcl-x_S. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.276, p.4205-4210, Feb. 2001.

GOLDMAN, J.M. Imatinib: a viewpoint by John M. Goldman. **Drugs**, New York, v.61, p.1775-1776, 2001.

GOLDMAN, J.M. Chronic myeloid leukemia: still a few questions. **Exp. Hematol.**, Copenhagen, v. 2, p.2-10, Jan. 2004.

GORRE, M.E.; MOHAMMED, M.; ELLWOOD, K. et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. **Science**, Washington, v.293, p.876-880, Aug. 2001.

GUTIERREZ-CASTELLANOS S.; CRUZ, M.; RABELO, L.; GODINEZ, R.; REYES-MALDONADO, E.; RIEBELING-NAVARRO, C.. Differences in BCL-X(L) expression and STAT5 phosphorylation in chronic myeloid leukaemia patients. **Eur. J. Haematol.**, Copenhagen, v.72, p.231-238, Apr. 2004.

HALLAERT, D.Y.H.; SPIJKER, R.; JAK, M., et al. Crosstalk among Bcl-2 family members in B-CLL: selecciclib acts via Mcl-1/Noxa axis and gradual exhaustion of Bcl-2 protection. **Cell death and differ.**, London, v.14, p.1958-1967, Aug. 2007.

HANDA, H.; HEGDE, U.P.; KOTELNIKOV, V.M. et al. Bcl-2 and c-myc expression, cell cycle kinetics and apoptosis during the progression of chronic myelogenous leukemia from diagnosis to blastic phase. **Leuk. Res.**, Oxford, v.21, p.479-489, Jun. 1997.

HEHLMANN, R.; BERGER, U.; HOCHHAUS, A. Chronic myeloid leukemia: a model for oncology. **Ann. Hematol.**, Berlin, v.84, p.487-497, Jun. 2005.

HEHLMANN, R.; HOCHHAUS, A.; BACCARANI, M. Chronic myeloid leukaemia. **Lancet**, London, v.370, p.342-350, Jul. 2007.

HEHLMANN, R.; SCHIFFER C.A. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.357, p.258-65, Jul. 2007.

HEANEY, N.B.; HOLYOAKE, T.L. Therapeutic targets in chronic myeloid leukaemia. **Hematol. Oncol.**, Chichester, v.25, p.66-75, Jun. 2007.

HOOVER, R.R.; GERLACH, M.; KOH, E.Y.; DALEY, G.O. Cooperative and redundant effects of STAT5 and Ras signaling in BCR/ABL transformed hematopoietic cells. **Oncogene**, Basingstoke, v.20, p.5826-5835, Apr. 2001.

HORITA M.; ANDREU E.J.; BENITO A. et al. Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-x_L. **J. Exp. Med.**, New York, v.191, p.977-84, Mar. 2000.

HUNTLY, B.J.; GUILHOT, F.; REID, A.G. et al. Imatinib improves but may not fully reverse the poor prognosis of patients with CML with derivative chromosome 9 deletions. **Blood**, New York, v.102, p.2205-2212, 2003.

IRMLER, I.; THOME, M.; HAHNE, M. et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. **Nature**, London, v.388, p.190-195, Jul. 1997.

JIN, H.; WANG, J.Y.J. Abl Tyrosine Kinase Promotes Dorsal Ruffles but Restrains Lamellipodia Extension during Cell Spreading on Fibronectin. **Mol. Biol. Cell**, Bethesda, v.18, p.4143-4154, Aug. 2007.

JOHN, A.M.; THOMAS, N.S.B.; MUFTI, G.J.; PADUA, R.A. Seminars in cancer biology: Target therapies in myeloid leukemia. **Science**, Washington, v.14, p.41-62, Feb. 2004.

KALIDAS, M.; TALPAZ, M.; ESTROV, Z.; KANTARJIAN, H. Chronic myelogenous leukemia. **JAMA**, Chicago, v.286, p.895-898, Aug. 2001.

KANTARJIAN, H.M.; TALPAZ, M. Therapy of chronic myelogenous leukemia. **Stem cells**, Basel, v.3, p.8-9, Oct. 1993.

KANTARJIAN, H.M.; SMITH, T.L.; O'BRIEN, S.; BERAN, M.; PIERCE, S.; TALPAZ, M. Prolonged survival in chronic myelogenous leukemia after cytogenetic response

to interferon- α therapy. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 122, p. 254-261, Feb. 1995.

KANTARJIAN, H.M.; TALPAZ, M.; O'BRIEN, S. et al. Imatinib mesylate for Philadelphia chromosome-positive, chronic-phase myeloid leukemia after failure of interferon-alpha: follow-up results. **Clin. Cancer Res.**, Denville, v.8, p.2177–2187, Jul. 2002.

KAWAUCHI K.; OGASAWARA T.; YASUYAMA M.; OHKAWA S. Involvement of Akt kinase in the action of STI571 on chronic myelogenous leukemia cells. **Blood Cells Mol. Dis.**, La Jolla, v.31, p.11-17, Jul. 2003.

KEESHAN, K.; MILLS, K.I.; COTTER, T.G.; McKENNA, S.L. Elevated Bcr-Abl expression levels are sufficient for a haematopoietic cell line to acquire a drug-resistant phenotype. **Leukemia**, Baltimore, v.15, p.823-833, Dec. 2001.

KEESHAN, K.; MILLS, K.I.; COTTER, T.G.; McKENNA, S.L. High Bcr-Abl expression prevents the translocation of Bax and Bad to the mitochondrion. **Leukemia**, Baltimore, v.16, p.1725-1734, Mar. 2002.

KIM, H.; SHAH, M.R.; TU, H.C. et al. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. **Nature**, London, v.8, p.1348-1358, Dec. 2006.

KIM, S.K.; YOON Y.D.; PARK, Y.S. et al. Involvement of the Fas-Fas ligand system and active caspase-3 in abnormal apoptosis in human testis with maturation arrest and Sertoli cell-only syndrome Fertil Steril, **Nature**, London, Nov. 2006.

KURIBARA, R.; HONDA, H.; MATSUI, H. et al. Roles of Bim in apoptosis of normal and Bcr-Abl-expressing hematopoietic progenitors. **Mol. Cell. Biol.**, Bethesda, v.24 p.6172-6183, Jul. 2004.

LAVENGA, H.; WOESTENENK, R.; SCHATTENBERG, A.V. et al. Dynamics in chimerism of T cells and dendritic cells in relapsed CML patients and the influence on the induction of alloreactivity following donor lymphocyte infusion. **Bone marrow transplant.**, Basingstoke, v.40, p.585-92, Sep. 2007.

LOMBARDO, L.J.; LEE, F.Y.; CHEN, P. et al. Discovery of *N*-(2-Chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-Carboxamide (BMS-354825), a Dual Src-Abl Kinase Inhibitor with Potent Antitumor Activity in Preclinical Assays. **J. Med. Chem.**, Easton, v.47, p. 6658-6661, June 2004.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle kinases in cancer. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, London, v.17, p.60-65, 2007.

MANASH, K.P.; MUKHOPADHYAY, A.K. Tyrosine kinase – Role and significance in cancer. **Int. J. Med. Sci.**, p.101-115, June 2004.

McCUBREY, J.A.; STEELMAN, L.S.; ABRAMS, S.L, et al. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. **Adv. Enzyme Regul.**, Oxford, v.46, p.249-79, Jul. 2006.

MELO, J.V., BARNES, D.J. Chronic myeloid leukemia as a model of disease evolution in human cancer. **Nature**, London, v.7, p.441-450, Jun. 2007.

MICHOR, F. Chronic myeloid leukemia blast crisis arises from progenitors. **Stem Cells**, New York, v.25, p.1114-1118, Oct. 2007.

MING, L.; WANG, P.; BANK, A.; YU, J.; ZHANG, L. Puma dissociates Bax and Bcl-x_L to induce apoptosis in colon cancer cells. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, Apr. 2006.

MOLICA, S.; MANELLA, A.; DATTILO, A. et al. Differential expression of BCL-2 oncoprotein and Fas antigen on normal peripheral blood and leukemic bone marrow cells. A flow cytometric analysis. **Haematologica**, Pavia, v.81, p.302-309, July 1996.

NAM S.; WILLIAMS A.; VULTUR A. et al. Dasatinib (BMS-354825) inhibits Stat5 signaling associated with apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells. **Mol. Cancer Ther.**, Philadelphia, v.6, p.1400-5, April 2007.

NEVIANI, P.; SANTHANAM, R.; OAKS, J.J. et al. FTY720, a new alternative for treating blast crisis chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.117, p.2408-2421, Sep. 2007.

NGUYEN T.K.; RAHMANI M.; HARADA H.; DENT, P.; GRANT, S. MEK1/2 inhibitors sensitize Bcr/Abl⁺ human leukemia cells to the dual Abl/Src inhibitor BMS-354825. **Blood**, New York, v.109, p.4006-15, May 2007.

NIEMANTSVERDRIET, M.; WAGNER, K.; VISSER, M; BACKENDORF, C. Cellular functions of 14-3-3 ζ in apoptosis and cell adhesion emphasize its oncogenic character. **Oncogene**, Basingstoke, p.1-5, Jul. 2007.

NISHII, K.; KABAROWSKI, J.H.; GIBBONS, D.L. et al. ts BCR-ABL kinase activation confers increased resistance to genotoxic damage via cell cycle block. **Oncogene**, Basingstoke, v.13, p.2225-34, Nov. 1996.

NOWELL, P.C.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome studies on normal and leukemic human leucocytes. **J. Natl. Cancer. Inst.**, Bethesda, v.25, p.85-109, Jul. 1960.

ODA, E.; OHKI, R.; MURASAWA, H. et al. Noxa, a BH-3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. **Science**, Washington, v.288, p.1053-1058.

OLAVARRIA, E.; APPERLEY, J.F. Haematology education: the education program for the annual congress of the European Hematology Association, **Haematology education**, 1:230-238, 2007.

PENDERGAST, A.M.; GISHIZKY, M.L.; HAVLIK, M.H.; WITTE, O.N. SH1 domain autophosphorylation of P210 BCR/ABL is required for transformation but not growth factor independence. **Mol. Cell Biol.**, Bethesda, v.13 p.1728-36, Mar. 1993.

PUTHALAKATH, H.; STRASSER, A. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH-3-only proteins. **Cell Death Differ.**, London, v.9, p.505-512.

QUINTAS-CARDAMA, A.; KANTARJIAN, H.; TALPAZ, M. et al. Imatinib mesylate therapy may overcome the poor prognostic significance of derivative chromosome 9 in patients with chronic myelogenous leukemia. **Blood**, New York, v.105, p.2281-2286, Mar. 2005.

RANDOLPH, T.R. Chronic myelocytic leukemia--Part I: History, clinical presentation, and molecular biology. **Clin. Lab. Sci.**, Washington, v.18, p.149, 2005.

RATHMELL, J.C.; THOMPSON, C.B. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. **Cell**, Cambridge, v.109, p.97-107, April 2002.

RAVANDI, F.; KANTARJIAN, H.M.; TALPAZ, M. et al. Expression of apoptosis proteins in chronic myelogenous leukemia: associations and significance. **Cancer.**, New York, 91, p.1964-72, February 2001.

RESS, A.; MOELLING, K. Bcr is a negative regulator of the Wnt signaling pathway. **Nature**, London, v.6, p.1095-1100, Oct. 2005.

SELLERI, C.; MACIEJEWSKI, J.P.; PANE, F. et al. Fas-mediated modulation of *Bcr-Abl* in Chronic Myelogenous Leukemia results in differential effects on apoptosis. **Blood**, New York, v.92, p.981-989, Aug. 1998.

SALESSE, S.; VERFAILLIE, C.M. Bcr-Abl: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. **Oncogene**, Basingstoke, v.21, p.8547-8559, Dec. 2002.

SAWYERS, C.L. Chronic myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.340, p.1330-1340, Apr. 1999.

SCHMELZLE, T.; MAILLEUX, A.A.; OVERHOLTZER, M. et al. Functional role and oncogene-regulated expression of the BH-3 only factor Bmf in mammary epithelial anoikis and morphogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.104, p.3787-3792, Mar. 2007.

SHAH, N.P.; TRAN, C.; LEE, F.Y.; CHEN, P.; NORRIS, D.; SAWYERS, C.L. Overriding Imatinib Resistance with a Novel ABL Kinase Inhibitor. **Science**, Washington, v.305, p.399-401, Jul. 2004.

SHARMA, K.; WANG, R.X.; ZHANG, L.Y. et al. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. **Pharmacol. Ther.**, Oxford, v.88, p.333-347, Dec. 2000.

SHERBENOU, D.W.; DRUKER, B.J. Applying the discovery of the Philadelphia chromosome. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.117 p.2067-2074, Aug. 2007.

SILVER, R.T.; WOOLF, S.H.; HEHLMANN, R. An evidence-based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: develop for the american society of hematology. **Blood**, New York, v.94, p.1517-1536, Sep. 1999.

SOKAL, J.E.; COX, E.B.; BACCARANI, M. et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. **Blood**, New York, v.63, p.789-99, Apr. 1984.

STEELMAN, L.S.; POHNERT, S.C.; SHELTON, J.G. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. **Leukemia**, Baltimore, v.18, p.189-218, Sep. 2003.

TONG, Y.; YANG, Q.; VATER, C. et al. The pro-apoptotic protein, Bik, exhibits potent antitumor activity that is dependent on its Bh3 domain. **Mol. Cancer Ther.**, Philadelphia, v.1, p.95-102, Dec. 2001.

VAN ETEN, R.A. Mechanisms of transformation by the *BCR-ABL* oncogene: new perspectives in the post-imatinib era. **Leuk. Res.**, Pergamon Press., v.28, p.21-28, May 2004.

WADLEIGH M.; DEANGELO D.J.; GRIFFIN J.D.; STONE R.M. After chronic myelogenous leukemia: tyrosine kinase inhibitors in other hematologic malignancies. **Blood**, New York, v.105, p. 22-30, Jan. 2005.

WEI, Y.; HARDLING, M.; OLSSON, B. Not all imatinib resistance in CML are *BCR-ABL* kinase domain mutation. **Ann. Hematol.**, Berlin, v.85, p.841-847, Sep. 2006.

WEISBERG, E.; MANLEY, P.W.; COWAN-JACOB, S.W.; HOCHHAUS, A.; GRIFFIN, J.D. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. **Nature**, London, v.7, p.345-356, May 2007.

WERTHEIM J.A.; FORSYTHE K.; DRUKER B.J.; HAMMER D.; BOETTIGER D.; PEAR W.S. Bcr-Abl-induced adhesion defects are tyrosine kinase-independent. **Blood**, New York, v.99, p.4122-30, Jun. 2002.

WILKINSON, J.C.; WILKINSON, A.S.; SCOTT, F.L.; CSOMOS, R.A.; SALVESEN, G.S.; DUCKETT, C.S. Neutralization of Smac/Diablo by Inhibitors of Apoptosis (IAPs)

- a caspase-independent mechanism for apoptotic inhibition. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.279, p.51082-51090, Sep. 2004.

YAKOVLEV, A.G.; GIOVANNI, S.; WANG, G.; LIU, W.; STOICA, B.; FADEN, A. I. *BOK* and *NOXA* are essential mediators of p53-dependent apoptosis. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.279, p.28367-28374, Jun. 2004.

YAMAGUCHI, H.; WANG, H.G. Bcl-x_L protects Bimel-induced Bax conformational change and cytochrome c release independent of interacting with Bax or Bimel. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.277, p.41604-41612, 2002.

YOUNG, M.A; SHAH, N.P.; CHAO, L.H. et al. Structure of the kinase domain of an imatinib-resistant Abl mutant in complex with Aurora kinase inhibitor VX-680. **Cancer Res.**, Chicago, p.1007-1014, Jan. 2006.

YU C.; KRYSTAL G.; VARTICOVKSI L. et al. Pharmacologic mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase/mitogen-activated protein kinase inhibitors interact synergistically with STI571 to induce apoptosis in Bcr/Abl-expressing human leukemia cells. **Cancer Res.**, Cambridge, v.62, p.188-99, Jan. 2002.

ZINKEL, S.; GROSS, A.; YANG, E. Bcl-2 family in DNA damage and cell cycle control. **Cell death differ.**, London, v.13, p.1351-1359, Sep. 2006

ANEXO

ALBERT EINSTEIN
INSTITUTO ISRAELITA DE
ENSINO E PESQUISA

São Paulo, 03 de abril de 2006

Ref. CEP/Einstein Nº 06/385

CAAE 0005.0.028.000-06

Título: "Efeito dos inibidores de tirosina-quinase na maquinaria apoptótica na leucemia mielóide crônica".

Investigador Principal: Dr. Nelson Hamerschlak

Ilmo. Sr.
Dr. Nelson Hamerschlak

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein **analisou e aprovou** o projeto de pesquisa supracitado, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Aproveitamos a oportunidade para orientar o pesquisador sobre os seguintes itens:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV. 2d).
- O Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III. 3z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V. 3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97. item III.2.e).

ALBERT EINSTEIN
INSTITUTO ISRAELITA DE
ENSINO E PESQUISA

- De acordo com a carta Circular nº 037 CONEP/CNS/MS os projetos de pesquisa na área de Genética Humana, consoantes com a Resolução CNS nº 340, são avaliados pelo CEP Institucional sendo enviado à CONEP somente os casos explicitados no item VI.3 da Resolução citada.
- Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em 03 de outubro de 2006.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Pinus
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
do Hospital Israelita Albert Einstein

HOSPITAL ALBERT EINSTEIN
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do Paciente: _____ **Idade:** _____

Responsável Legal: _____

Documento de Identificação paciente: _____

Título da pesquisa: ESTUDO DOS EFEITOS DOS INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE
SOBRE A "MAQUINARIA APOPTÓTICA" NA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

Responsável Clínico pelo Projeto: Prof. Dr. Nelson Hamerschlak

Pesquisadores responsáveis:

- Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP
- Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante Mendes, Departamento de Imunologia do ICB-USP;
- Prof. Dr. Keith Okamoto, Prof. Patrícia R. Tobo e Luciana R. Lopes, Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa do Hospital Albert Einstein;
- Aline Fernanda Ferreira, farmacêutica-bioquímica, aluna de mestrado

Justificativa, Objetivos e Procedimentos do Projeto:

Você foi admitido no Hospital São Paulo para tratar a Leucemia Mielóide Crônica (LMC), essa doença constitui 14% de todas as leucemias, com uma incidência anual de 1,6 casos por 100.000 pacientes e atinge principalmente pessoas na faixa etária entre 40 e 60 anos. Essa doença é dividida em fase crônica, acelerada e blástica, e pode ser tratada por meio da quimioterapia (hidroxiuréia), interferon- α , inibidor da enzima tirosina-quinase (STI571, Glivec®), BMS-354825 e transplante de medula óssea (TMO) alogênico. Dentre essas formas de terapia destaca-se o BMS-354825 um novo e promissor tratamento. Medicamento que você receberá durante seu acompanhamento médico neste hospital. Este medicamento parece apresentar poucos efeitos colaterais e possibilitará o controle das células sanguíneas malignas (controle hematológico e citogenético) presentes em sua doença. Nem todos pacientes que usam o BMS-354825 respondem da mesma maneira. Então, os objetivos dessa pesquisa são: 1) estudar porque os pacientes portadores de LMC apresentam resposta diferente quando tomam este medicamento; 2) investigar alguns componentes das células malignas que são capazes de torná-las mais sensíveis ou resistentes aos medicamentos. O melhor conhecimento sobre estes componentes celulares e do efeito dos medicamentos contra células malignas presentes na LMC, em diferentes estágios, poderá levar os médicos ao desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para essa doença.

A função deste termo é convidá-lo a participar dessa pesquisa. Caso você aceite participar, você doará 40 ml de sangue, antes e após 6 e 12 meses do início de seu tratamento com o BMS-354825. A amostra do seu sangue venoso será utilizada apenas para essa pesquisa. A colheita de sangue será realizada por profissionais capacitados (enfermeiros, biomédicos ou farmacêuticos) com material descartável para que não haja riscos de contaminação. Os riscos dessa colheita serão mínimos, existindo uma pequena chance de aparecimento de um hematoma, inchaços após a colheita. Todas as

informações sobre sua condição médica e análise de seu sangue serão mantidas em sigilo.

Os dados serão armazenados em um computador sem identificação e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação literária.

A sua participação neste estudo é voluntária. Caso você não queira participar, os cuidados médicos que você recebe não serão afetados e se você aceitar você poderá retirar-se do estudo em qualquer momento, sem afetar os cuidados médicos.

Declaro que concordei voluntariamente em participar no projeto de pesquisa acima referido, e fui devidamente informado em detalhes pelos responsáveis do projeto sobre os meus direitos, tais como:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de quaisquer dúvidas acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa da qual participei;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo à continuação do meu cuidado, medicação e tratamento médico;
3. A segurança de que não serei identificado (a) e de que a informação relacionada à minha privacidade será confidencial;
4. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade em participar do mesmo, bem como de fornecer os resultados de todos os exames laboratoriais realizados;
5. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à Saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa;

Nome do paciente: _____

Assinatura: _____

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Nome do investigador: _____

Assinatura: _____

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Se o paciente não puder assinar:

Nome do representante: _____

Assinatura: _____

São Paulo, _____ de _____ de _____.