



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA



VIRGÍNIA CAMPOS SILVESTRINI

Análises proteômicas aplicadas à Investigação dos mecanismos de resistência celular em Leucemia Mieloide Crônica

Ribeirão Preto

2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

*Análises proteômicas aplicadas à Investigação dos mecanismos de resistência
celular em Leucemia Mieloide Crônica*

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Vitor Marcel Faça.

**Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da
Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD)**

Ribeirão Preto

2023

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

FICHA CATALOGRÁFICA

SILVESTRINI, V.C.

Análises proteômicas aplicadas à Investigação dos mecanismos de resistência celular em Leucemia Mieloide Crônica. Ribeirão Preto, 2023.

Virgínia Campos Silvestrini; Orientador, Vitor Marcel Faça – 2023.

124 p.: il., 30 cm.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Vitor Marcel Faça.

1. LMC. 2. Proteômica. Mutação T315I. Inibidores tirosinoquinase.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SILVESTRINI, Virgínia Campos

Título: *Análises proteômicas aplicadas à Investigação dos mecanismos de resistência celular em Leucemia Mieloide Crônica*

Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração bioquímica.

Aprovado em: 26/01/2023

Banca Examinadora

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Minha gratidão...

A Deus,

Pelo dom da Vida,
Pela Conclusão deste trabalho
por iluminar minha vida e meus estudos sempre

Ao meu amor, Arthur

Pelo amor e companheirismo
Por ser minha fonte de cuidado e inspiração

À minha mãe e meu pai

Pelo incentivo a conquista dos meus objetivos
Por nunca me deixar desistir de realizar meus sonhos

Aos meus avós, Márcia e João Evandro

Que sempre estiveram ao meu lado
Me apoiando e me encorajando a seguir em frente

Ao meu irmão, Júnior

Pela cumplicidade e amizade

À minha família do coração, Elieti e Fernando

Por todo amor e carinho
Por ser suporte em todos os momentos

Aos meus amigos, **Aline, Ana, Ale, Carol, Cris, Erika, Natasha, Iza, Lucas, Jojo e Leo**

Pela ajuda nos momentos difíceis,
Risadas e momentos de alegria.

A vocês o meu muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

- ❖ Ao meu orientador, **Prof. Dr. Vítor Marcel Faça** pela oportunidade e confiança depositada em mim nestes quase 6 anos de convivência. Obrigada por todo apoio, incentivo e por representar para mim um importante modelo pessoal e profissional;
- ❖ A minha Co-orientadora, **Profa. Dra. Fabíola Traina**, pelos ensinamentos e pela oportunidade de colaborar com seu grupo de pesquisa;
- ❖ A técnica especialista do Laboratório, **Ana Masson**, por todo auxílio profissional e pessoal, e, sobretudo, pela oportunidade de crescer cientificamente nestes últimos anos;
- ❖ Aos mestres do programa de pós-graduação em **Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**. Obrigada pelos ensinamentos transmitidos durante estes anos;
- ❖ Aos meus amigos do **Laboratório de Proteômica do câncer: Ana, Alessandra, John, Guilherme, Izadora e Beatriz**.
- ❖ Aos pesquisadores, alunos e funcionários do **Hemocentro de Ribeirão Preto que tanto me ajudaram**;
- ❖ Aos funcionários e amigos do Departamento de **Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**. Em especial à **Ivone, Ana e Silvinha**, por toda a ajuda e amizade;
- ❖ A **CAPES, FAPESP, CNPq e HEMOCENTRO** pelo suporte financeiro e incentivo a pesquisa;
- ❖ Aos **integrantes da banca examinadora**, que disponibilizaram parte do seu tempo para análise deste trabalho;
- ❖ A **todas as pessoas** que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

**O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de
Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil**

*Que nossos esforços desafiem as impossibilidades.
Lembrai-vos que as grandes proezas da história foram conquistas
daquilo que parecia impossível”*

(Charles Chaplin)

RESUMO

Análises proteômicas aplicadas à Investigação dos mecanismos de resistência celular em Leucemia Mieloide Crônica

SILVESTRINI, V.C. Tese de doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2023.

A leucemia mieloide crônica (LMC) é caracterizada pela presença da oncoproteína BCR-ABL1, com ativação constitutiva de sua atividade tirosina quinase, e pela transformação neoplásica de células-tronco hematopoiéticas. O desenvolvimento dos inibidores tirosinoquinase (TKI) específicos para BCR-ABL1, como o mesilato de imatinibe, representou um avanço importante no tratamento da LMC. Entretanto, os atuais desafios terapêuticos são: i- oferecer aos pacientes cura a longo prazo, sem a manutenção contínua do tratamento, e, ii- reduzir o impacto a resistência ao tratamento observada em até 20% dos pacientes. A mutação T315I em BCR-ABL1 produz resistência a todos os TKI disponíveis. Emergem dessas demandas, o racional lógico para complementação terapêutica baseada em alvos moleculares coadjuvantes da ação transformante de BCR-ABL1. A identificação da associação da proteína adaptadora IRS1 com BCR-ABL1 e a demonstração dos efeitos antineoplásicos do inibidor farmacológico NT157 de IGF1R-IRS1/2 em modelos celulares BCR-ABL1, independente do *status* mutacional para T315I, abriram novas perspectivas para redução do impacto da resistência em pacientes. Assim, buscamos identificar novos mecanismos moleculares do NT157 e imatinibe em células BCR-ABL1, mutadas ou não para T315I, através de análises proteômicas. Para isso, utilizamos modelos *in vitro* de linhagens celulares murinas Ba/F3 (WT e T315I) que foram submetidas ao tratamento com NT157 e/ou imatinibe e também células primárias de paciente com mutação T315I. A fim de elucidar os processos moleculares precoces desencadeados por NT157, utilizamos condições que não interferem na viabilidade das células, mas que alteram mecanismos de sobrevivência. A análise proteômica detalhada em células Ba/F3 demonstrou proteínas que são NT157 e imatinibe-dependentes, destacando processos regulados como sistema ubiquitina proteassoma, metabolismo celular e regulação da transcrição gênica. Em células primárias, nossos resultados indicaram que o tratamento com NT157 (6,4 μ M) diminuiu a viabilidade e aumentou a apoptose em PBMCs de portador da mutação T315I. Também através de uma análise proteômica quantitativa, destaca-se proteínas nas células do paciente como a citocina CD70, que teve seus níveis aumentados com o tratamento pelo NT157. Também foram identificadas alterações em outras proteínas conhecida envolvidas na LMC, como CD44, CD14 e CD33. Nossas descobertas sugerem que a inibição da sinalização de IGF1R/IRS tem especificidade importante e abre perspectiva de possíveis terapias combinadas com TKI para pacientes resistentes.

Palavras-chave: LMC, proteômica, mutação T315I, inibidores tirosinoquinase.

ABSTRACT

Investigation of cellular resistance mechanisms in Chronic Myeloid Leukemia using proteomics strategies

PhD thesis – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. 2023.

Chronic myeloid leukemia (CML) is characterized by the presence of the BCR-ABL1 oncoprotein, with constitutive activation of its tyrosine kinase activity, and the neoplastic transformation of hematopoietic stem cells. The development of BCR-ABL1-specific tyrosine kinase inhibitors (TKIs), such as imatinib mesylate, represented an important advancement in the treatment of CML. However, the current therapeutic challenges are: i- offering patients a long-term cure, without ongoing maintenance of treatment, and, ii- reducing the impact of resistance to treatment observed in up to 20% of patients. The T315I mutation in BCR-ABL1 produces resistance to all available TKIs. From these demands, the logical rationale for therapeutic complementation based on molecular targets supporting the transforming action of BCR-ABL1 emerges. The identification of the association of the IRS1 adapter protein with BCR-ABL1 and the demonstration of the antineoplastic effects of the pharmacological inhibitor NT157 of IGF1R-IRS1/2 in BCR-ABL1 cell models, regardless of the mutational status for T315I, opened new perspectives for reducing the impact of resistance in patients. Thus, we sought to identify new molecular mechanisms of NT157 and imatinib in BCR-ABL1 cells, mutated or not for T315I, through proteomic analysis. For this, we used in vitro models of murine cell lines Ba/F3 BCR-ABL1 (WT e T315I) that were submitted to treatment with NT157 and/or imatinib and also primary cells from patients with mutation T315I. In order to elucidate the early molecular processes triggered by NT157, we used conditions that do not interfere with cell viability, but that alter survival mechanisms. Detailed proteomic analysis in Ba/F3 cells demonstrated proteins that are NT157 and imatinib-dependent, highlighting regulated processes such as the ubiquitin proteasome system, cellular metabolism and regulation of gene transcription. In primary cells, our results indicated that treatment with NT157 (6.4 μ M) decreased viability and increased apoptosis in PBMCs carrying the T315I mutation. Also, through a quantitative proteomic analysis, proteins in the patient's cells stand out, such as the CD70 cytokine, which had its levels increased with NT157 treatment. Changes were also identified in other proteins known to be involved in CML, such as CD44, CD14 and CD33. Our findings suggest that inhibition of IGF1R/IRS signaling has important specificity and opens up the prospect of possible combination therapies with TKI for resistant patients.

Keywords: CML, proteomics, T315I mutation, tyrosine kinase inhibitors.

ABREVIATURAS

ACN - Acetonitrila

AKT - kinase-transforming protein

AKT - Protein kinase B

ATCC - American Type Culture Collection

CTRL - Controle

DTT - Ditioneitol

FDA - Food and Drug Administration

GO - Gene Ontology

IGF - Fator de Crescimento de Insulina

INCA - Instituto Nacional do Câncer

kDa - Kilo Dalton

LC-MS/MS - Espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida

LFQ – Label free quantification

LMA – Leucemia Mieloide Aguda

LMC – Leucemia Mieloide Crônica

MO – Medula Óssea

MS – Espectrometria de Massas

OMS - Organização Mundial da Saúde

PANTHER - Protein Analysis Through Evolutionary Relationships

PBS - Salina tamponada com fosfato

PDGF - Platelet-derived Growth Factor

PI3K - Phosphatidylinositol3-kinase

PTM – Modificação Pós-Translacional

RNA - Ácido ribonucleico

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil-sulfato de sódio

SFB - Soro fetal bovino

SILAC - Stable Isotopic Labeling in Cell Culture

STAT - Signal transducer and transcription activator

STRING - Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes

TKI – Inibidores tirosinoquinase

TMT – Tandem Mass Tagg

SÍMBOLOS

g - Grama

x g – Força centrífuga relativa

µg - Micrograma

ng - Nanograma

L - Litro

mL - Mililitro

µL - Microlitro

cm - Centímetro

µm - Micrômetro

M - Molar

pH - Log negativo da concentração de H⁺

RPM - Rotações por minuto

% - Porcentagem

°C - Graus Celsius

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Resumo das alterações citogenéticas e moleculares que ocorrem no cromossomo Ph+ para formação do gene fusionado BCR-ABL1.
- Figura 2:** Principais vias reguladas pela ativação da proteína BCR-ABL1, alterando a sobrevivência celular, proliferação, ciclo celular, apoptose e microambiente de células-tronco leucêmicas.
- Figura 3:** Estruturas químicas dos inibidores do sítio ativo de BCR-ABL1, incluindo os inibidores do tipo 2 imatinibe, nilotinibe e ponatinibe, e dos inibidores do tipo 1, bosutinibe e desatinibe.
- Figura 4:** Modelos estruturais de C-ABL com os inibidores tirosinoquinase desatinibe e imatinibe.
- Figura 5:** Sinalização química desencadeada por ligação de tirosinas quinases em seus receptores.
- Figura 6:** Principais vias envolvidas na ativação de IGF1R, bem como os inibidores e anticorpos monoclonais já desenvolvidos.
- Figura 7:** Estrutura molecular do fármaco inibidor de IGF1R-IRS1/2, NT157.
- Figura 8:** Representação da estrutura geral e regiões relevantes para um reagente TMT.
- Figura 9:** Esquema ilustrativo de diversas quinases envolvidas na sinalização celular em variados tipos de câncer.
- Figura 10:** Fluxograma da metodologia utilizada.
- Figura 11:** Protocolo e organização de amostras marcadas com TMT para análise proteômica global e de fosfopeptídeos.
- Figura 12:** Caracterização por *western blotting* da expressão de caspase-3 clivada em células WT e T315I tratadas com NT157 nas concentrações de 0,8 e 1,6 μM , nos tempos de 0, 12, 24 e 48 horas.
- Figura 13:** Caracterização por *western blotting* de vias de sinalização relacionadas a LMC.
- Figura 14:** Análise da viabilidade celular das células WT e T315I pelo ensaio de MTT.
- Figura 15:** Análise da viabilidade celular das células WT e T315I pelo ensaio de MTT.
- Figura 16:** Resumo dos dados proteômicos coletados para as linhagens celulares WT e T315I.
- Figura 17:** Avaliação da assinatura molecular das 3.093 proteínas identificadas em células murinas WT e T315I tratadas com imatinibe 1 μM e NT157 0,8 μM .
- Figura 18:** Comparação das alterações proteômicas promovidas por NT157 em células WT e T315I.
- Figura 19:** Análise de interações para as 559 proteínas reguladas com NT157 0,8 μM em células WT.
- Figura 20:** Análise de interações para as 183 proteínas reguladas com NT157 0,8 μM em células T315I.
- Figura 21:** Comparação das alterações promovidas por imatinibe em células WT e T315I.
- Figura 22:** Análise de interações para as 301 proteínas reguladas com imatinibe 1 μM em células WT.
- Figura 23:** Análise de interações para as 404 proteínas reguladas com imatinibe 1 μM em células T315I.
- Figura 24:** Comparação das alterações proteômicas promovidas por NT157 e imatinibe em células WT x T315I.
- Figura 25:** Análise de interações para as 141 proteínas NT157 dependentes em células T315I.

- Figura 26:** Avaliação da assinatura molecular dos 1.078 sítios de fosforilação encontrados na análise fosfoproteômica em células murinas WT e T315I tratadas com imatinibe 1 μ M e NT157 0.8 μ M.
- Figura 27:** Fosfopeptideo de Abl2-Ser632, ativado pelo tratamento de imatinibe.
- Figura 28:** Comparação das alterações fosfoproteômicas induzidas por NT157 e imatinibe em células WT e T315I.
- Figura 29:** Análise de interações para as 72 proteínas NT157 dependentes em células T315I.
- Figura 30:** Análise de apoptose e viabilidade em células mononucleares derivadas de paciente com mutação T315I
- Figura 31:** Análise de apoptose e viabilidade em células mononucleares derivadas de paciente com LMC.
- Figura 32:** Análise de interações para as 60 proteínas reguladas com NT157 em células primárias de pacientes.
- Figura 33:** Expressão proteica das 60 proteínas mais reguladas em amostra de paciente com LMC tratadas com NT157.
- Figura 34:** Expressão de proteínas de adesão em células primárias.
- Figura 35:** Diagrama de Venn das proteínas reguladas entre células Ba/F3 e amostras primárias de pacientes.
- Figura 36:** Análise de interações para as 858 proteínas sobrepostas gerou subrede de proteínas envolvidas principalmente no metabolismo celular.
- Figura 37:** Análise de interações para as 858 proteínas sobrepostas gerou subrede de proteínas principalmente envolvidas no UPS e em resposta a transdução de sinal por danos no DNA.
- Figura 38:** Análise de interações para as 858 proteínas sobrepostas gerou subrede de proteínas principalmente envolvidas na regulação do processamento do RNA.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características dos pacientes com LMC no momento da coleta do material.

Tabela 2: Proteínas analisadas por *western blotting*: proteína, peso molecular, espécie produzida e fabricante de anticorpos.

Tabela 3: Proteínas selecionadas para comparação dos estudos proteômicos e fosfoproteômicos em cultura de células e amostra primária.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Leucemia Mieloide Crônica.....	21
1.2. A proteína quinase BCR-ABL1.....	22
1.3. Aspectos bioquímicos da LMC.....	24
1.4. Tratamento da LMC utilizando BCR-ABL1 como alvo.....	25
1.5. Inibidores tirosinoquinase e resistência.....	27
1.6. Via de sinalização de IGFIR.....	31
1.7. O papel de IRS1/2.....	32
1.8. Inibidor Farmacológico de IGF1R/IRS1-2.....	33
1.9. Análise proteômica aliada a descoberta de alvos terapêuticos na LMC.....	35
1.10. Análise fosfoproteômica aliada à descoberta de biomarcadores.....	39
OBJETIVOS.....	43
2.1. Objetivos gerais.....	44
2.2. Objetivos específicos.....	44
ABORDAGEM EXPERIMENTAL.....	45
3.1. Fluxograma da metodologia utilizada.....	46
3.2. Causuística.....	46
3.3. Células primárias de pacientes com LMC.....	47
3.4. Linhagens celulares Ba/F3.....	47
3.5. Tratamento com NT157 e imatinibe.....	48
3.6. Extração celular e quantificação proteica das linhagens e amostra primária.....	48
3.7. Ensaio funcionais.....	49
3.7.1. Análise de viabilidade celular de Ba/F3 e amostras primárias.....	49
3.7.2. Ensaio de apoptose.....	50
3.7.3. Análise por western blotting.....	51
3.8. Análise proteômica e fosfoproteômica das linhagens celulares.....	52
3.8.1. Preparo das amostras e digestão enzimática.....	52
3.8.2. Fosfoenriquecimento de peptídeos.....	52

3.8.3. Marcação com TMT.....	53
3.8.4. Análise por espectrometria de massas.....	54
3.9. Análise proteômica de amostra primária leucêmica.....	55
3.10. Análise estatística.....	55
3.11. Análise de redes de interação.....	55
RESULTADOS.....	56
<u>4.1. Ensaio funcionais utilizando células Ba/F3 WT e T315I.....</u>	<u>57</u>
4.1.1. Caracterização da dosagem de NT157.....	57
4.1.2. Avaliação da viabilidade celular decorrentes do tratamento com NT157.....	59
<u>4.2. Ensaio de proteômica global utilizando células Ba/F3 WT e T315I.....</u>	<u>59</u>
4.2.1. Caracterização das alterações proteômicas desencadeadas pelo tratamento com NT157 e imatinibe.....	61
4.2.2. Caracterização das alterações proteômicas desencadeadas pelo tratamento com NT157.....	65
4.2.3. Comparação de alterações proteômicas desencadeadas pelo tratamento com imatinibe.....	69
4.2.4. Comparação das alterações desencadeadas por NT157 e imatinibe.....	73
<u>4.3. Avaliação fosfoproteômica utilizando células Ba/F3 WT ou T315I tratadas com NT157 e imatinibe.....</u>	<u>76</u>
<u>4.4. Investigação das alterações funcionais promovidas pelo tratamento com NT157 em células primárias de pacientes com LMC.....</u>	<u>82</u>
4.4.1. Avaliação da viabilidade celular e apoptose.....	83
4.4.2. Observações proteômicas gerais decorrentes do tratamento de NT157 em células primárias de pacientes com mutação T315I.....	84
4.4.3. Avaliação de proteínas de superfície em amostras primárias tratadas com NT157.....	88
<u>4.5) Integração de dados proteômicos de linhagens celulares e amostras de paciente.....</u>	<u>89</u>
DISCUSSÃO.....	96
CONCLUSÕES FINAIS.....	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1) Leucemia Mieloide Crônica

A Leucemia Mieloide Crônica resulta da transformação neoplásica de células-tronco hematopoiéticas, sendo caracterizada pela expansão do componente mieloide na medula óssea que mantém a capacidade de diferenciação terminal. A doença é associada a uma anormalidade citogenética específica, o cromossomo *Philadelphia* (Ph), resultando na formação do gene de fusão BCR-ABL1 (JABBOUR, E; KANTARJIAN, 2014, 2018).

A prevalência de pacientes com LMC é de aproximadamente um a dois casos para cada 100 mil habitantes por ano, totalizando 15% a 20% das leucemias. É mais prevalente entre adultos de 45 a 60 anos, afetando menos de 2% das crianças. De acordo com dados disponíveis no Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o ano de 2020, foram estimados cerca de 10.810 novos casos de LMC no Brasil, com morte de aproximadamente 6.738 pacientes (INCA, 2022). No Brasil, a mediana de idade da apresentação da doença é, no mínimo, dez anos mais baixa que a encontrada na literatura internacional (GOLDMAN, 2010).

Devido a heterogeneidade clínica encontrada nos exames de pacientes com LMC, seu curso natural pode ser caracterizado por três fases, que podem ser consecutivas ou não: crônica, acelerada e crise blástica, que necessitam de abordagens clínicas específicas. Na primeira fase, as células da linhagem mieloide apresentam hiper celularidade medular com capacidade de diferenciação. Nesta fase, as manifestações sanguíneas conseguem ser temporariamente controladas por quimioterapia. Na segunda fase, verifica-se esplenomegalia não controlada com terapia medicamentosa, 10-19% de blastos no sangue periférico e/ou medula óssea, mais que 20% de basófilos e elevação no número de plaquetas (trombocitose) não controlada com terapia. Também pode ser observado diminuição de plaquetas (trombocitopenia) não relacionada à terapia. Por fim, na crise blástica mieloide ou linfóide, as células perdem sua capacidade de diferenciação terminal, com mais que 20% de blastos no sangue periférico, caracterizando quadro de Leucemia Mieloide Aguda (INCA 2022).

O diagnóstico para LMC atualmente é baseado em sintomas clínicos constitucionais e alterações laboratoriais relacionadas à proliferação de células mieloides, principalmente leucocitose às custas de granulócitos terminais e seus precursores na medula óssea e sangue periférico (SCOPIM-RIBEIRO *et al.*, 2021). As principais sintomatologias incluem letargia, perda de peso, desconforto abdominal, sudorese, anemia, esplenomegalia e febre. Adicionalmente, cerca de 20% dos pacientes são assintomáticos (JABBOUR, Elias; KANTARJIAN, 2022).

As alterações laboratoriais são monitoradas através hemograma e mielograma, com pesquisa adicional da presença do gene BCR-ABL1 nas células da medula óssea por PCR-multiplex, hibridização fluorescente *in situ* ou análise de cariótipo. Portanto, dada a ampla disponibilidade de estratégias para diagnóstico, a identificação da doença em seu estágio inicial permite um bom prognóstico para pacientes com LMC (INCA 2022).

1.2) A proteína quinase BCR-ABL1

O cromossomo Philadelphia (Ph+) é resultado de uma translocação recíproca no cromossomo 9 e 22 (9; 22) (q34; q11), que justapõe o oncogene 1 C-ABL (ABL1) no cromossomo 9, com o gene da região *breakpoint cluster* (BCR) no cromossomo 22, gerando o gene fusionado BCR-ABL1 (**Figura 1**). ABL1 é uma proteína com atividade tirosina quinase não receptora expressa na maioria dos tecidos, e BCR é uma proteína de sinalização que contém múltiplos domínios regulatórios (TENG *et al.*, 2022). A proteína quimérica BCR-ABL1, produto da translocação gênica, apresenta atividade tirosina quinase independente de seus reguladores fisiológicos, ativando vias de sinalização, proliferação e diferenciação celulares em LMC, que incluem STAT, MAPK e PI3K/AKT/mTOR (**Figura 2**).

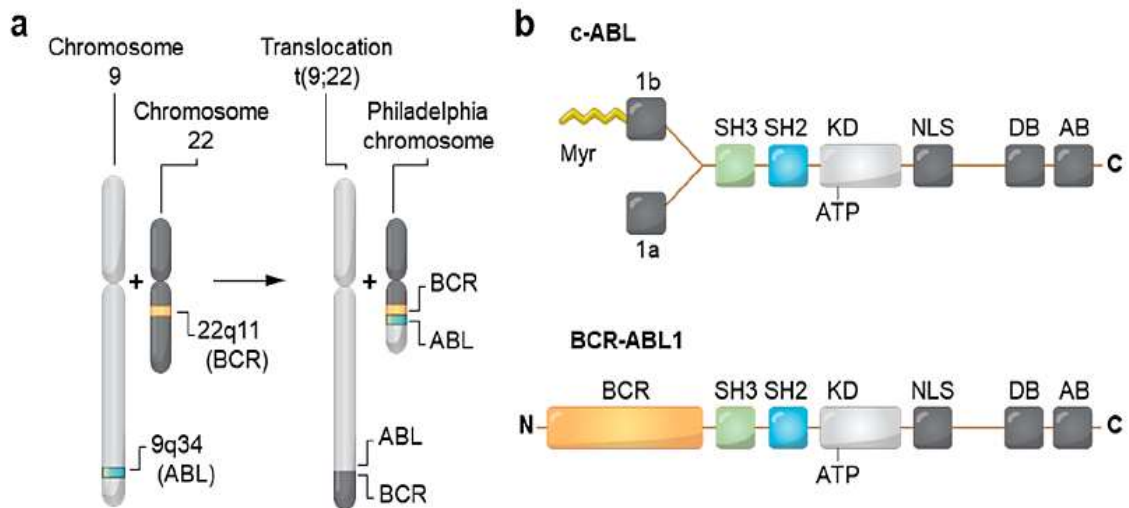


Figura 1: Resumo das alterações citogenéticas e moleculares que ocorrem no cromossomo Ph+ para formação do gene fusionado BCR-ABL1. Em A) são ilustradas as posições nos cromossomos dos genes envolvidos nessa translocação. Em B) é ilustrada a comparação dos domínios estruturais e funcionais proteína C-ABL original e da químera BCR-ABL1. Adaptado de (TENGG *et al.*, 2022).

Dependendo da região gênica de BCR ou ABL1 envolvidas na translocação, três isoformas diferentes de BCR-ABL1 podem ser produzidas, que são baseadas em seus pesos moleculares: p190, p210 e p230. A primeira (p190) é comumente relacionada ao diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda e as demais, mais frequentes na LMC (DALEY; VAN ETEN; BALTIMORE, 1990).

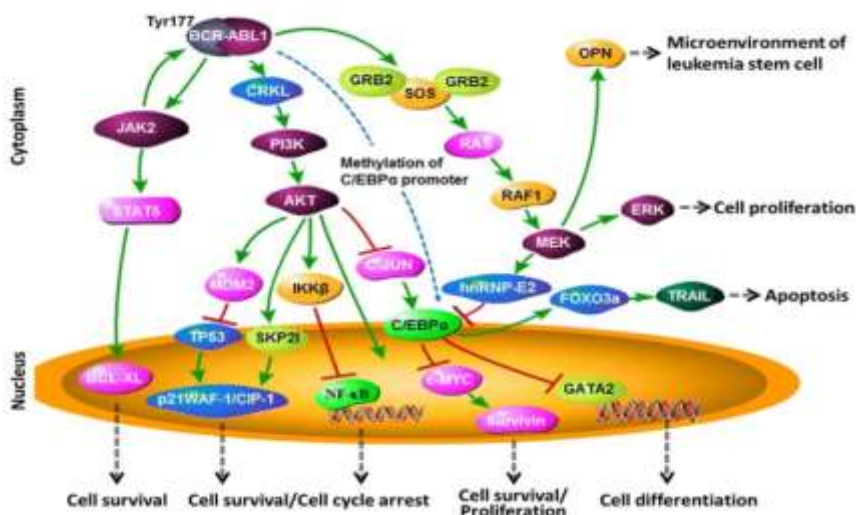


Figura 2: Principais vias reguladas pela ativação da proteína BCR-ABL1, alterando a sobrevivência celular, proliferação, ciclo celular, apoptose e microambiente de células-

tronco leucêmicas. Em violeta, estão destacadas as quinases ativadas. Em rosa, há marcação de oncoproteínas comprovadamente envolvidas e em azul, proteínas supressoras de tumor (KANG *et al.*, 2016).

1.3) Aspectos bioquímicos da LMC

Os aspectos bioquímicos de sinalização celular em LMC são extremamente complexos, visto que várias vias estão ativadas de forma a promover a sobrevivência, inibição da morte celular, e, sobretudo, a transformação e aquisição da capacidade de auto renovação celular. Tal fenômeno ocorre em decorrência da ativação da tirosina quinase de forma constitutiva em ABL-1 (GOLDMAN, 2010).

Sabe-se, atualmente, que a adesão em células transformadas pela translocação de BCR-ABL, ocorre, em grande parte devido à proteína CRK-like (adapter molecule CRK), substrato fosforilado de BCR-ABL1 (**Figura 2**). Também há ativação de outras proteínas fosforiladas em tirosina, como: paxilina (PXN), vinculina (VCL), p125FAK (focal adhesion kinase p125) e as proteínas de adesão talina (TLN) e tensina (TNS) a jusante das integrinas (ITG). Por meio de várias proteínas intermediárias, BCR-ABL1 também regula positivamente a expressão de CD44 ou integrina $\alpha 6$, e estimula a função do antígeno (VLA)-4 e -5 (KANG *et al.*, 2016).

Sabe-se que três principais vias de sinalização estão associadas à ativação constitutiva de BCR-ABL1: **1)** Transdução de sinal através da ativação de STAT5; **2)** Ras/proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK); **3)** Fosfoinositol 3-quinase (sinalização mediada por PI3K/AKT). Estudos publicados anteriormente demonstraram que STAT5 media a transcrição de vários fatores pró-sobrevivência e proliferação, bem como fatores anti-apoptóticos como Bcl-xL (Bcl2-associated agonist of cell death). De forma semelhante, a sinalização de PI3K/AKT apresenta papel na sobrevivência celular e sinalização anti-apoptótica, enquanto a ativação da sinalização Ras/MAPK foi implicada na transformação BCR-ABL (MORADI *et al.*, 2019).

Recentemente, foi identificada a participação de p38-MAPK em células de LMC KU812, que apresenta heterogeneidade em blastos. O estudo demonstra que a regulação de BCR-ABL1 promove um aumento de p38-MAPK de forma constitutiva, em diferentes estágios do desenvolvimento (NARASIMHAN *et al.*, 2022). No geral, BCR-

ABL1 é uma proteína de sinalização suscetível a transformações, que interfere em vários aspectos da maquinaria celular (MORADI *et al.*, 2019).

1.4) Tratamento da LMC utilizando BCR-ABL1 como alvo

A descoberta de que BCR-ABL1 é indispensável para patogênese da LMC, e que a atividade tirosina quinase de ABL1 é essencial para sua transformação, a tornaram alvo atraente para intervenção terapêutica. Por muitos anos, o tratamento da LMC era realizado com uso de hidroxiureia, inibidor da ribonucleotídeo redutase, ou interferon-alfa, que atua na redução do crescimento e divisão das células leucêmicas, sem alteração significativa no curso clínico da doença. Posteriormente, o transplante halogênico de células-tronco hematopoiéticas começou a ser utilizado como terapia curativa. Porém, apenas 20% dos pacientes eram elegíveis em decorrência da idade ou por falta de doador compatível (GÓMEZ-ALMAGUER *et al.*, 2016).

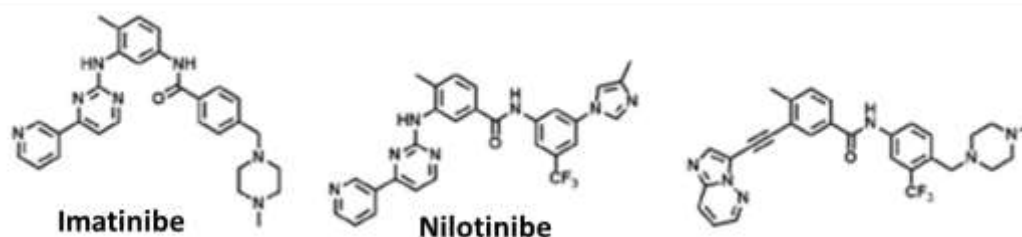
Foi somente no ano de 1996 que começaram a surgir estudos a partir da inibição da atividade tirosina quinase de BCR-ABL1 com o composto CGP-57148, da classe das 2-fenilaminopirimidina (DRUKER *et al.*, 2001a). O fármaco atua como inibidor competitivo, possuindo capacidade de inibir a estrutura de ligação a quinase na molécula de ATP, mostrando-se específico para atividade tirosina quinase de ABL1 em comparação a outros inibidores tirosinoquinase (TKI) relatados anteriormente (GOLDMAN, 2010).

Estudos demonstraram que as linhagens celulares K562, derivadas de pacientes com LMC em crise blástica são afetadas por CGP-57148, sem efeitos em células normais. Sua atividade também foi comprovada em tumores induzidos por BCR-ABL1. Em ensaios de formação de colônias de sangue periférico ou medula óssea de pacientes com LMC, o tratamento ocasionou uma diminuição de 90 a 98% no número de colônias formadas, sem inibição de colônias em amostras de pacientes saudáveis (DRUKER *et al.*, 1996).

O composto CGP-57148 passou a ser denominado de STI571 no estudo clínico de fase 1 para pacientes com LMC com falha no tratamento com interferon- α . No estudo clínico de fase 2, o composto STI571 induziu resposta hematológica completa em 95%

dos pacientes tratados e resposta citogenética parcial em 60% (DRUKER *et al.*, 2001b). Posteriormente, o composto passou a ser chamado mesilato de imatinibe (**Figura 3**) e é atualmente o medicamento de primeira escolha para tratamento da LMC, apresentando sobrevida global de 83% dos pacientes tratados. O fármaco está disponível no Brasil desde o ano 2.000. A recomendação inicial era para pacientes refratários ao interferon- α , sendo posteriormente aprovado como a primeira opção terapêutica no tratamento da LMC (SILVEIRA; DALDEGAN; FERRARI, 2011).

Tipo 2



Tipo 1

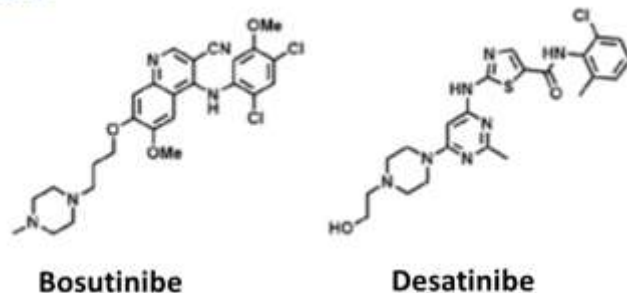


Figura 3: Estruturas químicas dos inibidores do sítio ativo de BCR-ABL1, incluindo os inibidores do tipo 2 imatinibe, nilotinibe e ponatinibe, e dos inibidores do tipo 1, bosutinibe e desatinibe (TENG *et al.*, 2022).

Atualmente, o imatinibe genérico é disponibilizado para pacientes do SUS. As medicações dasatinibe (Sprycell; Bristol-Myers Squibb) e nilotinibe (Tasigna; Novartis) são disponibilizadas em segunda linha no Brasil (**Figura 3**). Se a droga de primeira escolha falhar, ou não apresentar eficácia, a dose é aumentada ou outro TKI pode ser utilizado. O ponatinibe é uma opção após tentativa com os outros inibidores, ou se as células leucêmicas desenvolverem a mutação T315I. Também são utilizados hidroxiureia, interferon- α e transplante de células-tronco hematopoiéticas para tratamento a depender do contexto clínico (HAMERSCHLAK *et al.*, 2015).

1.5) Inibidores tirosinoquinases e resistência

A LMC representa uma das terapias mais bem-sucedidas, onde a inibição da atividade da tirosina quinase da oncoproteína BCR-ABL1 pelo imatinibe, induz remissão em 83% dos pacientes em fase crônica inicial. No entanto, apesar do tratamento com os TKIs aumentarem a sobrevida dos pacientes com LMC e ser capaz de induzir a remissão hematológica, citogenética e molecular em grande parte dos pacientes, a persistência das células-tronco leucêmicas é evidenciada pela necessidade de manutenção do inibidor em todo seguimento clínico, ou seja, observa-se falha do inibidor em eliminar a população celular iniciadora e mantenedora da doença. Sobretudo, na fase aguda da crise blástica, 80% dos pacientes apresentam resistência, e 40% deles, mesmo com a inibição da atividade de BCR-ABL1. Isso implica a ativação de vias de sinalização independentes de BCR-ABL1 ou restauração da sinalização a decorrentes de BCR-ABL1 inativo (DRUKER *et al.*, 2001a; TALATI; PINILLA-IBARZ, 2018).

A eficácia do tratamento é diferente para as três fases da LMC. A fase crônica é aquela em que a maioria dos pacientes são diagnosticados e cujo controle da doença é eficientemente realizado com TKI seletivos. A progressão para fase de transformação e crise blástica em pacientes tratados com imatinibe, após falha com uso de interferon e citarabina, foi de 39% e 24% em seis anos, respectivamente (INCA, 2022). As fases aceleradas e de crise blástica representam maior desafio terapêutico e estão usualmente associadas à resistência a TKIs (TALATI; PINILLA-IBARZ, 2018).

Na crise blástica, a maioria dos pacientes perdem resposta durante o curso do tratamento e a proteína BCR-ABL1 continua sendo o principal impulsionador da transformação. A resistência ocorre devido a qualquer amplificação do gene BCR-ABL1, mutação no domínio quinase ou transporte celular alterado do fármaco imatinibe. O aumento da dose de imatinibe e administração de TKIs de segunda e terceira geração são estratégias de tratamento para não respondedores (JABBOUR, Elias; KANTARJIAN, 2022). Somente aqueles pacientes que falham nestas estratégias progridem para crise blástica. Por outro lado, para pacientes em crise blástica, mesmo quando a resposta citogenética é melhorada com TKIs de segunda geração, o

tratamento não oferece vantagem na sobrevida em comparação com imatinibe. Importante destacar que os pacientes que atingem estas fases possuem curso clínico adverso com escassas e ineficientes opções terapêuticas (NARASIMHAN *et al.*, 2022).

A resistência aos TKIs pode ser definida como primária ou secundária, com alteração de mecanismos celulares, moleculares e bioquímicos. A primária ocorre quando o paciente não desenvolve nenhuma resposta ao tratamento, enquanto na secundária o paciente passa a não mais responder ao tratamento de forma hematológica, molecular e citogenética (DRUKER *et al.*, 2001a; SCHOEPF *et al.*, 2021).

Atualmente, alguns autores consideram ainda uma outra designação para a resistência, que refere à sua dependência ou independência de BCR-ABL1. A primeira envolve mutações no domínio de ABL1 e influxo/efluxo de transportadores como ABC, OCT-1 e MDR. Já os mecanismos de resistência independente de BCR-ABL1 incluem ativação de STAT3, alterações nas vias PI3K/AKT/mTOR, RAF/MEK/ERK, JAK/STAT e presença de mutações somáticas (SINGH *et al.*, 2021). Adicionalmente, vale ressaltar que a frequência da resistência também está relacionada a mecanismos como: redução da biodisponibilidade oral do fármaco, associação a proteínas plasmáticas, efluxo da droga, contínua permanência das células-tronco leucêmicas, quiescência celular e mecanismos moleculares que incluem mutações no domínio tirosina quinase (TALATI; PINILLA-IBARZ, 2018).

Enquanto vários mecanismos de resistência têm sido descritos ao longo do tempo, a emergência de mutações pontuais na porção ABL1 do gene BCR-ABL1 é mais comumente associada com a falha do imatinibe (SOVERINI *et al.*, 2005). Estas alterações na sequência de codificação BCR-ABL1 induzem alterações em seu padrão de aminoácidos envolvendo resíduos críticos para a interação entre imatinibe e ABL1 ou mais frequentemente atuando no bloqueio da oncoproteína na sua conformação ativa, não podendo assim, se ligar ao imatinibe (O'HARE; EIDE; DEININGER, 2007). Dentre elas, a mutação T315I, confere resistência a todos os TKIs, sendo reportada em 2001 como um caso de leucemia transformada pela ação do imatinibe. A mutação, também denominada "*gatekeeper*", resulta na troca do aminoácido treonina (Thr) para isoleucina (Ile) na posição 315 do BCR-ABL (NICOLINI *et al.*, 2009). Isso impede a formação da ponte de hidrogênio, criando um obstáculo espacial entre o aminoácido

isoleucina e o TKI, conforme demonstrado na **Figura 4**. Pacientes com mutação T315I apresentam resistência ao imatinibe e também ao desatinibe, nilotinibe e bosutinibe, e são atualmente sensíveis ao ponatinibe (terceira geração) (KHORASHAD *et al.*, 2013).

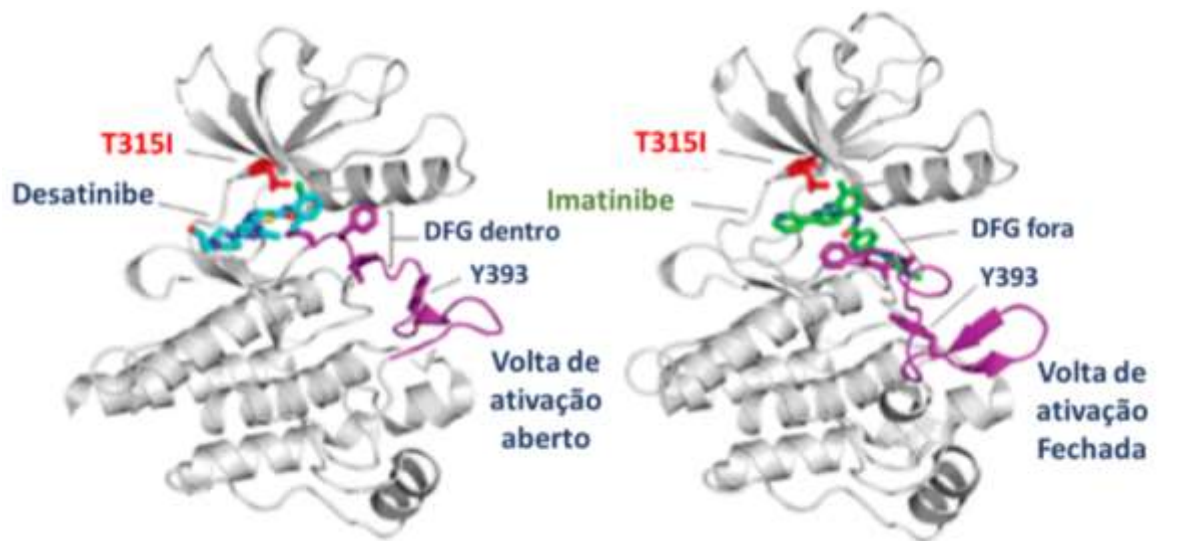


Figura 4: Modelos estruturais de C-ABL com os inibidores tirosinoquinase desatinibe e imatinibe. Estão selecionados os resíduos de ligação com os inibidores. Em vermelho destaca-se a mutação T315I, também chamada de “*gatekeeper*”, que resulta da troca do aminoácido Thr por Ile na posição 315 do BCR-ABL selvagem. Em roxo está demonstrado o motivo DFG (Asp-Phe-Gly) e o loop de ativação (TENGG *et al.*, 2022).

Dentre os mecanismos de resistência, enfoque deve ser dado às células-tronco quiescentes, processo pelo qual a maioria dos pacientes com LMC continuam a apresentar valores de BCR-ABL1 através de qPCR. Já a recorrência da doença após descontinuação do tratamento é comum em pacientes cujo gene de fusão é indetectável por qPCR. A quiescência da célula-tronco leucêmica tem sido proposta como mecanismo potencial pelo qual a célula escapa dos efeitos citotóxicos do imatinibe, mas ainda não se sabe como a atividade do BCR-ABL1 interfere na sobrevivência dessas células (ROUSSELOT *et al.*, 2007). Este processo resulta na criação de um microambiente que impede a ação dos compostos terapêuticos disponíveis atualmente (TALATI; PINILLA-IBARZ, 2018).

O fato de que a resistência ao imatinibe pode ser comumente associada a mutações pontuais na atividade quinase do domínio do BCR-ABL1 demonstra importância de processos de fosforilação na patogênese da LMC. Por outro lado, a persistência de BCR-ABL1 em células de pacientes em terapia indica que a inibição da

atividade quinase de ABL1 sozinha pode não ser suficiente para erradicar as células de leucemia (LINDSTRÖM; FRIEDMAN, 2022; O'HARE *et al.*, 2009). O processo de como ocorre a resistência e os seus mecanismos moleculares de ativação ainda não é bem compreendido, mas sabe-se que uma cascata de sinalização é disparada intracelularmente, ativando vias metabólicas que culminam na síntese proteica, sobrevivência, evasão de apoptose e proliferação celular (**Figura 5**).

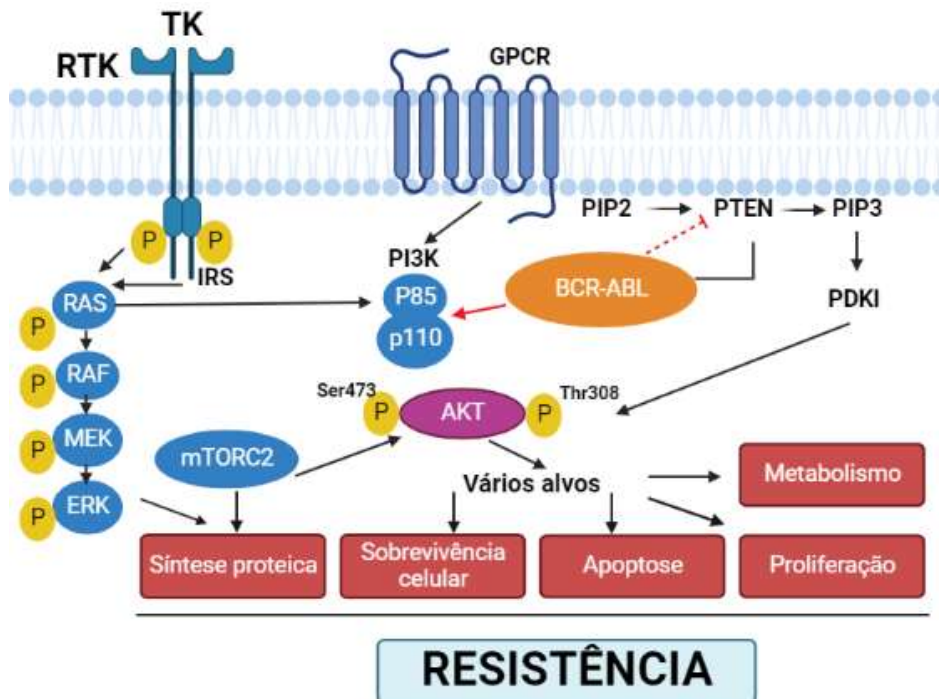


Figura 5: Sinalização química desencadeada por ligação de tirosinas quinases a seus receptores. Após a ligação, há a ativação de vias PI3K/AKT/mTOR, do receptor acoplado a proteína G GPCR, substrato de insulina IRS, proteína RAS, MEK, ERK e mTOR, promovendo a síntese proteica, sobrevivência celular, evasão da apoptose, proliferação e metabolismo, desencadeando o processo de resistência. Baseado em (SINGH *et al.*, 2021).

Dessa forma, a identificação de componentes essenciais adicionais na patogênese da LMC continua sendo crucial para o desenvolvimento de terapias multialvos aprimoradas, visando outros elementos controladores de vias de sinalização que não BCR-ABL1. Assim, fica clara a necessidade de explorar mecanismos bioquímicos e moleculares que regem a biologia de resistência da célula-tronco leucêmica da LMC. Para isso, diferentes estratégias têm sido empregadas, incluindo a síntese de novos inibidores ATP-competitivos ou não de BCR-ABL1 e TKIs que operam em mais alvos. Uma abordagem alternativa ainda é baseada no uso de compostos que

não se ligam diretamente na proteína BCR-ABL1. Estas moléculas atuam sobre outras proteínas que participam da via de sinalização BCR-ABL1 e do processo de transformação maligna das células. Alguns exemplos serão discutidos a seguir.

1 .6) Via de sinalização de IGF1R

IGF1 é um fator de crescimento semelhante à insulina que atua na regulação do crescimento celular, diferenciação, sobrevivência e metabolismo. Seu receptor (IGF1R) é uma proteína quinase tipo II, que possui similaridade de 70% com os receptores de insulina. Muitos fatores de crescimento se ligam e ativam seus receptores tirosina quinase induzindo sua dimerização. No entanto, IGF1R se apresenta como homodímero ou heterodímero sem a necessidade de ligação do fator de crescimento. Cada dímero é composto por duas cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto, chamadas de “*half-receptor*”, que consistem em uma cadeia alfa extracelular contendo domínio de ligação e uma cadeia β intracelular com atividade tirosina quinase (CAO; YEE, 2021).

A ligação do fator de crescimento ao domínio extracelular dos receptores faz com que ocorra ativação do domínio tirosina quinase, promovendo o recrutamento de resíduos de tirosina fosforilados em proteínas adaptadoras, que incluem IRS1 (insulin receptor substrate 1), IRS2 e SHC (shc transforming protein). Esta ativação promove a sinalização para vias como PI3K/AKT e MAPK, mediando processos fisiológicos normais e patológicos (**Figura 6**) (CAO; YEE, 2021).

Estudos já mostraram o envolvimento de IGF1R na eritopoese, granulopoese e linfopoese em sinalizações normais e neoplásicas. IGF1R foi demonstrado como superexpresso em Leucemia Linfocítica Crônica sendo um alvo terapêutico promissor. Sua inibição diminuiu a viabilidade e induziu apoptose em células leucêmicas primárias (CHAPUIS *et al.*, 2008). Adicionalmente, em LMA, IGF1R se mostrou constantemente ativo e fosforilado em amostras PI3K e AKT positivas, sugerindo que a atividade constitutiva de PI3K/AKT procede da ativação de IGF1R (YAKTAPOUR *et al.*, 2013). Portanto, sua participação em LMC necessita ser melhor investigada.

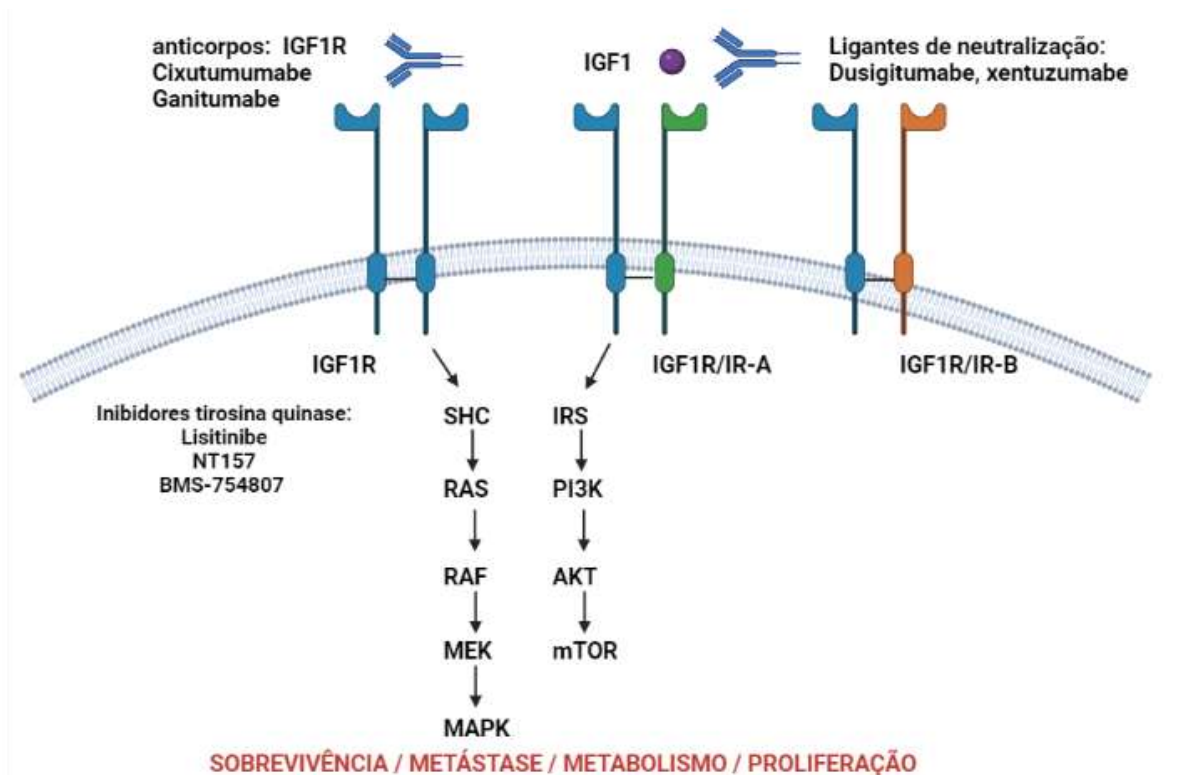


Figura 6: Principais vias envolvidas na ativação de IGF1R, bem como os inibidores e anticorpos monoclonais já desenvolvidos. As estratégias baseadas em anticorpos podem atacar tanto o ativador da via IGF, como o dusigitumabe e também inibir a atividade do receptor, como cixutumumabe. Baseado em (CAO; YEE, 2021).

1.7) O papel de IRS1/2

Estudos voltados para alvos que não se liguem diretamente a proteína BCR-ABL1 identificaram os substratos do receptor de insulina (IRS) como regulados, representando uma promessa terapêutica para LMC (MACHADO-NETO *et al.*, 2011; TRAINA *et al.*, 2003). As IRS pertencem à família de proteínas adaptadoras citoplasmáticas inicialmente descritas por seu papel na sinalização durante a secreção de insulina, que posteriormente se mostraram envolvidas em vias de sinalização importantes em muitos outros processos biológicos, incluindo crescimento e proliferação celular tanto em situações fisiológicas, como também patológicas (SUN *et al.*, 1993; ZICK, 2005).

A família de IRS consiste em quatro proteínas com domínios de interação bem conservados (IRS1, IRS2, IRS3 e IRS4), que apresentam homologia na porção N-terminal, contribuindo para o recrutamento de receptores (GORGISEN; GULACAR;

OZES, 2017). O primeiro domínio, denominado Pleckstrin Homology Domain (PH), apresenta aminoácidos carregados positivamente que mediam a interação de proteínas IRS com a célula, e também leva sinalização para receptores acoplados à proteína G (GPCR). A segunda região conservada é o domínio de ligação à fosfotirosina, Phosphotyrosine Binding (PTB). A proteína IRS2 apresenta um motivo adicional de ligação de regulação à quinase (KRLB) que contribui para o recrutamento de receptores. O C-terminal das proteínas IRS não é bem conservado, e contém vários pontos passíveis de fosforilação atuando como ativação/desativação da célula, onde outras moléculas com menor especificidade podem se ligar, incluindo GRB2, CRK, CSK e FYN, com ativação de vias de sinalização como PI3K/AKT/mTOR e MAPK. Nesta região existem mais de 200 resíduos de Ser/Thr (S/T) que, ao contrário da fosforilação em tirosina, regula negativamente a sinalização de insulina/IGF (CAO; YEE, 2021). Alterações na expressão de IRS estão relacionadas a diversos tipos de cânceres, como de pâncreas, mama e leucemias (DEARTH *et al.*, 2006, 2007; GIBSON; MA; SHAW, 2007).

1.8) Inibidor farmacológico de IGF1R/IRS1-IRS2 – NT157

Na terapia personalizada existem poucos fármacos altamente seletivos para apenas um alvo molecular, como é o caso do imatinibe. Porém, conforme supracitado, apesar da alta seletividade, estes fármacos apresentam como desvantagem em comum: a comum manutenção das células leucêmicas e resistência ao tratamento. Portanto, atualmente, começaram a ser desenvolvidas novas estratégias farmacológicas que incluem fármacos que se liguem em múltiplos alvos.

O fármaco NT157 consiste em uma molécula de tirfostina, apresentada na **Figura 7** que age como um inibidor seletivo de IRS1/2, descrito também como um inibidor alostérico de IGF1R. Seu mecanismo de ação consiste na indução da fosforilação em serina regulada por consequente degradação de IRS1/2. Também ocorre o deslocamento de IGF1R com inibição a longo prazo de IGF1R-IRS1/2. Outro alvo de NT157 é STAT3 e 5, que são inativados por defosforilação através da ativação de proteínas fosfatases (DE MIRANDA *et al.*, 2022; IBUKI *et al.*, 2014).

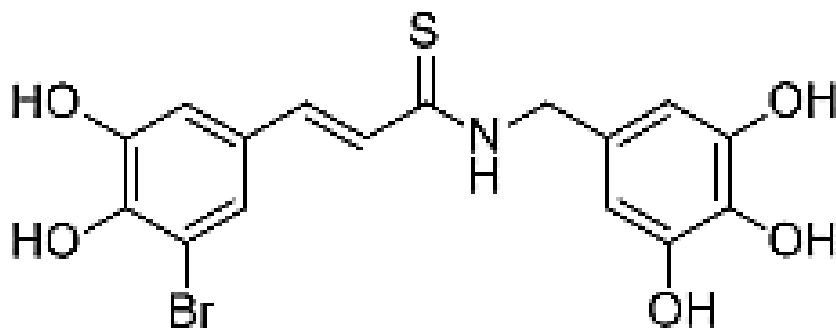


Figura 7: Estrutura molecular do fármaco inibidor de IGF1R-IRS1/2, NT157. Figura disponível em: [selleckchem.com](https://www.selleckchem.com) Acesso em 11/04/2022.

Recentemente, pesquisadores demonstraram que NT157 diminuiu a viabilidade, clonogenicidade, progressão do ciclo celular, migração e apoptose em células de câncer de pulmão (DE MIRANDA *et al.*, 2022). Na sinalização celular, o fármaco reduziu a expressão de IRS1 e AXL (tyrosine-protein kinase receptor UFO), fosforilação de MAPK e AKT. Oncogenes como BCL2 (apoptose regulator), CCND1 (G1/S-specific cyclin-D1), MYB (Transcriptional activator Myb) e MYC (proto-oncogen protein MYC) também tiveram sua expressão diminuída com o tratamento. Em células de câncer de mama, o NT157 resultou na regulação negativa do receptor de estrogênio (ER α) devido a interrupção do complexo IRS1-IGFIR/InR/ER α (YANG *et al.*, 2018).

Estudo recente do grupo de pesquisa da Profa. Fabíola Traina demonstrou que o fármaco NT157, reduziu a capacidade clonogênica de células primárias de pacientes com LMC, mas não de células hematopoiéticas de indivíduos saudáveis. Em células K562, o tratamento com NT157 reduziu a viabilidade e proliferação celular, induziu apoptose, inibiu a ativação das vias IGF1R/IRS, STAT, PI3K/AKT/mTOR e MAPK, aumentou a expressão dos genes supressores tumorais CDKN1A (interacting protein), FOS (protein c-FOS) e JUN (transcription fator Jun) e reduziu a expressão dos oncogenes MYC e BCL2 (SCOPIM-RIBEIRO *et al.*, 2021).

Baseado na hipótese de que NT157 apresenta efeito antineoplásico nas células de LMC e considerando a importância de IRS e IGF1R para ativação de genes relacionados a manutenção da célula leucêmica, acredita-se que ainda há a necessidade de esforços crescentes na elucidação de mecanismos celulares visem o entendimento das vias de sinalização na hematopoiese normal e leucêmica.

Adicionalmente, o mecanismo completo pelo qual NT157 atua na célula resistente ao imatinibe ainda demanda maior investigação. Dessa forma, ferramentas exploratórias, em especial análises proteômicas e fosfoproteômicas, apresentam caráter essencial para elucidação de novos mecanismos envolvidos com a resistência terapêutica, bem como com o tratamento com NT157. Estas estratégias serão descritas nos próximos tópicos.

1.9) Análise proteômica aliada a descoberta de alvos terapêuticos para LMC

O Projeto Genoma Humano revolucionou a prática da biologia e o futuro potencial da medicina. A tradicional abordagem de estudar um gene por vez, embora eficaz em revelar funções moleculares detalhadas de genes individuais, não fornece uma visão global da função gênica, regulação temporal e espacial de todos os genes envolvidos coordenadamente em diferentes estados fisiológicos, patológicos ou estágios de desenvolvimento. Como a maioria dos processos biológicos e patológicos se manifestam ao nível proteico, a proteômica apresenta vantagens únicas e significativas surgindo como um complemento importante para abordagens genômicas e transcriptômicas ao identificar e quantificar todas as proteínas expressas em uma variedade de condições (TEIBO *et al.*, 2022). Como resultado, existe um interesse intenso na aplicação de abordagens proteômicas para promover uma melhor compreensão da biologia básica, processos de progressão e detecção de doenças, desenvolvimento de novos biomarcadores para diagnóstico e ainda acelerar e identificar novos alvos terapêuticos (FACA, Vitor; KRASNOSELSKY; HANASH, 2007).

A proteômica é caracterizada como a análise do complemento proteico de uma célula, tecido ou organismo em determinadas condições e momentos específicos (SILVESTRINI *et al.*, 2019). Embora para muitos o termo proteômica seja sinônimo de espectrometria de massas, na realidade o termo abrange qualquer método sensível de análise de proteínas, como por exemplo, biossensores, microarranjos, ressonância magnética nuclear e análise bioinformática de dados complexos, que permitem acessar qualitativamente ou quantitativamente um conjunto de proteínas (NICE, 2021).

Na última década, as análises proteômicas aplicadas a solução de problemas biológicos progrediu rapidamente, com mais de 135.500 publicações sobre o tema (NICE, 2021). Atualmente, considera-se a proteômica como uma técnica complementar e essencial a tantas outras abordagens “ômicas”, como a genômica e transcriptômica. Adicionalmente, foi adicionada a esta abordagem a denominação “proteo-genômica”, que fornece uma correlação gene-proteína-função em diversas situações. Estas estratégias em conjunto proporcionam uma melhor compreensão da biologia de sistemas em estados fisiológicos e patológicos, facilitando a implementação da medicina de precisão (PIETZNER *et al.*, 2021).

O proteoma é altamente dinâmico e variável, principalmente quando comparado ao genoma, relativamente estático, com aproximadamente 20.000 genes. As proteínas, reais mensageiros da maquinaria celular, agem controlando células e tecidos e catalisando diversas reações metabólicas que sustentam o metabolismo. Sua expressão é pouco refletida a nível de DNA e RNA, e dependem ainda de mecanismos de *splicing alternativo*, edição gênica e modificações pós-traducionais (PTMs). Estudos já mostraram inclusive a desintegração de dados genômicos, transcriptômicos e proteômicos, o que enfatiza ainda mais as variações sofridas a nível proteico (CLARK *et al.*, 2019; RODRIGUEZ *et al.*, 2021).

Um ponto importante a ser considerado ao estudar proteínas em um determinado sistema biológico é a natureza da amostra, visto que há grande variação a nível de expressão proteica em diferentes tecidos, como sangue, células de diferentes órgãos e líquido cefalorraquiano, por exemplo. O sangue é o material mais utilizado para estudos de proteômica clínica, devido a facilidade de coleta, mas também é uma das amostras mais desafiadoras e complexas em decorrência da ampla faixa dinâmica de concentração de proteínas individuais e a presença de proteínas “*housekeeping*” que dominam o espectro de massas (NICE, 2021).

Assim como nas abordagens genômicas, a análise proteômica foi impulsionada por avanços tecnológicos, que trouxeram maior sensibilidade, velocidade, confiabilidade e reprodutibilidade dos dados obtidos. Isso ocorreu especialmente na espectrometria de massas (MS), que se tornou o método de escolha para identificação de proteínas em estudos proteômicos de alto rendimento, devido sua robustez, sensibilidade e eficiência.

Quando acoplada a sistemas de separação de peptídeos, a MS apresenta capacidade de identificar aproximadamente 10.000 proteínas em análises de rotina, que partem de nanogramas de extratos proteicos de células ou tecidos. Dessa forma, a proteômica abre fronteiras para diagnóstico e entendimento de neoplasias, que pode ser ainda maximizada quando comparada às análises genômicas nas mesmas amostras e tecidos (Teibo and Silvestrini et al. 2022).

As proteínas podem ainda ser estudadas em sua forma íntegra (proteômica *top down*) ou através de peptídeos, normalmente derivados de uma digestão enzimática com tripsina (*proteômica bottom-up*). A segunda é a estratégia mais utilizada e pode ser realizada através de três abordagens: 1) análise proteômica focada na descoberta e dependente de dados de identificação dos peptídeos, com cobertura completa do proteoma; 2) através de fragmentação múltipla de todos os peptídeos detectáveis por análise independente de dados de identificação específica dos peptídeos, gerando mapas de fragmentos iônicos abrangentes para uma amostra. Em ambos os casos, estas análises em larga escala permitem a identificação de milhares de proteínas em um modelo de estudo biológico. 3) Existe ainda uma terceira estratégia denominada de proteômica dirigida, a qual é baseada em hipóteses, utilizando monitoramento de reações selecionadas (SRM ou MRM), para peptídeos que representam proteínas específicas de interesse. Para isso, são criados painéis com peptídeos ideais e únicos para proteínas selecionadas, que são monitorados simultaneamente por espectrometria de massas (NICE, 2021).

A quantificação absoluta ou relativa de amostras representa uma importante etapa da análise proteômica. Ela pode ser realizada a partir de marcações das diferentes amostras, normalmente com isótopos que permitem sua discriminação pelo MS, ou sem marcação, pela estratégia denominada *label free quantification* (LFQ), que se baseia na leitura das intensidades dos íons detectados em cada amostra. Marcações isotópicas também podem ser feitas de forma metabólica, utilizando aminoácidos marcados isotopicamente em cultura de células, permitindo a incorporação dos isótopos a cada replicação celular (*Stable isotope labeling by amino acids in cell culture* - SILAC) (ONG; MANN, 2006; SILVESTRINI *et al.*, 2020). Alternativamente, proteínas ou peptídeos podem receber através de reações químicas específicas os mais diversos

marcadores isotópicos, com acrilamida, água deuterada ou isobáricos como TMT ou ITRAQ (FACA, V *et al.*, 2006).

As estratégias mais modernas, envolvem as marcações isobáricas como, por exemplo, a estratégia TMT (tandem mass tag) que fornece o recurso para quantificação relativa de até 16 amostras diferentes derivadas de células, tecidos ou fluidos. Os reagentes apresentam uma região de massa repórter, uma região de ligação clivável, uma região de massa de normalização e um grupo reativo de amina (**Figura 8**). Uma vez marcadas, todas as amostras são combinadas e analisadas em um único experimento de LC-MS. Como os marcadores isobáricos possuem as mesmas propriedades químicas, todos os peptídeos de diferentes amostras marcadas com TMT co-eluem durante a separação por LC (cromatografia líquida). Quando os peptídeos são analisados no MS, a intensidade dos fragmentos repórter distintos em diferentes valores de massa fornecem a quantificação relativa dos peptídeos em uma corrida única. A grande vantagem é que esta estratégia de multiplexação fornece um maior rendimento para análises quantitativas com alta cobertura, além de serem combinadas em uma única amostra análise pelo MS e consequente processamento dos dados (HUTCHINSON-BUNCH *et al.*, 2021).

O fato é que cada vez mais a análise proteômica vem ganhando espaço em aplicações biológicas, e vem sendo amplamente utilizada para estudos do câncer. Como resultado, há um interesse intenso na aplicação de proteômica no sentido de promover uma melhor compreensão da biologia básica, processos de progressão e detecção de doenças, desenvolvimento de novos biomarcadores para diagnóstico e ainda acelerar e identificar novos alvos terapêuticos. Considerando particularmente o tópico desta tese, e dada a heterogeneidade celular das amostras encontradas em pacientes com LMC principalmente resistentes ao tratamento com TKI, entendemos que estratégias como a análise proteômica podem permitir a detecção de novos alvos moleculares e o entendimento de vias de sinalização que impulsiona a resistência, auxiliando no desenvolvimento de novas terapias resgate.

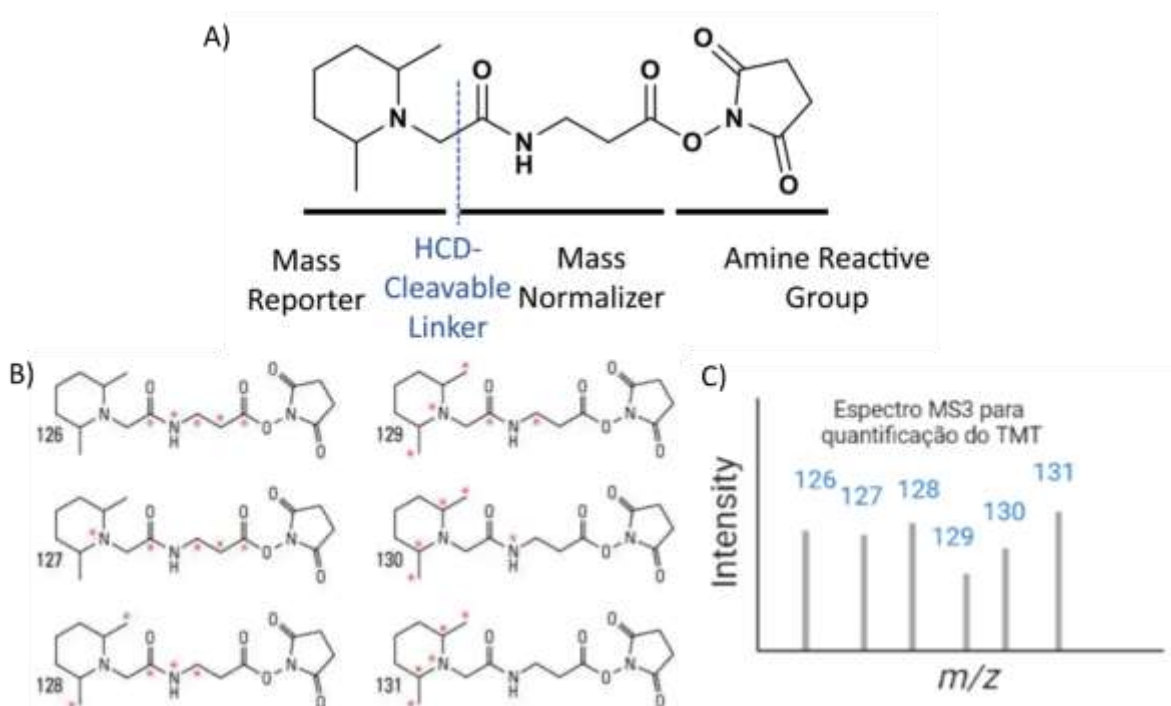


Figura 8: Representação da estrutura geral e regiões relevantes para um reagente TMT A) Regiões funcionais da estrutura do reagente TMT incluindo sítios de fragmentação MS/MS por alta energia de colisão (HCD); B) Estruturas dos reagentes TMT 6-plex com posições de isótopos pesados ^{13}C e ^{15}N , marcados nos asteriscos em vermelho; D) espectro de identificação e quantificação do TMT. Baseado em (HUTCHINSON-BUNCH *et al.*, 2021).

1.10) Análise fosfoproteômica aliada à descoberta de biomarcadores

Fosforilação é uma PTM transitória realizada por proteínas quinases específicas que regulam uma infinidade de processos de comunicação intra e intercelulares em situações fisiológicas e patológicas. De forma contrária, proteínas que retiram o grupamento fosfato de proteínas alvos são denominadas “fosfatases”, e também são de grande importância na homeostase celular. Ao longo de anos, as quinases e fosfatases se mostraram envolvidas em vários processos celulares, incluindo crescimento, proliferação e diferenciação, e estão frequentemente associadas a vários tipos de neoplasias. De forma rápida, a fosforilação pode alterar a atividade das proteínas e transdução de sinais que contribuem para a progressão da maioria dos cânceres (WU *et al.*, 2019).

No genoma humano, foi demonstrada a presença de 556 proteínas quinases codificadas, e cerca de um terço dos alvos proteicos estão relacionadas a estas

proteínas que vem sendo exploradas em estudos clínicos. Adicionalmente, mais de 390 agentes empregados como inibidores de quinase estão em fase clínica ou pré-clínicas para tratamento de diferentes tipos de cânceres. A **Figura 9** exemplifica uma variedade de quinases e seus inibidores envolvidos na sinalização de EGFR (*epidermal growth factor receptor*) para inibir proliferação, sobrevivência e escape da apoptose (WU *et al.*, 2019).

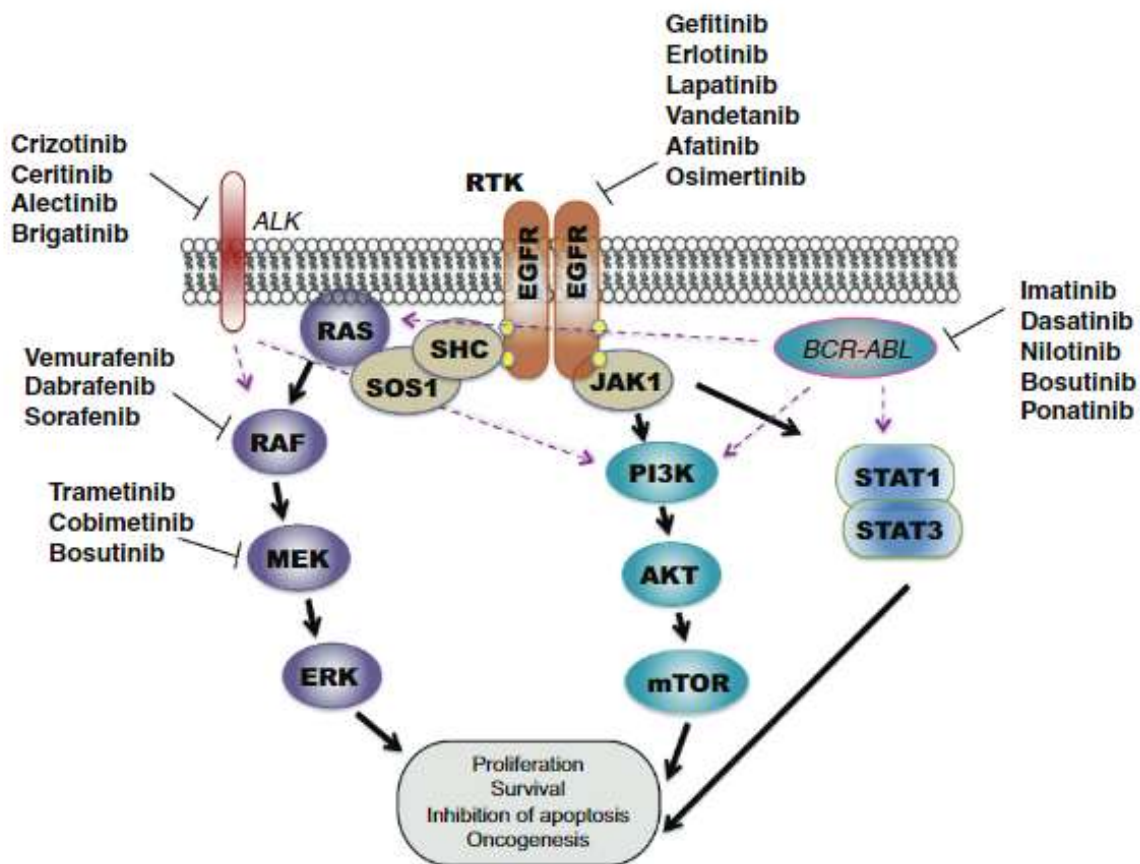


Figura 9: Esquema ilustrativo de diversas quinases envolvidas na sinalização celular em variados tipos de câncer. Estão destacados também alvos/fármacos utilizados para tratamento de enzimas específicas, como, por exemplo, os TKIs MI, desatinibe, nilotinibe, bosutinibe e ponatinibe na LMC (WU *et al.*, 2019).

Conforme mencionado anteriormente, a fosforilação ocorre de maneira transitória e parcial, onde apenas uma pequena fração de uma determinada proteína é fosforilada em um espaço de tempo. Este processo ocorre principalmente em resíduos de serina, mas também em resíduos de treonina e tirosina, seguindo a proporção aproximada de 84/15/1%, respectivamente. Para compreensão do fosfoproteoma, que consiste na identificação de milhares de eventos de fosforilação, métodos eficientes de

enriquecimentos de fosfopeptídeos são cruciais, devido à baixa abundância e alta dinâmica das quinases em distintos estados celulares. Para isso, proteínas isoladas de células e/ou tecidos precisam ser digeridas com enzimas proteolíticas, seguidos por diferentes estratégias de enriquecimento de fosfopeptídeos, que podem incluir a aplicação em colunas específicas de enriquecimento, imunoprecipitação e kits comerciais de alta reprodutibilidade (HARSHA; PANDEY, 2010).

Dado aos avanços nas estratégias no sentido de caracterizar o fosfoproteoma em larga escala, vem se tornando comum a identificação de proteínas-quinases e seus alvos de maneira rotineira (FACA, V. M. *et al.*, 2020b). Um estudo importante e precursor desta área demonstrou o perfil de fosfotirosinas em um painel de tumores de câncer de pulmão, permitindo a identificação de diversas proteínas quinases que agem como oncogênicas, como PDGFR-alfa (platelet-derived growth factor receptor beta), SRC (proto-oncogene tyrosine-protein kinase) e AXL (RIKOVA *et al.*, 2007). Estudos utilizando linhagens hematológicas, que incluem LMA, linfoma e mieloma múltiplo mostraram padrões diferentes nos estados de fosforilação correlacionados com respostas potenciais aos TKIs. Foi demonstrado ainda que células resistentes e sensíveis ao tratamento diferiam em seus padrões de atividades quinases, com respostas ativadas em vias paralelas que não as usualmente descritas (CASADO *et al.*, 2013).

Recentemente foi realizado o primeiro estudo fosfoproteômico voltado para os inibidores pazopanibe e dasatinibe em linhagens celulares A204 resistentes a estes dois inibidores. O estudo mostrou um enriquecimento de fosfoproteínas que desempenham um papel na regulação da dinâmica do citoesqueleto durante LMC, onde foram quantificados aproximadamente 7.000 sítios de fosforilação (VYSE *et al.*, 2018). Também foi demonstrado que a resistência ao imatinibe em linhagem de tumor gastrointestinal GIST882 apresentou alterações de aproximadamente 75% do fosfoproteoma quando comparado a linhagem parental (NAGATA *et al.*, 2015). Em contraste, a análise fosfoproteômica de resistência adquirida ao lapatinibe em célula cancerígena gástrica (SNU216-LR) mostrou que apenas 5% do fosfoproteoma foi significativamente alterado em relação às células do qual a resistência foi derivada (LEE *et al.*, 2013).

Portanto, a análise fosfoproteômica vem fornecendo uma visão valiosa sobre a biologia do câncer e redes de sinalização ativadas, que não são fornecidas a nível cromossômico e transcricional. Abordagens de circuitos de sinalização podem ser a chave para a identificação de biomarcadores para intervenção terapêutica em respostas a proteínas quinases. Neste contexto, fica claro que o estudo da cinética dos padrões globais de fosforilação de maneira não enviesada constitui uma alternativa altamente necessária no sentido de melhorar estratégias e tratamentos bem sucedidos na terapia dentro dos regimes terapêuticos multimodais, visando entender o comportamento maligno de células-tronco neoplásicas, incluindo a LMC. Até o momento, não se tem conhecimento de análises proteômicas utilizando inibidor NT157 e imatinibe em linhagens de LMC. Alguns estudos focados na busca de marcadores genéticos principalmente voltados ao gene BCR-ABL1 foram realizados, mas existe ainda grande perspectiva para estudos proteômicos que visem a identificação de outros marcadores funcionais. Assim, entendemos ser bastante relevante a aplicação de tecnologias modernas de análise quantitativa do proteoma e do fosfoproteoma na caracterização mais detalhada dos mecanismos envolvidos na ação do NT157 em comparação com o imatinibe em células resistentes e amostras de pacientes.

OBJETIVOS

2. Objetivos gerais

Investigar as alterações proteômicas promovidas pelo NT157 e imatinibe em modelo celular BCR-ABL1 não mutado ou mutado para T315I e compará-las com células de pacientes.

2.1) Objetivos específicos

1. Caracterizar a atividade e viabilidade celular do processo de inibição de vias IGF1R-IRS1/2 através do uso de NT157 em modelo celular murino WT e T315I.
2. Determinar a melhor dosagem do tratamento com NT157 em modelos celulares de LMC para análise proteômica e fosfoproteômica.
3. Coletar dados proteômicos por espectrometria de massas de alta resolução acoplados a cromatografia líquida (LC-MS/MS) de células WT e T315I tratadas com NT157 e imatinibe.
4. Detectar alterações proteômicas e fosfoproteômicas promovidas pelo NT157 e imatinibe no modelo *in vitro*, identificando processos celulares, vias e proteínas específicas dependentes de cada tratamento.
5. Coletar amostra de sangue periférico e/ou medula óssea de pacientes com LMC para análise proteômica de células primárias.
6. Realizar análise proteômica de células primárias de paciente resistente ao imatinibe.
7. Integrar e correlacionar os dados obtidos nas linhagens celulares com as análises proteômicas de células primárias e propor assinaturas moleculares relacionadas a resistência.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Abordagem experimental

3.1) Fluxograma da metodologia utilizada

A metodologia utilizada no desenvolvimento deste trabalho encontra-se resumida na **Figura 10**.

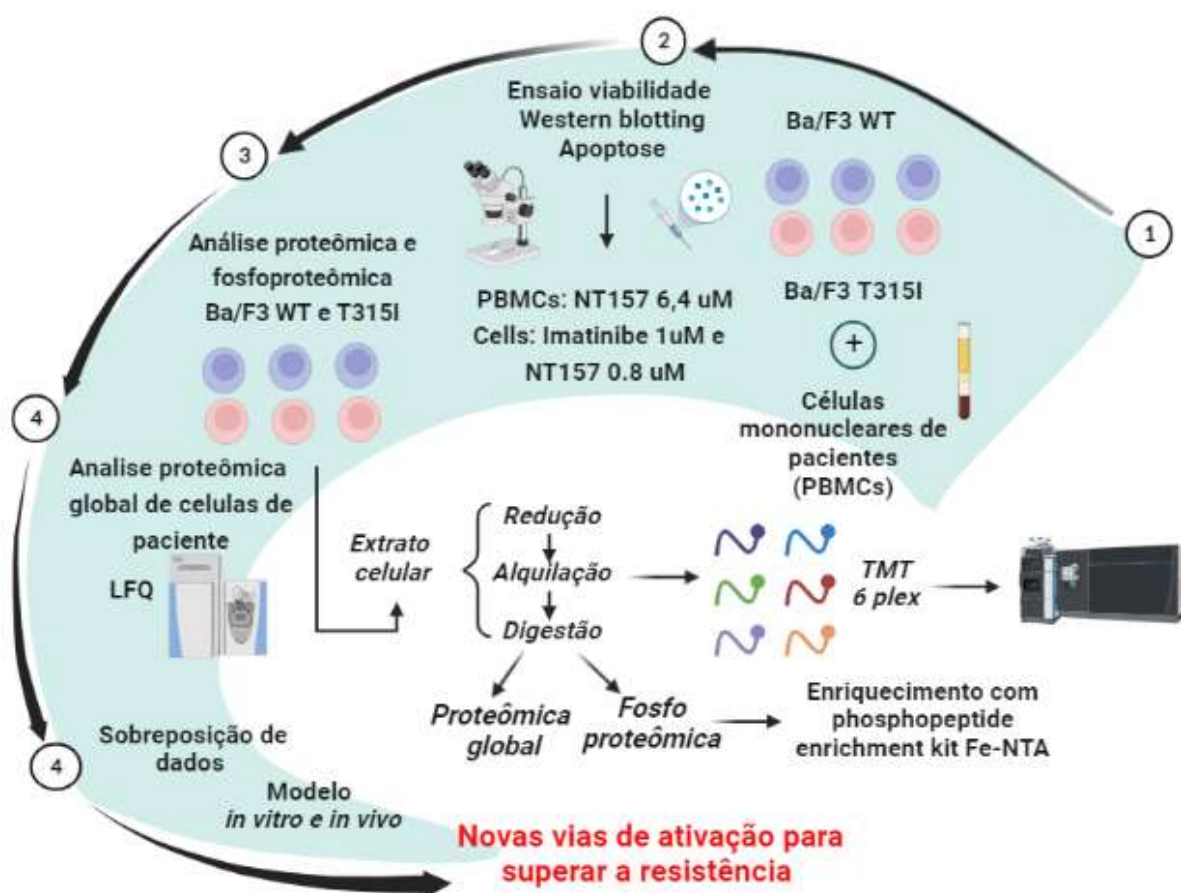


Figura 10: Fluxograma da metodologia utilizada. Em geral, foram utilizados modelos celulares murinos de Ba/F3 WT ou T315I para análise *in vitro* do tratamento com imatinibe e NT157. Foi realizada análise proteômica destas amostras e comparadas com células primárias de pacientes com LMC a fim de identificar novas vias de ativação que possam ajudar a compreender o processo de resistência celular.

3.2) Casuística

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), CAAE: 16723319.0.0000.5440. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.3) Células primárias de pacientes com LMC

As células hematopoiéticas de pacientes com LMC ao diagnóstico foram obtidas de sangue periférico ou medula óssea no Ambulatório de Hematologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto FMRP-USP. Ao todo foram coletadas 5 amostras de pacientes com LMC, totalizando apenas 2 viáveis, sendo um paciente com mutação T315I no BCR-ABL1, previamente tratados com inibidores tirosinoquinase (n=2). A ausência de um número maior de amostras de pacientes ocorreu devido à descontinuação do ambulatório de pesquisa durante a pandemia COVID-19. As características das amostras coletadas estão mostradas na **Tabela 1**.

Para análise proteômica, foram coletados 4 mL de sangue periférico ou medula óssea contendo ácido etilenodiamino tetracético (EDTA). As células mononucleares obtidas foram separadas por centrifugação com gradiente de Ficoll (Sigma-Aldrich, EUA), e aproximadamente 1×10^7 células foram armazenadas em soro fetal bovino (SFB) com 10% DMSO e mantidas em nitrogênio líquido.

Tabela 1: Características dos pacientes com LMC no momento da coleta do material.

Pacientes	Número
Gênero: Feminino/Masculino	2/3
Idade (Média)	61
Classificação: Crônica/Acelerada/Blástica	3/1/1

3.4) Linhagens celulares Ba/F3

Para o presente projeto, inicialmente foram utilizadas duas linhagens celulares BCR-ABL1: Ba/F3 WT e Ba/F3 T315I.

A linhagem celular Ba/F3 é murina, apresentando expressão ectópica do oncogene BCR-ABL1 selvagem e mutado para T315I. Ba/F3 WT consiste em células originárias da medula óssea, de pré-linfócitos B, contendo o vetor pMAX BCR-ABL1 (p210). A célula mutada contém o vetor pMAX BCR-ABL1 T315I (p210). Elas foram gentilmente cedidas pelo Dr. Brian J. Druker do OHSU (Knight Cancer Institute da Oregon Health and Science University, Oregon, EUA). A cada 500 mL de meio de cultura

RPMI 1640 (Thermo Fisher; #11875119), foram adicionados 5 mL da solução de antibiótico penicilina e estreptomicina 1000 U/mL (Thermo Fisher, #15140163) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Thermo Scientific, Marietta, OH).

3.5) Tratamento NT157 e Imatinibe

O composto NT157 (Axon Medchem - Groningen, Holanda) foi ressuspendido em DMSO e armazenado em freezer -80°C em uma concentração de 10 mM. O imatinibe (Selleckchem - TX, EUA), foi ressuspendido em DMSO e armazenado em freezer -80°C em uma concentração de 50 mM. As características dos dois fármacos são exibidas na **Tabela 2**.

Para as análises proteômicas, as linhagens celulares Ba/F3 foram submetidas ao tratamento com NT157 0,8 µM e imatinibe 1 µM por 2 horas. As células primárias, por apresentarem interferências metabólicas e serem mais complexas, foram tratadas com NT157 6,4 µM e imatinibe 10 µM por 48 horas. As concentrações foram definidas a partir de resultados anteriores do grupo liderado pela Co-orientadora do projeto.

Tabela 2: Inibidores utilizados para ensaios de células primárias e linhagens de LMC.

Inibidor	Via alvo	Código
NT157	IGF1R- IRS1/IRS2	<i>Axon medchem (#2238)</i>
Imatinibe	Atividade tirosinoquinase de C-ABL	<i>Selleckchem (#S1026)</i>

3.6) Extração celular e quantificação proteica das linhagens celulares e amostras primárias

Para a extração total de proteínas, os pellets celulares provenientes das linhagens ou amostras primárias, foram coletados com tampão ureia 8M com adição de inibidores de protease e fosfatase e submetidos a 5 ciclos de ultrassom em banho

(UltraSonic Cleaner 750, Unique, São Paulo, Brasil) a 45 W por 5 minutos, intercalando-se a agitação em vórtex e resfriamento em banho de gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20.000 xg por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado.

A quantificação de proteínas foi realizada utilizando-se o kit Bio-Rad DC (Bio-Rad, Hercules, C.A), baseado no método descrito por (BRADFORD, 1976). O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, com um volume total de 220 µL por poço, e faixa de linearidade 0,5 a 2,0 µg de proteínas. Foram utilizados 20 µL de amostra diluída em água Milli Q e 200 µL do reagente Bradford. O volume total utilizado em cada poço da microplaca foi mantido constante (220 µL). Após 15 minutos de incubação, as absorbâncias foram lidas a 595 nm em espectrofotômetro de placas (BioRad XMark).

3.7) Ensaios funcionais

As linhagens celulares Ba/F3 e células de leucemia primária foram tratadas com imatinibe e NT157 e submetidas a viabilidade celular, apoptose e *western blotting*.

3.7.1) Análise da viabilidade celular de Ba/F3 e amostras primárias

As células Ba/F3 e células leucêmicas primárias foram cultivadas em placas de 96 poços, contendo 1×10^5 células, com meio RPMI 10% de SFB. As células foram plaqueadas em diferentes concentrações de NT157 (0,8; 1,6; 3,2 e 6,4 µM) e imatinibe (1 e 10 µM) e avaliadas por até 2, 4, 12, 24 e 48 horas. Após o período de incubação, foram adicionados 50 µL de Brometo tiazolil azul de tetrazólio (MTT) e as células foram incubadas por 2 horas a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de 0,1 M HCL em isopropanol. As células aglutinadas foram ressuspendidas e analisadas em relação a viabilidade em leitor de ELISA (Versamarx Tubable Microplate Reader, Molecular Devices) pela leitura da absorbância a 570 nm. Todas as condições foram testadas em três replicatas para três experimentos independentes. O valor de IC_{50} foi determinado por meio de regressão não linear utilizando o GraphPad 8 (GraphPad software).

3.7.2) Ensaio de apoptose

O ensaio de apoptose foi realizado através da marcação de células com anexina V (annexin V-FITC, PharMingen) e iodeto de propídio (propidium iodide/Molecular Probes). Para isso, 2×10^5 células WT T315I foram plaqueadas em meio RPMI 10% de SFB na presença de NT157 em diferentes concentrações (0,8; 1,6; 3,2 e 6,4 μM) por 24 e 48 horas. Posteriormente, as amostras foram incubadas com os anticorpos supracitados durante 15 minutos na ausência de luz e temperatura ambiente. Os dados foram coletados no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Bioscience) e analisados com o programa FlowJo. As células positivas para anexina V foram atribuídas como células apoptóticas.

3.7.3) Análise por Western Blotting

Após a extração de proteínas descrita na **seção 3.6**, alíquotas do lisado celular contendo 50 μg de proteína total foram combinadas com tampão da amostra (Tris-HCl 60 mM, glicerol 10% (v/v), SDS 2% (v/v), BME 5% (v/v), ABF 0,002% (p/v)). Após esta etapa, as proteínas foram submetidas a desnaturação a 98°C, por 5 minutos, em banho seco (Thermomixer confort, Eppendorf) e centrifugadas a 12.000 x g por 5 minutos (Mini Spin, Eppendorf). O extrato foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 6,5 a 15% a depender do peso molecular da proteína de interesse. O protocolo foi realizado conforme descrito por (LAEMMLI, 1970). As proteínas separadas por eletroforese foram transferidas para a membrana de nitrocelulose e/ou PVDF. A transferência foi realizada em tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM metanol 20% por 1 hora e 30 minutos a 100 V, 300 mA a 4°C. Para bloquear sítios não específicos, as membranas foram incubadas em tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1%, 30 pH 7,6 (TBS-T) com 5% (m/v) de leite desnatado ou albumina soro bovina (BSA) durante 1 hora de acordo com as instruções do fabricante do anticorpo. As membranas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos com TBS-T e incubadas com os anticorpos primários na diluição adequada por 2 horas à temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C sob agitação. Após 3 etapas de lavagem, as membranas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação com os anticorpos secundários anti-rabbit ou anti-mouse (Cell Signaling). A detecção foi feita usando o kit ECL Prime Western Blotting Detection Reagents (GE HealthCare), de acordo com as instruções do fabricante. O sistema de revelação utilizado foi baseado em

quimiluminescência pelo *software* ImageQuant LAS4000 mini (GE Healthcare Life Sciences). As proteínas analisadas, a diluição e a procedência dos anticorpos primários estão especificadas na **Tabela 2**. A intensidade de expressão proteica foi normalizada por proteínas endógenas, como GAPDH e β -actina.

Tabela 2: Proteínas analisadas por *Western Blotting*: proteína, peso molecular (kDa), espécie produzida, diluição e fabricante de anticorpos.

Proteína	Peso molecular	Espécie	Diluição	Fabricante e código
IRS1	180 kDa	Rabbit	1:1000	Cell Signaling #2382
IRS2	185 kDa	Rabbit	1:1000	Cell Signaling #4502
C-ABL	135 kDa	Rabbit	1:1000	Cell Signaling #2862S
ERK1/2	44 e 42 kDa	Rabbit	1:1000	Cell Signaling #4370S
BCR-ABL	210 kDa	Mouse	1:1000	Cell Signaling #3908S

3.8) Análise proteômica e fosfoproteômica das células Ba/F3 WT e T315I

Para análise proteômica e fosfoproteômica, grande esforço foi realizado na padronização do protocolo no laboratório, visto que são necessárias grandes quantidades de células, ao considerar que apenas 4% do proteoma é constituído por fosfoproteínas. Portanto, todos os ensaios partiram de 1×10^9 células por condição, extraídos conforme **seção 3.6** e quantificados por Bradford.

3.8.1) Preparo das amostras e digestão enzimática

Para análise proteômica e fosfoproteômica das linhagens celulares Ba/F3 WT e Ba/F3 T315I, 5 mg de proteínas provenientes do extrato celular representando amostras controle, tratamento com NT157 0,8 μ M e imatinibe 1 μ M foram submetidas ao protocolo de digestão enzimática. Para esta etapa, inicialmente os extratos proteicos foram reduzidos com 5 mg de Ditioneitol (Sigma-Aldrich) a 37°C durante 1 hora sob agitação. Em seguida, as proteínas foram alquiladas com Iodoacetamida (Sigma-Aldrich) na proporção de 1:4, a 25°C em agitação, durante uma 1 hora ao abrigo da luz. A digestão enzimática utilizando tripsina modificada na proporção 1:50 (Promega #V5111) ocorreu a 37°C durante 18 horas. A reação foi interrompida por adição de ácido fórmico 1% (v/v). Após a digestão, os peptídeos foram quantificados em fluorímetro Qubit (ThermoScientific).

3.8.2) Caracterização da digestão enzimática por HPLC

Após a digestão, o padrão de peptídeos foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Esta análise teve o fim de avaliar a eficácia da enzima tripsina utilizada, já que foi empregada grande quantidade de amostra proteica, o que pode dificultar o processo de digestão. As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema Shimadzu. As separações foram realizadas com fluxo de fase móvel de 1mL/min. Utilizou-se um gradiente de concentração de 5% de ACN (acetonitrila) a 100% durante 35 minutos de corrida.

3.8.2) Fosfoenriquecimento de peptídeos

Posteriormente à etapa de digestão já caracterizada, foi realizado o enriquecimento de peptídeos utilizando colunas de Fe³⁺ utilizando-se o kit High-Select™ Fe-NTA Phosphopeptide Enrichment Kit (Thermo Scientific, #A32992). O protocolo proposto pelo fabricante proporcionou um enriquecimento de 85% de fosfopetídeos. De forma resumida, as colunas cromatográficas foram equilibradas com *binding buffer*, contendo ACN e ácido trifluoracético, e centrifugadas 3 vezes durante 30 segundos a 1000 xg. Posteriormente, os peptídeos foram ressuspensos em 200 μ L do mesmo tampão e o pH da solução foi aferido, sendo essencial pH <3. A mistura de peptídeos foi adicionada à coluna cromatográfica e a reação ocorreu durante 30 minutos, com

agitação cautelosa a cada 10 minutos. Em seguida, foi realizada a centrifugação da coluna, com coleta do eluato, que representa a **fração global de proteínas**. Para **eluição dos fosfopeptídeos**, foram adicionados 200 μL de *elution buffer* (hidróxido de amônio). As amostras foram secas em Speedvac (modelo ISS100) e quantificadas pelo método de BCA (Bicinchoninic acid assay).

3.8.3) Marcação isobárica com TMT

Para análise proteômica, os peptídeos e fosfopeptídeos foram marcados com TMT 6 *plex*, seguindo o protocolo proposto por (HUTCHINSON-BUNCH *et al.*, 2021). Os peptídeos foram reconstituídos em 500 Mm de HEPES ((4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) a uma concentração final de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Cada reagente do TMT foi dissolvido em 40 μL de ACN anidra, resultando em uma concentração final de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Para cada 10 μg de peptídeo, foram adicionados 7 μL de reagente do TMT, conforme exemplificado na **Figura 11**. A reação ocorreu durante 1 hora a 25°C com agitação constante. Posteriormente, cada amostra foi diluída com 20% de ACN e combinada com as demais em uma única amostra. As amostras foram purificadas em colunas de extração de fase sólida (Oasis – Waters), conforme instruções do fabricante, secas em Speedvac e encaminhadas para análise no espectrômetro de massas.

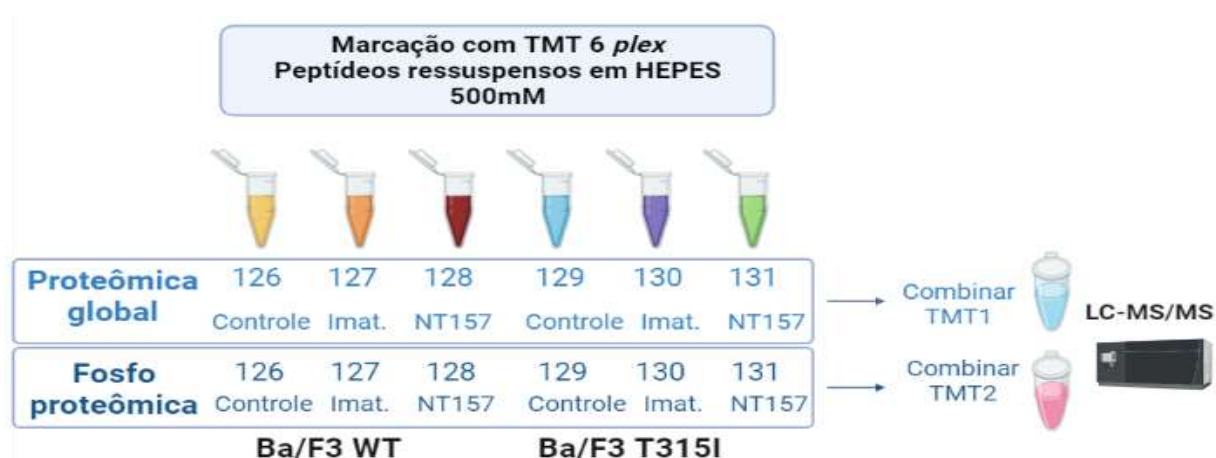


Figura 11: Protocolo e organização de amostras marcadas com TMT para análise proteômica global e de fosfopeptídeos.

3.8.4) Análise por espectrometria de massas

As amostras foram analisadas em um sistema cromatográfico Orbitrap Eclipse Tribrid (Thermo Fisher), disponível na Universidade de Stanford - Califórnia em

colaboração com a Profa. Dra. Sharon Pitteri. Os espectros foram adquiridos na faixa de m/z de 400 – 1800, seguida por 10 eventos subsequentes de fragmentação de dissociação induzida por colisão (CID), com seleção dos 15 íons mais abundantes com cargas +2 ou +3 de cada espectro de massas para a análise MS/MS. O método de coleta de dados utilizado foi baseado na estratégia de seleção síncrona do íon precursor e quantificação do íon repórter baseado em MS3. Os dados foram analisados utilizando *software* comercial do instrumento devido a detalhes metodológicos da estratégia. As amostras foram analisadas em triplicata técnica e analisados quanto ao valor de *z-score*.

3.9) Análise proteômica de célula primária leucêmica

O extrato proteico foi preparado conforme seção 3.6. Devido à pequena quantidade de amostra e raridade do modelo, decidiu-se realizar o preparo a partir de extração de bandas de SDS-PAGE. Para isso, 100 μg de proteínas totais em solução de ureia 8M foram reduzidas com DTT na proporção 1:1 durante 30 minutos a 37°C, seguida de adição de tampão de amostra 5X, sem 2-Mercaptoetanol (**seção 3.7.3**). Os extratos proteicos foram desnaturados durante 5 minutos a 100°C. Com a amostra a temperatura ambiente, foi adicionado IAA na proporção 1:5 à quantidade de proteína e a amostra foi incubada à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. As amostras foram aplicadas no gel de SDS-PAGE. Após a separação de proteínas, o gel foi corado com solução de Coomassie G-250 (Biorad 161-0786) overnight. No dia seguinte, o gel foi enxaguado com água Milli-Q por 1 hora. Com auxílio de uma placa de petri, régua e lâminas de bisturi (1 para cada amostra), cada canaleta do gel foi dividida em 6 partes iguais, e cada parte foi adicionada ao respectivo eppendorf devidamente numerado. O gel foi descorado adicionando-se 100 μL de ACN/Ambic 100 Mm (1:1) overnight a 4°C. No dia seguinte, o sobrenadante foi descartado, e ao gel no tubo foram adicionados 100 μL de ACN, e secos em Speedvac. As amostras foram ressuspendidas em 50 μL de tripsina modificada e incubadas overnight a 37°C e 450 rpm overnight. No dia seguinte, a tripsina foi inativada com adição de ácido fórmico 1% e o conteúdo dos tubos foi extraído com concentrações crescentes de ACN, sendo secos em seguida em Speedvac. Para a extração em fase sólida em ZipTip, foram adicionados 20 μL de ACN 60% para condicionamento e em seguida 20 μL de ACN 5% para equilíbrio da coluna.

A amostra foi adicionada e lavada mais duas vezes com ACN 5% e eluída com 40 µL de ACN 60%. As amostras foram analisadas em espectrômetro de massas com tecnologia Orbitrap (Thermo-Finnigan) acoplado a um sistema de cromatografia nanoflow.

A aquisição de dados desta etapa foi realizada em colaboração com o Laboratório do Dr. Marcus Smolka na Universidade de Cornell, USA pela estratégia de Label free Quantification (LFQ). A separação por cromatografia líquida foi realizada em uma coluna de 25 cm empacotada no próprio laboratório com resina cromatográfica tipo C18. A separação foi realizada com gradiente de acetonitrila/ácido fórmico em água, em fluxo aproximado de 250nL/min. Os espectros foram adquiridos em modo DDA na faixa de m/z 400 – 1800 com seleção dos 15 íons mais abundantes com cargas +2 ou +3 de cada espectro de massas para a análise MS/MS. Os dados adquiridos foram automaticamente processados pela plataforma TPP (Trans Proteomic Pipeline), utilizando-se o algoritmo de busca Comet (ENG; JAHAN; HOOPMANN, 2013). O critério de qualidade dos peptídeos identificados foi obtido pelo algoritmo Peptide Prophet. Esta plataforma de análise de dados proteômicos do tipo “*open source*” está implementada em computador de alto desempenho no Laboratório de Proteômica do Câncer no departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Foram utilizados “Scripts” customizados para análise e organização dos dados com a linguagem “R”.

3.10) Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software Graphpad Prism, versão 8.0. Os dados foram expressos como média e desvio padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. O teste ANOVA foi realizado para comparação entre um ou mais grupo tratado e controle. Os resultados com valor $**p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.11) Análise da interação gênica

Com a evolução da análise genômica, transcriptômica ou proteômica, já é possível identificar conjuntos ou redes de proteínas que se coordenam durante alterações biológicas ou mesmo que interagem fisicamente entre si. Esses conjuntos, também chamados de redes de proteínas, podem ser avaliados por meio de *softwares* ou bancos de dados disponíveis. Assim, as interações entre as proteínas reguladas em nossos resultados foram verificadas através da ferramenta STRING (<http://string-db.org/>) que utiliza um banco de dados com interações previstas e conhecidas. As interações incluem associações diretas e indiretas, contexto genômico, técnicas experimentais de alto rendimento, coexpressão e conhecimento prévio de outros bancos de dados (SZKLARCZYK *et al.*, 2021).

RESULTADOS

4. Resultados

4.1) Ensaio funcionais utilizando células Ba/F3 WT e T315I

4.1.1) Caracterização da dosagem de NT157

Visando o objetivo inicial do trabalho de analisar as alterações promovidas pelo tratamento com NT157, iniciamos as avaliações de atividade do composto pelo monitoramento da fosforilação de BCR-ABL1. Esta é uma modificação pós-traducional que ocorre de forma dinâmica e em um pequeno espaço de tempo, e, assim, nossos esforços foram inicialmente dirigidos para identificar a melhor dosagem do inibidor NT157 para posterior análise proteômica (VYSE *et al.*, 2018). Partindo deste princípio, levamos em consideração o fato de que, ao considerar eventos de fosforilação, deve-se escolher a melhor dosagem que dispara vias de sinalização celular relacionadas à proteínas quinases de interesse, mas que antecedem ao processo generalizado de morte celular programada.

Baseado nessas informações, e considerando que cada linhagem celular possui uma dose-resposta específica para ativar vias de sinalização de IGF1R-IRS1/IRS2, avaliamos a resposta de células Ba/F3^{BCR/ABL1} (WT) e Ba/F3^{BCR/ABL1-T315I} (T315I) por *western blotting* nos tempos de 0, 12, 24 e 48 horas, em concentrações de 0,8 µM e 1,6 µM a fim de detectar a clivagem de caspase 3, proteína utilizada como marcador de células apoptóticas (**Figura 12**).

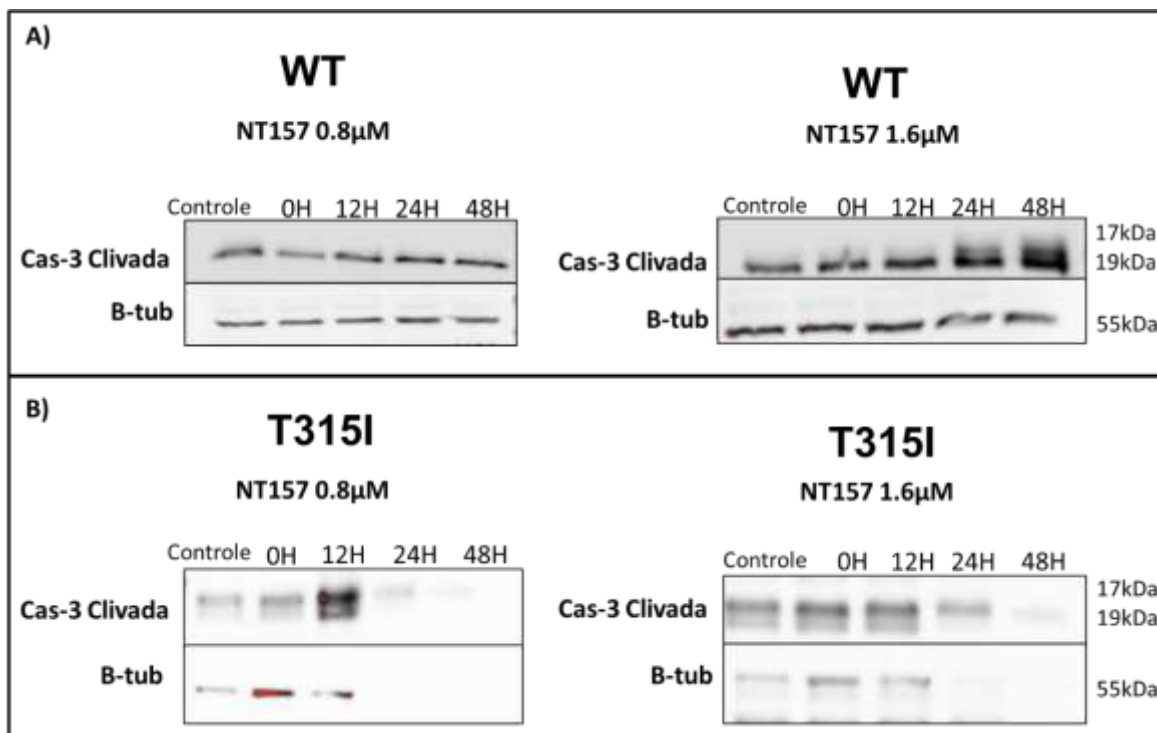


Figura 12: Caracterização por *western blotting* da expressão de caspase-3 clivada em células WT e T315I tratadas com NT157 nas concentrações de 0,8 e 1,6 μM, nos tempos de 0, 12, 24 e 48 horas. Todos os anticorpos foram utilizados na diluição 1:1000 (ver tabela 2 na seção 3.8.2). 50 μg dos extratos celulares foram aplicados para cada condição estudada. A proteína β-tubulina foi utilizada como controle endógeno.

Dentre as condições analisadas, observamos que para 12 horas de tratamento com NT157 na concentração de 0,8 μM, houve um aumento de caspase 3 clivada em células T315I indicando início da apoptose. Para avaliar as vias de sinalização especificamente ativadas que disparam a apoptose com o tratamento, foi padronizado o período de avaliação inferiores a 12 horas. Analisamos a expressão de caspase 3 clivada e de proteínas relacionadas à inibição de IGF1R/IRS1-2 na concentração de 0,8 μM de NT157, em períodos de 30 minutos, 1, 2 e 4 horas (**Figura 13**).

A partir de 2 horas de tratamento com NT157 0,8 μM, há diminuição da expressão de IRS1 e de C-ABL nas duas linhagens celulares (Figura 13 A/B). Na **Figura 13-C** observamos que a inibição com imatinibe 1 μM resultou na inibição de C-ABL apenas em WT, e não em T315I. Houve diminuição também de IRS1 nas células T315I quando comparadas a WT. Um fato interessante é que houve um aumento significativo de IGFIR em células WT tratadas com NT157 e imatinibe. Desta maneira, demonstrou-se que

NT157 e imatinibe alteram a sinalização celular de forma diferente nos dois modelos celulares.

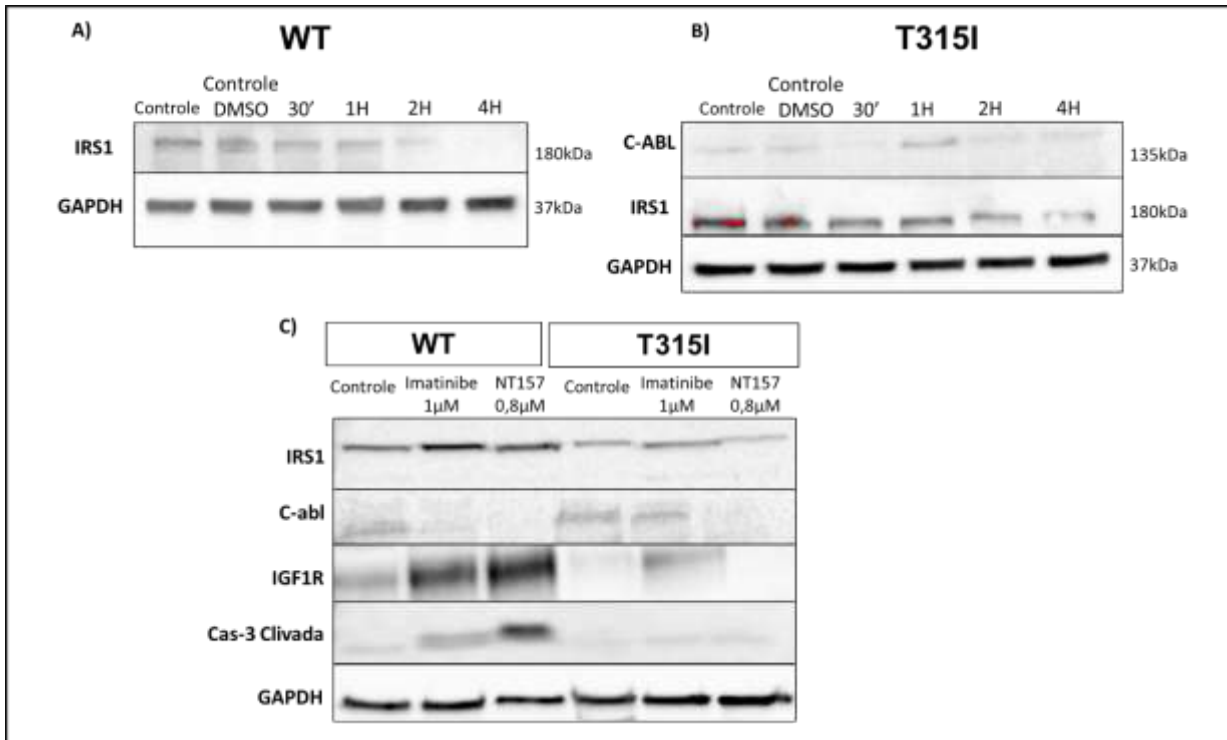


Figura 13: Caracterização por *western blotting* de vias de sinalização relacionadas a LMC em a) WT e b) T315I tratadas com NT157 nas concentrações de 0,8 µM, durante 0, 30 minutos, 1, 2 e 4 horas. Todos os anticorpos foram utilizados na diluição 1:1000 (ver tabela 2 na seção 3.8.2). O extrato celular foi aplicado 50 µg por amostra. A proteína β-tubulina foi utilizada como controle endógeno.

4.1.2) Avaliação da viabilidade celular decorrentes do tratamento com NT157

Para avaliar a viabilidade celular durante todas as condições de tratamento foi realizado o ensaio de MTT, teste colorimétrico para análise metabólica celular. Inicialmente, células WT e T315I foram tratadas com NT157 nas concentrações 0,8, 1,6, 3,2 e 6,4 µM durante 0, 12, 24 e 48 horas (**Figura 14**). Observamos que o tratamento foi capaz de reduzir a viabilidade celular das células WT e T315I, e, portanto, sugere apresentar potencial oncogênico. A viabilidade celular reduziu de forma dose e tempo dependente, considerando que nos tempos de 24 horas e 48 horas houve uma diminuição significativa em doses acima de 3,2 µM. Adicionalmente, os valores de IC50

foram menores para células com mutação T315I, indicando maior sensibilidade ao tratamento com NT157.

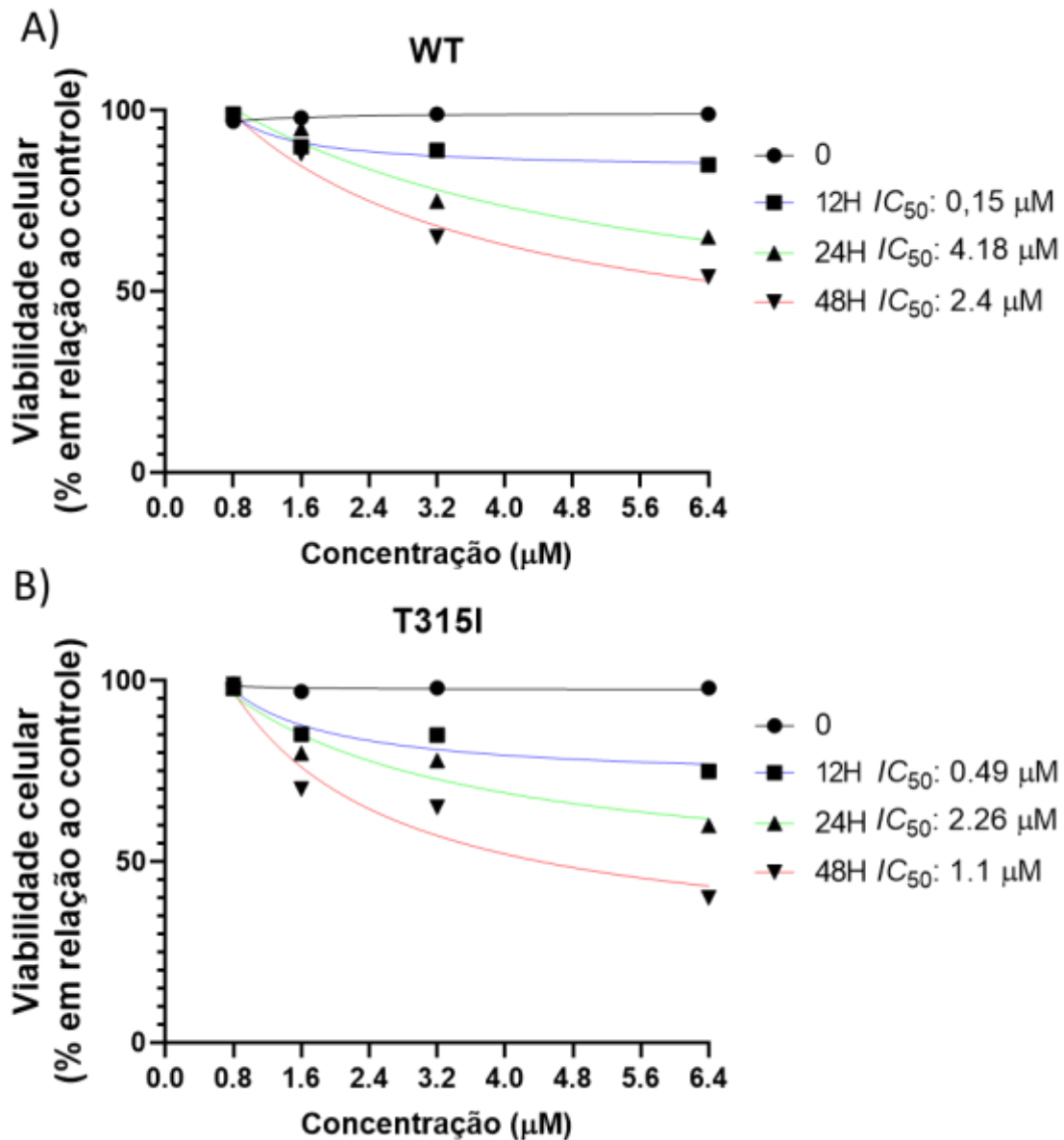


Figura 14: Análise da viabilidade celular das células WT e T315I pelo ensaio de MTT. O gráfico demonstra os valores de IC_{50} para o tratamento com NT157, realizados pelo GraphPad Prism8.

Visando refinar a avaliação do efeito do tratamento, o ensaio de MTT foi repetido com NT157 na concentração de 0,8 µM durante 30 minutos, 1, 2, 4, 24 e 48 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Como foi observado, em células T315I tratadas com NT157 0,8 µM não há reduções significativas da viabilidade em até 2 horas de tratamento (**Figura 15**). Estes resultados também são consistentes com os

resultados de expressão proteica verificados por *western blotting* (**Figura 13**). Baseados nestes resultados, definimos que a condição para os estudos proteômicos e fosfoproteômicos em linhagens celulares Ba/F3 WT e T315I utilizariam tratamentos de 2 horas com NT157 0.8 μM .

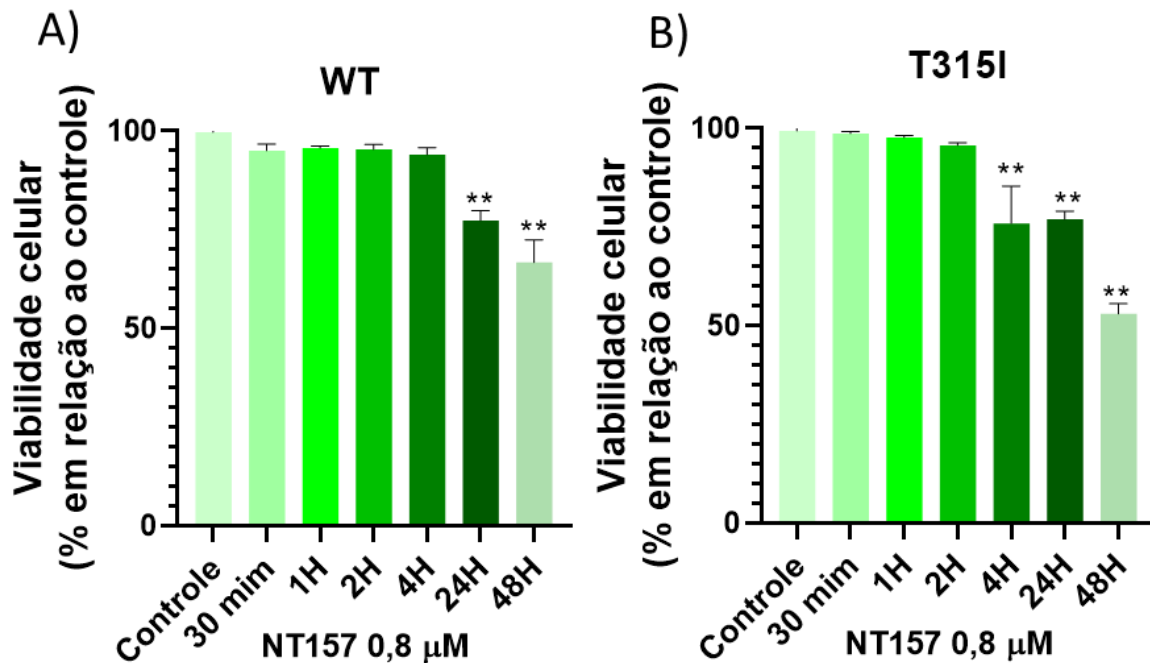


Figura 15: Análise da viabilidade celular das células WT e T315I pelo ensaio de MTT. O inibidor NT157 foi utilizado na concentração de 0,8 μM por até 48 horas. Resultados estatisticamente significantes em relação ao controle ** $p < 0,05$.

4.2) Ensaios de proteômica global utilizando células Ba/F3 WT e T315I

4.2.1) Caracterização das alterações proteômicas desencadeadas pelo tratamento com NT157 e imatinibe

A análise de proteômica global por espectrometria de massas foi realizada com linhagens celulares murinas WT e T315I com objetivo de mapeamento e identificação das alterações proteicas induzidas pela mutação e/ou pelos os tratamentos NT157 0,8 μM e imatinibe 1 μM . Para isso, grande esforço foi realizado para implementação metodológica, visto que a estratégia utilizada necessitava ser compatível com os experimentos de fosfoproteômica (**vide seção 3.8.2**). A digestão de peptídeos foi iniciada a partir de 5 mg de proteínas para cada condição, partindo de 1×10^9 células. As etapas de digestão foram minuciosamente monitoradas por HPLC devido à grande

concentração de amostra. A escolha do método para realização de uma avaliação proteômica quantitativa com múltiplas variáveis foi decisiva para a viabilidade do projeto. A opção pela estratégia de TMT-6plex contemplou diversas vantagens importantes, mas foi fundamental para permitir comparar todas as condições experimentais selecionadas em um único experimento. Toda a metodologia de marcação isobárica com TMT passou por padronização e implementação em nosso laboratório para análise de amostras complexas.

A etapa de coleta de dados proteômicos em combinação com a marcação por TMT também necessitou de refinamento. Todo esse processo foi realizado em colaboração com a Profa. Sharon Pitteri da Universidade Stanford, USA. Avaliamos dois métodos de coleta de dados obtidos pelo espectrômetro de massas Orbitrap Eclipse (Thermo Scientific): 1) o que utiliza alta energia de dissociação (HCD) em comparação com a seleção síncrona do íon precursor e 2) quantificação dos íons repórter baseado em MS3 (SPS-MS3). As amostras foram analisadas em triplicata técnica.

Para análise dos dados, optou-se por utilizar o *software* comercial da fabricante do instrumento devido aos detalhes metodológicos da estratégia SPS-MS3. Em cada uma das estratégias, foi selecionado pelo menos 1 observação por modelo celular, e menos de 1% de FDR (*false Discovery rate*) nas identificações de proteínas. No total, foram identificadas 1.561 proteínas pelo método HCD e 3.093 pelo SPS-MS3, e portanto, esta foi a estratégia escolhida para a análise de dados.

Com a finalidade de facilitar a integração de todos os diferentes tipos de dados produzidos neste estudo, optamos por ilustrar os dados quantitativos no formato de *z-score* (o *z-score* demonstra o número de desvios padrão em relação à média). Dada a característica de amostragem para a coleta dos dados proteômicos, foram selecionadas apenas proteínas identificadas nas seis condições, com variação apenas de forma quantitativa. Portanto, alterações acima ou abaixo de 1 já poderiam ser consideradas como reguladas. Assim, com este modelo experimental utilizando células murinas, foi possível detectar proteínas que são reguladas por NT157 (NT157-dependentes) ou por imatinibe (imatinibe-dependentes), ou ainda dependentes da mutação T315I. A **Figura 16-A** mostra um resumo dos resultados e a sobreposição das proteínas encontradas acima ou abaixo de 1 e -1 entre os dois modelos celulares.

A)

WT Controle						
WT Imatinibe	555 (40.0%)					
WT NT157	474 (32.7%)	449 (30.5%)				
T315I Controle	670 (48.1%)	606 (41.7%)	513 (33.5%)			
T315I Imatinibe	647 (24.2%)	585 (21.4%)	538 (19.5%)	684 (24.8%)		
T315I NT157	597 (43.0%)	580 (41.3%)	498 (33.9%)	732 (53.3%)	636 (23.3%)	
	WT Controle	WT Imatinibe	WT NT157	T315I Controle	T315I Imatinibe	T315I NT157

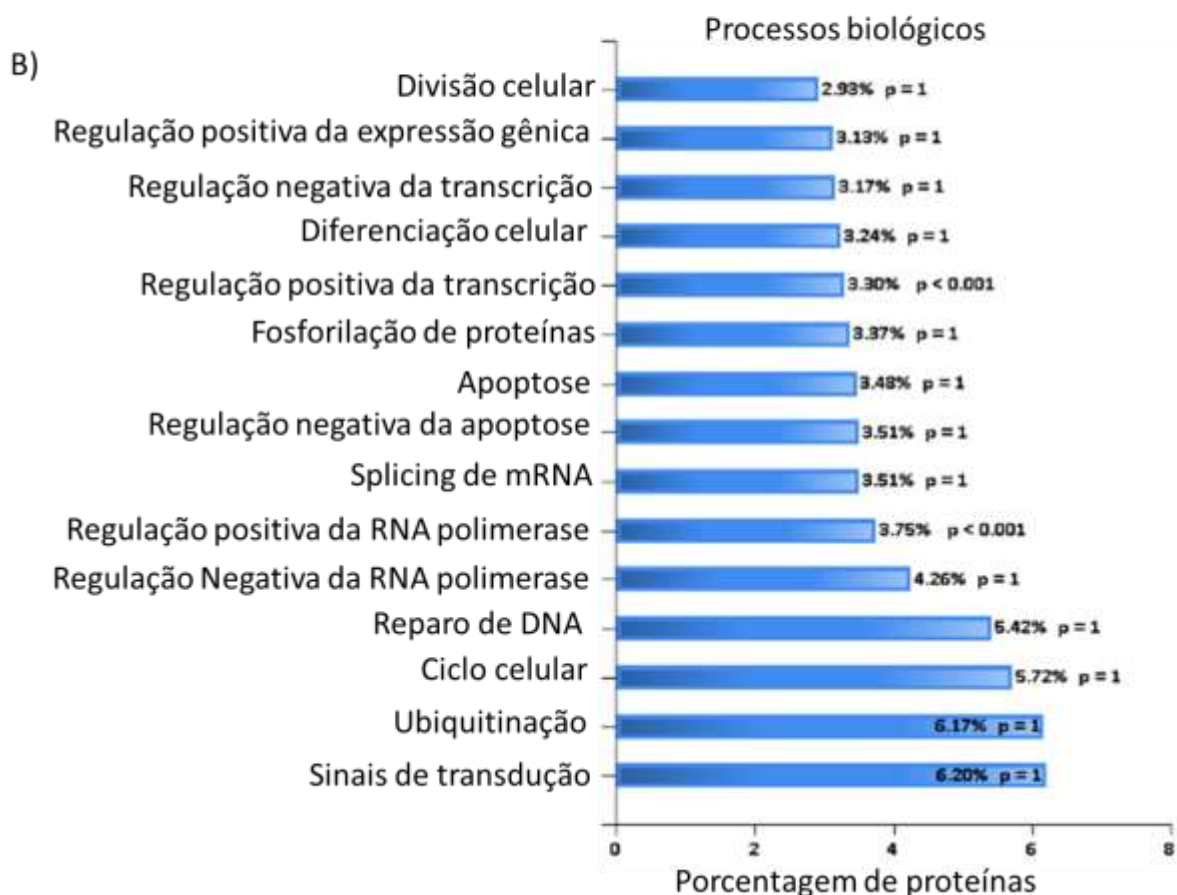


Figura 16: Resumo dos dados proteômicos coletados para as linhagens celulares WT e T315I. A) Tabela demonstrando a sobreposição de proteínas identificadas *com z-score* +1 ou -1 em todos os modelos experimentais celulares; B) Processos biológicos a partir do *software* Funrich das 3.093 proteínas encontradas em todos os modelos celulares.

Conforme pode ser observado na **Figura 16-B**, as 3.093 proteínas identificadas atuam principalmente em processos biológicos como transdução de sinal, ubiquitinação, ciclo celular, reparo de DNA, mas também na regulação positiva e negativa da RNA polimerase, *splicing* de mRNA, apoptose, fosforilação de proteínas, diferenciação e divisão celular. Estas são funções comuns em processos fisiológicos, mas também alteradas na maioria das neoplasias. A porcentagem de proteínas quinases envolvidas

na fosforilação de proteínas merecem atenção por serem vias alvos de inativação em diversas terapias, e que serão adiante estudadas com mais enfoque.

A assinatura molecular de todos os conjuntos amostrais nos dois modelos celulares está representada no *heatmap* presente na **Figura 17**.

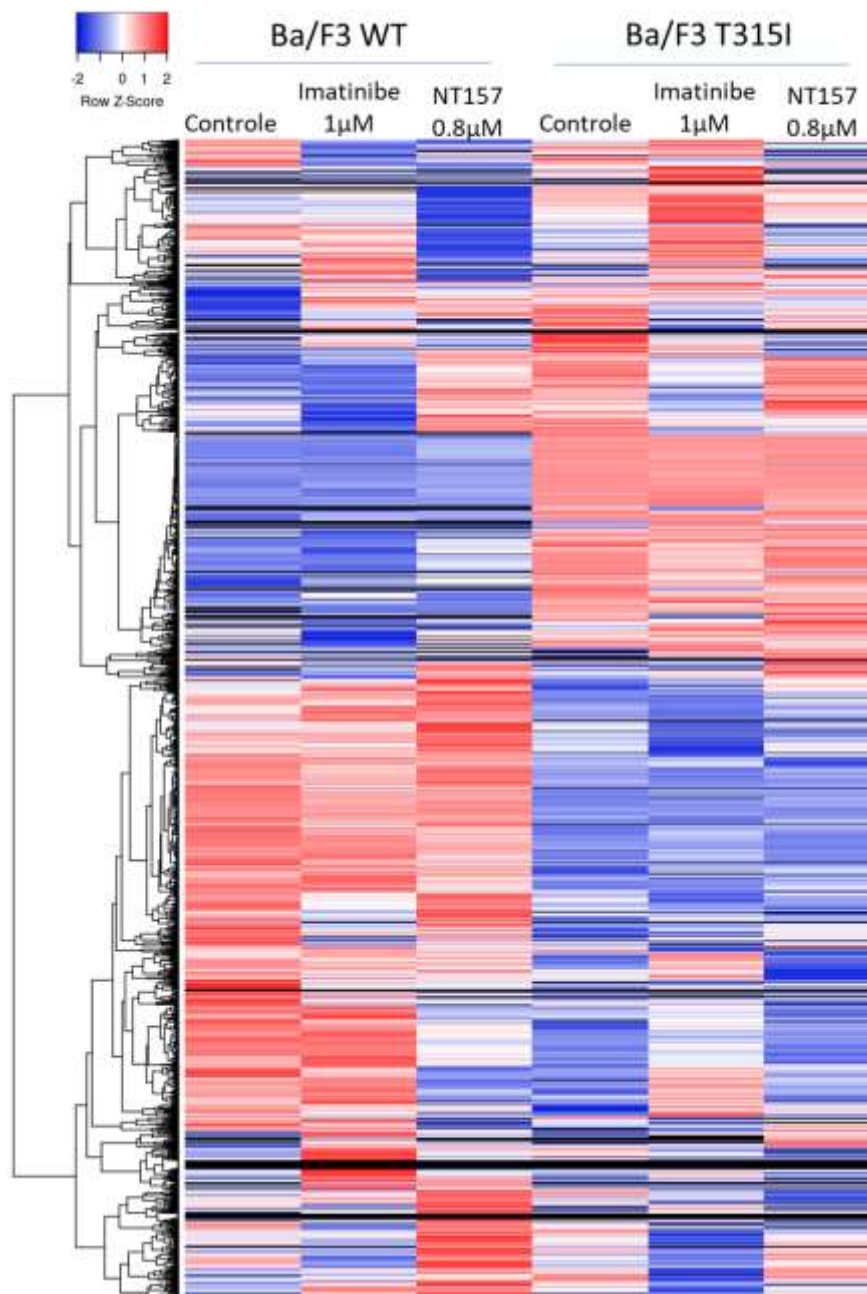


Figura 17: Avaliação da assinatura molecular das 3.093 proteínas identificadas em células murinas WT e T315I tratadas com imatinibe 1 µM e NT157 0.8 µM. Em vermelho estão destacadas proteínas aumentadas, e em azul, diminuídas. A escala das cores está representada no topo do gráfico.

4.2.2) Caracterização das alterações proteômicas desencadeadas pelo tratamento com NT157

Conforme supracitado, após a obtenção dos dados quantitativos para cada uma das variáveis do estudo (tratamento com NT157, tratamento com imatinibe e mutação T315I) conseguimos compreender as alterações proteômicas decorrentes do tratamento com NT157 0,8 μ M por 2 horas. Optamos por utilizar um gráfico de correlação para cada variável, a fim de identificar as alterações para as linhagens celulares Ba/F3 WT ou T315I com o tratamento (**Figura 18-A**). Com este tipo de representação, ficam evidentes as proteínas que aumentaram ou diminuíram seus níveis concordantemente (Q2 e Q4, respectivamente), mas independentemente do modelo mutado ou não. Em contrapartida, também é possível identificar aquelas proteínas que foram reguladas diferentemente entre os dois *status* mutacionais (Q1 e Q3). Para estas análises, foram observadas apenas modulações mais refinadas, com *z-score* acima 1,3 ou abaixo de -1,3.

Nesta comparação, observa-se que o tratamento com NT157 desencadeia maiores alterações em células Ba/F3 WT (612 proteínas – **Figura 18-B**) quando comparado com as mutadas T315I (236 proteínas - **Figura 18-C**). A **Figura 18-D** demonstra o diagrama de Venn das alterações proteômicas promovidas por NT157 em ambos modelos celulares, com 53 proteínas sobrepostas. Vale destacar também, o aumento expressivo da variante de histona HIST2H2AC (**Figura 18-D**), positivamente regulada em WT e NT157.

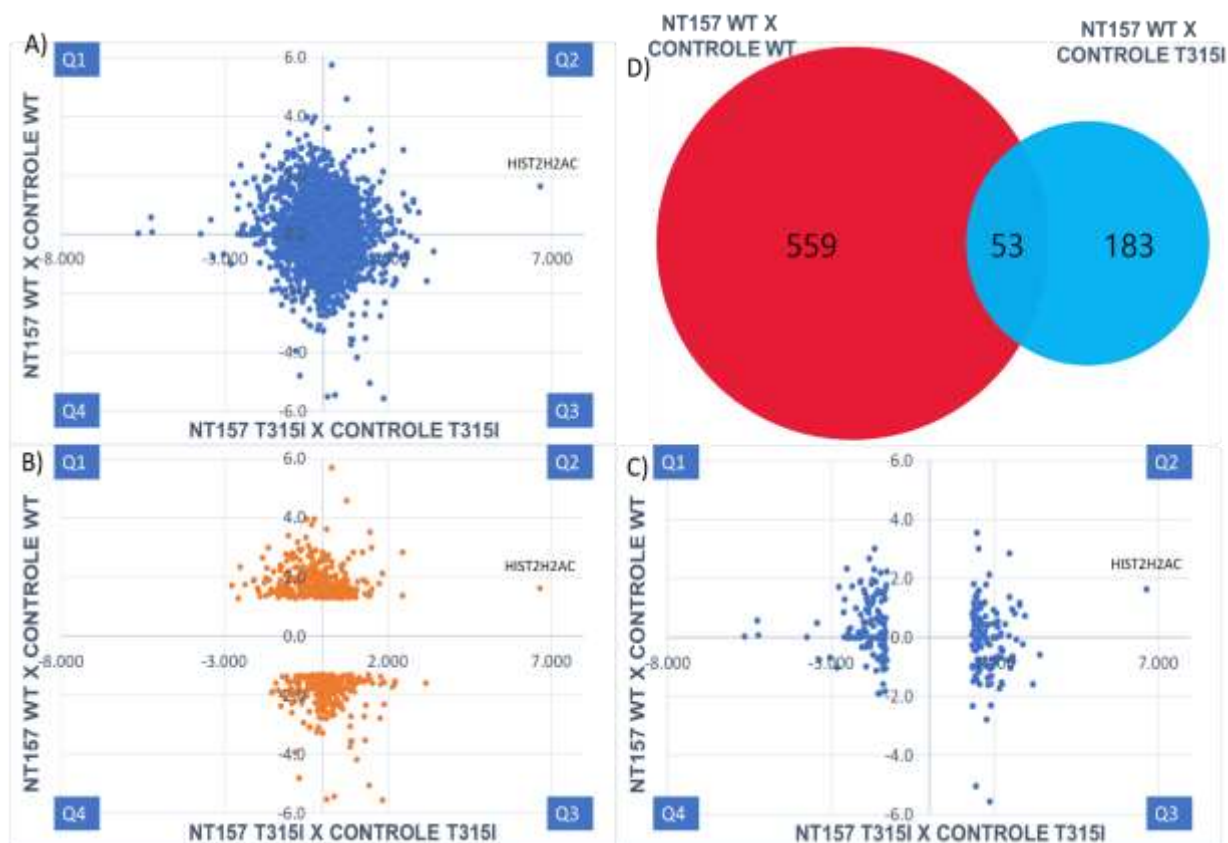


Figura 18: Comparação das alterações proteômicas promovidas por NT157 em células WT e T315I. A) Gráfico de correlação utilizado para análise das alterações proteômicas decorrentes do tratamento com NT157. B) Proteínas significativamente alteradas com tratamento com NT157 em células WT. C) Proteínas significativamente alteradas com tratamento com NT157 em células T315I. D) Diagrama de Venn das proteínas reguladas entre os dois modelos celulares tratados com NT157. Foram consideradas alterações de z-score acima de 1,3 ou -1,3.

Afim de estabelecer correlações entre as proteínas reguladas e gerar redes de interação proteína-proteína (PPI – protein-protein interaction) associadas a diferentes processos moleculares, foi utilizado o *software* STRING-DB, que consiste em um banco de dados contendo informações referentes às interações diretas entre proteínas, anotações funcionais, processos celulares e co-expressão.

Inicialmente, ao considerar apenas modulações exclusivas de células WT, as 559 proteínas geraram uma complexa rede PPI, que foram agrupadas em três grupos principais baseados em similaridade: proteínas de *splicing* e nucleoproteínas (SNRNPs), sistema ubiquitina proteassoma (proteínas RPS) e também transdução de sinal. Neste último processo, merecem destaque quinases já identificadas como envolvidas na regulação em processos neoplásicos e também na LMC, como CRKL,

LCK (proto-oncogene tyrosine-protein kinase LCK) e MAPK. Também chamam atenção as proteínas STAT1, STAT5, ILF3 (interleukin enhancer binding fator 3), FIL1L1 (filamin A-interacting protein 1-like) e HDAC2 (histone deacetylase) **(Figura 19)**.

Para as células T315I tratadas com NT157, as 236 proteínas exclusivas foram igualmente agrupadas na rede do STRING-DB, gerando grupos envolvidos na regulação do DNA, RNA e proteínas ribossomais, principalmente. Por fim, merecem destaque quinases exclusivas do tratamento em células T315I, como por exemplo, MAP4K4, NCK (cytoplasmic protein NCK1), TTK (dual specificity protein kinase TTK) e a enzima histona deacetilase HDAC3 **(Figura 20)**.

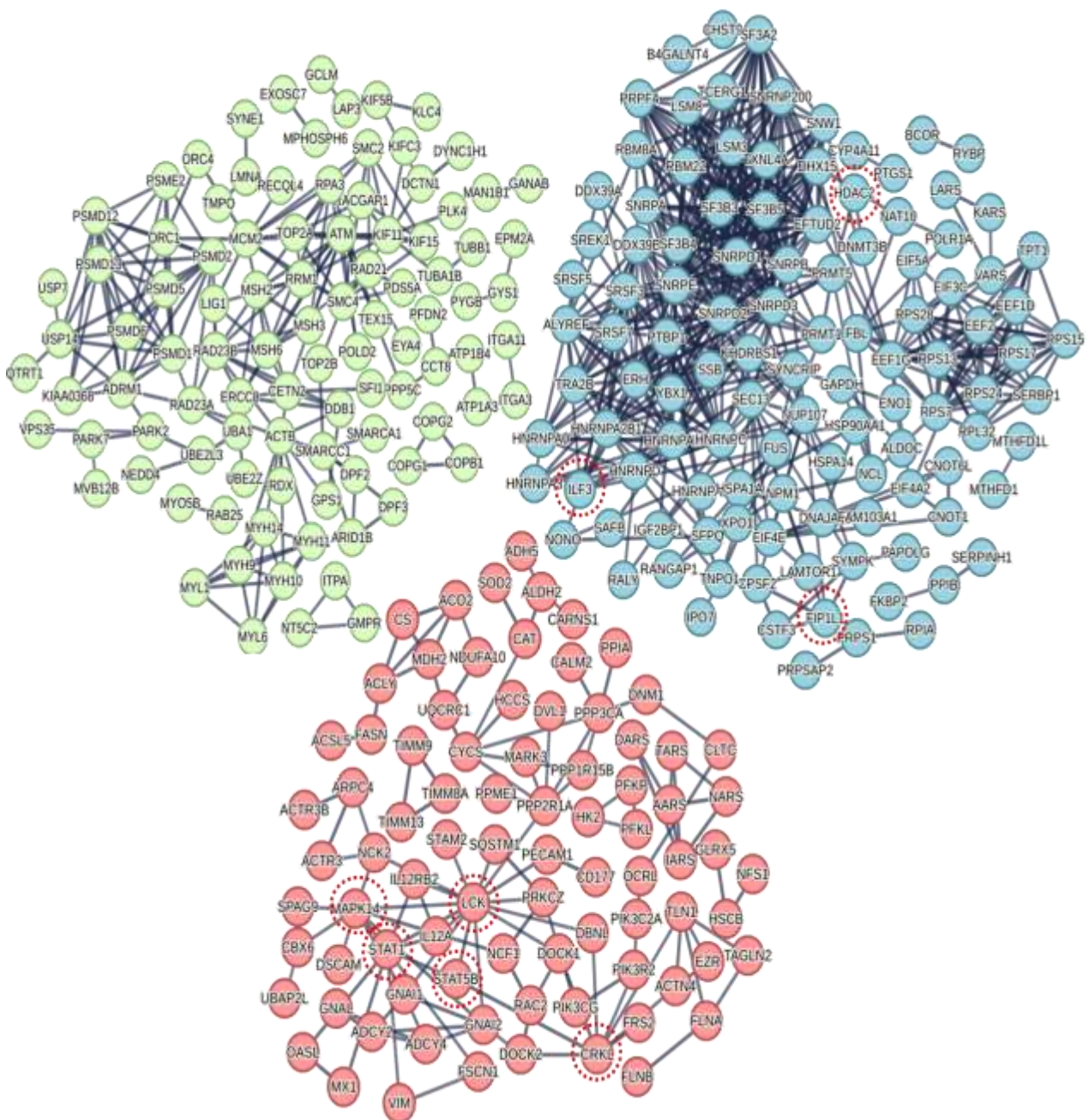


Figura 19: Análise de interações das 559 proteínas reguladas com NT157 0,8 μ M em células WT. Foi utilizado o STRING-DB para avaliar o conjunto de proteínas. As sub-redes geradas foram agrupadas por *k-mean*, considerando confiança de 0,9. As diferentes proteínas correspondem, principalmente, às seguintes sub-redes funcionalmente relacionadas: (verde) UPS; (azul) proteínas de *splicing* e nucleoproteínas e (vermelho) transdução de sinal.

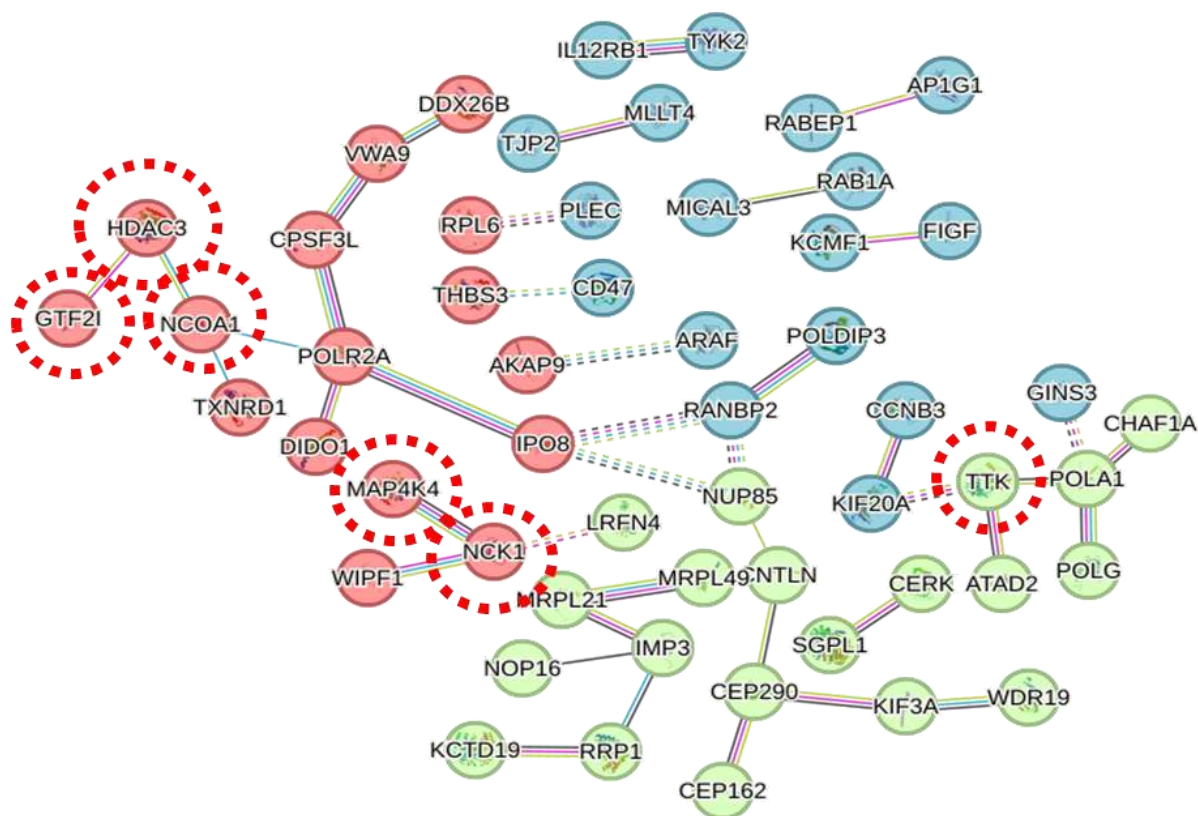


Figura 20: Análise de interações para as 183 proteínas reguladas com NT157 0,8 μ M em células T315I. Foi utilizado o STRING-DB para avaliar o conjunto de proteínas. As sub-redes geradas foram agrupadas por *k-mean*, considerando confiança de 0,9. As diferentes proteínas correspondem, respectivamente, às seguintes sub-redes funcionalmente relacionadas: (verde) proteínas ribossomais, (azul) reguladores de transcrição (vermelho) RNA polimerases e proteínas envolvidas na transdução de sinal.

4.2.3) Comparação de alterações proteômicas desencadeadas pelo tratamento com imatinibe

De maneira a identificar proteínas reguladas por imatinibe que podem interferir na ausência de resposta terapêutica em células resistentes, realizamos a comparação do tratamento em células WT ou T315I (**Figura 21**). Nos dados gerados pelo gráfico de correlação, observamos as distribuições diferenciais entre as amostras, com maiores alterações proteômicas em células T315I. Estas modulações ficam claras na **Figura 21-C/D** que demonstra que de 796 proteínas reguladas, 91 estão sobrepostas em ambos os modelos celulares e 404 exclusivamente em células T315I (**Figura 21-C/D**). Estas proteínas podem ser a resposta para o entendimento de como a terapia de escolha atual

(imatinibe) pode causar uma grande adaptabilidade nas células T315I ao disparar cascatas de sinalização que atuam na reestruturação celular, disparando vias de resistência. Para identificar quais as proteínas reguladas exclusivamente nos grupos em WT e T315I que foram alteradas com o tratamento com imatinibe, realizamos novamente a análise por similaridade através do STRING-DB (**Figura 22 e 23**).

As proteínas reguladas somente nas células WT estão agrupadas na **Figura 22**. Os grupos gerados são referentes a proteínas envolvidas na regulação de RNA e DNA, transdução de sinal e variantes de *splicing*. Um nó importante que une as sub-redes é a proteína mTOR, uma serina/treonina quinase envolvida na regulação central do metabolismo, proliferação e divisão celular. mTOR aparece interligada às proteínas PIK3R2 (tyrosine-protein kinase receptor UFO) e PIK3CG, a fatores de alongamento da transcrição (EIF4E) e proteínas do complexo de poros nuclear (NUPs).

Na **Figura 23** está demonstrada a rede PPI para as 404 proteínas exclusivas do tratamento com imatinibe em células T315I. Novamente as proteínas variantes de *splicing* e ribossomais desencadeiam papéis chaves na regulação. Destaca-se um nó central de proteínas SNRPE (small nuclear ribonucleoprotein E), RPS (disease resistance protein RPS4), EEF1A1 (elongation factor 1-alpha), MYH (adenine DNA glycosylase), MAPK1 e LCK. Estas duas últimas aparecem reguladas de forma consistente em nossas análises.

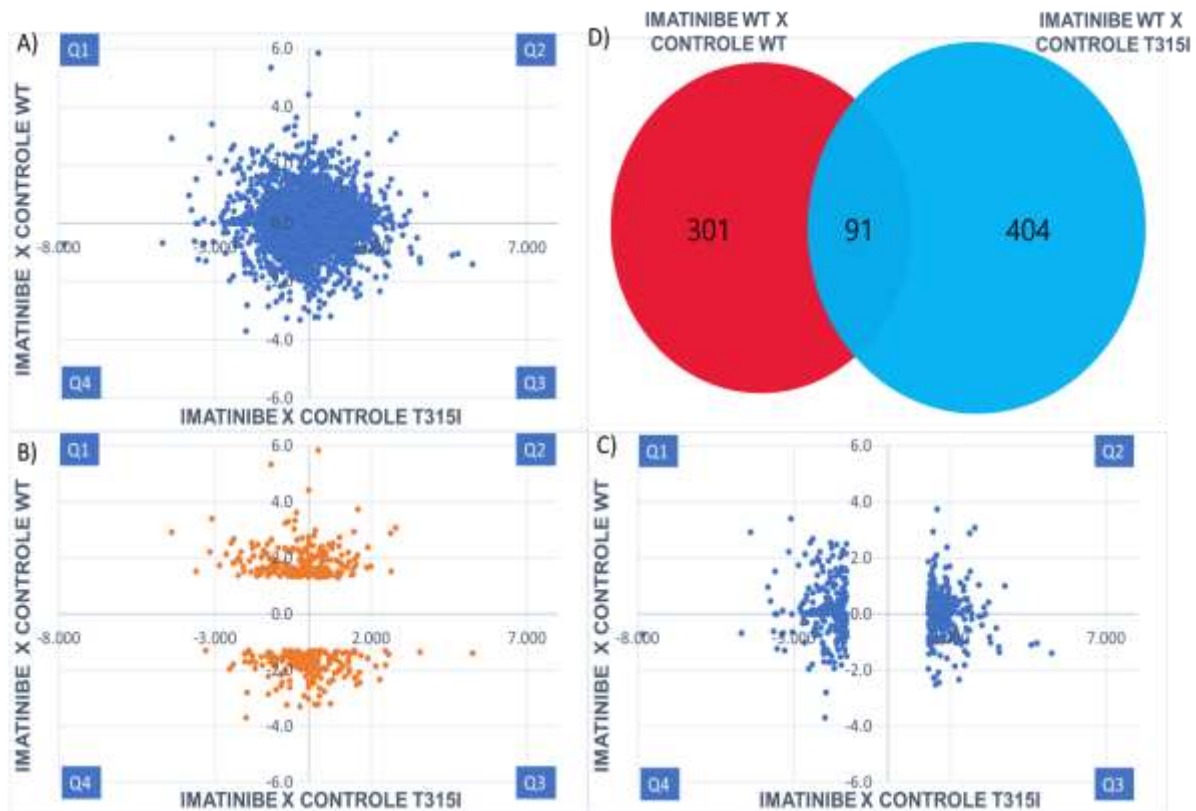


Figura 21: Comparação das alterações promovidas por imatinibe em células WT e T315I. A) Gráfico de correlação utilizado para análise das alterações proteômicas decorrentes do tratamento com imatinibe 1 μ M em células WT e T315I. B) Proteínas significativamente alteradas com tratamento com imatinibe 1 μ M em células WT; C) Proteínas significativamente alteradas com tratamento com imatinibe 1 μ M em células T315I; D) Diagrama de Venn das proteínas reguladas entre os dois modelos celulares tratados com imatinibe. Foram consideradas alterações de z-score acima de 1,3 ou -1,3.

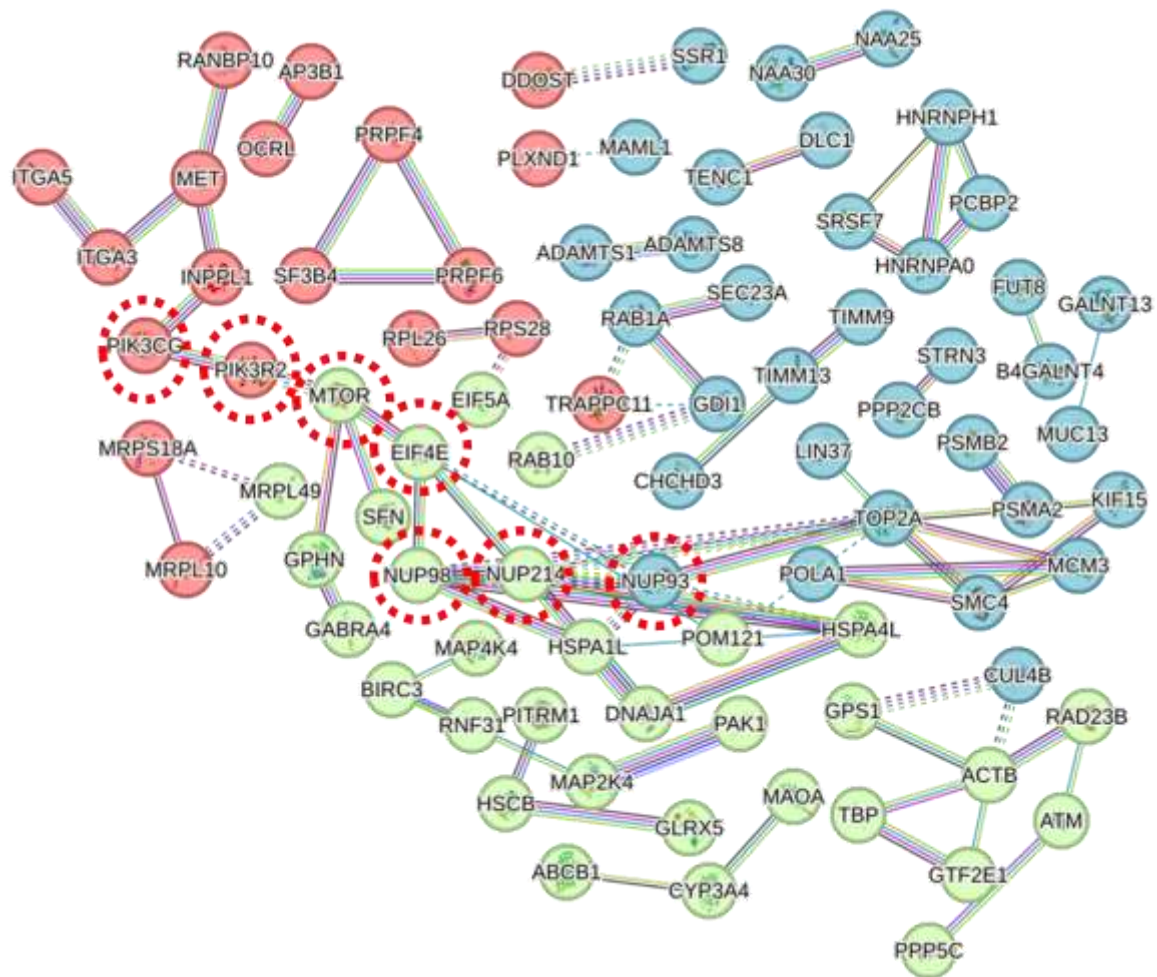


Figura 22: Análise de interações para as 301 proteínas reguladas com imatinibe 1 μ M em células WT. Foi utilizado o STRING-DB para avaliar o conjunto de proteínas. As sub-redes geradas foram agrupadas por *k-mean*, considerando confiança de 0,9. As diferentes proteínas correspondem, respectivamente, às seguintes sub-redes funcionalmente relacionadas: (verde) regulação do RNA e DNA; (azul) transdução de sinal e (vermelho) *splicing*.

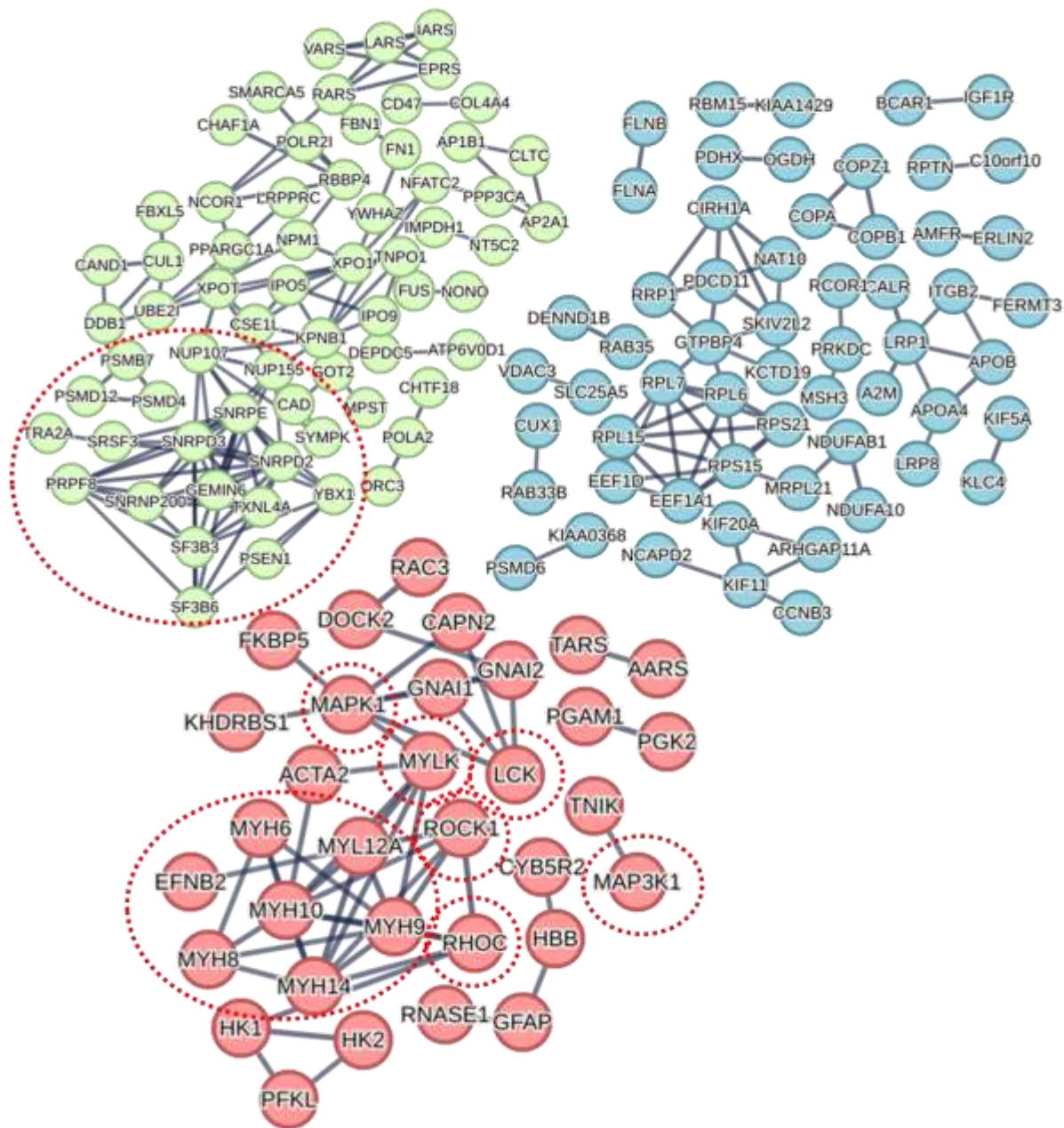


Figura 23: Análise de interações para as 404 proteínas reguladas com imatinibe 1 μ M em células T3151. Foi utilizado o STRING-DB para avaliar o conjunto de proteínas. As sub-redes geradas foram agrupadas por *k-mean*, considerando confiança de 0,9. As diferentes proteínas correspondem, respectivamente, às seguintes sub-redes funcionalmente relacionadas: (verde) transdução de sinal; (azul) regulação do RNA e (vermelho) proteínas ribossomais.

4.2.4) Comparação das alterações desencadeadas por NT157 e imatinibe

Para complementar as análises anteriores referentes ao tratamento com NT157 e imatinibe e propor proteínas chaves que atuem positivamente nos dois tratamentos,

avaliamos as alterações proteômicas induzidas pelos dois inibidores em células WT e T315I (**Figura 24**). O objetivo principal consiste em destacar proteínas que são prioritariamente NT157 dependentes na célula T315I, que não apresentam resposta da convencional terapia com imatinibe.

Na **Figura 24-B**, foram selecionadas proteínas que responderam de forma dependente de NT157 inicialmente nos dois modelos celulares (valor de *z-score* +1,3), e na **Figura 24-C**, apenas na célula T315I (valor de *z-score*: Y <1,3 e X >-1,3 e >1,3). Destaque se dá a proteína MMD2 (PAQR10) ativada e diferencialmente expressa, importante mediadora da via RAS no complexo de Golgi (JIN *et al.*, 2012).

A rede PPI das modulações de NT157 ocorridas apenas em células T315I está ilustrada na **Figura 25**. Observa-se que o tratamento refletiu na regulação de grandes conjuntos de proteínas ribossomais (RPS26, RPS7, RPS24) e ribonucleoproteínas (HNRNPA1, HNRNPD). Interessantemente, também se destaca a presença de proteínas que ativam vias chaves em processos neoplásicos como RICTOR, MYLK (myosin light chain) e VIM (vimentina).

A proteína RICTOR (rapamycin-sinsensitive companion of mTOR), subunidade de mTORC2, regula o crescimento e sobrevivência celular em resposta a sinais hormonais. Também desempenha papel crítico na fosforilação de AKT1 (FANG *et al.*, 2017). A família de proteínas MYLK pertencem a quinases de cadeia leve de miosina dependentes de cálcio e já foram descritas pela alta capacidade proliferativa das células do câncer de mama atuando através de mecanismos que inibem a apoptose (CHO; JIN; EOM, 2021). Por último, a superexpressão da proteína vimentina tem sido considerada indicador importante na progressão tumoral, principalmente em tumores sólidos. Em LMC, a participação de vimentina foi ligeiramente correlacionada com a expressão de microRNAs em células K562 (XISHAN *et al.*, 2015). Portanto, estas proteínas podem representar potenciais alvos alterados durante o processo de resistência na LMC.

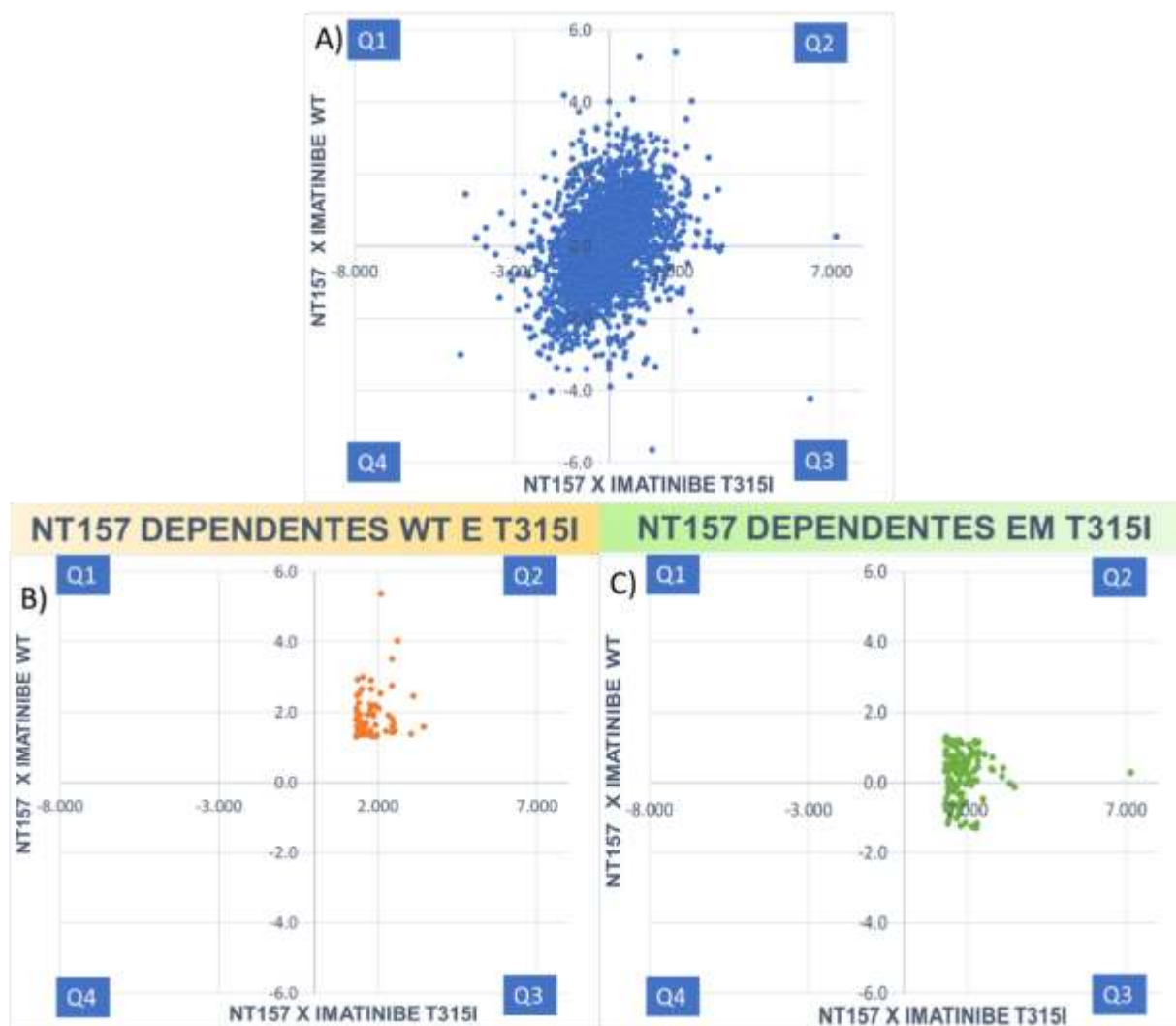


Figura 24: Comparação das alterações proteômicas promovidas por NT157 e imatinibe em células WT x T315I. A) Gráfico de correlação utilizado para análise das alterações proteômicas decorrentes da diferença do tratamento com imatinibe e NT157 em células WT. B) Dependentes do tratamento com NT157 em células WT e T315I; B) Dependentes do tratamento com NT157 em células T315I.

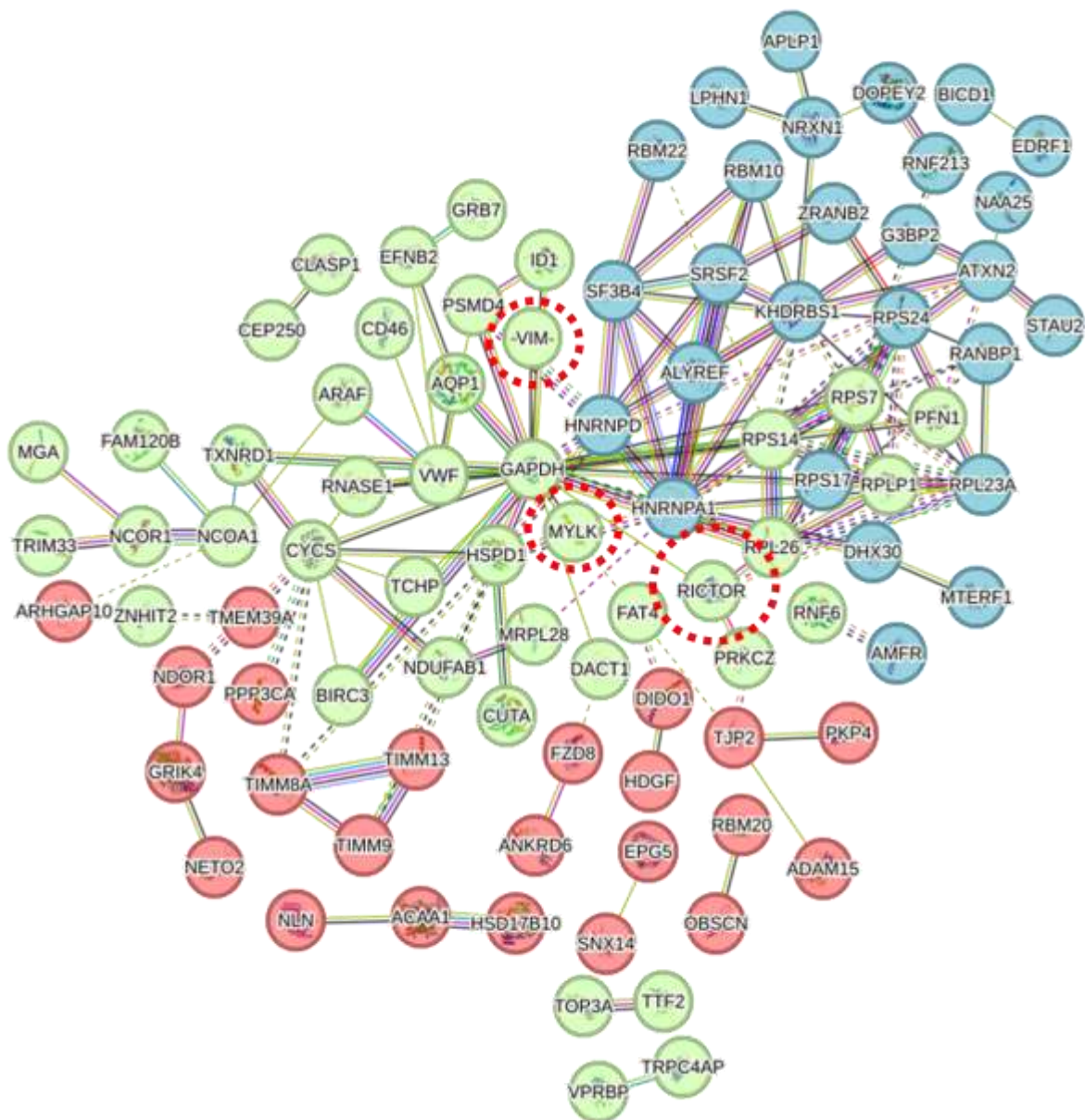


Figura 25: Análise de interações para as 141 proteínas NT157 dependentes em células T315I. Foi utilizado o STRING-DB para avaliar o conjunto de proteínas. As sub-redes geradas foram agrupadas por *k-mean*, considerando confiança de 0,9. As diferentes proteínas correspondem, respectivamente, às seguintes sub-redes funcionalmente relacionadas: (verde) proteínas ribossomais e de adesão; (azul) regulação do RNA e (vermelho) proteínas mitocondriais.

4.3) Avaliação fosfoproteômica utilizando células Ba/F3 WT ou T315I tratadas com NT157 e imatinibe

A utilização dos TKIs para tratamento de leucemias, ou os inibidores das vias de insulina, como o NT157, desencadeiam importantes cascatas de sinalização onde a fosforilação é de grande importância. Assim, com a finalidade de aprofundar os estudos proteômicos dos modelos descritos anteriormente, realizamos uma análise fosfoproteômica quantitativa utilizando as mesmas amostras e estratégia de marcação isobárica utilizada para os perfis proteômicos globais.

Um grande investimento foi feito no sentido de padronizar os experimentos para a análise fosfoproteômica, visto que os fosfopeptídeos representam apenas em torno de 1-2% da massa total de um digesto proteico, trazendo grandes dificuldades de homogeneidade e especificidade nos processos de purificação. A partir de estratégias padronizadas anteriormente (FACA, V. M. *et al.*, 2020a), escalonamos os modelos com as duas linhagens celulares (WT e T315I) a fim de produzir grandes quantidades de extratos proteicos para obter maior rendimento de fosfopeptídeos necessários para as análises por espectrometria de massas, com aproximadamente 10 µg de cada condição.

Com as condições definidas, obtivemos um perfil quantitativo para as 6 condições experimentais (células WT e T315I, tratamentos com Imatinibe 1 µM e NT157 0,8 µM e respectivos controles). Identificamos e quantificamos 1.078 sítios de fosforilação com taxa de erro inferior a 1% e presentes nos dois modelos. A assinatura molecular dos sítios de fosforilação está ilustrada na **Figura 26**. A partir das intensidades de coloração, é possível observar uma clara discordância nos sítios de fosforilação para as células WT e T315I. Apesar disso poder representar apenas as dificuldades técnicas, também podem representar diferenças funcionais entre os modelos WT e T315I.

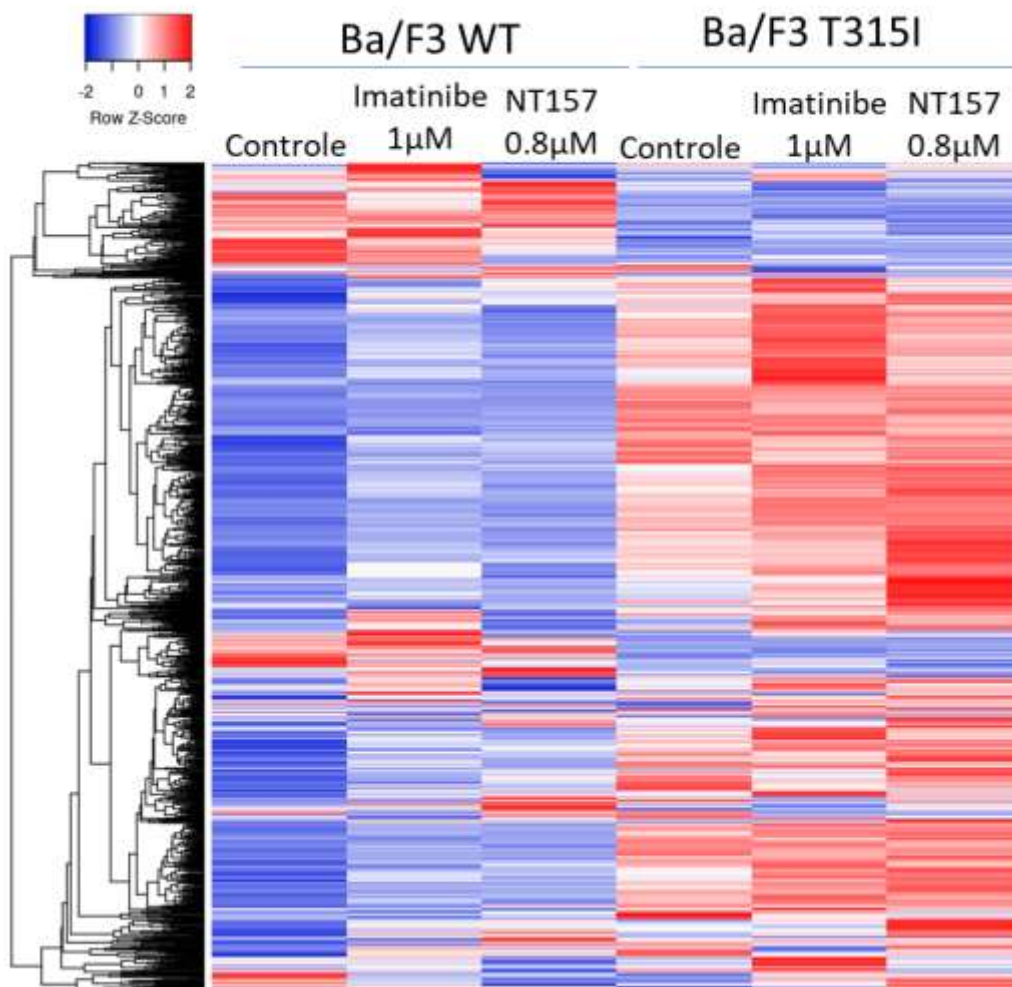


Figura 26: Avaliação da assinatura molecular dos 1.078 sítios de fosforilação encontrados na análise fosfoproteômica em células murinas WT e T315I tratadas com imatinibe 1 µM e NT157 0.8 µM. Em vermelho estão destacadas proteínas aumentadas, e em azul, diminuídas. A escala das cores está representada no topo do gráfico.

Dentre esses sítios, foi identificado o fosfopeptídeo da proteína Abl2 com fosforilação na posição Ser-632 altamente ativada na presença de imatinibe em ambos os modelos (**Figura 27**). Não há descrição para células murinas da função deste sítio, e por homologia, em humanos, esta fosforilação, apesar de detectada em outros estudos, não tem função específica descrita, visto que a mesma se encontra em um domínio desordenado. Nas proximidades desta região, encontram-se sítios de fosforilação da quinase PAK2 (p21-activated kinase 2), relacionada à ligação de Abl2 aos domínios do tipo SH3 em alguns de seus alvos (JUNG *et al.*, 2008).

```

sp|Q4JIM5|ABL2_MOUSE  SLASSAPAGFIRSTQASSGSPALPRKQRDKSPSSLLEDAKETCFTRDRKGGFFSSFMKK 660
sp|P42684|ABL2_HUMAN  NSASS-LAPGFIRGAQASSGSPALPRKQRDKSPSSLLEDAKETCFTRDRKGGFFSSFMKK 659
      ***      ***** . *****
      .          :

```

Figura 27: Fosfopeptídeo Abl2-Ser632, ativado pelo tratamento de Imatinibe. A figura mostra o alinhamento das sequências da quinase Abl2 murina e ABL2 humana. No estudo fosfoproteômico foi identificado o fosfopeptídeo destacado em amarelo, com o sítio de maior probabilidade destacado em vermelho. Apesar desse sítio ter sido identificado em estudos anteriores, não há descrição de sua participação específica na atividade Abl2.

Como realizado anteriormente, avaliamos a correlação dos resultados em diferentes condições. A correlação dos eventos de fosforilação ativados por imatinibe entre os dois modelos celulares (WT x mutado T315I) mostra uma grande quantidade de pontos no quadrante 2 (Q2), sugerindo um efeito similar desse inibidor em ambos os modelos (**Figura 28-A**). Similarmente, o mesmo foi observado para o inibidor NT157 (**Figura 28-B**).

Olhando mais especificamente para os efeitos do NT157 coordenadamente aumentado entre os dois modelos celulares WT e T315I, observamos um total de 21 sítios de fosforilação em 18 proteínas (**Figura 28-C**). Dente essas, destaca-se inicialmente a proteína Bclaf1 (Bcl-2-associated transcription factor 1), homóloga a mesma proteína humana e que quando superexpressa induz apoptose mas que quando reduzida sua expressão, resulta na desregulação de várias vias de sinalização do câncer e proliferação celular anormal (MWAPAGHA *et al.*, 2021). Destaca-se também que não há descrição da função do sítio de fosforilação identificado para a Bclaf1.

Considerando um dos pontos principais deste estudo, que foca nos alvos do NT157, especialmente em células que possuem a mutação T315I, buscamos

especificamente por sítios de fosforilação regulados no modelo celular mutado. Ao todo, 90 sítios em 72 proteínas foram destacados (**Figura 28-D**). As 72 proteínas com tais sítios regulados participam de vários processos celulares importantes, como destacado na rede de interações do STRING-DB (**Figura 29**).

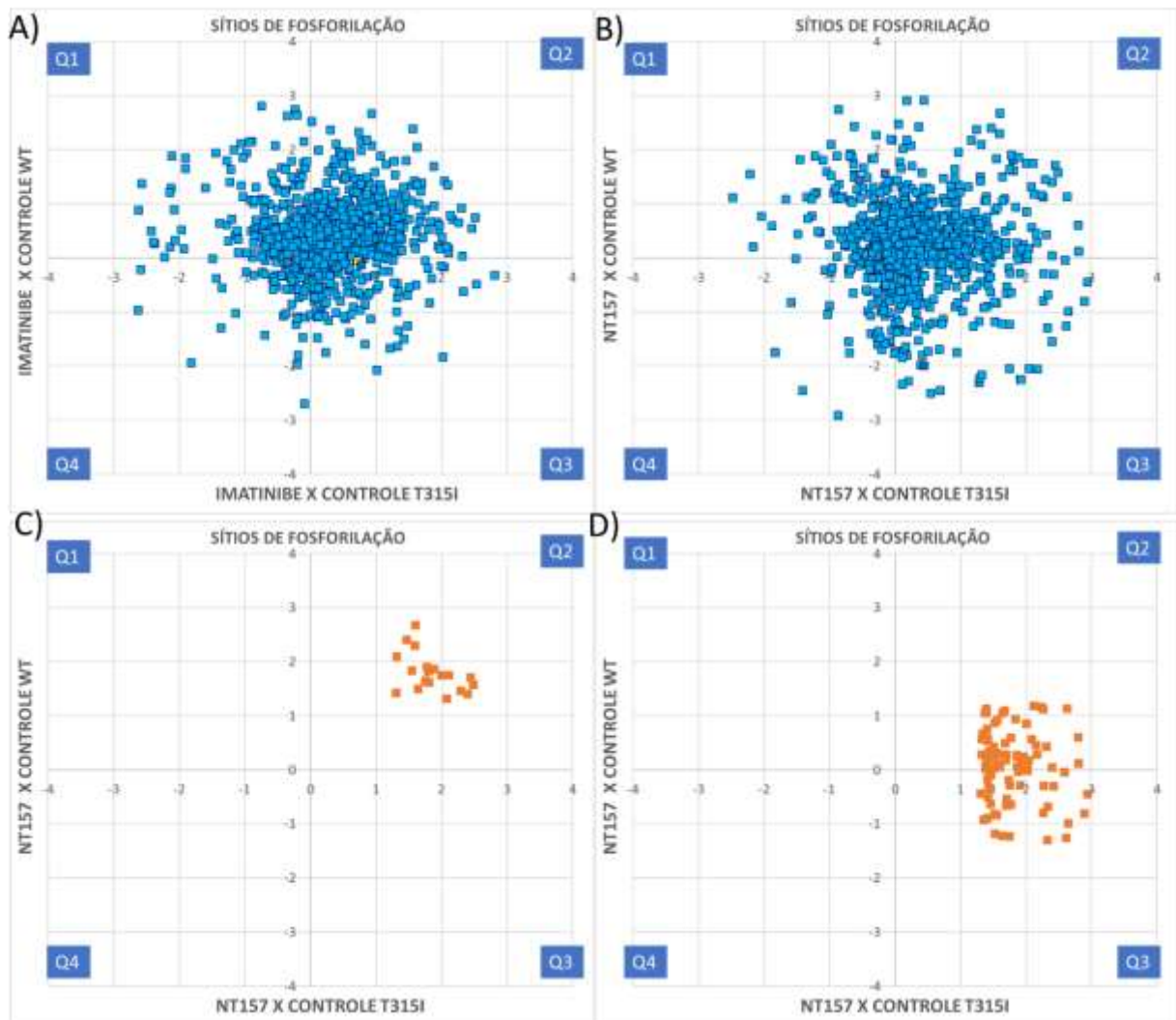


Figura 28: Comparação das alterações fosfoproteômicas induzidas por NT157 e imatinibe em células WT e T315I. A) Gráfico de correlação utilizado para análise das alterações dos sítios de fosforilação decorrentes do tratamento com imatinibe em células T315I e WT. B) Gráfico de correlação utilizado para análise dos sítios de fosforilação decorrentes do tratamento NT157 em células T315I e WT. C) Gráfico de correlação utilizado para análise para análise dos sítios de fosforilação decorrentes do tratamento com NT157, demonstrando correlação positiva de sítios de fosforilação entre T315I e WT. D) Gráfico de correlação utilizado para análise dos sítios de fosforilação decorrentes do tratamento com NT157 somente em células T315I.

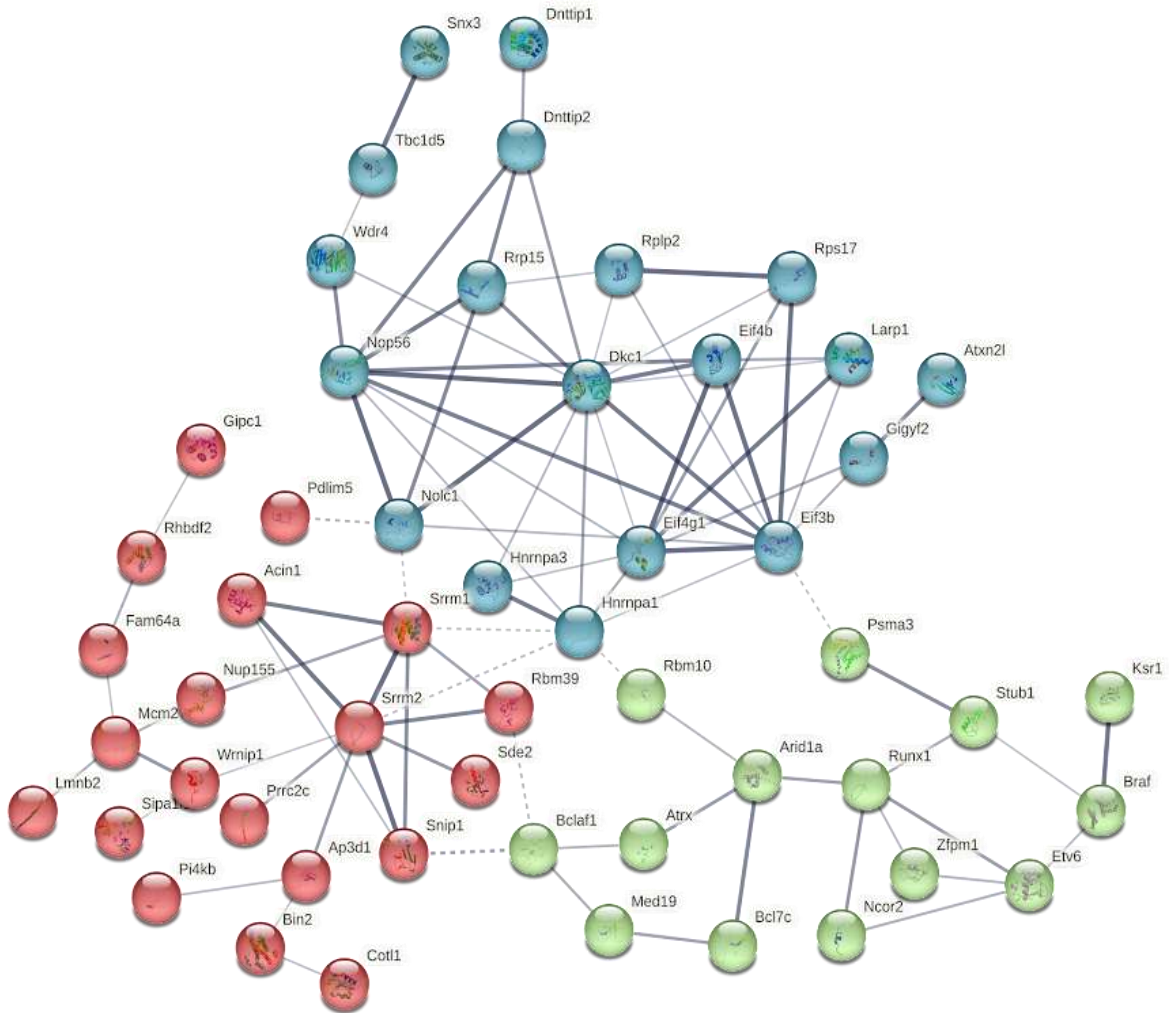


Figura 29: Análise de interações para as 72 proteínas NT157 dependentes em células T315I. Foi utilizado o STRING-DB para avaliar o conjunto de proteínas. As sub-redes geradas foram agrupadas por *k-mean*, considerando confiança de 0,9. As diferentes proteínas correspondem, respectivamente, às seguintes sub-redes funcionalmente relacionadas: (verde) regulação da transcrição pela RNA polimerase II; sendo que algumas são relevantes para a leucemia promielocítica aguda (LIQUORI *et al.*, 2020); (azul) expressão gênica, iniciação da tradução; (vermelha) destacam-se proteínas nucleares ou ligadas a membranas, algumas envolvidas em splicing de RNA.

Para algumas dessas proteínas, múltiplos peptídeos foram detectados, indicando um possível aumento generalizado do processo de fosforilação ou uma regulação da proteína. As proteínas Srrm1 (6 fosfopeptídeos), Srrm2 (4), Bcl7c (3) e Bin2 (3) foram as mais observadas. Chama a atenção a proteína Bcl7c (BAF Chromatin Remodeling Complex Subunit BCL7C), descrito como envolvido em leucemias e câncer de ovário, mas com função específica desconhecida (HUANG, C. *et al.*, 2021). Já Srrm1

(serine/arginine repetitive matrix protein 1) e Srrm2 participam de complexos de *splicing* mas não são descritos em leucemia.

Um nodo destacado nessa rede é a proteína Dkc1, proteína estrutural envolvida no complexo da telomerase e na sua atividade, e diretamente correlacionada em leucemias e falha da medula óssea (PERDIGONES *et al.*, 2016). Pacientes com LMC em crise blástica apresentam maior expressão de Dkc1 quando comparado a fase crônica (DEREGOWSKA *et al.*, 2018). Também é importante destacar outro sítio fosforilado da proteína Bclaf1 foi detectado como dependente de NT157 nas células mutadas.

Até aqui, foram destacadas proteínas de relevância biológica e potencialmente associadas a resistência nas análises proteômicas e fosfoproteômicas dos modelos celulares. Estas proteínas serão comparadas e integradas com proteínas identificadas em amostras primárias na **seção 4.5**.

4.4) Investigação das alterações funcionais promovidas pelo tratamento com NT157 em células primárias de pacientes com LMC

4.4.1) Avaliação da viabilidade celular e apoptose

Com o objetivo de realizar análises proteômicas também para células primárias de paciente e investigar as principais alterações em um modelo complexo e que represente diretamente o curso natural da LMC, iniciamos a coleta de sangue periférico ou medula óssea de pacientes que deram entrada no HC-FMRP-USP. Estas amostras foram coletadas de pacientes ao diagnóstico que assinavam o TCLE exclusivo para análises proteômicas.

Após separação de células mononucleares, todas as amostras foram submetidas a ensaios de viabilidade e apoptose, anteriormente a análise proteômica. Dada a característica complexa de amostras de pacientes com LMC, principalmente em crise blástica, algumas apresentaram baixa viabilidade e não conseguimos dar seguimento aos estudos. Nas **Figuras 30 e 31** estão demonstrados ensaios de apoptose e viabilidade de dois pacientes, um resistente ao imatinibe e portador da mutação T315I (#1) e outro somente BCR-ABL⁺ (#2).

O ensaio de apoptose foi realizado nas concentrações de 0,8, 1,6, 3,2 e 6,4 μM durante 48 horas. Observa-se que o aumento da apoptose ocorreu de forma dose-dependente para o tratamento com NT157 em paciente com a mutação T315I, visto que maiores dosagens (6,4 μM) aumentou a porcentagem de células anexinas V positivas de maneira significativa. Os resultados foram comprovados pela diminuição da viabilidade também de forma dose-dependente (**Figura 30-E/F**).

O mesmo resultado não foi observado no paciente #2, sem mutação que confere resistência aos TKIs. Porém, o baixo número de células viáveis no controle para o ensaio de citometria de fluxo prejudicou a análise (**Figura 31**). Portanto, somente as células do paciente #1 foram utilizadas para análise proteômica global por espectrometria de massas, a fim de mapear as alterações entre células controle e o tratamento com NT157 6,4 μM .

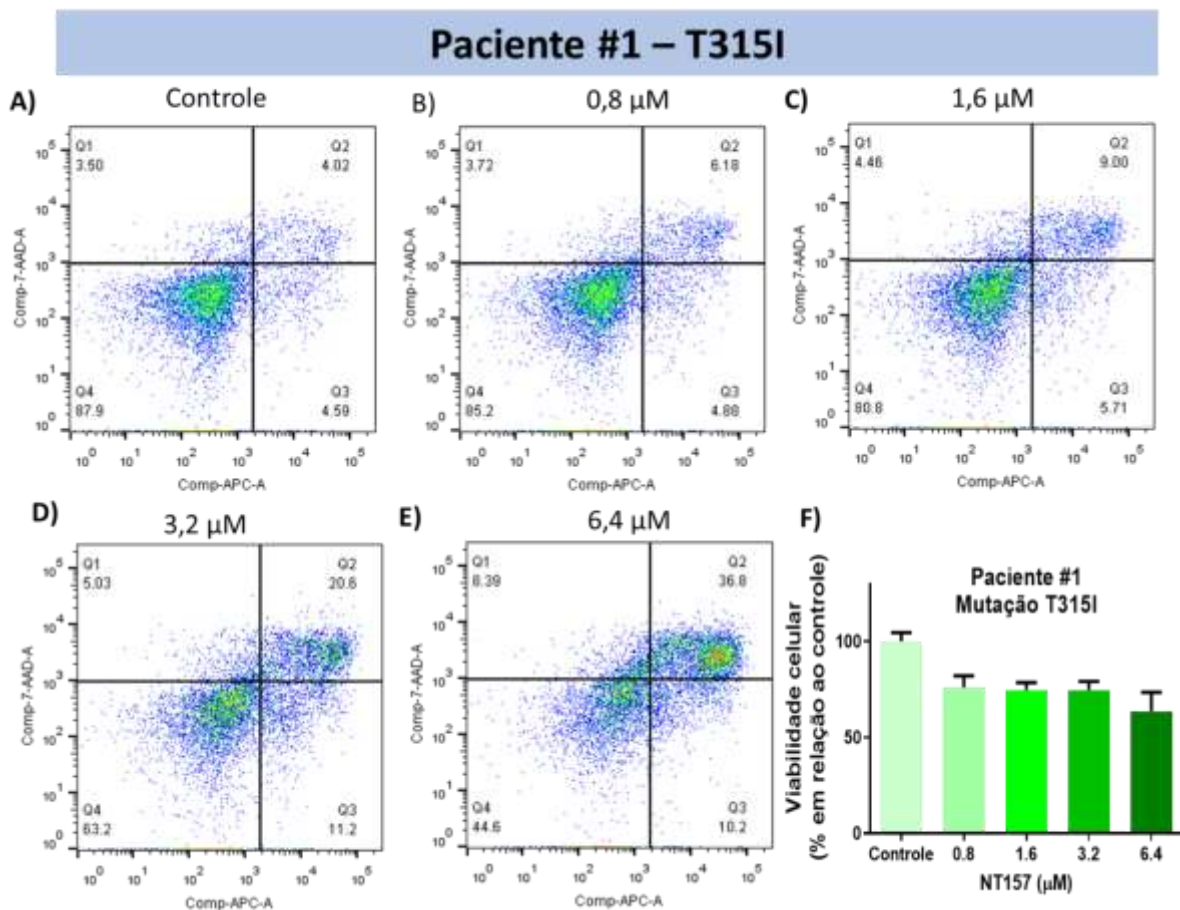


Figura 30: Análise de apoptose e viabilidade em células mononucleares derivadas de paciente com mutação T315I. A-E) Apoptose foi determinada por citometria de fluxo de marcação com anexina V e iodeto de propídio após 48 horas de tratamento, nas concentrações

de 0,8, 1,6, 3,2 e 6,4 μM . F) Análise da viabilidade celular pelo ensaio de MTT. O inibidor NT157 foi utilizado nas concentrações indicadas por 48 horas.

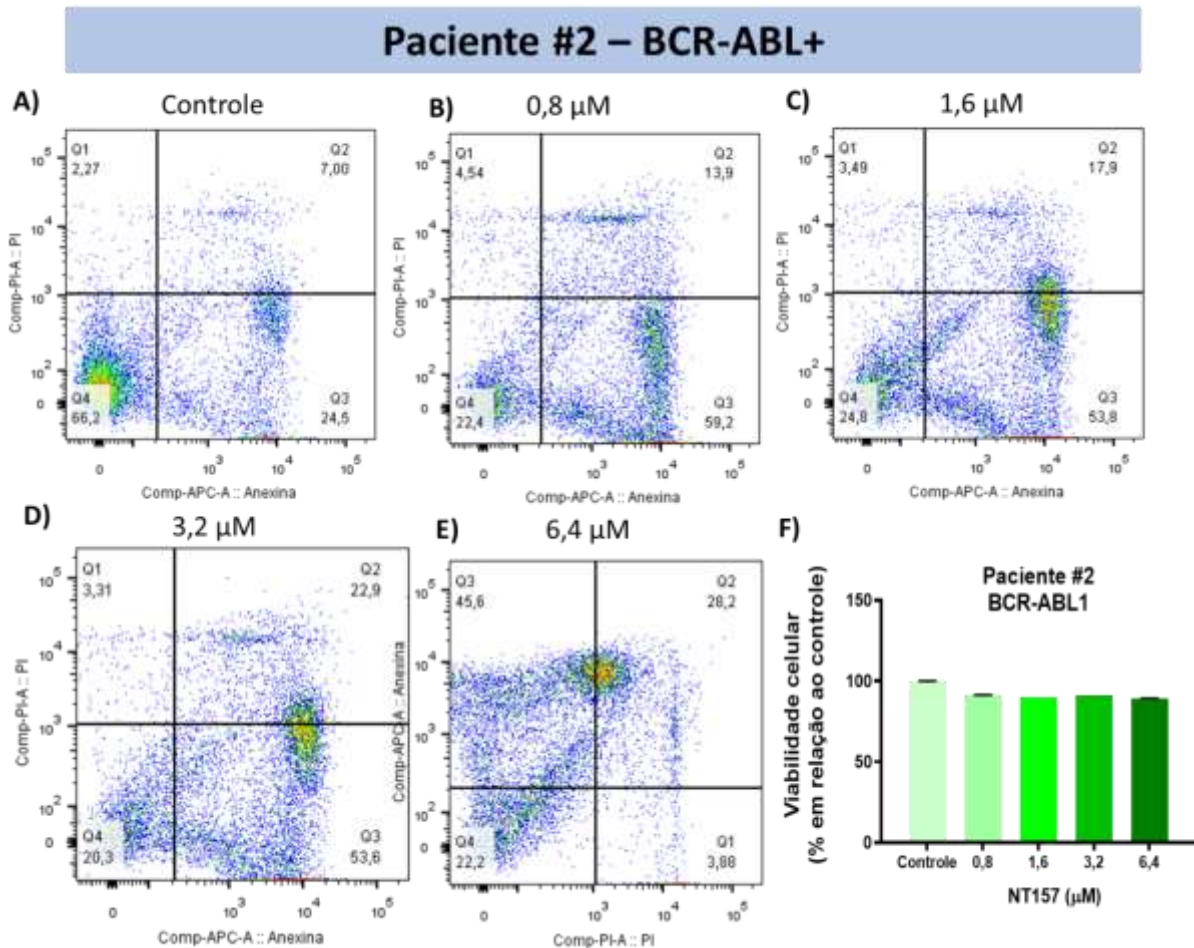


Figura 31: Análise de apoptose e viabilidade em células mononucleares derivadas de paciente com LMC. A-E) Apoptose foi determinada por citometria de fluxo de marcação com anexina V e iodeto de propídio após 48 horas de tratamento, nas concentrações de 0,8, 1,6, 3,2 e 6,4 μM . F) Análise da viabilidade celular pelo ensaio de MTT. O inibidor NT157 foi utilizado nas concentrações indicadas por 48 horas.

4.4.2) Observações proteômicas gerais decorrentes do tratamento de NT157 em células primárias de pacientes com mutação T315I

Considerando o paciente com mutação T315I um valioso e complexo modelo de estudo, utilizamos células mononucleares derivadas de medula óssea (PBMCs) advindas do paciente #1 (**Figura 30**) para mapear as alterações proteômicas globais decorrentes do tratamento com NT157 6,4 μM durante 48 horas. A escolha da dose e

do tempo baseou-se na complexidade da amostra e na necessidade de avaliação da citotoxicidade do NT157. Portanto, este dado expande e complementa de forma extremamente significativa os dados obtidos através das linhagens celulares.

Devido a quantidade limitada de amostra, a digestão iniciou-se a partir de 100 µg de extrato proteico do controle e NT157 6,4 µM. Para isso, a metodologia empregada foi baseada em fracionamento por SDS-PAGE, a título de aumentar a cobertura de identificação de proteínas pela análise de larga escala, através de LC-MS/MS. O fracionamento do gel de eletroforese foi essencial para simplificar a amostra e assim auxiliar na identificação de proteínas de baixa abundância presentes no proteoma estudado. Ao todo, foram identificadas 5.016 proteínas. Destas, 3.635 estavam presentes em todas as amostras, possibilitando a análise por quantificação relativa pela estratégia de LFQ. Apenas proteínas identificadas com pelo menos dois peptídeos únicos e taxa de falsa descoberta (FDR) < 1% foram consideradas.

Para estas proteínas, em uma primeira análise, foi realizada a razão NT157/controle representada na forma de logaritmo na base 2. A **Figura 32** apresenta as 60 proteínas selecionadas e mais reguladas em decorrência do tratamento com NT157. Destas, 30 proteínas estão aumentadas e 30 diminuídas. A rede PPI enriquecida por *k-mean* destas proteínas está ilustrada na **Figura 33**. A estas proteínas identificadas na rede, adicionamos a proteína de fusão BCR-ABL, para compreender sobre sua correlação com outras descritas em nosso dado. As proteínas estão biologicamente conectadas em três grandes grupos: metabolismo celular, metabolização do RNA e envolvimento em leucemia e transporte vesicular.

Interessantemente, ABL1 aparece no nodo central da rede PPI regulando diversas proteínas, como IGF1R, SNW1 (SNW domain-containing protein 1), PPM1G, FIP1L1 (Pre-mRNA 3'-end-processing factor) e CD70 (CD70 antigen). Vale ressaltar que a proteína IGF1R, alvo do fármaco NT157, aparece regulado no nodo central da rede PPI e superexpresso em nosso estudo proteômico de células primárias de paciente com mutação T315I, demonstrando mais uma vez ser essencial na patogênese da LMC.

A SNW1 é uma proteína conhecida por ser componente do spliceossomo que remove sequências de íntrons antes que os mRNA maduros sejam exportados do

núcleo, com alta expressão em diversos cânceres (HÖFLMAYER *et al.*, 2019; LELIJ *et al.*, 2014). Também chamamos atenção ao nodo PPM1G, também interligado a ABL e outras proteínas. Esta é uma serina/treonina fosfatase que atua na via de PI3K/AKT, regulando crescimento e proliferação celular (NARLA; SANGODKAR; RYDER, 2018).

A proteína FIP1L1 é conhecida por formar um gene de fusão com PDGFR α (fator de crescimento derivado de plaquetas), através de uma deleção no cromossomo 4q12. A fusão de FIP1L1-PDGFR α torna uma quinase constitutivamente ativada que transforma células hematopoiéticas e é inibida por imatinibe. Evidências sugerem que a recaída ao tratamento de alguns pacientes se correlaciona com o aparecimento de uma mutação TG64I no PDGFR α , conferindo resistência ao imatinibe. Esta mutação é homóloga a T315I em LMC (COOLS *et al.*, 2003; LEGRAND *et al.*, 2013; LIERMAN *et al.*, 2006).

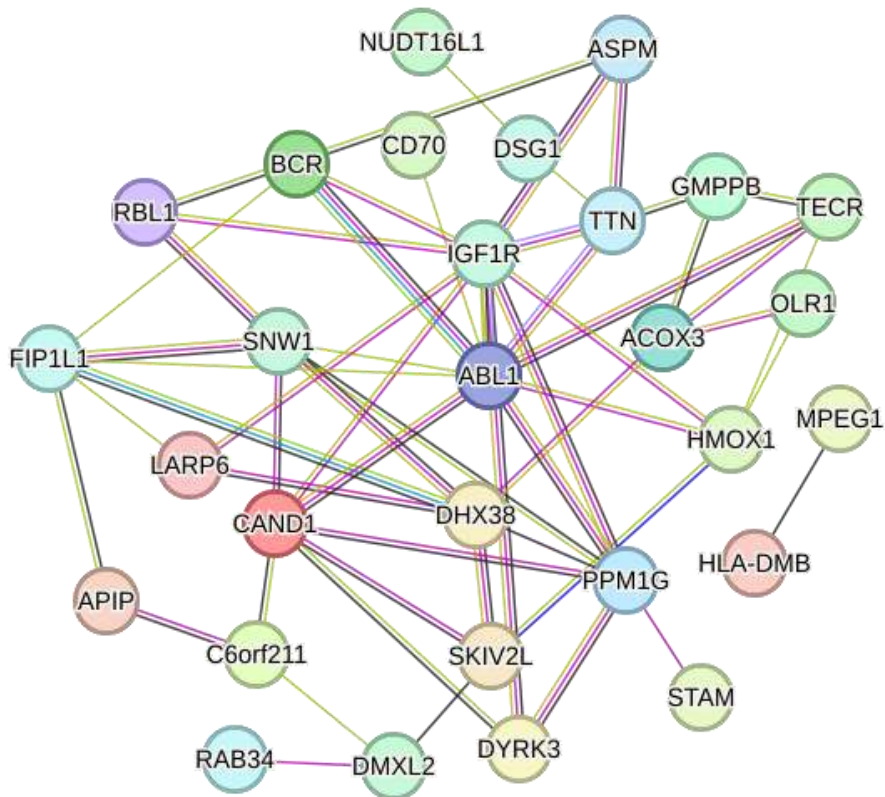


Figura 32: Análise de interações para as 60 proteínas reguladas com NT157 em células primárias de pacientes. Foi utilizado o STRING-DB para avaliar o conjunto de proteínas. Rede composta pelas 30 proteínas up e down reguladas com o tratamento com NT157, que estabeleceram interrelação com pelo menos uma proteína vizinha.

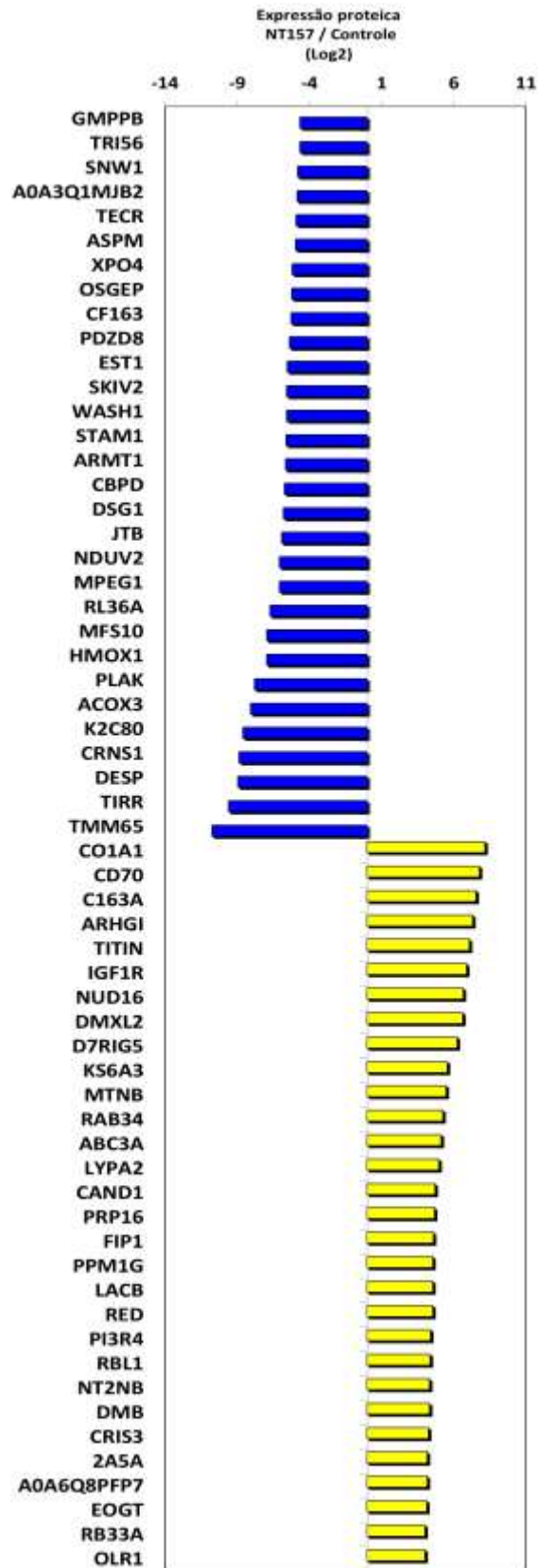


Figura 33: Expressão proteica das 60 proteínas mais reguladas em amostra de paciente com LMC tratadas com NT157. No gráfico de barras está demonstrada expressão proteica

com em escala logarítmica na base 2. Em amarelo estão representadas proteínas aumentadas, e em azul, diminuídas com o tratamento.

4.4.3) Avaliação de proteínas de superfície em amostras primárias tratadas com NT157

As proteínas de superfície são moléculas chaves em diversos processos, como proliferação, sobrevivência e resistência celular. Cientes de que sua desregulação pode gerar alterações complexas no câncer, e estimulados pela alta expressão da proteína CD70, decidimos aprofundar nossas análises olhando especificamente para estas proteínas. Com base nisso, a análise proteômica de células primárias identificou 24 proteínas de superfície (CDs) entre controle e tratamento com o fármaco NT157, que estão representadas na **Figura 34**.

De fato, das 24 CDs identificadas, apenas 7 estavam moduladas. Dentre elas, demos destaque a proteína CD70, ligante de CD27, que apresentou maior expressão no tratamento com NT157 em células primárias, com aumento de >200 vezes (7.76 em log₂). Alta expressão de CD70 tem sido correlacionada com baixo prognóstico em LMA, câncer renal, pulmonar e recentemente descrita em processos de resistência na LMC (SCHÜRCH *et al.*, 2012). CD123, com expressão reduzida no tratamento já foi descrita como superexpressa em células CD34⁺CD38⁻ de LMC, em comparação com células normais. Neste estudo, também apresentou maior expressão em pacientes com LMC em fase crônica quando comparados à pacientes em crise blástica (NIEVERGALL *et al.*, 2014; TESTA; PELOSI; FRANKEL, 2014).

As proteínas de adesão foram igualmente agrupadas na rede do STRING-DB juntamente com BCR-ABL. Observamos uma complexa rede de interações partindo das proteínas BCR e ABL. As proteínas CD44, CD33 e CD5, também identificadas, foram previamente descritas como envolvidas na manutenção das células leucêmicas e resistência celular, e estão destacadas em vermelho na **Figura 34-B**. A proteína CD44, em específico, está diretamente envolvida na LMC e tem sido descrita como um potencial alvo terapêutico (SHI; LIU, 2021).

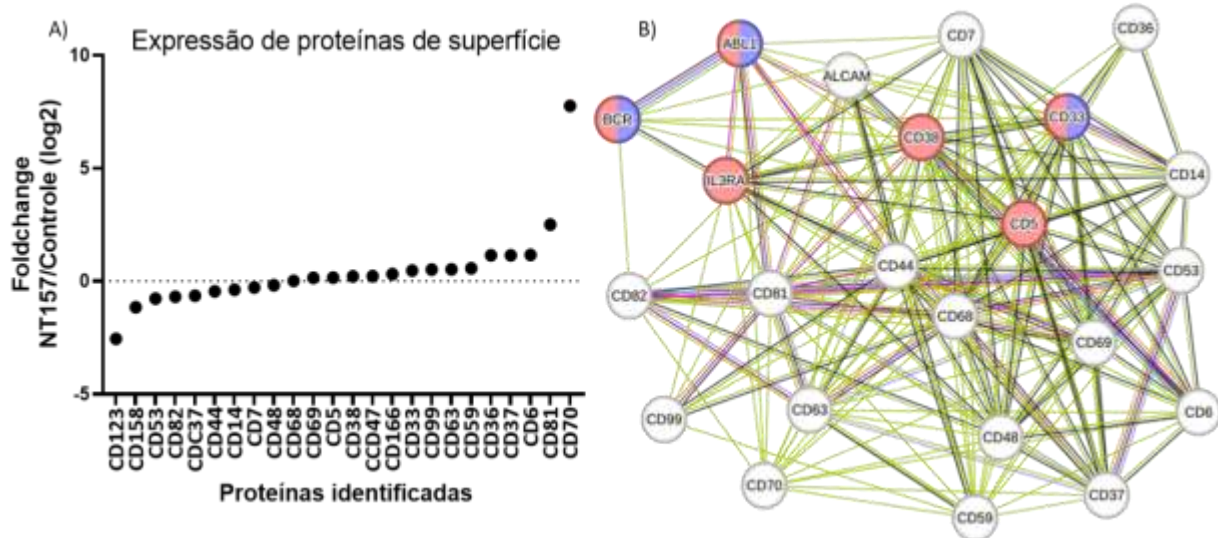


Figura 34: Expressão de proteínas de adesão em células primárias. Gráfico de expressão das 24 proteínas encontradas em amostra de paciente com LMC tratadas com NT157. Destaque se dá as duas proteínas mais reguladas CD70 e CD123, com alterações de 7.76 e -2.54, respectivamente. B) Rede de interação obtida pelo banco de dados STRING-DB contendo as 24 proteínas de adesão encontradas na análise proteômica de células primárias. As quatro proteínas em vermelho já foram descritas em leucemias, e CD33 (azul), está envolvida na LMC.

4.5) Integração de dados proteômicos de linhagens celulares e amostras de paciente

Considerando níveis mais altos de análises de dados, realizamos a integração e correlação dos dados obtidos entre a análise proteômica e fosfoproteômica das linhagens celulares e também da amostra primária leucêmica, com o objetivo de propor e desvendar novas assinaturas moleculares relacionadas à resistência. Ao considerar uma análise abrangente de lista de identificação entre as linhagens celulares murinas Ba/F3 (3.093) e células primárias do paciente #1 (5.016), identificamos 858 proteínas sobrepostas, ilustradas no diagrama de Venn (**Figura 35**).

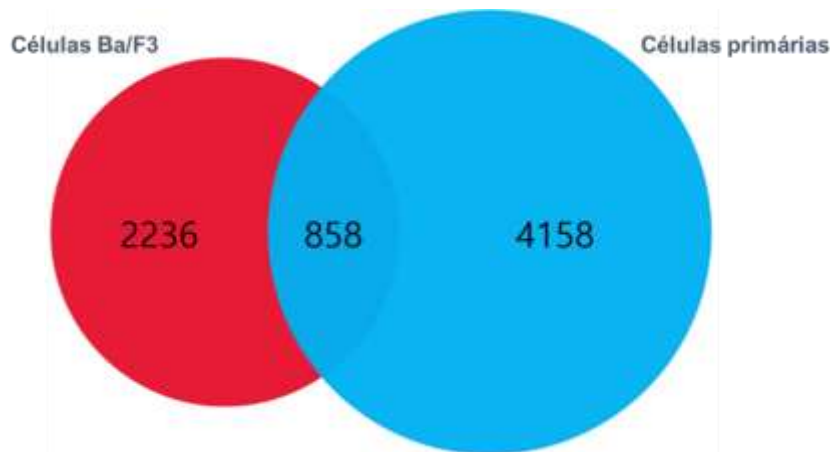


Figura 35: Diagrama de Venn das proteínas reguladas entre células Ba/F3 e amostras primárias de pacientes. Em vermelho estão proteínas identificadas nas células Ba/F3 WT e T315I, e em azul, nas células primárias de paciente, com sobreposição de 858 proteínas.

As 858 proteínas sobrepostas foram agrupadas em três redes de interações com base em similaridade (**Figuras 36, 37 e 38**). Damos destaque a proteínas no nodo central da rede PPI, que incluem CRKL, GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2), RHOA (Transforming protein RHOA), CDC42 (Cell Division Cycle 42) e PAK1 (Serine/threonine-protein kinase PAK 1) (**Figura 36**). A quantificação através do z-score para estas proteínas nos diferentes estudos proteômicos está descrita na **Tabela 3**.

A proteína CRKL aparece de forma consistente em nossos dados, com expressão reduzida em células primárias tratadas com NT157 e em células WT. A proteína GRB2, com expressão diminuída em ambos os modelos celulares, já foi descrita como envolvida na sinalização de LMC através da formação de um complexo BCR-ABL/IRS1/GRB2/PI3K (TRAINA *et al.*, 2003). De forma contrária, em células primárias T315I, GRB2 apresenta com expressão aumentada no tratamento com NT157. Estas diferenças encontradas podem ser explicadas pela complexidade e heterogeneidade celular em amostras primárias de pacientes com LMC.

O tratamento com NT157 diminuiu de forma significativa a expressão de RHOA no modelo celular T315I, e aumentou em células primárias de paciente. Estas proteínas tem sido estudadas durante a LMC e sua inibição apresentou efeitos antineoplásicos em células resistentes ao imatinibe (MOLLI *et al.*, 2012). CDC42, envolvida na regulação do ciclo celular, não foi muito descrita em leucemia, mas está associada com o estímulo da fosforilação em resíduos de tirosina de proteínas da família STAT, incluindo STAT3,

STAT5A e STAT5B. Estas, por sua vez, estão ativadas em células de leucemia e diversos tipos de cânceres (LOH *et al.*, 2019).

Em concordância com as análises fosfoproteômicas supracitadas, a proteína PAK1 foi identificada na proteômica global. Em células WT, sua expressão aparece aumentada apenas com o tratamento com imatinibe, e em células T315I, sua expressão foi diminuída em ambos os tratamentos, porém de forma mais acentuada no tratamento com NT157.

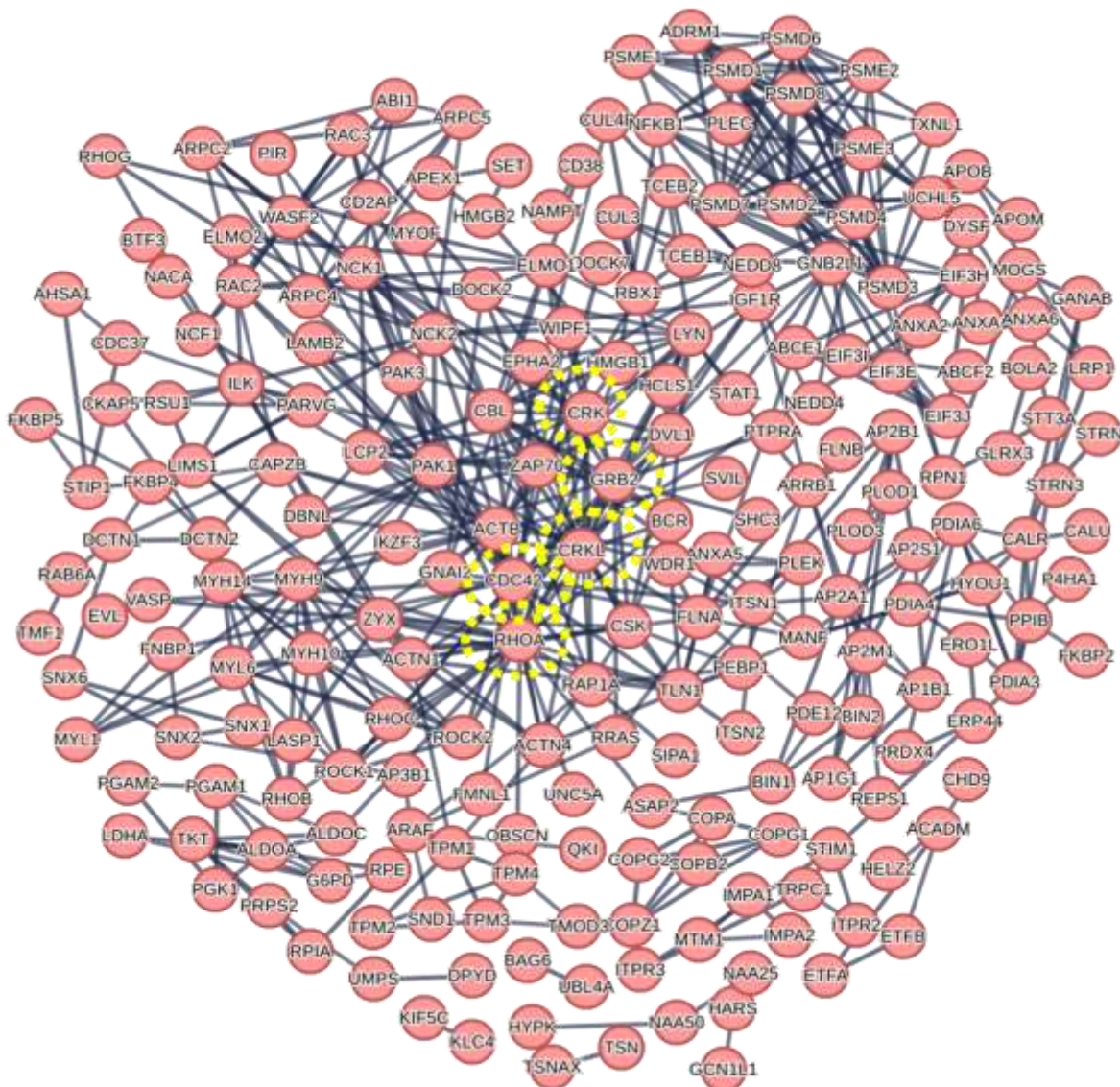


Figura 36: Análise de interações para as 858 proteínas sobrepostas gerou subrede de proteínas envolvidas principalmente no metabolismo celular. Foi utilizado o STRING-DB

para avaliar o conjunto de proteínas. As sub-redes geradas foram agrupadas por *k-mean*, considerando confiança de 0,9.

Como pode ser observado, a proteína UBB vem ganhando destaque em nossos dados, com alteração nos valores de *z-score* nos tratamentos com NT157 e T315I. Adicionalmente, chama atenção a expressão de UBB em células controle WT (1,6) e controle T315I (-1.59), sugerindo diferença no padrão de ubiquitinação em células resistentes ao tratamento. De fato, é de conhecimento consolidado na literatura que estas alterações do UPS ocorrem na sinalização celular no câncer. Isto vem sendo explorado pelo desenvolvimento de terapias direcionadas para este sistema levando a elaboração do fármaco bortezomibe, um inibidor do proteassoma de primeira geração que é atualmente utilizado para tratamento de mieloma recidivo (PARK *et al.*, 2018). Devido a diferença de expressão de UBB, este pode ser um mecanismo de relevância para compreensão bioquímica e molecular da LMC.

As proteínas HDAC1, HDAC2 e SUMO1 também aparecem consistentemente em nossos dados proteômicos. Vale salientar também a proteína CDK1 como nodo central, já que está envolvida na proliferação e ciclo celular (**Figura 37**).

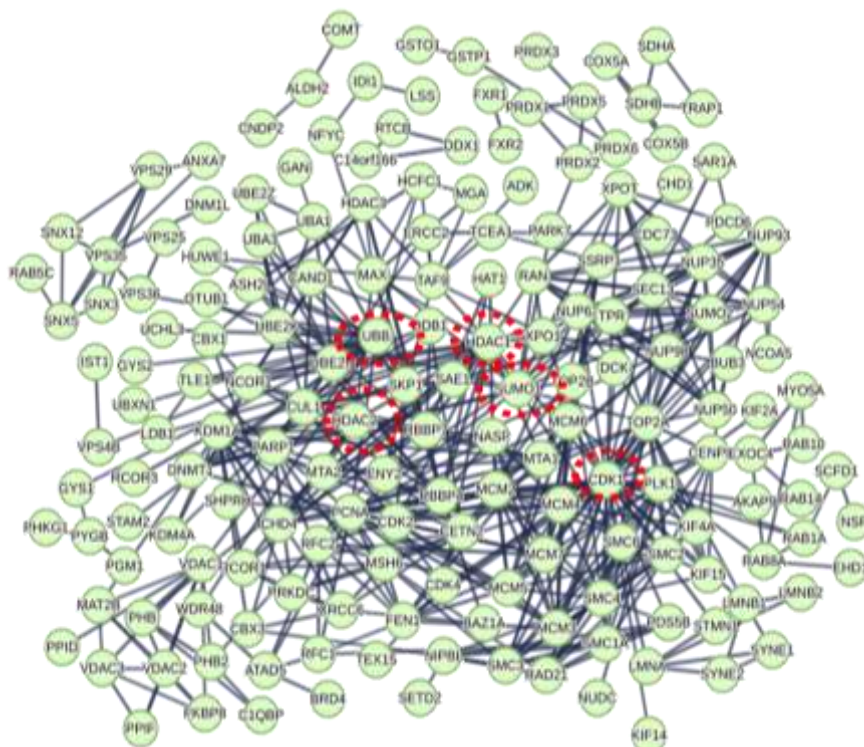


Figura 37: Análise de interações para as 858 proteínas sobrepostas gerou subrede de proteínas principalmente envolvidas no UPS e em resposta a transdução de sinal por danos no DNA. Foi utilizado o STRING-DB para avaliar o conjunto de proteínas. As sub-redes geradas foram agrupadas por *k-mean*, considerando confiança de 0,9.

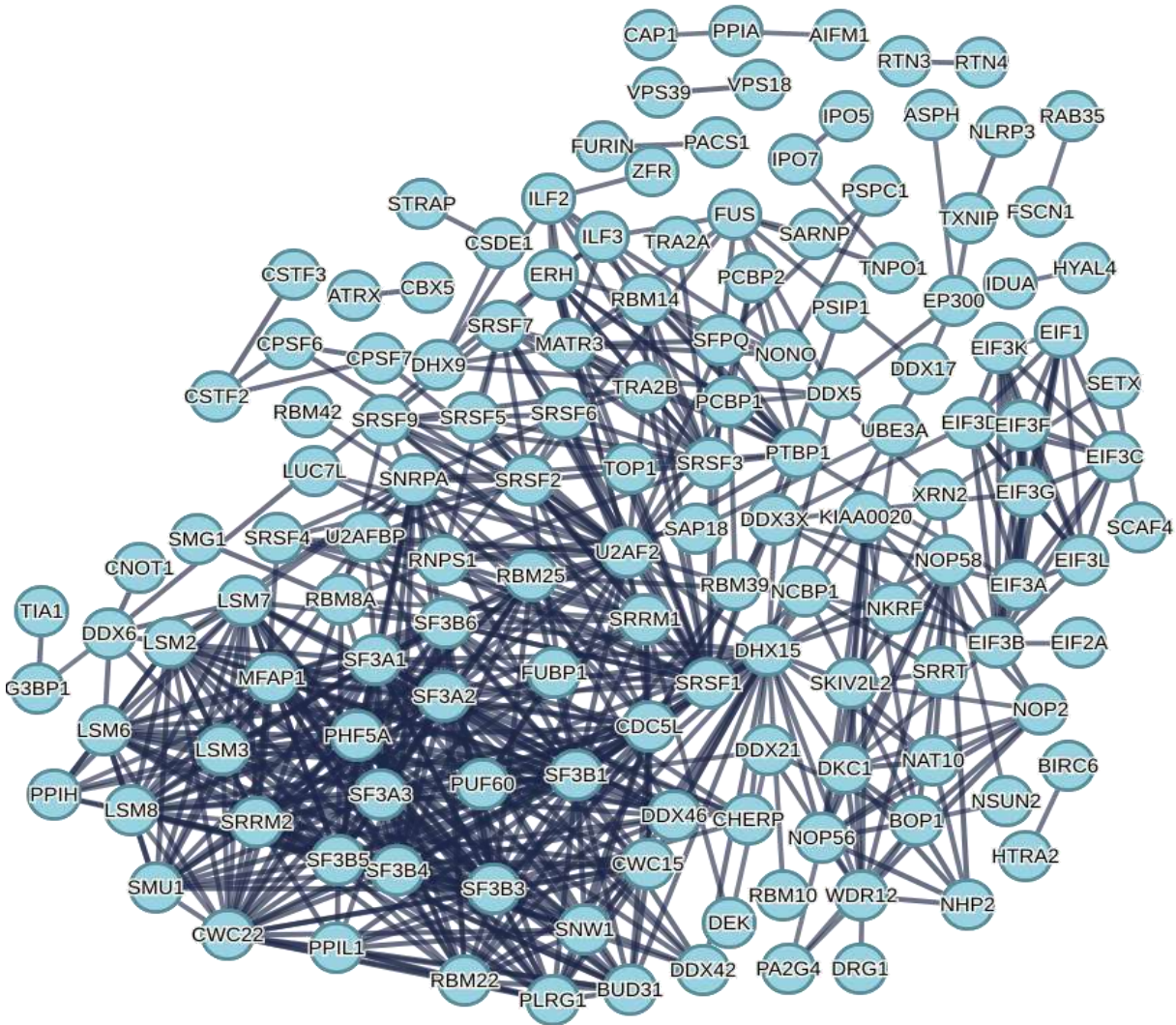


Figura 38: Análise de interações para as proteínas sobrepostas gerou subrede de proteínas principalmente envolvidas na regulação do processamento do RNA. Foi utilizado o STRING-DB para avaliar o conjunto de proteínas. As sub-redes geradas foram agrupadas por *k-mean*, considerando confiança de 0,9.

Motivados pela busca de novos alvos de assinatura molecular referente às células WT, T315 e também amostras primárias, observamos se as principais proteínas descritas anteriormente, eram correlacionadas nas análises proteômicas e de fosfoproteômica. De acordo com os dados descritos anteriormente, demos destaque a

43 proteínas que estão ilustradas na **Tabela 3**. No entanto, não é possível observar uma correlação clara entre as proteínas selecionadas nas diferentes análises. Apenas as proteínas SRRM1 e SRRM2 (serine/arginine repetitive matrix protein) aparecem em todos os estudos, e aumentadas de forma concordante em células Ba/F3 T315I e amostra primária de paciente tratados com NT157. Existem poucos estudos envolvendo SRRM1 e 2 no câncer, porém, sabe-se que esta proteína está ligada ao prognóstico desfavorável de câncer de fígado e que parece regulada por EIF4A2 em células de leucemia (LIU *et al.*, 2022).

Tabela 3: Proteínas selecionadas para comparação dos estudos proteômicos e fosfoproteômicos em cultura de células WT e T315I e amostra primária. Valores de z-score maior que 2 estão destacados de vermelho, e menor que -2, em verde.

Proteína	Glob WT CT	Glob WT IM	Glob WT NT	Glob T315I CT	Glob T315I IM	Glob T315I NT	Fosfo WT CT	Fosfo WTIM	Fosfo WT NT	Fosfo T315I CT	Fosfo T315I IM	Fosfo T315I NT	Pacient CT	Pacient NT
HIST2H2AC	-4.789	1.051	-3.16	-2.1	-1.7	4.5	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
CRKL	-4.1	-3.2	-2.2	2.6	1.5	2.2	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0.515535	-0.51554
LCK	0.418	0.292	-0.913	-0.412	1.086	-0.239	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
MAPK1	-0.904	-0.909	-2.184	0.584	1.915	1.067	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-0.85604	0.856038
HDAC1	0.498	0.368	-0.386	-0.446	0.236	0.204	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0.103417	-0.10342
MAP4K4	-1.271	1.449	-0.579	0.497	0.289	-0.952	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
NCK1	0.772	-0.739	0.566	0.988	-0.521	-0.892	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-0.74483	0.744828
NCK2	-3.849	-5.022	-2.303	1.421	2.379	1.597	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0.701226	-0.70123
TTK	0.000	0.000	0.000	1.154	1.525	3.191	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
mTOR	-0.343	0.970	-1.252	-0.216	0.710	0.159	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
PIK3K2	-0.667	0.840	1.432	-0.367	-1.581	-0.303	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
PIK3CG	1.935	-0.052	0.173	-1.305	-0.327	-0.521	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
EIF4E	-0.916	0.441	0.453	0.562	-0.339	0.121	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
MYH9	2.188	2.858	0.057	-4.178	-2.656	-4.101	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0.675938	0.856429
MYH10	2.069	2.648	-0.445	-3.615	-1.855	-3.761	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
MYH6	0.580	0.080	-0.276	-0.528	0.844	-0.280	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
MMD2	-3.725	-4.437	-4.151	3.502	-4.320	2.821	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
RICTOR	1.167	0.154	0.759	-1.053	-1.243	0.304	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
VIM	-1.124	-0.991	0.184	1.188	-0.335	1.353	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-0.80096	0.80096
MYLK	-2.636	-2.135	-1.537	1.851	0.252	2.198	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
BCLAF1	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-1.21704	-0.24033	-0.09467	-0.43187	0.160774	1.823131	N/D	N/D
NUP93	-1.181	1.037	0.053	0.426	0.778	-0.177	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-0.52754	0.527537
NUP214	-1.541	-0.035	-0.829	1.293	0.875	-0.613	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
NUP98	-0.136	1.520	0.595	1.048	-0.086	0.816	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
ROCK1	0.000	0.000	2.973	3.162	0.096	3.204	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
RHOC	0.517	0.141	0.266	-0.746	0.909	-0.961	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-0.73688	0.736883
SRRM1	0.446	0.270	0.545	0.066	-0.539	-0.249	-1.29782	0.093315	-0.13107	-0.85994	0.833092	1.362432	-0.08369	0.083691
SRRM2	0.194	-0.650	0.810	0.216	-0.284	0.419	-1.31157	-0.76472	-0.17025	0.00037	0.855334	1.390831	-0.46793	0.467935
BCL7C	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-1.27413	-0.39468	-0.59604	0.294513	0.337983	1.632357	N/D	N/D
BIN2	0.459	0.901	1.572	-1.157	-1.385	-1.611	-0.8912	-0.64111	-0.81794	0.328101	0.313389	1.708759	N/D	N/D
CBL7C	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
PKC1	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
FIPIL1	-1.178	-0.998	0.579	0.752	0.216	1.017	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-0.5883	0.294149
CD70	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-1.15427	0.604319
CD123	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0.833708	-0.83371
GRB2	-0.240	0.151	0.725	-0.273	-0.194	0.339	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-0.8521	0.852099
RHOA	-0.224	1.003	0.462	-0.566	0.655	-1.326	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-0.85803	0.858031
CDC42	-0.775	0.876	-0.465	-0.391	1.464	-1.036	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-1.26552	0.670088
PAK1	-0.349	1.159	-0.024	-0.227	0.015	-0.535	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0.106219	-0.10622
UBB	1.608	0.159	-1.165	-1.599	0.963	0.154	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0.2452	0.245199
SUMO1	-0.240	0.151	0.725	-0.273	-0.194	0.339	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-1.10399	0.551993
HDAC1	0.498	0.368	-0.386	-0.446	0.236	0.204	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0.633477	-0.05583
HDAC2	0.120	1.067	-1.401	-0.174	0.905	-0.566	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0.348705	0.538663

A proteína BIN2 (bridging integrator 2), descrita por promover a motilidade e migração celular foi identificada em células Ba/F3 na análise proteômica e fosfoproteômica. Interessantemente, em células T315I tratadas com NT157, BIN2 aparece significativamente reduzida, e na mesma amostra, apresenta um sítio ativo de fosforilação. Não existem relatos na literatura sobre BIN2, porém sua expressão parece correlacionada com bom prognóstico em câncer cervical e endometrial (UHLEN *et al.*, 2017).

Por fim, as proteínas MAPK1, HDAC1, NCK1, NCK2, MYH9, VIM, NUP93 e RHOC foram identificadas nas análises proteômicas em células Ba/F3 e amostra primária e representam um valioso modelo de estudo. Vale ressaltar que níveis de expressão reduzidas de HDAC1 tem sido correlacionado com maior sobrevida e bom prognóstico em leucemia mieloide (HUANG, Y. *et al.*, 2014). Acreditamos que mesmo com a ausência de correlação direta do tratamento em ambos os modelos celulares, estas são proteínas que podem desempenhar papel central no desenvolvimento da LMC e precisam ser melhores investigadas quanto ao seu potencial oncogênico.

DISCUSSÃO

5. Discussão

O desenvolvimento da LMC é causado pela transformação maligna de células-tronco hematopoiética, caracterizada pela formação do gene de fusão BCR-ABL, codificando uma tirosina quinase constitutivamente ativa. É um processo que compreende diversas etapas e vias de ativação complexas impulsionados pela presença do oncogene BCR-ABL, como JAK-STAT, MAPK/ERK e PI3K/AKT/mTOR. O tratamento inicial é realizado com imatinibe, TKI que transformou positivamente a terapia da LMC e diminuiu de forma significativa a mortalidade de pacientes, devido a indução de respostas duráveis em uma alta proporção de pacientes. No entanto, independentemente da presença de potenciais mutações que possam explicar a resistência aos TKIs, a maioria dos pacientes ainda continuam a apresentar níveis detectáveis de BCR-ABL durante o tratamento (SCHOEPF *et al.*, 2021). A maior dificuldade em obter a remissão completa da doença, ou seja, desaparecimento de todos os sinais bioquímicos e moleculares, parece estar ligada a incapacidade do imatinibe de atingir as células-tronco da LMC (SEKE ETET; VECCHIO; NWABO KAMDJE, 2012).

Estudos demonstraram que uma população quiescente de células-tronco leucêmicas BCR-ABL+ são particularmente resistentes à apoptose induzida por uma ampla gama de agentes pró-apoptóticos, incluindo TKIs. Estas células persistem após o tratamento *in vivo*, mas morrem quando expostas à droga *in vitro*, indicando um papel crucial do microambiente estromal na LMC (GRAHAM *et al.*, 2002). Partindo deste princípio, e considerando que uma parcela dos pacientes não apresenta resposta ao tratamento, torna-se indispensável a busca por alvos genéticos e moleculares que ainda precisam ser desvendados. Adicionalmente, é necessário a ampliação da busca por novos alvos/biomarcadores para descoberta de terapias alternativas ou em combinação com imatinibe, que auxiliem na compreensão da sobrevivência e quimiorresistência de células afetadas.

Vários mecanismos tem sido reportados para justificar a resistência aos TKIs, dentre eles, alterações comuns na sequência de codificação de BCR-ABL, que incluem a mutação T315I, principal alvo deste estudo. Esta falha ao tratamento pode ocorrer independente de BCR-ABL, por alterações em vias chaves do processo, como

PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT e RAF/MEK/ERK. Baseado neste princípio e motivados pela busca de novos alvos que não se liguem diretamente a BCR-ABL1, o grupo de pesquisa da Profa. Fabíola Traina foi o pioneiro em demonstrar a identificação da fosforilação constitutiva de IRS1 e sua associação com a oncoproteína BCR-ABL1 em células K562 (TRAINA *et al.*, 2003).

O estudo supracitado descreveu a interação entre IRS1 com PI3K e GRB2, e demonstrou que o tratamento com imatinibe resultou na diminuição tempo e dose-dependente da fosforilação de IRS1, sugerindo a formação de um complexo BCR-ABL1/IRS1/GRB2/PI3K. A fosforilação de IRS1 via BCR-ABL1 mantém a estabilidade do complexo, e o tratamento com imatinibe resultou em diminuição significativa da associação IRS1/PI3K e IRS1/GRB2, com consequente atenuação da atividade de PI3K e da via de sinalização MAPK (TRAINA *et al.*, 2003). Os estudos utilizando a inibição de IRS1/2 avançaram demonstrando que o *knockout* de IRS1 induz a redução da expressão de AKT/mTOR e MAPK, diminuindo a proliferação celular, com parada do ciclo celular em G0/G1 em células BCR-ABL1 (MACHADO-NETO *et al.*, 2011). Portanto, o presente trabalho expande e potencializa de forma significativa o trabalho iniciado pelo grupo da Co-orientadora do projeto, trazendo nova perspectiva sobre os mecanismos e às proteínas envolvidas no processo de resistência ao imatinibe.

Savage e colaboradores (2015) também identificaram mutações em IRS2 em 13,6% (3/22) dos pacientes com LMC resistentes ao imatinibe. A expressão das duas formas variantes de IRS2 identificadas nos pacientes (S594W e H1328R) na linhagem celular Ba/F3 resultou em aquisição de capacidade de sobrevivência. A presença de IRS2 nestas mesmas células resultou na aquisição de resistência ao imatinibe, com contínua ativação de AKT apesar da inibição da atividade TKI de BCR-ABL pelo imatinibe (SAVAGE *et al.*, 2015). Em neoplasia mieloproliferativa JAK2V617F, IRS2 se associa a JAK2, e seu silenciamento inibiu a viabilidade celular e a via STAT5 e induziu a apoptose (FENERICH *et al.*, 2020)

Outro fator de crescimento importante na regulação da hematopoese já descrito na LMC é o IGF1 que atua via seu receptor (IGF1R). Estudos anteriores demonstraram que a expressão de IGF1R está constitutivamente fosforilada e correlacionada com PI3K em LMA. O tratamento com anti-IGF1R diminuiu ensaios clonogênicos de

progenitores leucêmicos e proliferação celular de células ativadas por PI3K (CHAPUIS *et al.*, 2010). A ativação de IGF1R é também um importante mecanismo de resistência a diversos TKIs, incluindo EGFR, HER2, MEK e BRAF, o que fornece uma forte razão para estudos de terapia direcionada (CAO; YEE, 2021).

Recentemente, que o inibidor farmacológico de IGF1R-IRS1/2, NT157 ganhou destaque e demonstrou efeitos anti-neoplásicos a partir da redução da viabilidade celular, indução de apoptose e inibição de vias de sinalização oncogênicas em células K562 e Ba/F3 (SCOPIM-RIBEIRO *et al.*, 2021). De maneira similar, os resultados obtidos no presente estudo em células Ba/F3 WT e T315I coincidem com os achados descritos anteriormente, uma vez que NT157 desencadeou apoptose através do aumento de caspase 3 clivada e diminuição de fatores chaves da via de sinalização de BCR-ABL, como IRS1 e C-ABL de forma dose e tempo dependente. Adicionalmente, também houve diminuição na viabilidade celular a partir de 2 horas de tratamento.

Baseado nestes achados e estimulados pela tentativa de desvendar novas vias de sinalização envolvidas na fisiopatologia da LMC, empregamos estratégias proteômicas para identificação de proteínas chaves que possam atuar no processo de resistência celular. Os avanços na LMC foram crescentes desde a descoberta dos TKIs, porém, ainda há espaço para avaliar mecanismos de resistência e também a função molecular de inibidores IGF1R/IRS1-IRS2, principalmente para os cenários de resistência onde as terapias atuais se tornam ineficientes em grande parte dos pacientes.

Após uma etapa de identificação da melhor dosagem de NT157 bem caracterizada, iniciamos a padronização das estratégias fosfoproteômicas e proteômicas, a fim de avaliar as alterações do fosfoproteoma/proteoma resultantes de 6 variáveis diferentes: células WT (controle, NT157 0,8 μ M, imatinibe 1 μ M) e T315I (controle, NT157 0,8 μ M e imatinibe 1 μ M). A opção pela estratégia de marcação isobárica por TMT-6plex foi essencial para o sucesso da análise ao contemplar todas as condições experimentais em uma única análise. Vale destacar aqui, que o modelo celular murino consiste em uma excelente estratégia de representação das alterações proteicas humanas (PITTERI *et al.*, 2008). Porém, anteriormente à análise de dados, foi

necessário realizar a ortologia gênica de mouse para humano através do MGI data base (mouse genome informatics).

Estudos anteriores eram baseados na compreensão de sistemas biológicos focados na compreensão de um gene, proteína ou um pequeno grupo por vez. Entretanto, atualmente com o advento das estratégias de análise em larga escala como a proteômica, observou-se a capacidade de geração de listas imensas de proteínas, que passaram responder diversas perguntas biológicas em uma única análise (TEIBO *et al.*, 2022). Assim, surgiram novos desafios focados principalmente na análise e integração de dados, que são minimizados pelas atuais ferramentas de bioinformática. Portanto, utilizando análises compatíveis com grande número de proteínas e variáveis, a avaliação dos seis conjuntos amostrais no modelo celular revelou uma gama de proteínas reguladas, com 3.093 identificadas em todas as condições. Estas proteínas tem sido correlacionadas com diversos processos biológicos inerentes à transformação neoplásica, como, por exemplo: sinais de transdução, ubiquitinação, ciclo celular, reparo de DNA, *splicing*, apoptose, fosforilação de proteínas, diferenciação e divisão celular.

É de extrema importância destacar aqui a observação recorrente do sistema ubiquitina proteassoma (UPS) durante nossas análises. Esta PTM vem ganhando destaque por regular o endereçamento e degradação de sinais proteicos. Durante este processo, proteínas alvo são marcadas pós-traducionalmente por meio de proteínas ubiquitinas (UBB), que participam do controle fino das rotas metabólicas nas quais estão envolvidas. Atualmente, a ubiquitinação vai muito além em termos de processos celulares, e pode sofrer mutações em proteínas alvos que desencadeiam ainda mais processos neoplásicos. Isso pode ocorrer através de internalização e degradação de receptores tirosina quinases, da alteração da localização e degradação de sinais intermediários, da promoção da regulação de genes de transcrição, reparo de danos no DNA, apoptose e progressão do ciclo celular (DI COSTANZO *et al.*, 2020).

Em nosso dado proteômico, encontramos várias enzimas de conjugação de ubiquitina reguladas em ambos os tratamentos, destacando UBE2L3, UBE2I, UBE2D3, UBE2N, UBE2K, UBE2G1, UBE2N, UE2D3 e UBE2Z. Um estudo recente demonstrou a presença de UBE2A em 10 amostras de paciente com crise blástica. Análises maiores em uma coorte de 24 pacientes com crise blástica, 40 pacientes com LMA e 38 com

LMC atípica demonstraram que mutações em UBE2A são adquiridas especificamente durante a progressão para fase crônica, com frequência de 16.7% em pacientes com fase avançada (MAGISTRONI *et al.*, 2019). O processo inverso da ubiquitinação, chamado de desubiquitinação, também está associado em diversos tipos de cânceres, alterando o controle do crescimento e sobrevivência celular (SILVESTRINI *et al.*, 2020). Neste sentido também encontramos diferentes deubiquitinases reguladas negativamente em ambos modelos celulares e o tratamento com NT157, incluindo USP14, USP7, USP9X, USP5, USP15, USP14, USP26, USP39, USP54, USP13, USP26 e USP36. Portanto, estas proteínas podem ser consideradas novos alvos responsáveis pela regulação dos mecanismos celulares relevantes na LMC.

Outra modificação pós-traducional, a fosforilação de proteínas, também merece destaque especial neste projeto. Conforme descrito neste documento, essa PTM é realizada por proteínas quinases, que constituem cerca de 2% do genoma humano. As quinases desempenham papéis cruciais na sinalização intracelular, controlando o comportamento, proliferação, diferenciação e metabolismo. Muitas destas enzimas são também alvos terapêuticos no câncer, com cerca de 50 TKI já atualmente aprovados pelo FDA (DE SEPULVEDA; PASQUET, 2021).

Conforme supracitado, nas últimas décadas o papel de BCR-ABL1 foi amplamente analisado, com participação de uma cascata de sinalização envolvendo quinases específicas. Uma das principais cascatas envolve a família de proteínas quinases ativadas por mitógenos RAS (MAPKs), como as famílias ERK1/2, MEK, JNK e p38, que levam à insensibilidade aos estímulos do fator de crescimento e regulam o comportamento proliferativo das células (BONI; SORIO, 2021). Na sua conformação ativa, a proteína quimérica BCR-ABL1 possui vários sítios de tirosina, como Y545 no ligante SH2-quinase e Y412 na alça de ativação, que são conhecidos por regular sua atividade. A proteína ligada ao receptor do fator de crescimento 2 (GRB2) reconhece ainda outro sítio Y177 no domínio BCR que promove sinergicamente a LMC, pela ativação de RAS. Foi demonstrado que células BCR-ABL+ que abrigam mutação no domínio Y177F ou SH2 exibiram menor transformação leucêmica e proliferação reduzida por inibição da via MAPK (BONI; SORIO, 2021).

De fato, as análises proteômicas realizadas em células Ba/F3 demonstraram alteração em diversas proteínas quinases conhecidas por regular BCR-ABL. Nas análises de comparação de proteínas exclusivamente reguladas em células WT pelo tratamento com NT157, foram destacadas as proteínas quinases da família de MAPK, CRKL e LCK. CRKL atua mediando vários processos de sinalização intracelulares e já foi identificada como presente e fosforilada em células K562, formando um complexo estável com BCR-ABL, quando a quinase ABL está ativa (LA ROSÉE *et al.*, 2008). Embora a proteína CRKL esteja presente em neutrófilos normais, ela não é tirosina-fosforilada, e a incapacidade de induzir tal fosforilação em neutrófilos normais sugere um papel especial dessa fosfoproteína na patogênese da LMC. Ademais, a fosforilação constitutiva de CRKL é exclusiva da LMC, indicando um alvo útil para intervenção terapêutica (NICHOLS *et al.*, 1994).

A proteína LCK (tirosina quinase da família SRC) consiste em um receptor tirosina quinase que desempenha papel na seleção e maturação de células T, bem como na transdução de sinal ligadas ao receptor de antígeno de células T. Sua expressão aparece descrita como essencial em células de leucemia linfoblástica aguda (LLA) (DE KEERSMAECKER *et al.*, 2014). Também foi demonstrado que desatinibe pode inibir a ativação de LCK para atenuar a sinalização do receptor de células T (TCR). Isso desencadeia a inibição da proteína mTORC1, induzindo a morte celular em LLA (LAUKKANEN *et al.*, 2022).

Ao gerar redes exclusivas para o tratamento de NT157 em células T315I também foram identificadas quinases com atividade específica como MAP4K4, NCK, TTK. Um estudo recente demonstrou a participação de várias proteínas da família MAPK (mitogen-activated protein kinase kinase) em LMA. A análise demonstrou baixa sobrevida global em pacientes com alta expressão de MAP4K3, MAP4K4 e MAP4K5 e baixa expressão de MAP4K1, sugerindo uma favorável perspectiva para terapia associada a LMA (BAI *et al.*, 2019). A quinase NCK aparece envolvida com CD27/CD70 em células de LMC, através do aumento da expressão de WNT/ β -catenina e interação com TRAF2, provocando um aumento da proliferação de células-tronco hematopoiéticas (SCHÜRCH *et al.*, 2012). Esta via de sinalização também é

evidenciada na análise de proteômica global de amostra primária, descrita nos próximos tópicos.

Em adição às identificações de proteínas importantes no tratamento com NT157, também buscamos identificar proteínas exclusivas do tratamento com imatinibe nos dois modelos celulares, em especial, em células T315I, não responsivas ao tratamento. Interessantemente, encontramos várias proteínas moduladas por imatinibe, que podem contribuir e favorecer a resistência celular. Aqui, destacamos novamente a participação importante de proteínas da família MAPK, como MAPK1 e também de LCK.

Baseado na questão central do problema da LMC que envolve a resistência a TKIs e a necessidade de compreender quais os efeitos dependentes de NT157 em células T315I, avaliamos as alterações proteômicas decorrentes do tratamento com NT157 e imatinibe em células WT e T315I. Dentre as proteínas encontradas, destaque se dá a MMD2 (monocyte to macrophage differentiation factor 2), ou também conhecida como PAQR10 como positivamente regulada com o tratamento com NT157 em células T315I. Esta proteína não é bem descrita em leucemias, mas apresenta papel na sinalização de RAS para o complexo de Golgi. Esta, por sua vez, desempenha papel fundamental em muitas atividades celulares, incluindo senescência, proliferação, apoptose e diferenciação celular (JIN *et al.*, 2012).

A rede PPI para proteínas dependentes de NT157 em células T315I também destacou a proteína RICTOR, envolvida na quiescência e manutenção de células-tronco leucêmicas em LMA. Estudos prévios demonstraram que a depleção de RICTOR desencadeou uma ativação reativa de mTORC1. Este processo comprometeu a quiescência de células-tronco hematopoiéticas, diminuindo a capacidade de desencadear LMA. Ao mesmo tempo, a perda da proteína RICTOR levou a uma ativação de FoxO3A, atuando como um mecanismo de feedback negativo para conter a reativação de mTORC1, de forma contraditória, protegendo as células leucêmicas de exaustão (FANG *et al.*, 2017).

Além dos estudos de alterações globais dos proteomas descritos acima, também investimos em um detalhado estudo das alterações dos padrões de fosforilação das proteínas nos modelos celulares WT e T315I. Portanto, os dados de proteômica global

foram complementados com a avaliação do fosfoproteoma, visto que PTMs como a fosforilação governam muitas das vias durante a transformação neoplásica. Todos os esforços foram realizados para identificar o maior número de fosfoproteínas nos diferentes tratamentos. Apesar de preliminar, devido ao grande volume e complexidade de todos os dados, a análise fosfoproteômica identificou 1.078 sítios de fosforilação.

Algumas proteínas identificadas em nosso estudo já foram descritas na literatura como envolvidas em processos neoplásicos, apesar da implicância da LMC ainda não ter sido completamente desvendada. A proteína Bclaf1, coordenadamente aumentada com o tratamento com NT157, exibe alta expressão em células K562 e pacientes com LMC (PONTÉN; JIRSTRÖM; UHLEN, 2008), sendo um alvo importante para estudo. Sua expressão está relacionada à indução da apoptose e fatores de repressão da transcrição. Também já foi vista como dependente de fatores epigenéticos atuando em uma via dependente de HDAC para regular a diferenciação e apoptose (LI *et al.*, 2018). Outra proteína identificada que merece atenção é Dkc1, previamente descrita como superexpressa em pacientes com crise blástica de LMC (DEREGOWSKA *et al.*, 2018). Sua inibição foi estudada em células de adenocarcinoma de pulmão que apresentou efeitos na parada da fase G1 do ciclo celular e inibição da apoptose (KAN *et al.*, 2021).

Expandimos nossas análises para células primárias de uma rara e complexa amostra de paciente com mutação T315I. Nesta etapa, nosso estudo focou em compreender as alterações citotóxicas desencadeadas por NT157 em pacientes resistentes, complementando os dados obtidos nas linhagens celulares. Devido à complexidade dos dados obtidos, inicialmente olhamos para as 60 proteínas mais reguladas positivamente e negativamente com o tratamento. Um alvo superexpresso é a proteína CD70, ligante de CD27, uma molécula coestimulatória da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNF), a qual é constitutivamente expresso em diferentes células imunes e em células-tronco hematopoiéticas leucêmicas (RIETHER *et al.*, 2015).

Em estudos prévios, a sinalização de CD27 em células-tronco leucêmicas (LSCs) foi utilizada para promover a progressão da LMC em modelo murino. Nesse modelo, os autores demonstraram que a interação CD70/CD27 ativa a via de sinalização Wnt, através de β -catenina, essencial para a manutenção das características das células-

tronco, como quiescência, autorrenovação e regulação do destino celular (SCHÜRCH *et al.*, 2012). No entanto, embora os TKIs específicos de BCR-ABL1 inibam a estabilidade da β -catenina e, portanto, a sinalização Wnt, está bem documentado que as LSCs são resistentes ao tratamento com TKI (SINGH *et al.*, 2021). Também, foi descrito que em resposta ao tratamento com TKI e à inibição da via Wnt, as (LSCs) regulam positivamente a expressão de CD70, conferindo resistência ao tratamento. Além disso, CD70 não é detectável em indivíduos saudáveis, mas é expresso em linfócitos e subconjuntos de células dendríticas durante a ativação imunológica. Portanto, células imunes ativadas que expressam CD70 podem contribuir para a progressão da LMC (RIETHER *et al.*, 2015).

Adicionalmente, a proteína CD123 apresentou diminuição da expressão de forma significativa com o tratamento com NT157 em células primárias de pacientes. Estudos tem demonstrado que esta proteína é regulada positivamente em LSCs em relação à células-tronco hematopoiéticas não neoplásicas e tem sido considerada um importante biomarcador de diagnóstico (NIEVERGALL *et al.*, 2014).

A partir dos dados obtidos anteriormente, utilizamos a integração dos resultados advindos dos modelos celulares e amostra primária leucêmica a fim de refinar a descoberta de novas proteínas chaves envolvidas durante a LMC. Observamos que apenas 858 proteínas sobrepostas entre os modelos, descritas com funções moleculares principais no metabolismo celular, UPS, transdução de sinal e processamento do RNA. Evidenciamos novamente as proteínas CRK, CRKL, UBB e RHOA desempenhando papel central na rede de interações, mas também novas proteínas chaves como GRB2, CDC42, CDK1, SUMO1 e HDAC1 e 2.

A proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento (GRB2) é uma proteína adaptadora de 25 kDa, que foi originalmente descoberta para realizar eventos celulares básicos, como crescimento celular, proliferação celular e metabolismo. No entanto, estudos anteriores evidenciaram que GRB2 está envolvida em múltiplas neoplasias malignas e atua como um intermediário entre os receptores ativados na superfície celular. Também foi descrito que GRB2 pode se ligar a BCR-ABL1 fosforilado e induzir a ativação da proteína RAS. Sua inibição reduziu a atividade de MAPK em células

hematopoiéticas BCR-ABL+, portanto, parece ter potencial na transformação hematopoiética mediada por BCR-ABL (MODI *et al.*, 2011).

A proteína CDC42 (ACK - cell division control protein 42), pertence à família RHO ativada no câncer, que se encontra no centro da rede PPI. Em uma publicação recente, sua expressão foi associada com o estímulo da fosforilação em resíduos de tirosina de proteínas da família STAT, incluindo STAT3, STAT5A e STAT5B, induzindo sua realocação nuclear e contribuindo para manutenção de células leucêmicas (proof CORRY, *et al.*, 2022). CDK1, também identificada nas células primárias e modelos celulares, representa uma das principais proteínas reguladoras do ciclo celular. Alta expressão de CDK1 tem sido associada com um mau prognóstico em câncer de ovário e importante alvo de inibição no câncer. Interessantemente, a expressão de CDK1 se encontra diminuída em células WT, e de forma mais acentuada com o tratamento com NT157. Quando comparada as células T315I, CDK1 apresenta maior *z-score*, em especial no tratamento com imatinibe.

As enzimas histonas deacetilases (HDACs) atuam na retirada do grupo acetil das lisinas das histonas, levando a condensação do material gênico em heretocromatina, inibindo o processo de transcrição. HDAC1 já foi descrita em vários estudos de forma controversa, podendo agir tanto como repressora como indutora de células tumorais (KIM; HONG, 2015). Um estudo publicado por nosso grupo demonstrou que a inibição de HDAC através do inibidor SAHA pode desencadear o processo de metástase em células de câncer de mama através da superexpressão do fator de transcrição SNAIL (PALMA *et al.*, 2016). Recentemente foi publicado um estudo utilizando o inibidor de HDAC panobinostat em células k562 resistentes, demonstrando indução de apoptose e efeitos antineoplásicos. De forma complementar, o *Knockout* de HDAC1 e 2 também induziu a apoptose e diminuiu a sobrevivência de células K562 indicando que a regulação de HDAC pode ser um ponto chave para inibição em LMC (CHEN *et al.*, 2019).

Por fim, identificamos se as principais proteínas descritas anteriormente correlacionavam-se nos diferentes modelos proteômicos. No entanto, essa correlação direta entre os diferentes estudos não ficou clara para a maioria das proteínas destacadas. Apenas as proteínas SRRM1 e 2 foram identificadas em todos os estudos. Estas proteínas não são bem descritas em processos neoplásicos, mas parece

relacionada ao mau prognóstico em câncer de fígado (PONTÉN; JIRSTRÖM; UHLEN, 2008). Consistentemente, as proteínas MAPK1, HDAC1, NCK1, NCK2, MYH9, VIM, NUP93 e RHOC foram identificadas nos modelos celulares e células primárias de pacientes, apesar de não apresentarem concordância direta entre os tratamentos com NT157 e imatinibe. Acreditamos que um dos motivos que envolvem diretamente esta alteração de expressão seja a diferença entre o tempo e dose dos tratamentos utilizados, bem como a complexidade das amostras primárias leucêmicas. Estudos detalhados e focados nestas proteínas por estratégias tradicionais como o Western Blotting, podem indicar a potencial concordância entre os modelos *in vitro* e as células do paciente.

Em conclusão, nossos estudos em células Ba/3 e amostra primária de LMC utilizando imatinibe e NT157 mostraram algumas alterações proteômicas importantes relacionadas à progressão neoplásica, além de ter revelado novos alvos diferencialmente expressos entre os modelos WT e T315I. Também revelamos alterações moleculares de NT157 em células onde a terapia com imatinibe se torna insuficiente. Estes novos resultados podem representar avanços significativos no entendimento da resistência aos TKIs. Nossos resultados sugerem que a inibição da sinalização referente a via de insulina abre perspectiva para possíveis terapias combinadas com TKI para pacientes resistentes, por exemplo, envolvendo inibidores do sistema UPS. Obviamente, mais estudos são necessários para validar os alvos encontrados neste projeto exploratório, mas acreditamos que o conhecimento de processos comuns entre diferentes modelos celulares pode revelar moléculas chaves que podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias para conter a resistência ao imatinibe, podendo potencialmente aumentar a sobrevida e qualidade de vida dos pacientes com LMC.

CONCLUSÃO

6. Conclusão

Neste estudo foi realizada a avaliação proteômica de diferentes modelos celulares visando identificar processos envolvidos na resistência aos inibidores TKI na LMC. Esses modelos consistiram em cultura de células Ba/F3 WT ou T315I tratados com imatinibe ou NT157 e também células primárias de paciente mutados ou não para T315I. Os dois tratamentos induziram alterações bioquímicas e de viabilidade consistentes com fármacos antineoplásicos. Além disso, foi possível identificar proteínas que são dependentes e alteradas por cada tratamento, revelando proteínas que podem ser chaves para a resistência celular. Nossos resultados sugerem que a inibição da sinalização referente a via de insulina abre perspectiva para possíveis terapias combinadas com TKI para pacientes resistentes. Em conclusão, estes resultados podem representar avanços significativos no entendimento da célula leucêmica, ao revelar proteínas alvo relacionadas à mutação T315I em LMC, que podem se tornar candidatas a novas terapias resgate e possíveis biomarcadores de processos relacionados à resistência ao TKI.

REFERÊNCIAS

7. Referências

- BAI, Zhenjie *et al.* Prognostic Value of mRNA Expression of MAP4K Family in Acute Myeloid Leukemia. **Technology in cancer research & treatment**, [s. l.], v. 18, p. 1533033819873927, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1533033819873927>
- BONI, Christian; SORIO, Claudio. Current Views on the Interplay between Tyrosine Kinases and Phosphatases in Chronic Myeloid Leukemia. **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 2311, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers13102311>
- CAO, Jingran; YEE, Douglas. Disrupting Insulin and IGF Receptor Function in Cancer. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 22, n. 2, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22020555>
- CASADO, Pedro *et al.* Phosphoproteomics data classify hematological cancer cell lines according to tumor type and sensitivity to kinase inhibitors. **Genome biology**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. R37, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-4-r37>
- CHAPUIS, Nicolas *et al.* Autocrine IGF-1/IGF-1R signaling is responsible for constitutive PI3K/Akt activation in acute myeloid leukemia: therapeutic value of neutralizing anti-IGF-1R antibody. **Haematologica**, [s. l.], v. 95, n. 3, p. 415–423, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.010785>
- CHAPUIS, Nicolas *et al.* Autocrine IGF-1/IGF-1R Signaling Is Responsible for PI3K/Akt Constitutive Activation in Acute Myeloid Leukemia. **Blood**, [s. l.], v. 112, n. 11, p. 937–937, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood.v112.11.937.937>
- CHEN, Shu-Huey *et al.* HDAC1,2 Knock-Out and HDACi Induced Cell Apoptosis in Imatinib-Resistant K562 Cells. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 20, n. 9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20092271>
- CHO, Hye-Won; JIN, Hyun-Seok; EOM, Yong-Bin. MYLK and PTGS1 Genetic Variations Associated with Osteoporosis and Benign Breast Tumors in Korean Women. **Genes**, [s. l.], v. 12, n. 3, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/genes12030378>
- CLARK, David J. *et al.* Integrated Proteogenomic Characterization of Clear Cell Renal

Cell Carcinoma. **Cell**, [s. l.], v. 179, n. 4, p. 964-983.e31, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.007>

COOLS, Jan *et al.* A Tyrosine Kinase Created by Fusion of the PDGFRA and FIP1L1 Genes as a Therapeutic Target of Imatinib in Idiopathic Hypereosinophilic Syndrome. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 348, n. 13, p. 1201–1214, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa025217>

DALEY, G Q; VAN ETEN, R A; BALTIMORE, D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 247, n. 4944, p. 824–830, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.2406902>

DE KEERSMAECKER, K. *et al.* NUP214-ABL1-mediated cell proliferation in T-cell acute lymphoblastic leukemia is dependent on the LCK kinase and various interacting proteins. **Haematologica**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 85–93, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.088674>

DE MIRANDA, Livia Bassani Lins *et al.* NT157 exerts antineoplastic activity by targeting JNK and AXL signaling in lung cancer cells. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–11, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21419-6>

DE SEPULVEDA, Paulo; PASQUET, Jean-Max. Protein Kinases in Leukemias. **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. 2747, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers13112747>

DEARTH, Robert K *et al.* Mammary tumorigenesis and metastasis caused by overexpression of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) or IRS-2. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 26, n. 24, p. 9302–9314, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MCB.00260-06>

DEARTH, Robert K *et al.* Oncogenic transformation by the signaling adaptor proteins insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 705–713, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/cc.6.6.4035>

DEREGOWSKA, Anna *et al.* The Role of Shelterin Complex and Post-Translational Non-

Enzymatic Modification in Telomere Maintenance in Chronic Myeloid Leukemia. **Blood**, [s. l.], v. 132, n. Supplement 1, p. 5426–5426, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-112879>

DI COSTANZO, Antonella *et al.* The Ubiquitin Proteasome System in Hematological Malignancies: New Insight into Its Functional Role and Therapeutic Options. **Cancers**, [s. l.], v. 12, n. 7, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers12071898>

DRUKER, B J *et al.* Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. **Nat Med**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 561–566, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8616716>

DRUKER, B J *et al.* Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 344, n. 14, p. 1031–1037, 2001a. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441401>

DRUKER, B J *et al.* Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med**, [s. l.], v. 344, n. 14, p. 1031–1037, 2001b. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441401>

ENG, Jimmy K; JAHAN, Tahmina A; HOOPMANN, Michael R. Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool. **Proteomics**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 22–24, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pmic.201200439>

FACA, Vitor Marcel *et al.* Maximized quantitative phosphoproteomics allows high confidence dissection of the DNA damage signaling network. **Scientific reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 18056, 2020a. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74939-4>

FACA, Vitor Marcel *et al.* Maximized quantitative phosphoproteomics allows high confidence dissection of the DNA damage signaling network. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 18056, 2020b. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74939-4>

FACA, V *et al.* Quantitative analysis of acrylamide labeled serum proteins by LC-MS/MS.

J Proteome Res, [s. l.], v. 5, n. 8, p. 2009–2018, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/pr060102+>

FACA, Vitor; KRASNOSELSKY, Alexei; HANASH, Samir. Innovative proteomic approaches for cancer biomarker discovery. **BioTechniques**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 279, 281–283, 285, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.2144/000112541>

FANG, Y *et al.* Rictor has a pivotal role in maintaining quiescence as well as stemness of leukemia stem cells in MLL-driven leukemia. **Leukemia**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 414–422, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/leu.2016.223>

FENERICH, Bruna Alves *et al.* NT157 has antineoplastic effects and inhibits IRS1/2 and STAT3/5 in JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasm cells. **Signal transduction and targeted therapy**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 5, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0102-5>

GIBSON, Shannon L; MA, Zhefu; SHAW, Leslie M. Divergent roles for IRS-1 and IRS-2 in breast cancer metastasis. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 631–637, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/cc.6.6.3987>

GOLDMAN, John M. Chronic myeloid leukemia: a historical perspective. **Seminars in hematology**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 302–311, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2010.07.001>

GÓMEZ-ALMAGUER, David *et al.* The treatment of CML at an environment with limited resources. **Hematology (Amsterdam, Netherlands)**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 576–582, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10245332.2016.1182695>

GORGISEN, G; GULACAR, I M; OZES, O N. The role of insulin receptor substrate (IRS) proteins in oncogenic transformation. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 1–5, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.14715/cmb/2017.63.1.1>

GRAHAM, S M *et al.* Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. **Blood**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 319–325, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756187>

HAMERSCHLAK, N *et al.* Patients' perceptions about diagnosis and treatment of chronic myeloid leukemia: a cross-sectional study among Brazilian patients. **Sao Paulo Med J**, [s. l.], v. 133, n. 6, p. 471–479, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1516-3180.2014.0001306>

HARSHA, H C; PANDEY, A. Phosphoproteomics in cancer. **Mol Oncol**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 482–495, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.09.004>

HÖFLMAYER, Doris *et al.* SNW1 is a prognostic biomarker in prostate cancer. **Diagnostic Pathology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 33, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13000-019-0810-8>

HUANG, Canhua *et al.* BCL7C suppresses ovarian cancer growth by inactivating mutant p53. **Journal of molecular cell biology**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 141–150, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjaa065>

HUANG, Y *et al.* HDAC1 and Klf4 interplay critically regulates human myeloid leukemia cell proliferation. **Cell death & disease**, [s. l.], v. 5, p. e1491, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.433>

HUTCHINSON-BUNCH, Chelsea *et al.* Assessment of TMT Labeling Efficiency in Large-Scale Quantitative Proteomics: The Critical Effect of Sample pH. **ACS Omega**, [s. l.], v. 6, n. 19, p. 12660–12666, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00776>

IBUKI, Naokazu *et al.* The tyrphostin NT157 suppresses insulin receptor substrates and augments therapeutic response of prostate cancer. **Molecular cancer therapeutics**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 2827–2839, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0842>

JABBOUR, E; KANTARJIAN, H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. **Am J Hematol**, [s. l.], v. 89, n. 5, p. 547–556, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ajh.23691>

JABBOUR, E; KANTARJIAN, H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. **Am J Hematol**, [s. l.], v. 93, n. 3, p. 442–459, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ajh.23691>

em: <https://doi.org/10.1002/ajh.25011>

JABBOUR, Elias; KANTARJIAN, Hagop. Chronic myeloid leukemia: 2022 update on diagnosis, therapy, and monitoring. **American journal of hematology**, [s. l.], v. 97, n. 9, p. 1236–1256, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ajh.26642>

JIN, Ting *et al.* PAQR10 and PAQR11 mediate Ras signaling in the Golgi apparatus. **Cell research**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 661–676, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/cr.2011.161>

JUNG, Jin-Hun *et al.* Phosphorylation of c-Abl by protein kinase Pak2 regulates differential binding of ABI2 and CRK. **Biochemistry**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 1094–1104, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi701533j>

KAN, Guangyan *et al.* Inhibition of DKC1 induces telomere-related senescence and apoptosis in lung adenocarcinoma. **Journal of Translational Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 161, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02827-0>

KANG, Zhi-Jie *et al.* The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. **Chinese Journal of Cancer**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 48, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40880-016-0108-0>

KHORASHAD, Jamshid S *et al.* BCR-ABL1 compound mutations in tyrosine kinase inhibitor-resistant CML: frequency and clonal relationships. **Blood**, [s. l.], v. 121, n. 3, p. 489–498, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-431379>

KIM, Bumki; HONG, Jiyong. An overview of naturally occurring histone deacetylase inhibitors. **Current topics in medicinal chemistry**, [s. l.], v. 14, n. 24, p. 2759–2782, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1568026615666141208105614>

LA ROSÉE, Paul *et al.* Phospho-CRKL monitoring for the assessment of BCR-ABL activity in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia or Ph+ acute lymphoblastic leukemia patients treated with nilotinib. **Haematologica**, [s. l.], v. 93, n. 5, p. 765–769, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.3324/haematol.12186>

LAEMMLI, U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

bacteriophage T4. **Nature**, [s. l.], v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>

LAUKKANEN, Saara *et al.* Therapeutic targeting of LCK tyrosine kinase and mTOR signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, [s. l.], v. 140, n. 17, p. 1891–1906, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood.2021015106>

LEE, Yong Yook *et al.* Phosphoproteomic analysis identifies activated MET-axis PI3K/AKT and MAPK/ERK in lapatinib-resistant cancer cell line. **Experimental & molecular medicine**, [s. l.], v. 45, p. e64, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/emm.2013.115>

LEGRAND, Fanny *et al.* The Spectrum of FIP1L1-PDGFR α -Associated Chronic Eosinophilic Leukemia: New Insights Based on a Survey of 44 Cases. **Medicine**, [s. l.], v. 92, n. 5, p. e1–e9, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MD.0b013e3182a71eba>

LELIJ, Petra *et al.* SNW1 enables sister chromatid cohesion by mediating the splicing of sororin and APC2 pre-mRNAs. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 33, n. 22, p. 2643–2658, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.15252/emj.201488202>

LI, Xinyao *et al.* Effect of BCLAF1 on HDAC inhibitor LMK-235-mediated apoptosis of diffuse large B cell lymphoma cells and its mechanism. **Cancer Biology & Therapy**, [s. l.], v. 19, n. 9, p. 825–834, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1472188>

LIERMAN, Els *et al.* Sorafenib is a potent inhibitor of FIP1L1-PDGFR α and the imatinib-resistant FIP1L1-PDGFR α T674I mutant. **Blood**, [s. l.], v. 108, n. 4, p. 1374–1376, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-004457>

LINDSTRÖM, H. Jonathan G.; FRIEDMAN, Ran. Rotating between ponatinib and imatinib temporarily increases the efficacy of imatinib as shown in a chronic myeloid leukaemia model. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–7, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09048-5>

LIQUORI, Alessandro *et al.* Acute Promyelocytic Leukemia: A Constellation of Molecular

Events around a Single PML-RARA Fusion Gene. **Cancers**, [s. l.], v. 12, n. 3, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers12030624>

LIU, Lina *et al.* The splicing factor RBM17 drives leukemic stem cell maintenance by evading nonsense-mediated decay of pro-leukemic factors. **Nature communications**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 3833, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31155-0>

LOH, Chin-Yap *et al.* Signal Transducer and Activator of Transcription (STATs) Proteins in Cancer and Inflammation: Functions and Therapeutic Implication. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00048>

MACHADO-NETO, João Agostinho *et al.* Knockdown of insulin receptor substrate 1 reduces proliferation and downregulates Akt/mTOR and MAPK pathways in K562 cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1813, n. 8, p. 1404–1411, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.04.002>

MAGISTRONI, Vera *et al.* De novo UBE2A mutations are recurrently acquired during chronic myeloid leukemia progression and interfere with myeloid differentiation pathways. **Haematologica**, [s. l.], v. 104, n. 9, p. 1789–1797, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.179937>

MODI, H *et al.* Inhibition of Grb2 expression demonstrates an important role in BCR-ABL-mediated MAPK activation and transformation of primary human hematopoietic cells. **Leukemia**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 305–312, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/leu.2010.257>

MOLLI, Poonam R *et al.* RhoA: A therapeutic target for chronic myeloid leukemia. **Molecular Cancer**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 16, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1476-4598-11-16>

MORADI, Foruzan *et al.* Signaling pathways involved in chronic myeloid leukemia pathogenesis: The importance of targeting Musashi2-Numb signaling to eradicate leukemia stem cells. **Iranian journal of basic medical sciences**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 581–589, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.22038/ijbms.2019.31879.7666>

MWAPAGHA, Lamech M *et al.* New insights from Whole Genome Sequencing: BCLAF1 deletion as a structural variant that predisposes cells towards cellular transformation. **Oncology reports**, [s. l.], v. 46, n. 4, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/or.2021.8180>

NAGATA, Kayoko *et al.* Augmentation of multiple protein kinase activities associated with secondary imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors as revealed by quantitative phosphoproteome analysis. **Journal of proteomics**, [s. l.], v. 115, p. 132–142, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.12.012>

NARASIMHAN, Mythreyi *et al.* Atypical activation of signaling downstream of inactivated Bcr-Abl mediates chemoresistance in chronic myeloid leukemia. **Journal of Cell Communication and Signaling**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 207–222, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12079-021-00647-x>

NARLA, Goutham; SANGODKAR, Jaya; RYDER, Christopher B. The impact of phosphatases on proliferative and survival signaling in cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 75, n. 15, p. 2695–2718, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2826-8>

NICE, Edouard C. The separation sciences, the front end to proteomics: An historical perspective. **Biomedical chromatography : BMC**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. e4995, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bmc.4995>

NICHOLS, G L *et al.* Identification of CRKL as the constitutively phosphorylated 39-kD tyrosine phosphoprotein in chronic myelogenous leukemia cells. **Blood**, [s. l.], v. 84, n. 9, p. 2912–2918, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7524758>

NICOLINI, Franck E *et al.* Epidemiologic study on survival of chronic myeloid leukemia and Ph(+) acute lymphoblastic leukemia patients with BCR-ABL T315I mutation. **Blood**, [s. l.], v. 114, n. 26, p. 5271–5278, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-219410>

NIEVERGALL, Eva *et al.* Monoclonal antibody targeting of IL-3 receptor α with CSL362 effectively depletes CML progenitor and stem cells. **Blood**, [s. l.], v. 123, n. 8, p. 1218–1228, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-475194>

O'HARE, Thomas *et al.* AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. **Cancer cell**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 401–412, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.09.028>

O'HARE, Thomas; EIDE, Christopher A.; DEININGER, Michael W. N. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. **Blood**, [s. l.], v. 110, n. 7, p. 2242–2249, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-066936>

ONG, S E; MANN, M. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). **Nat Protoc**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 2650–2660, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.427>

PALMA, Camila de Souza *et al.* Proteomic Analysis of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) Reveals Cross-talk between SNAIL and HDAC1 Proteins in Breast Cancer Cells. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 906–917, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.052910>

PARK, Ji Eun *et al.* Next-generation proteasome inhibitors for cancer therapy. **Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine**, [s. l.], v. 198, p. 1–16, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.03.002>

PERDIGONES, Nieves *et al.* Clonal hematopoiesis in patients with dyskeratosis congenita. **American journal of hematology**, [s. l.], v. 91, n. 12, p. 1227–1233, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ajh.24552>

PIETZNER, Maik *et al.* Mapping the proteo-genomic convergence of human diseases. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 374, n. 6569, p. eabj1541, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.abj1541>

PITTERI, Sharon J. *et al.* Plasma Proteome Profiling of a Mouse Model of Breast Cancer Identifies a Set of Up-Regulated Proteins in Common with Human Breast Cancer Cells. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 1481–1489, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/pr7007994>

PONTÉN, F; JIRSTRÖM, K; UHLEN, M. The Human Protein Atlas—a tool for pathology. **The Journal of Pathology**, [s. l.], v. 216, n. 4, p. 387–393, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/path.2440>

RIETHER, Carsten *et al.* Tyrosine kinase inhibitor-induced CD70 expression mediates drug resistance in leukemia stem cells by activating Wnt signaling. **Science translational medicine**, [s. l.], v. 7, n. 298, p. 298ra119, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aab1740>

RIKOVA, Klarisa *et al.* Global Survey of Phosphotyrosine Signaling Identifies Oncogenic Kinases in Lung Cancer. **Cell**, [s. l.], v. 131, n. 6, p. 1190–1203, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.025>

RODRIGUEZ, Henry *et al.* The next horizon in precision oncology: Proteogenomics to inform cancer diagnosis and treatment. **Cell**, [s. l.], v. 184, n. 7, p. 1661–1670, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.055>

ROUSSELOT, Philippe *et al.* Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. **Blood**, [s. l.], v. 109, n. 1, p. 58–60, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-011239>

SAVAGE, Samantha L *et al.* Activating Mutations of Insulin Receptor Substrate 2 (IRS2) in Patients with Tyrosine Kinase Inhibitor-Refractory Chronic Myeloid Leukemia. **Blood**, [s. l.], v. 126, n. 23, p. 2461–2461, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood.V126.23.2461.2461>

SCHOEPF, Anna M. *et al.* Tackling resistance in chronic myeloid leukemia: Novel cell death modulators with improved efficacy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 216, p. 113285, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113285>

SCHÜRCH, Christian *et al.* CD27 signaling on chronic myelogenous leukemia stem cells activates Wnt target genes and promotes disease progression. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 122, n. 2, p. 624–638, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI45977>

SCOPIM-RIBEIRO, Renata *et al.* NT157, an IGF1R-IRS1/2 inhibitor, exhibits antineoplastic effects in pre-clinical models of chronic myeloid leukemia. **Investigational new drugs**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 736–746, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10637-020-01028-8>

SEKE ETET, P.F.; VECCHIO, L.; NWABO KAMDJE, A.H. Signaling pathways in chronic myeloid leukemia and leukemic stem cell maintenance: Key role of stromal microenvironment. **Cellular Signalling**, [s. l.], v. 24, n. 9, p. 1883–1888, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.05.015>

SHI, Rui; LIU, Xinle. CD44: a potential therapeutic target in chronic myeloid leukemia. **Die Pharmazie**, [s. l.], v. 76, n. 12, p. 574–578, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1691/ph.2021.1744>

SILVEIRA, C A; DALDEGAN, M B; FERRARI, I. Response to treatment with imatinib mesylate in previously treated chronic-phase chronic myeloid leukemia patients in a hospital in Brazil. **Genet Mol Res**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 2038–2048, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4238/vol10-3gmr1073>

SILVESTRINI, Virgínia Campos *et al.* **A proteomics outlook towards the elucidation of epithelial-mesenchymal transition molecular events**. [S. l.: s. n.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c9mo00095j>

SILVESTRINI, Virgínia Campos *et al.* Proteomics analysis reveals the role of ubiquitin specific protease (USP47) in Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) induced by TGFβ2 in breast cells. **Journal of Proteomics**, [s. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103734>

SINGH, Priyanka *et al.* Combating TKI resistance in CML by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR pathway in combination with TKIs: a review. **Medical Oncology**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12032-021-01462-5>

SOVERINI, Simona *et al.* ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: a study by the GIMEMA Working Party on Chr. **Journal of clinical oncology : official journal of the American**

Society of Clinical Oncology, [s. l.], v. 23, n. 18, p. 4100–4109, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.531>

SUN, X J *et al.* Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 7418–7428, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mcb.13.12.7418-7428.1993>

SZKLARCZYK, Damian *et al.* The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 49, n. D1, p. D605–D612, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074>

TALATI, Chetasi; PINILLA-IBARZ, Javier. Resistance in chronic myeloid leukemia: definitions and novel therapeutic agents. **Current opinion in hematology**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 154–161, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000403>

TEIBO, John Oluwafemi *et al.* The Interplay Between the Transcriptomics and Proteomics Profiles. *In*: TRANSCRIPTOMICS IN HEALTH AND DISEASE. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 187–208. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-87821-4_8

TENG, Mingxing *et al.* The Dawn of Allosteric BCR-ABL1 Drugs: From a Phenotypic Screening Hit to an Approved Drug. [s. l.], 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00373>

TESTA, Ugo; PELOSI, Elvira; FRANKEL, Arthur. CD 123 is a membrane biomarker and a therapeutic target in hematologic malignancies. **Biomarker Research**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 4, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/2050-7771-2-4>

TRAINA, Fabíola *et al.* BCR-ABL binds to IRS-1 and IRS-1 phosphorylation is inhibited by imatinib in K562 cells. **FEBS letters**, [s. l.], v. 535, n. 1–3, p. 17–22, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03845-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03845-0)

UHLEN, Mathias *et al.* A pathology atlas of the human cancer transcriptome. **Science**, [s. l.], v. 357, n. 6352, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aan2507>

VYSE, Simon *et al.* Quantitative phosphoproteomic analysis of acquired cancer drug resistance to pazopanib and dasatinib. **Journal of proteomics**, [s. l.], v. 170, p. 130–140, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.08.015>

WU, Xiaomo *et al.* Integrating phosphoproteomics into kinase-targeted cancer therapies in precision medicine. **Journal of proteomics**, [s. l.], v. 191, p. 68–79, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.03.033>

XISHAN, Zhu *et al.* MicroRNA-320a acts as a tumor suppressor by targeting BCR/ABL oncogene in chronic myeloid leukemia. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 12460, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep12460>

YAKTAPOUR, Niuscha *et al.* Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) as a novel target in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, [s. l.], v. 122, n. 9, p. 1621–1633, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-484386>

YANG, Yuzhe *et al.* Insulin Receptor Substrate Suppression by the Tyrphostin NT157 Inhibits Responses to Insulin-Like Growth Factor-I and Insulin in Breast Cancer Cells. **Hormones & cancer**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 371–382, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12672-018-0343-8>

ZICK, Yehiel. Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, [s. l.], v. 2005, n. 268, p. pe4, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/stke.2682005pe4>