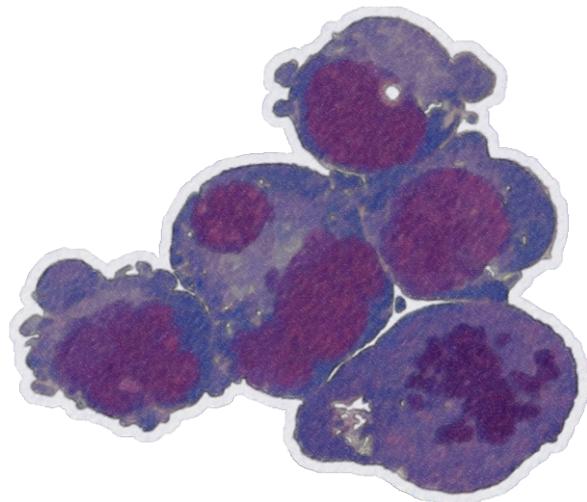




## DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Avaliação molecular dos mecanismos envolvidos na sensibilidade e resistência ao Imatinib independente do *BCR-ABL* em Leucemia Mielóide Crónica



Raquel Fernanda da Silva Alves

2011



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Avaliação molecular dos mecanismos envolvidos na sensibilidade e resistência ao Imatinib independente do *BCR-ABL* em Leucemia Mielóide Crónica

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro (Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Maria da Graça Vale (Universidade de Coimbra)

Raquel Fernanda da Silva Alves

2011

## Agradecimentos

Um trabalho de mestrado apesar de ser individual não se faz sem o apoio e a presença de inúmeras pessoas, às quais gostaria de agradecer:

À Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro pela orientação neste projecto, pelo apoio e disponibilidade, pelos conselhos e críticas no decorrer do trabalho, mas em particular pela confiança. À Professora Graça Vale pelos conselhos e disponibilidade ao longo do curso e do mestrado.

À Mestre Ana Cristina Gonçalves pela dedicação, pelo apoio e empenho, pelos ensinamentos e motivação, mas especialmente pela paciência demonstrada sempre.

Ao laboratório de Biologia Molecular Aplicada da Faculdade de Medicina da UC e a todos os seus investigadores e colaboradores, um obrigada pela ajuda.

À Professora Doutora Filomena Botelho, directora do serviço de Biofísica (FMUC), à Margarida Abrantes, ao João Casalta e aos restantes investigadores, pela disponibilidade e colaboração no desenvolvimento de parte deste projecto.

À Professora Doutora Isabel Carreira, directora do serviço de Biologia Médica (FMUC), à Eunice e aos restantes investigadores, pela ajuda e disponibilidade.

À Professora Doutora Raquel Seiça, directora do serviço de Fisiologia (FMUC), à Teresa Louro e aos restantes investigadores e alunos, um obrigada pela amizade, apoio e motivação.

Ao Professora Doutor Manuel Santos Rosa, director do serviço de Imunologia Fisiologia (FMUC) e Dra. Vera Alves, pela disponibilidade e apoio na realização deste trabalho.

À Raquel e à Cristina pela amizade, entreaajuda e companheirismo que foram vitais ao longo deste ano. Obrigada por tudo.

Aos amigos de curso e de mestrado que tornaram estes anos em Coimbra ainda com mais encanto...

Finalmente, ao meu pequeno grande mundo que está sempre presente e me apoia incondicionalmente:

Aos meus pais pelo carinho, pelo respeito e pelos ensinamentos sempre presentes.

À Jo, a melhor irmã e amiga do mundo, obrigada por tudo, pelos carinhos, pelos sermões, pela presença mas especialmente pelo exemplo de Mulher.

Ao Toni pelas brincadeiras e pelo apoio, pelo carinho... e qualquer dia eu pago a conta que não pára de crescer!!!

Ao Pi, o meu amor, por tudo e mais alguma coisa, contigo este caminho foi mais fácil!

Aos meus avós que sempre me incentivaram e apoiaram em cada pequena vitória.

À Inês, a pequena cheia de energia e diversão.

À Manuela, ao Luís, ao Rui Pedro e Ana Lúcia obrigada pelo apoio.

À Tita e a todos outros que sempre me incentivaram e apoiaram.

## Resumo

A Leucemia mieloide crónica (LMC) é uma doença clonal mieloproliferativa que se caracteriza pela presença do gene fusão *BCR-ABL*. Este gene codifica o alvo terapêutico desta patologia, a oncoproteína BCR-ABL que possui actividade tirosina cinase desregulada. O tratamento de primeira linha em LMC é um inibidor tirosina cinase, o Imatinib, que bloqueia especificamente a actividade da oncoproteína BCR-ABL. Contudo, apesar dos bons resultados obtidos com esta terapêutica são conhecidos casos de resistência, cujos mecanismos moleculares podem ser mediados por múltiplas vias. Além das mutações no gene *BCR-ABL*, a resistência ao Imatinib pode resultar de alterações nos transportadores de influxo e efluxo, condicionando assim a concentração de fármaco acumulado no interior das células. Além destes factores, a oncoproteína BCR-ABL tem a capacidade de activar múltiplas vias de sinalização celular, que são particularmente responsáveis pelo aumento da capacidade de proliferação e pela resistência à apoptose. Assim, o conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos em todo este processo possibilitará o uso de novos fármacos na LMC.

Os objectivos deste trabalho foram avaliar os mecanismos envolvidos na resistência ao Imatinib, em particular o envolvimento dos transportadores de influxo, OCT1 e OCTN2, e de efluxo, P-gP e de BCRP, e o potencial terapêutico do L-744,832 (inibidor da farnesiltransferase), do Everolimus (inibidor do mTOR) e da Reversina 205 (inibidor da P-gP) na modulação da resistência, num modelo *in vitro* de LMC.

Para tal, foi utilizada a linha celular K562, a partir da qual foram geradas duas sublinhas resistentes ao Imatinib, as células K562 RC e K562 RD. Os níveis de expressão dos transportadores membranares, nomeadamente do OCT1, do OCTN2, da P-gP e do BCRP, foram determinados por citometria de fluxo recorrendo a anticorpos marcados com sondas fluorescentes. Através de ensaios de cinética com radiofármacos foi avaliada a actividade funcional da P-gP. De forma a avaliar os efeitos dos diversos fármacos na viabilidade celular, recorreu-se ao ensaio metabólico com resazurina, após as várias

linhas celulares terem sido incubadas na ausência e na presença dos compostos. A morte celular foi avaliada por microscopia óptica (coloração de *May-Grünwald-Giemsa*), por citometria de fluxo com a dupla marcação anexina V e iodeto de propídeo e pela avaliação dos níveis de expressão de proteínas envolvidas nos processos de morte celular, como a BAX, FAS e as caspases.

Nas células resistentes observou-se diminuição dos níveis de expressão de OCT1 e OCNT2, acompanhados por aumento da expressão de P-gP e BCRP comparativamente com as células sensíveis, K562, sugerindo uma contribuição destes transportadores na resistência ao Imatinib. Além disso, e concordante com o resultado anterior, verificou-se uma diminuição na porcentagem de captação do radiofármaco em relação ao observado na linha celular sensível.

Os ensaios com o L-744,832, o Everolimus e com a Reversina 205, evidenciaram que estes compostos, em monoterapia, têm um efeito maioritariamente citotóxico quer na linha sensível quer nas resistentes, induzindo morte celular preferencialmente por apoptose. Estes resultados foram confirmados tanto pela microscopia óptica (características morfológicas de apoptose) como pelos níveis de expressão de moléculas mediadoras da apoptose. Adicionalmente, a associação entre os diversos fármacos e o Imatinib revelou um efeito sinérgico, o que sugere que estas associações além de benéficas pela redução da toxicidade dos fármacos, poderão ser úteis para ultrapassar a resistência ao Imatinib. Por outro lado, a Reversina 205 mostrou-se útil na modulação da resistência ao Imatinib, tendo-se observado re-sensibilização das células para este inibidor de tirosina cinase.

Em conclusão, os resultados sugerem o envolvimento dos transportadores de influxo e efluxo na aquisição de resistência ao Imatinib, sendo possível re-sensibilizar as células resistentes pela administração simultânea de Imatinib e Reversina 205. Adicionalmente, conclui-se que a utilização de outros inibidores da via de sinalização celular a jusante à da oncoproteína poderá vir a ser uma nova abordagem terapêutica no tratamento de LMC.

**Palavras-Chave:**

- Leucemia mielóide crónica
- Imatinib
- Transportadores de influxo e Efluxo
- Novos fármacos dirigidos a alvos moleculares
- Moduladores de glicoproteína-P



## Abstract

Chronic myeloid leukaemia (CML) is a mieloproliferative disorder characterized by the presence of the *BCR-ABL* gene fusion, which encodes an oncoprotein with a deregulated tyrosine kinase activity. This oncoprotein became the main therapeutic target of the disease. In fact, the first-line therapy is Imatinib, a specific tyrosine inhibitor that blocks BCR-ABL tyrosine kinase activity. Although, the good results with Imatinib, the development of drug resistance is a reality and can be mediated by different pathways. Besides the BCR-ABL mutations, the resistance can be mediated by the increase of drug efflux transporters expression, which contributes to the decrease of drug concentration in the leukemia cells. In addition to this problem, this oncoprotein activates multiple cell signaling pathways, particularly responsible for the enhancer in cellular proliferation and resistance to apoptosis. Therefore, the knowledge of these changes would enable the use of new drugs in CML.

The aims of this study were to evaluate the mechanisms involved in resistance to Imatinib, particularly the involvement of influx (OCT1 and OCTN2) and efflux transporters (P-gP and BCRP), and the therapeutic potential of L-744, 832 (inhibitor farnesiltransferase), Everolimus (an inhibitor of mTOR) and Reversina 205 (inhibitor of P-gp) in Imatinib resistance modulation of, using an *in vitro* model of CML

For this purpose, we used a CML cell line, the K562 cells, and generated two sub-cell lines resistant to Imatinib, the K562-RC and K562-RD cells. Drug influx and efflux transporters expression levels, namely OCT1, OCTN2, PgP and BCRP, were evaluated through flow cytometry (FC) using monoclonal antibodies labeled with fluorescent probes. The functionality of PgP was assessed using radiosensitizer ( $^{99m}\text{Tc}$  Sestamibi) kinetic studies. To evaluate the effect of new targeted drugs on cell viability, all cell lines were treated in absence and presence of different drug's concentrations and analyzed by the resazurin assay. Cell death was determined by optical microscopy (*May-Grünwald-Giemsa* staining), by FC using the annexin V and

propidium iodide double staining and by the expression levels of molecules involved in cell death.

In resistant cells were observed a decrease in OCT1 and OCTN2 expression levels and an increase in P-gP and BCRP expression compared with the sensitive cell line, which may contribute to the resistance to Imatinib. According with this, the results show a decrease in the uptake profile of the radiosensitizer, comparing with the sensitive cell line, demonstrating the P-gP functionality. On the other hand, the new drugs tested in these cell lines revealed mostly a cytotoxic effect in sensitive and resistant cells, and induces cell death by apoptosis in a time- and dose- dependent manner. These results are confirmed by optical microscopy (apoptotic morphological characteristics) and by the increase in death molecule's expression. The combination of new drugs with Imatinib showed a synergistic effect, suggesting that besides the decrease in the toxicity, this combination may be useful in circumventing Imatinib resistance. Therefore, Reversin 205 may modulate Imatinib resistance, and could re-sensitize the cells to this tyrosine kinase inhibitor.

Abstract | VIII

In conclusion, our results suggest the involvement of drug's transporters in acquisition of resistance to Imatinib, and the use of Reversin 205 might circumvent this resistance. Additionally, our results propose that inhibition of other pathways beyond BCR-ABL oncoprotein can be used as a new potential therapeutic approach in the treatment of CML.

#### **Key-words**

- Chronic myeloid leukaemia
- Imatinib
- Influx and efflux transporters
- New drugs specific to molecular targets
- P-Glycoprotein modulators

## Índice

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract	VII
Índice de Figuras	XII
Índice de Tabelas	XIV
Lista de Abreviaturas	XV
<b>Capítulo 1.Introdução</b>	<b>1</b>
1.1. O Cancro	3
1.2. Sistema Hematopoiético	5
1.3. Neoplasias Hematológicas - Leucemias	7
1.3.1. Leucemia Mielóide Crónica	8
1.3.1.1. Características Clínicas	8
1.3.1.2. Epidemiologia	10
1.3.1.3. Caracterização molecular – O Cromossoma Filadélfia ( <i>Ph</i> )	11
1.3.1.4. Tratamento da LMC	16
1.3.1.4.1.Terapêutica de primeira linha da LMC - O Imatinib	17
1.3.1.4.2.Novos alvos terapêuticos	18
1.4. Resistência ao Imatinib	20
1.4.1. Mecanismos Dependentes do Gene <i>BCR-ABL</i>	22
1.4.1.1.Mutações Pontuais	22
1.4.1.2.Sobre-expressão e Amplificação	24
1.4.2. Mecanismos Independentes do Gene <i>BCR-ABL</i>	25
1.4.2.1.Metabolismo do Imatinib	25
1.4.2.2.Proteínas Plasmáticas	27
1.4.2.3.Transportadores de Influxo e Efluxo	27
1.5. Objectivos	31

**Capítulo 2. Materiais e Métodos ----- 33**

2.1. Caracterização de linhas celulares sensíveis e resistentes ao Imatinib --	35
2.1.1. Descrição da cultura celular -----	35
2.1.2. Análise citogenética convencional -----	35
2.1.3. Indução de resistência -----	36
2.1.4. Avaliação do crescimento celular pelo teste de exclusão com azul de tripano-----	36
2.1.5. Análise da expressão de transportadores proteicos de influxo e efluxo por citometria de fluxo -----	37
2.1.6. Estudos de cinética com Sestamibi -----	38
2.1.6.1. Estudos de captação com <sup>99mTc</sup> -Sestamibi-----	39
2.1.6.2. Determinação da captação dos radiofármacos -----	39
2.2. Avaliação do potencial terapêutico de novos fármacos -----	40
2.2.1. Cultura celular -----	40
2.2.2. Incubação da linha celular de Leucemia mielóide crónica com fármacos anticancerígenos -----	40
2.2.3. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio metabólico com resazurina-----	40
2.2.4. Avaliação da morte celular -----	42
2.2.4.1. Avaliação da morte celular por microscopia óptica-----	42
2.2.4.2. Avaliação da morte celular por citometria de fluxo -----	42
2.2.5. Avaliação da expressão de moléculas envolvidas na morte celular por citometria de fluxo -----	44
2.2.6. Avaliação de moléculas envolvidas no mecanismo de acção dos fármacos -----	45
2.2.6.1. Avaliação intracelular da expressão de laminas-----	45
2.2.6.2. Avaliação intracelular da expressão de ciclina D1-----	46
2.2.6.3. Avaliação intracelular da expressão de glutatião reduzido -----	46
2.3. Análise Estatística-----	47

**Capítulo 3. Resultados----- 49**

3.1. Caracterização de células sensíveis e resistentes ao Imatinib -----	51
3.1.1. Caracterização da linha celular K562 sensível ao Imatinib -----	51
3.1.2. Caracterização das linhas celulares resistentes-----	53
3.1.3. Expressão de transportadores de influxo e efluxo -----	57
3.1.4. Estudos de cinética com Sestamibi -----	60
3.2. Avaliação do potencial terapêutico de novos fármacos -----	61
3.2.1. Inibidores de vias de sinalização RAS/MAPK e PI3K/mTOR -----	61
3.2.1.1. Inibidor farnesiltransferase-----	61
3.2.1.2. Inibidor da via do mTOR -----	66
3.2.1.3. Inibidor da glicoproteína-P- Reversina 205 -----	70
3.2.1.4. Papel da Reversina 205 na modulação da resistência -----	74
3.2.3. Associação de novos fármacos com Imatinib -----	76

**Capítulo 4. Discussão ----- 81**

4.1. Avaliação dos mecanismos de sensibilidade e resistência ao Imatinib em células de Leucemia mieloide crônica em cultura -----	83
4.1.1. Avaliação do papel dos transportadores de influxo e efluxo na resistência ao Imatinib -----	85
4.1.2. Avaliação do potencial terapêutico de novos fármacos -----	88
4.1.2.1. Inibidores das vias de sinalização RAS/MAPK e PI3K/mTOR ---	88
4.1.2.2. Inibidor do transportador de efluxo-----	92

**Capítulo 5. Conclusão----- 95**

**Capítulo 6. Bibliografia----- 99**

## Índice de Figuras

Figura 1. - Células estaminais normais e cancerígenas .....	4
Figura 2 - Heterogeneidade tumoral e aresposta à terapêutica.....	5
Figura 3 - Esquema representativo da Hematopoiese.....	6
Figura 4 - Hematopoiese na fase crónica e na crise blástica da LMC.....	10
Figura 5 - Formação do Cromossoma Filadélfia ( <i>Ph</i> ) .....	11
Figura 6 - Domínios Funcionais do produto do Gene <i>ABL</i> .....	12
Figura 7 - Domínios funcionais do produto do Gene <i>BCR</i> .....	13
Figura 8 - Representação dos transcritos (oncoproteínas) que derivam da fusão entre os genes <i>BCR</i> e <i>ABL</i> .....	14
Figura 9 - Vias de sinalização activadas pela oncoproteína BCR-ABL.....	15
Figura 10 - Mecanismo de acção do Imatinib .....	17
Figura 11 – Alvos terapêuticos em LMC.....	19
Figura 12 - Representação esquemática da estrutura do hOCT-1. ....	28
Figura 13 - Representação esquemática da estrutura da glicoproteína-P .....	29
Figura 14 - Curva de crescimento e aspecto morfológico das células K562 .....	51
Figura 15 - Cariograma das células K562por análise citogenética de <i>G-banding</i> .....	52
Figura 16 - Efeito do Imatinib na viabilidade das células K562. ....	52
Figura 17 - Aspecto morfológico das células K562 expostas 10 $\eta$ M de Imatinib.....	53
Figura 18 - Curva de crescimento das sublinhas de K562 resistentes ao Imatinib. ....	54
Figura 19 - Efeito do Imatinib na viabilidade das sublinhas K562 resistentes ao Imatinib. ....	55
Figura 20 - Comparação entre o efeito do Imatinib na viabilidade às 48horas nas linhas celularesde LMC.....	56
Figura 21 - Expressão membranar de transportadores de influxo e efluxo.....	57
Figura 22 - Percentagem de células que expressam transportadores de influxo e efluxo e respectivos MIF .....	59
Figura 23 - Perfil de captação do radioligando <sup>99m</sup> Tc-Sestamibinas várias linhas celulares.....	61
Figura 24 - Efeito do L-744,832 na viabilidade das células K562 e sublinhas resistentes .....	63
Figura 25 - Avaliação do efeito citotóxico de 25 $\mu$ M de L-744,832 nas células K562, K562 RC, K562 RD por citometria de fluxo .....	64
Figura 26 - Aspecto morfológico de células K562 tratadas com 50 uM de L-744,832. ....	64
Figura 27 - Expressão membranar de FAS e respectivo ligando na ausência e na presença de L-744,832 .....	65
Figura 28 - Expressão intracelular de laminas na ausência e na presença de L-744,832.....	66
Figura 29 - Efeito do Everolimus na viabilidade das células K562 e sublinhas resistentes .....	67

Figura 30 - Avaliação do efeito citotóxico de 15 $\mu$ M de Everolimus nas células K562, K562 RC, K562 RD por citometria de fluxo .....	68
Figura 31 - Aspectos morfológico das células K562 expostas a 15uM de Everolimus. ....	69
Figura 32 - Expressão intracelular de BCL2, de BAX e a razão BAX/BCL2 em células expostas a Everolimus por citometria de fluxo.....	69
Figura 33 - Expressão intracelular de ciclina D1 na ausência e na presença de Everolimus.....	70
Figura 34 - Efeito da Rversina 205 na viabilidade das linha celulares sensíveis eresistentes ao Imatinib .....	72
Figura 35 - Avaliação do efeito citotóxico induzido por 15uM de Reversina 205 por citometria de fluxo .....	73
Figura 36 – Aspecto Morfológica e Expressão intracelular de caspases na ausência e na presença de Reversina 205 .....	73
Figura 37 - Expressão intracelular de glutatião reduzido na ausência e na presença de Reversina 205.....	74
Figura 38- Efeito da Combinação de Imatinib e Reversina 205 na viabilidade celulares das linhas celulares resistentes ao Imatinib .....	75
Figura 39 - Efeito das associações entre vários fármacos na viabilidade celular das células K562, K562 RC e K562 RD.....	78
Figura 40 - Índice de combinação e isoblogramas para as várias combinações entre os fármacos Imatinib, L-744,832, Everolimus e Reversina 205 .....	79
Figura 41 - Aspecto morfológico das células tratadas com combinações de fármacos.....	80

## Índice de Tabelas

Tabela 1- Classificação geral das neoplasias hematológicas .....	7
Tabela 2- Definição do tipo de resposta à terapêutica.....	21
Tabela 3 - Mutações da oncoproteína BCR-ABL e sensibilidade ao Imatinib .....	23
Tabela 4 - Intervalos de valores do índice de combinação (CI) .....	48
Tabela 5 - Sensibilidade e Resistência ao Imatinib nas linhas celulares de LMC.....	56

## Lista de abreviaturas

ABC – *ATP-binding cassette*  
ABL – *Abelson leukemia gene*  
ACA – *acquired cytogenetic abnormalities*  
ADN – ácido desoxirribonucleico  
AGP –  *$\alpha$ 1-acid glycoprotein*  
AKT – *protein kinase B*  
ARN – ácido ribonucleico  
ATP – adenosina trifosfato  
BAX – *BCL-2 associated X protein*  
BC – crise blástica *do ingles blast crisis*  
Bcl-2 – *B-cell leukemia/lymphoma*  
BCR – *breakpoint cluster region*  
BCRP – *breast cancer resistance protein*  
CCyR – *complete cytogenetic response*  
CD – *cluster differentiation*  
CE – célula estaminal  
CEC – célula estaminal cancerígena  
CEH – célula estaminal hematopoiética  
CFU – unidades formadoras de colónias  
CHR – *complete hematological response*  
CI – *combination index*  
CLP – célula linfóide progenitora  
CMP – célula mielóide progenitora  
CP – *cronic phase*  
cpm – contagens por minutos  
CPM – célula progenitora multipotente  
Ctl – controlo  
CYP – *cytochrome P450*  
DP – desvio padrão

EVE – Everolimus  
FAS – *tumor necrosis factor receptor superfamily member 6*  
FBS – *fetal bovine serum*  
FITC – isiocianato de fluoresceína  
FSC – *foward scater channel*  
G1 – *gap 1*  
GAP – *GTPase-activating proteins*  
GEF – *guanine nucleotide exchange factors*  
GIST – *gastrointestinal stromal tumors*  
GSH – glutatião reduzido  
GTP – guanina trifosfato  
IFT – inibidores farnesiltransferase  
IMA – Imatinib  
IP – iodeto de propídeo  
JAK – *just another kinase*  
LMC – Leucemia mielóide crónica  
MAPK – *mitogen-activated protein kinases*  
M-bcr – *major breakpoint cluster region*  
m-bcr – *minor breakpoint cluster region*  
MDR – *multidrug resistance*  
MIF – média de intensidade de fluorescência  
MMR – *major molecular response*  
MRP – *multi resistance protein*  
mTOR – *mammalian target of rapamycin*  
MXR – *mitoxantrone resistance gene*  
NADH – dinucleótido de nicotinamida-adenina reduzido  
NBD – *nucleotide binding domain*  
NF-κB – *nuclear factor kappa B*  
NK – *natural Killer*  
OCT – *organic cation transporter*  
OCTN – *novel organic cation transporter*  
PBS – tampão fosfato

PDGFR – *platelet derived growth factor receptor*  
PE – ficoeritrina  
P-gP – glicoproteína P  
*Ph* – cromossoma Filadélfia  
PI3K – fosfatidilinositol-3-cinase  
Ras – *rat sarcoma*  
RC – resistência contínua  
RD – resistência descontínua  
REV – Reversina 205  
RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*  
ROS – *reactive oxygen species*  
SH – *src-Homology*  
SLC – solute-carrier  
SNP – *single-nucleotide polymorphism*  
SSC – *side scatter channel*  
STAT – *signal transducers and activators of transcription protein*  
TMD – *transmembrane domain*  
TK – *tyrosine Kinase*  
 $\mu$ -bcr – *micra breakpoint cluster region*



## ***Capítulo 1. Introdução***



### 1.1. O cancro

O organismo humano possui sistemas bastante complexos de controlo genético, que permitem o correcto equilíbrio dinâmico entre fenómenos de proliferação e de morte celular. A homeostase celular é mantida pela capacidade de detecção e de resposta a vários sinais intra e extracelulares, tais como, factores de crescimento e sinais apoptóticos. Deste modo, alterações nestes processos podem conduzir ao desenvolvimento de patologias, como o Cancro.

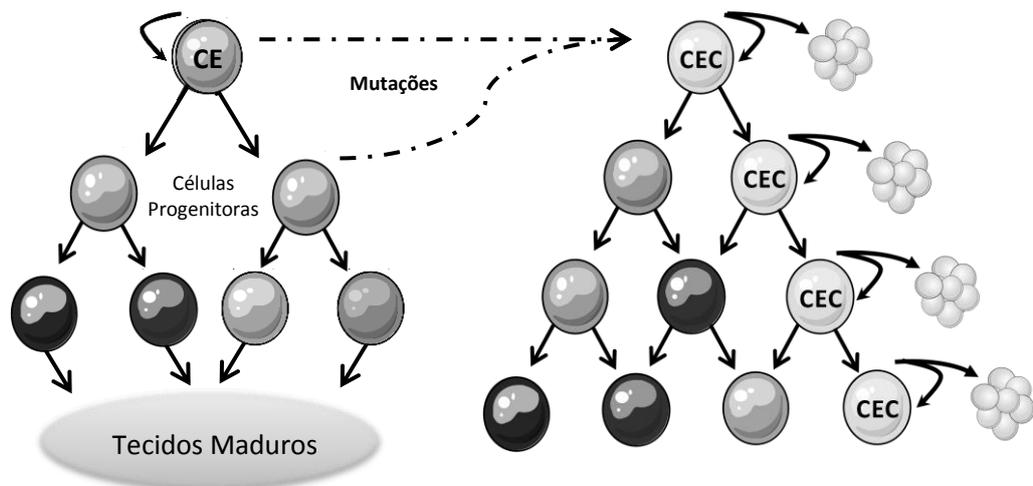
O cancro é designado como uma doença de genes, cuja modificação – estimulação e/ou desrepressão – confere características exclusivas e vantajosas à célula neoplásica, nomeadamente divisão celular excessiva ou resistência à apoptose. Estas alterações podem resultar da acção de vários agentes carcinogénicos, como factores exógenos – agentes químicos, físicos e biológicos, e/ou factores endógenos – inflamação, alteração do sistema imunitário. Estes agentes carcinogénicos induzem alterações a nível do material genético como mutações, translocações, deleções e/ou amplificações (Lodish *et al.* 2008).

No entanto, a carcinogénese é um processo multifactorial, que envolve vários genes e que ocorre em várias etapas, sendo elas, a iniciação, a promoção e a progressão. O aparecimento de uma alteração genética irreversível num único gene é o acontecimento característico da iniciação. Durante a etapa seguinte, a promoção, os clones iniciados são seleccionados face aos restantes e proliferam de forma desregulada. A progressão, a última fase da carcinogénese, caracteriza-se pelo acumular de novas anomalias genéticas nos clones previamente seleccionados, conferindo assim o fenótipo maligno e invasivo às células iniciadas (Pelengarís and Khan 2006).

Recentemente, surgiu o conceito de célula estaminal cancerígena (CEC) para explicar o aparecimento, a manutenção e recidiva do cancro. Estas células têm características similares às células estaminais, ou seja possuem capacidade de autorenovação e replicação, expressão activa de telomerase,

activação de vias de sinalização celular anti-apoptóticas, actividade dos transportadores de membrana e capacidade de migrar e metastizar (Jordan *et al.* 2006; Dalerba *et al.* 2007; Lobo *et al.* 2007).

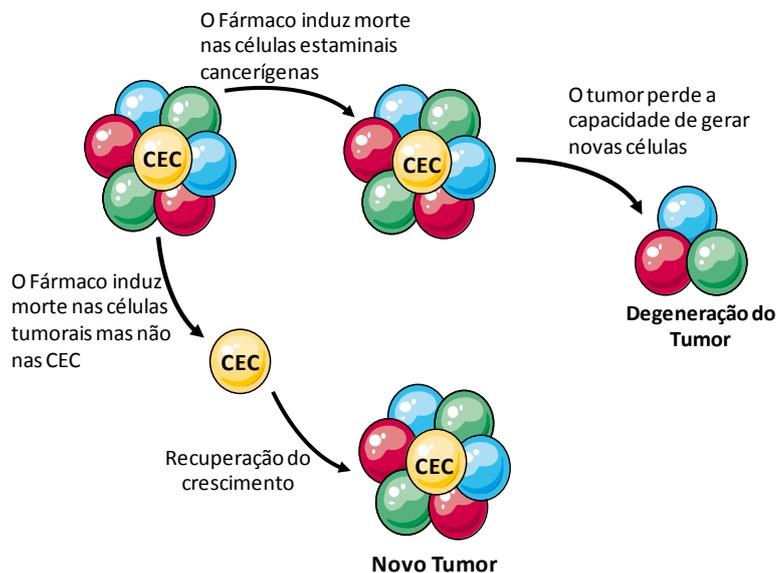
As células estaminais (CE) normais consistem num pequeno conjunto de células somáticas com capacidade de divisão elevada, que por divisão assimétrica dão origem a células novas estaminais e a células precursoras de linhagem, que por sua vez originarão as células diferenciadas e maduras. Para que a sua função seja cumprida, as CE têm um grande poder de auto-renovação – permite a manutenção de um *pool* de células estaminais – e de diferenciação, o que permite a manutenção do tecido ou órgão, sem que estes degenerem. Esta população de células torna-se mais susceptível à acumulação de alterações genéticas, devido ao facto de se encontrarem em constante divisão celular e ao seu maior tempo de semi-vida, comparativamente com as células diferenciadas que originam (Figura 1).



**Figura 1. - Células estaminais normais e cancerígenas.** As células estaminais (CE) normais além da sua capacidade de auto-renovação dão origem a várias linhagens de células progenitoras, que se diferenciam em células maduras, formando os tecidos. Caso ocorra uma alteração, como uma mutação, estas células passam a designar-se de células estaminais cancerígenas (CEC), desencadeando o aparecimento de tumores (adaptado de Jordan *et al.*, 2006).

Assim, num tumor temos um conjunto heterogéneo de células, maioritariamente constituído por células com a função de manutenção da massa tumoral, e por um conjunto restrito de células que podem por si só originar um novo tumor, dada a sua capacidade de auto-renovação. Como referido, as CEC não são normalmente erradicadas com as terapêuticas anti-

tumorais, sendo resistentes e responsáveis pelas recidivas dos doentes (Reya *et al.* 2001; Jordan *et al.* 2006; Dalerba *et al.* 2007) (Figura 2).



**Figura 2 - Heterogeneidade Tumoral e a Resposta à Terapêutica.** A presença de células estaminais cancerígenas condiciona a resposta à terapêutica. As terapêuticas que induzem morte ao nível das CEC conduzem à degeneração do tumor, por perda da capacidade de proliferação. Contudo as terapêuticas convencionais não conseguem erradicar as CEC, sendo estas as responsáveis pelas recidivas e pelo reaparecimento do tumor (adaptado de Reya *et al.* 2001)

Assim, o cancro pode ter origem em células diferenciadas e em células estaminais cancerígenas, que por alteração genética e/ou epigenética modificam o padrão de expressão de genes envolvidos na divisão, proliferação, diferenciação e morte celular.

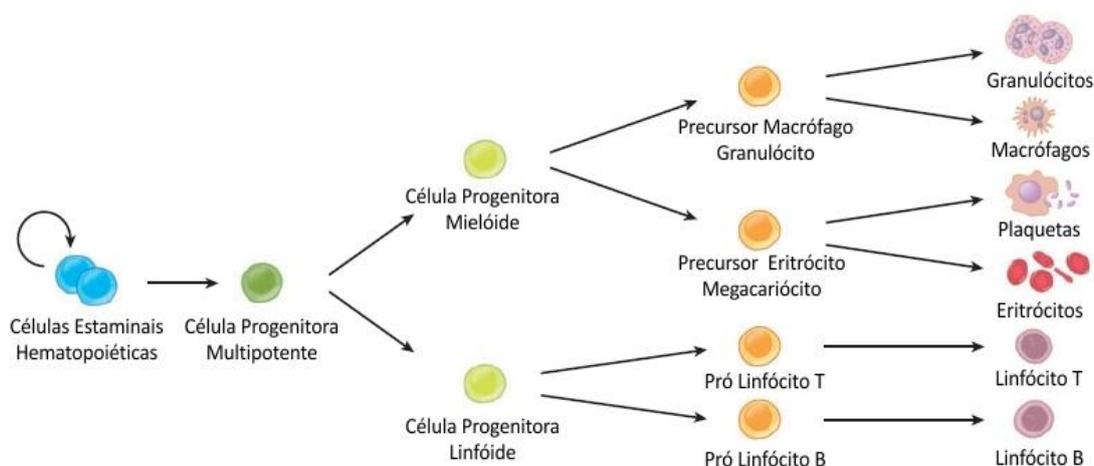
## 1.2. Sistema Hematopoético

O sistema hematopoético é um dos sistemas do organismo humano em que o conceito de célula estaminal se encontra mais aprofundado, quer em situações normais quer em casos de neoplasias, como as leucemias.

A hematopoiese consiste num processo hierárquico em que a partir de uma célula estaminal hematopoética (CEH), por acção de factores de crescimento, se originam todos os constituintes celulares do sangue. Durante o desenvolvimento fetal, este processo ocorre no saco vitelino (0 aos 2 meses), no fígado e no baço (2 aos 7 meses) e na medula óssea (5 aos 9

meses). Na fase pós-natal, a medula óssea dos ossos chatos – o externo e crista ilíaca – e as zonas proximais do fêmur e do úmero, são os principais pontos de formação dos elementos celulares do sangue (Hoffbrand *et al.* 2006)

Todo o processo de formação das células hematopoiéticas inicia-se com a divisão da CEH, que origina uma nova CEH por auto-renovação e uma célula progenitora multipotente (CPM). Esta CPM origina os precursores das diferentes linhagens: a célula linfóide progenitora (CLP), para a linhagem linfóide, e a célula mielóide progenitora (CMP), para a linhagem mielóide. De acordo com os estímulos presentes, estas células, já comprometidas com uma das linhagens, vão sofrer maturação originando os vários elementos sanguíneos. As CLP vão formar os linfócitos B, os linfócitos T e as células *natural killer* (NK). Por sua vez, as CMP vão formar os granulócitos, os macrófagos, as plaquetas e os eritrócitos (Dalerba *et al.* 2007; Lobo *et al.* 2007) (Figura 3).



**Figura 3 - Esquema representativo da Hematopoiese.** As células estaminais hemopoiéticas (CEH) auto-renovam-se e originam as células progenitoras multipotentes (CPM), que por sua vez se diferenciam em células precursoras da linhagem mielóide e linfóide (CMP e CLP). Estas vão originar os precursores dos diferentes elementos sanguíneos, que culminam em células maduras (adaptado de Lobo *et al.* 2007).

O microambiente da medula óssea é essencial para a manutenção das células estaminais, bem como para o crescimento e diferenciação dos vários elementos sanguíneos. Assim, as condições são mantidas devido à presença de adipócitos, fibroblastos, células endoteliais, macrófagos (que asseguram a

secreção de factores de crescimento) e de uma rede de microvasos, que permite que as células maduras alcancem a circulação sanguínea (Fox 1996; Hoffbrand *et al.* 2006; Myatt and Lam 2007).

### 1.3. Neoplasias Hematológicas - Leucemias

Dado o curto tempo de semi-vida dos componentes celulares sanguíneos e a constante reposição e maturação ao nível da medula óssea, a hematopoiese torna-se um processo passível de acumulação de erros, e consequente desenvolvimento de neoplasias.

As leucemias constituem um grupo de neoplasias hematológicas, que resultam da desregulação da proliferação, diminuição da apoptose e/ou bloqueio da diferenciação das células hematopoiéticas (Zhou *et al.* 2007). Estas células transformadas acumulam-se no local de maturação – a medula – e/ou no sangue periférico.

A classificação actual das neoplasias hematológicas tem em consideração a linhagem celular afectada, a velocidade de progressão da doença e a presença de alterações genéticas, como mutações e translocações (Hoffbrand *et al.* 2011) (Tabela 1).

**Tabela 1- Classificação geral das neoplasias hematológicas**

<i>Mielóides</i>	<i>Linfóide</i>
Neoplasias Mieloproliferativas (NMP)	Neoplasias dos precursores Linfóides
<b>LMC Cromossoma Filadélfia Positivo - <i>Ph</i><sup>+</sup></b>	Neoplasias de células B maduras
<b>NMP Cromossoma Filadélfia Negativo – <i>Ph</i><sup>-</sup></b>	
Neoplasias Mieloproliferativas/ Mielodisplásicas	Neoplasias de células T e NK maduras
Síndrome Mielodisplásica (SMD)	
Leucemia Mielóide Aguda	

(adaptado de Hoffbrand *et al.*, 2011)

### 1.3.1. Leucemia mielóide crónica

A Leucemia mielóide crónica (LMC) é uma doença mieloproliferativa da célula estaminal, que se caracteriza pelo crescimento descontrolado das células hematopoiéticas resultando na expansão clonal, em particular da linhagem mielóide (Faderl *et al.* 1999; Deininger *et al.* 2000; Melo *et al.* 2003; Frazer *et al.* 2007; Hehlmann *et al.* 2007) . As células estaminais alteradas proliferam e originam uma população de células mielóides em vários estádios de maturação (Hoffbrand *et al.* 2006).

A LMC foi a primeira doença humana cuja patogenia foi directamente associada à presença de uma anomalia citogenética, o cromossoma Filadélfia (*Ph*) (Hehlmann *et al.* 2007; Quintás-Cardama and Cortes 2009). Este cromossoma resulta de uma translocação recíproca entre o cromossoma 22 (gene *BCR*) e o cromossoma 9 (gene *ABL*). Como consequência desta anomalia forma-se um gene de fusão, o gene *BCR-ABL* (Hehlmann *et al.* 2007; Quintás-Cardama and Cortes 2009).

#### 1.3.1.1. Características Clínicas

A LMC é uma doença que evolui em três fases (trifásica), na maioria dos casos, englobando uma fase crónica (CP – *chronic phase*), uma fase de aceleração e uma crise blástica (BC – *blast crisis*). Contudo, existem doentes que passam directamente da fase crónica para a crise blástica, a fase mais grave da doença (Wiernik 2003; Calabretta and Perrotti 2004).

Em aproximadamente 85% dos casos, a LMC é diagnosticada em fase crónica (CP), sendo que, em metade dos casos são detectados com base em exames de rotina. Esta fase caracteriza-se pelo aumento da taxa proliferativa das células progenitoras mielóides e pela libertação para a corrente sanguínea de células imaturas em vários estádios de maturação (Wiernik 2003; Hoffbrand *et al.* 2006). É geralmente assintomática, existindo leucocitose no sangue periférico de 12 a  $1000 \times 10^9/L$  (média de  $100 \times 10^9/L$ ) e blastos

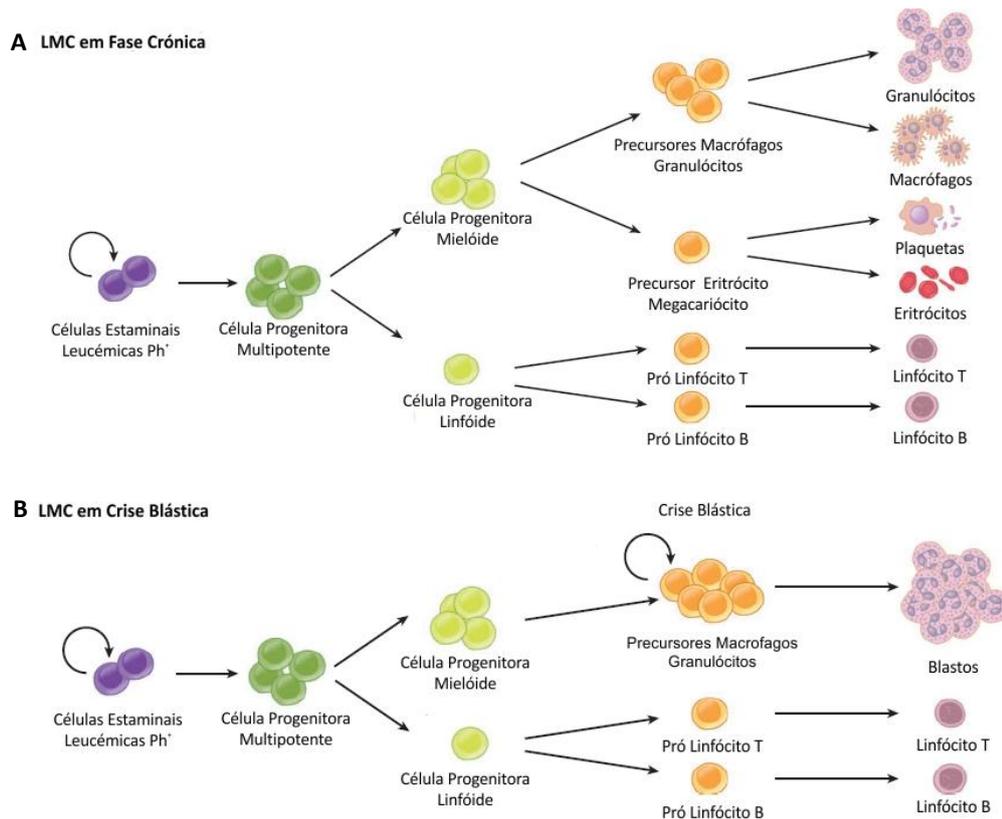
inferiores a 2% (Swerdlow *et al.* 2008). Nesta fase da doença, os resultados dos vários tratamentos são mais positivos e apresentam maior taxa de remissão (Wiernik 2003). Em doentes que respondam à terapêutica, a CP pode durar entre 10 a 15 anos (Figura 4A).

Durante a fase de aceleração, cujas características patológicas não se encontram bem definidas, verifica-se um aumento das células mielóides imaturas em circulação (10% a 19% de mieloblastos), pelo menos 20% de basófilos no sangue periférico, trombocitopenia ou trombocitose persistente sem resposta terapêutica, aumento do baço (Swerdlow *et al.* 2008) e acumulação de anomalias citogenéticas adicionais (Wiernik 2003).

O último estágio da doença, a crise blástica (BC), distingue-se das restantes devido à presença de mais 20% de células leucémicas imaturas (blastos) no sangue e na medula e/ou pela ocorrência de infiltrações extramedulares. Ao contrário do que acontece na CP, verifica-se expansão clonal com a perda de capacidade de diferenciação, isto é, os precursores mielóides ou mieloblastos surgem no sangue periférico (Calabretta and Perrotti 2004; Huntly and Gilliland 2004; Swerdlow *et al.* 2008) (Figura 4B).

Alguns doentes com LMC apresentam uma população de células estaminais (CD34<sup>+</sup>) portadoras do gene de fusão *BCR-ABL*, com elevados níveis de transcritos (ARN mensageiro) e de oncoproteínas (Crossman and O'Brien 2004; Volpe *et al.* 2009). Dado o seu estado quiescente, estas células não respondem à terapêutica, podendo ser responsáveis por recaídas em caso de interrupção do tratamento.

Estudos recentes revelam que a associação da terapêutica *standard* a outros fármacos, como inibidores da farnesiltransferase, aumenta o índice de apoptose nas células CD34<sup>+</sup> *in vitro* (Volpe *et al.* 2009). Assim, a eliminação da população de CEC, por regimes de monoterapia ou de associação com novos compostos terapêuticos, é essencial para alcançar melhores resultados na erradicação da doença.



**Figura 4 - Hematopoiese na Fase Crónica e na Crise Blástica da LMC.** As células estaminais cancerígenas (CEC) portadoras do gene *BCR-ABL* dão origem a um maior número de células progenitoras multipotentes (CPM) em ambas as fase da doença, em relação à hematopoiese normal (Figura 3). Durante a fase crónica (A), verifica-se um aumento de progenitores mielóides e, conseqüentemente, um aumento de células em vários estádios de maturação. Na situação B, durante a crise blástica, os progenitores mielóides não se diferenciam acumulando-se na medula (mieloblastos) podendo atingir a circulação sanguínea (adaptado de Lobo *et al.* 2007)

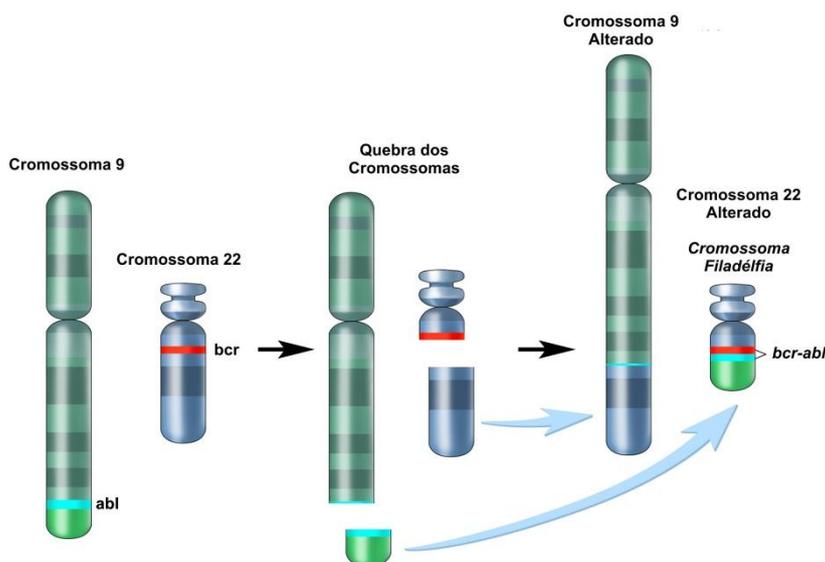
### 1.3.1.2. Epidemiologia

A Leucemia mielóide crónica é uma patologia pouco frequente, que atinge uma a duas pessoas por cada 100000 pessoas por ano, correspondendo a 15% das leucemias em adultos (Faderl *et al.* 1999; Hehlmann *et al.* 2007). Apesar de poder ocorrer em qualquer faixa etária, é mais frequente entre os 40 e os 60 anos de idade. Esta doença atinge mais os homens do que as mulheres, numa proporção 1,4:1 (Hehlmann *et al.* 2007; Rohrbacher and Hasford 2009). No que se refere às várias etnias e regiões geográficas não se

encontra descrito nenhum factor predisponente para o desenvolvimento desta patologia.

### 1.3.1.3. Caracterização molecular – O Cromossoma Filadélfia (*Ph*)

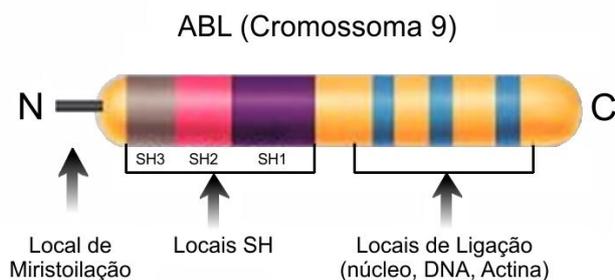
Em 1960, Nowell e Hungerford (1960) descreveram o cromossoma Filadélfia (*Ph*), no entanto, apenas em 1973 foi reportada por Rowley (1973) a sua presença em doentes com Leucemia mielóide crónica (LMC). Este consiste num cromossoma 22 com dimensões reduzidas, em resultado da translocação recíproca entre este e o cromossoma 9, como mencionado. Como consequência desta anomalia genética forma-se um gene de fusão *BCR-ABL* (Walz and Sattler 2006) (Figura 5).



**Figura 5 - Formação do Cromossoma Filadélfia (*Ph*).** Da translocação recíproca entre o cromossoma 9 e o 22, resulta a justaposição entre o gene *BCR* (cr. 22) e o gene *ABL* (cr 9), e a formação de um cromossoma 22 com dimensões reduzidas (adaptado de *Cancer National Institute*, 2010).

O gene *ABL*, *Abelson leukemia gene*, encontra-se incorporado no cromossoma 9 (9q34) e apresenta um tamanho de 225 Kb (Tefferi and Gilliland 2007). Este gene codifica a proteína ABL que apresenta actividade de tirosina cinase, sendo o seu peso molecular de 145 kDa. Em termos estruturais, podemos distinguir diferentes domínios ao longo do gene

importantes na transdução de sinais e na regulação do crescimento (Deininger *et al.* 2000). Assim, no terminal amínico (N) encontram-se domínios homólogos SRC (SH), que regulam a actividade de tirosina cinase, e um local de miristoilação, que permite a associação da proteína codificada com outras proteínas da membrana. A zona central e o terminal carboxílico incorporam locais de ligação a diferentes estruturas, como o ADN e a actina (Figura 6).

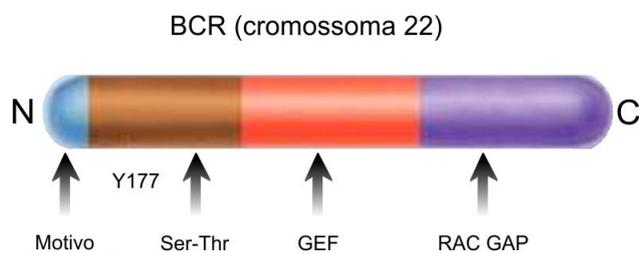


**Figura 6 - Domínios Funcionais do produto do Gene *ABL*.** (N) corresponde ao terminal amínico, (SH) são domínios com homologia SRC e os restantes domínios correspondem a locais de ligação até ao terminal carboxílico (C) (adaptado Faderl *et al.*, 1999).

As alterações nos domínios SH3 e SH2 interferem com o potencial de transformação e malignidade da proteína, aumentando-o ou reduzindo-o, respectivamente (Faderl *et al.* 1999). A proteína apresenta duas isoformas que se distinguem pelo seu tamanho e localização: a isoforma A, que se encontra no citoplasma, é ligeiramente mais pequena pois não apresenta o local de miristoilação, contrariamente à isoforma B, localizada no núcleo (Deininger *et al.* 2000; Quintás-Cardama and Cortes 2009). A proteína ABL normal é expressa de forma ubíqua, e encontra-se envolvida na regulação do ciclo celular, na resposta ao stresse genotóxico e na transmissão de informação com o microambiente celular. (Faderl *et al.* 1999; Tefferi and Gilliland 2007).

A proteína BCR (*breakpoint cluster region protein*) possui 160 kDa de peso molecular e encontra-se expressa de uma forma ubíqua pelos tecidos, sendo codificada pelo gene *BCR* localizado no cromossoma 22 (22q11) (Deininger *et al.* 2000). Estruturalmente, este gene tem um tamanho total de 135 Kb e possui vários motivos funcionais (Tefferi and Gilliland 2007). No

terminal amínico (N), encontra-se um domínio que permite a dimerização *in vivo* e outro que confere a actividade de cinase de serina-treonina. Os únicos substratos conhecidos para esta cinase são elementos da família das proteínas 14-3-3. A parte central do gene codifica um factor de troca de guanosinas, o GEF - *Guanine nucleotide exchange factors*, cuja função é mediar a activação da RHO, uma proteína envolvida na activação de factores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B. O terminal carboxílico (C) codifica uma GTPase com actividade na proteína RAC, que por sua vez se encontra envolvida na regulação da polimerização da actina e da actividade da NADPH oxidase das células fagocíticas (Advani and Pendergast 2002) (Figura 7).



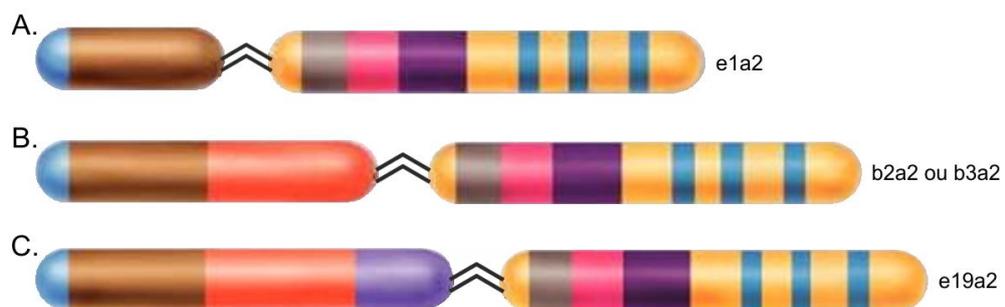
**Figura 7 - Domínios funcionais do produto do Gene *BCR*.** (N) corresponde ao terminal amínico, onde se encontra o motivo que permite a dimerização. A seguir um domínio com actividade serina-treonina cinase. GEF - *Guanine nucleotide exchange factors*; GAP - *GTPase-activating proteins*; (C) corresponde ao terminal carboxílico (adaptado Faderl *et al.*, 1999).

Da translocação entre o cromossoma 22 e o cromossoma 9 resulta a justaposição do gene *BCR* com o gene *ABL*, tendo como consequência o gene de fusão *BCR-ABL* (Hehlmann, R *et al.* 2007).

O gene *BCR* apresenta diferentes pontos de quebra o que pode originar diferentes transcritos de ARN mensageiro, de acordo com o local de inserção do gene *ABL*. Para o gene *ABL* também são conhecidos dois pontos de quebra, antes do exão 2 (a2) e depois deste (a3). Contudo, a translocação envolvendo o ponto de quebra a3 é bastante rara (Foroni *et al.* 2011).

A forma predominante dos transcritos dá origem a uma oncoproteína de 210 kDa, denominada de p210<sup>BCR-ABL</sup>, que tem o local de quebra entre o exão 12 (b1) e o exão 15 (b5). Para esta proteína encontram-se identificados dois transcritos: o b2a2 e o b3a2 com inserção no exão 12 e 13, respectivamente. Estas formas são denominadas *major breakpoint cluster*

*region* (M-bcr) e têm uma frequência de incidência nos casos de LMC de 90% (Melo *et al.* 2003; Walz and Sattler 2006; Tefferi and Gilliland 2007) (Figura 8B). Outra proteína que resulta da fusão dos dois genes é a proteína p190<sup>BCR-ABL</sup>, que corresponde a uma forma mais pequena com origem no transcrito e1a2, designada de *minor breakpoint cluster region* (m-bcr) (Figura 8A). Esta ocorre com maior frequência em leucemias linfoblásticas agudas (LLA) *Ph+*, nomeadamente em 50% dos casos de adultos e 80% das LLAs das crianças (Faderl *et al.* 1999; Walz and Sattler 2006). O terceiro, e o mais raro transcrito, tem origem na inserção entre o exão 19 e 20, e denomina-se de *micra breakpoint cluster region* ( $\mu$ -bcr) (Figura 8C). Deste resulta uma proteína com 230 kDa (p230<sup>BCR-ABL</sup>), que normalmente está associada a casos de leucemia neutrofílica crónica (Faderl *et al.* 1999).

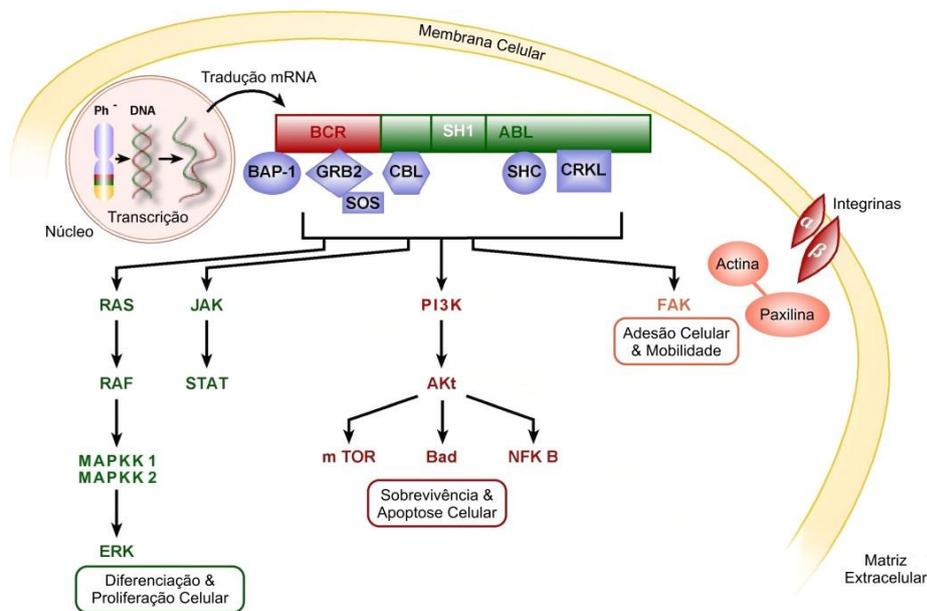


**Figura 8 - Representação dos transcritos (oncoproteínas) que derivam da fusão entre os genes *BCR* e *ABL*.** (A) m-bcr (e1a2) do qual deriva a proteína p190<sup>BCR-ABL</sup>; (B) M-bcr (b2a2 ou b3a2) que origina a proteína mais comum, a p210<sup>BCR-ABL</sup>; (C)  $\mu$ -bcr (e19a2), que origina a proteína menos frequente, a p230<sup>BCR-ABL</sup> (Adaptado de Faderl *et al.*, 1999).

Em termos funcionais, as diferentes oncoproteínas derivadas do gene fusão apresentam actividade de tirosina cinase desregulada e agressividade distinta (Walz and Sattler 2006). Assim, a forma menos agressiva corresponde ao transcrito  $\mu$ -bcr, seguido da forma M-bcr, correspondendo o transcrito m-bcr à forma mais agressiva. Desta forma, podemos afirmar que quanto maior o conteúdo de *BCR* translocado menor a agressividade da patologia associada (Foroni *et al.* 2011).

A identificação das vias de sinalização celular alteradas pela actividade desta oncoproteína é de vital importância para compreender os mecanismos moleculares envolvidos na sua patogénia (Walz and Sattler 2006). Foram já

descritos inúmeros substratos e vias que são activadas pela oncoproteína BCR-ABL, que conduzem à diminuição da morte celular, ao aumento da proliferação, à perda de adesão, com consequente libertação de células imaturas, e ao aumento da instabilidade genética, que resulta na progressão da doença. As vias activadas por esta oncoproteína incluem, entre outras, a via da RAS/MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) e da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) (Druker 2008; Quintás-Cardama and Cortes 2009) (Figura 9).



**Figura 9 - Vias de sinalização activadas pela oncoproteína BCR-ABL.** A via de sinalização da RAS/MAPK juntamente com a via da JAK/STAT (*Just Another Kinase – Signal transducer and activation of transcription*) são as vias responsáveis pela proliferação e diferenciação das células do sistema hematopoiético. A sobrevivência celular e a evasão à morte celular por apoptose são características resultantes da sobre-activação da via da PI3K. Alterações ao nível da mobilidade e adesão celular são mediadas pela via da FAK – *Focal Adhesion Kinase* (adaptado de Frazer *et al.* 2007).

A via de sinalização RAS/RAF/MAPK é uma das vias de sinalização mais utilizadas pelas células hematopoiéticas em processos de proliferação celular, juntamente com a via da JAK-STAT (*Just Another Kinase – Signal transducer and activation of transcription*). A molécula iniciadora da cascata RAS/MAPK, a RAS é um dos substratos conhecidos do gene fusão, gerando uma proliferação descontrolada das células leucémicas. Em cerca de 65% dos casos com LMC encontram-se também mutações no gene que codifica a proteína RAS (Cortes *et al.* 2003; Walz and Sattler 2006). As vias de sinalização RAS/RAF/MAPK e

JAK-STAT são as vias de sinalização mais utilizadas para a proliferação das células hematopoiéticas. A molécula iniciadora da cascata RAS/MAPK, a proteína RAS, é um dos substratos conhecidos do gene fusão, gerando proliferação descontrolada das células leucémicas. Em cerca de 65% dos casos com LMC encontram-se também mutações no gene que codifica a proteína RAS (Cortes *et al.* 2003; Walz and Sattler 2006)

A via da PI3K encontra-se também envolvida no processo de transformação, estando constitutivamente activa por associação ao domínio SH1 da oncoproteína BCR-ABL (Figura 9). Em termos funcionais, esta via tem uma acção reguladora de outras vias, como a AKT/mTOR envolvida em processos de sobrevivência e crescimento, e a da RAC que medeia processos de mobilidade e adesão celular (Burchert 2007).

Assim, o potencial maligno das células  $Ph^+$  parece associado à perda de adesão celular na medula óssea, à activação de vias mitogénicas e à inibição da apoptose (Deininger *et al.* 2000). Contudo, a capacidade do gene de fusão desencadear por si só a patologia é ainda controverso. Segundo Faderl e colaboradores (1999), o gene de fusão induz a proliferação de leucócitos independentemente de factores de crescimento das células hematopoiéticas. Pelo contrário, Deininger e colaboradores (2000) defendem que o gene de fusão não é por si só suficiente para o desenvolvimento da patologia, mas que a acumulação de anomalias genéticas está envolvida na progressão da doença. Deste modo, as diferentes vias tornam-se possíveis alvos terapêuticos e/ou alvos complementares à oncoproteína BCR-ABL, com o intuito de melhorar a eficácia terapêutica nas neoplasias hematológicas  $BCR-ABL^+$  (Kantarjian *et al.* 2007).

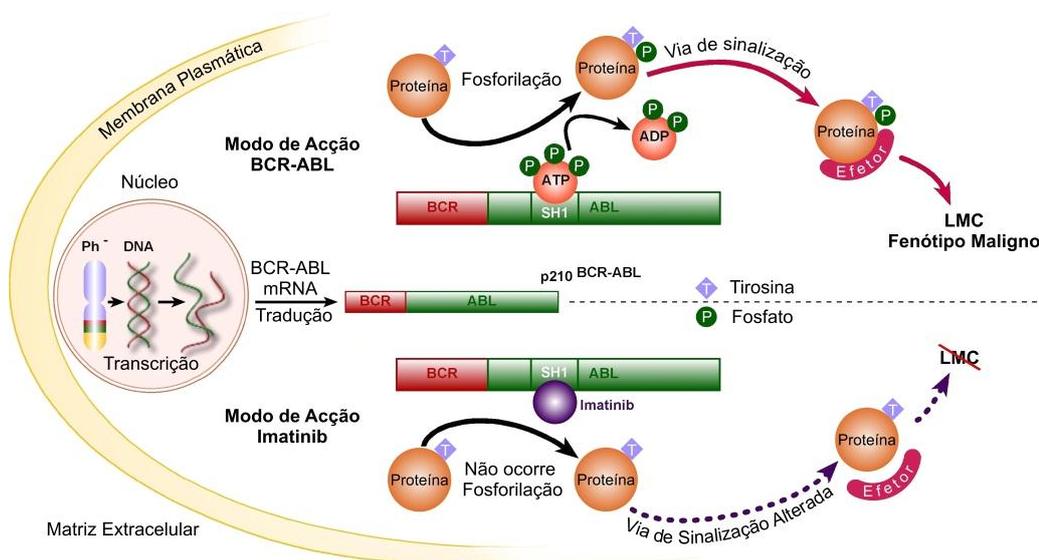
#### **1.3.1.4. Tratamento da LMC**

A Leucemia mielóide crónica foi a primeira a ser tratada com um agente biológico, o Interferon (Faderl *et al.* 1999). Actualmente, este já não é o tratamento de primeira linha, tendo sido substituído por um inibidor de tirosina cinase, o Imatinib (Deininger *et al.* 2005). Nos últimos anos têm

surgido novos inibidores de tirosina cinase, de segunda e terceira geração, que podem ser utilizados após falência da terapêutica de primeira linha. No entanto, o transplante de células estaminais é ainda a única terapêutica com capacidade curativa (Goldman 2009).

### 1.3.1.4.1. Terapêutica de primeira linha da LMC - O Imatinib

O Imatinib é um inibidor de tirosinas cinase que compete pelo local de ligação do ATP, tornando a proteína-alvo inactiva (Figura 10). Deste modo, todas as cascatas de sinalização dependentes das tirosinas cinases alvo ficam bloqueadas (Figura 9). Este composto reconhece múltiplos alvos, nomeadamente, a proteína BCR-ABL, o receptor PDGFR – *platelet derived growth factor receptor*, e c-KIT (Deininger *et al.* 2005; Walz and Sattler 2006; Volpe *et al.* 2009). Assim, este composto torna-se numa potencial terapêutica para as neoplasias nas quais estas moléculas alvo têm um papel importante, como é o caso das neoplasias hematológicas cromossoma *Ph*<sup>+</sup> e os tumores do estroma gastrointestinal (GIST – *gastrointestinal stromal tumors*).



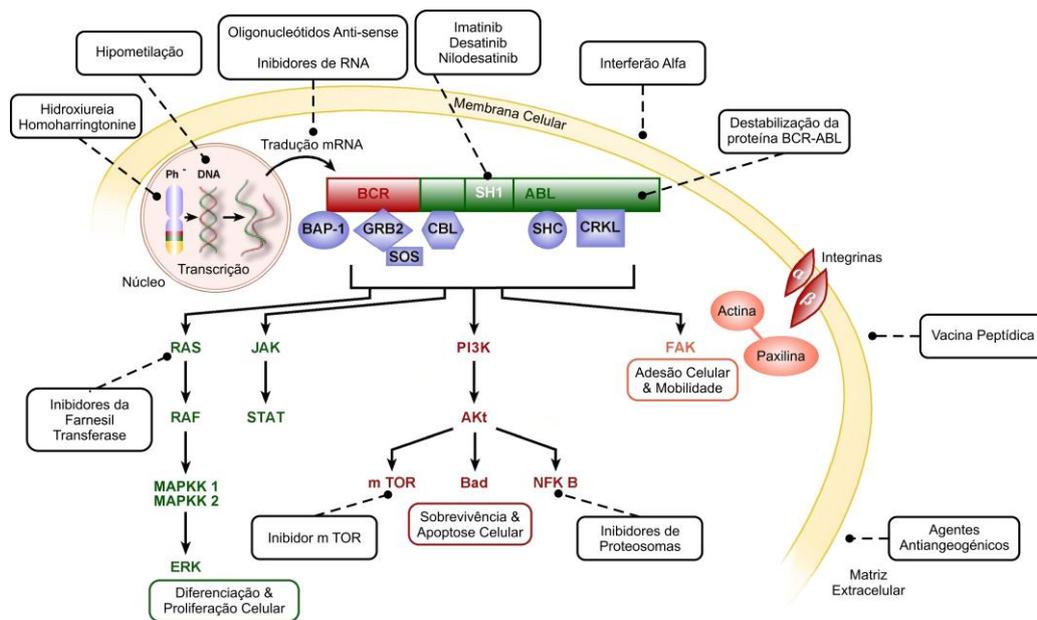
**Figura 10 - Mecanismo de acção do Imatinib.** A parte superior da figura ilustra o funcionamento da oncoproteína, que por ligação do ATP, fosforila os respectivos substratos, activando as vias de sinalização subsequentes. A parte inferior representa o mecanismo de acção do Imatinib, que se liga à oncoproteína no mesmo local onde ocorre a ligação do ATP. Deste modo, não ocorre fosforilação dos substratos e a actividade da proteína BCR-ABL fica inibida (adaptado de Frazer, R *et al.* 2007).

A dose *standard* de Imatinib administrada a doentes com LMC é de 400 mg/dia, originando uma taxa de remissão hematológica (RH) em 98% dos doentes, acompanhada de remissão citogenética completa (RCC) em 87% dos casos e a sobrevivência livre de doença (SLD) em 84% dos indivíduos sujeitos ao tratamento (Hehlmann *et al.* 2007; Goldman 2009). Como todos os fármacos, o Imatinib também tem efeitos secundários associados à sua utilização, sendo a toxicidade hematológica (*e.g.* anemia, neutropenia, trombocitopenia) a mais frequente (Crossman and O'Brien 2004; Hehlmann *et al.* 2007).

Apesar do seu enorme sucesso, o Imatinib não tem capacidade de erradicar a doença residual, a qual pode persistir nas células estaminais. Neste sentido, o acompanhamento após o diagnóstico é essencial para avaliar o desenvolvimento e a resposta obtida, evitando possíveis recidivas (Hehlmann *et al.* 2007). Geralmente, nos doentes com LMC, a recaída citogenética antecede à recaída hematológica. Este factor, associado aos já conhecidos casos de resistência a esta terapêutica, impõe uma cuidada monitorização da doença, que pode passar pela necessidade de ajuste na dose administrada ou mesmo ao recurso a um inibidor TK alternativo (Goldman 2009).

#### **1.3.1.4.2. Novos alvos terapêuticos**

Os aspectos moleculares da LMC têm sido um dos temas mais explorados nos últimos anos, conduzindo a um aumento do conhecimento sobre o funcionamento da célula leucémica (Deininger *et al.* 2000). O aparecimento de novas terapêuticas complementares aos inibidores tirosina cinase, têm como principal objectivo melhorar as respostas por parte dos doentes e contornar os casos de resistência. Os novos fármacos podem funcionar a diferentes níveis, alguns destes têm como alvo o ADN e o ARN mensageiro, já outros actuam em vias de sinalização alteradas pela actividade da oncoproteína BCR-ABL (Frazer *et al.* 2007) (Figura 11).



**Figura 11 – Alvos terapêuticos em LMC.** As múltiplas vias de sinalização activadas pela oncoproteína BCR-ABL permitem a utilização de diversas abordagens terapêuticas. Ao nível do núcleo é possível interferir com o cromossoma *Ph* ou directamente no ADN. Com oligonucleótidos *anti-sense* é possível actuar ao nível do ARN mensageiro. Os inibidores tirosina cinase actuam na oncoproteína BCR-ABL e os inibidores específicos de cada uma das vias actuam nas vias de sinalização subsequentes à oncoproteína. A hidroxiureia, o interferon alfa e os inibidores tirosina cinase são as terapêuticas aprovadas (adaptado de Frazer, R *et al.* 2007).

Os inibidores farnesiltransferase (IFT) podem ter eficácia terapêutica em doentes com LMC, visto que uma das vias mais alteradas pela oncoproteína é a via da RAS/MAPK. A proteína RAS para ser activada sofre inúmeras modificações pós-translacionais, sendo o passo limitante deste processo a isoprenilação mediada pela enzima farnesiltransferase. Esta enzima catalisa a transferência de um grupo farnesil para o resíduo terminal de cisteína dos seus substratos, entre os quais as proteínas RAS, RhoB e laminas (Lancet and Karp 2003). Os IFT, ao bloquearem a acção da farnesiltransferase, alteram o conteúdo de RAS na forma activa, bloqueando a via de sinalização RAS/MAPK envolvida na proliferação celular (Appels *et al.* 2005). Contudo, a acção dos IFT, como o L-744,832 e o SCH66336, não é específica da proteína RAS e pode alterar outras proteínas que sejam substrato da enzima farnesiltransferase (Appels *et al.* 2005).

Outra das vias de sinalização bastante alterada pela actividade desregulada da oncoproteína BCR-ABL é a via da PI3K/ATK/mTOR, uma via

implicada no processo oncogénico. A proteína mTOR regula inúmeros processos na célula, sendo de destacar a síntese proteica, o crescimento, a proliferação e a mobilidade celular (Kelly *et al.* 2011). Assim, são conhecidos vários compostos capazes de inibir a actividade desta via de sinalização, conduzindo à diminuição da sobrevivência celular e conseqüente apoptose. Entre estes compostos encontra-se a Rapamicina, o Everolimus e o Temsirolimus, sendo os dois últimos também designados por *rapalogs* visto derivarem da Rapamicina (Atkins *et al.* 2009).

Como novas terapias pode-se ainda destacar o recurso a moduladores da actividade de transportadores de influxo e efluxo, envolvidos na biodisponibilidade de inúmeros fármacos.

#### **1.4. Resistência ao Imatinib**

Antes de se definir a resistência a um fármaco é necessário ter presente a definição de resposta terapêutica. Assim, o objectivo primordial do tratamento com Imatinib é que os doentes desenvolvam uma resposta hematológica completa, isto é, que apresentem uma contagem de glóbulos brancos normal no sangue periférico associado a uma percentagem de blastos inferior a 5% na medula. Posteriormente a monitorização passará pela avaliação dos níveis de cromossoma *Ph* ou dos transcritos *BCR-ABL*, que no caso de não serem detectados, o doente apresentará uma resposta citogenética e/ou molecular completa, normalmente alcançada ao fim de 12 meses. Conhecendo a resposta óptima esperada com a administração do fármaco, foram definidas duas categorias de avaliação de resposta, a falência do tratamento ou ausência de resposta e a resposta sub-óptima. Esta classificação baseia-se no tempo que o doente demora a alcançar a resposta hematológica ou citogenética completa (Apperley 2007b) (Tabela 2).

**Tabela 2- Definição do tipo de resposta à terapêutica**

<b>Tempo Imatinib (meses)</b>	<b>Ausência/falência de Resposta</b>	<b>Resposta Sub-ótima</b>
3	Sem resposta hematológica	< CHR
6	< CHR	$Ph^+ > 35\%$
12	$Ph^+ > 35\%$	< CCyR
18	< CCyR	< MMR
Qualquer Tempo	Perda de CHR Perda de CCyR Mutações insensíveis	ACA nas células $Ph^+$ Perda de MMR Mutações com alguma sensibilidade

ACA- *acquired cytogenetic abnormalities*; CHR – *complete hematological response*; CCyR – *complete cytogenetic response*; MMR – *major molecular response*.

(adaptado de Milojkovic and Apperley 2009)

A resistência à terapêutica é um processo bastante complexo, em que a resposta parcial ou a ausência de resposta é apenas uma vertente. O fenómeno de resistência pode ser inato ou adquirido, tendo repercussões distintas nas decisões terapêuticas a aplicar. Resistência inata consiste na ausência de resposta logo no início da terapêutica administrada. Nos casos de resistência adquirida, os doentes numa fase inicial evidenciam respostas com as terapêuticas aplicadas, contudo, com o decorrer do tratamento verifica-se a falência ou ausência de resposta. Geralmente, os casos de resistência encontram-se associados a fases mais avançadas da patologia (Milojkovic and Apperley 2009; Quintás-Cardama *et al.* 2009).

A resistência ao Imatinib e os mecanismos implícitos neste processo são normalmente divididos de acordo com a sua dependência do gene de fusão. As mutações pontuais, a sobre-expressão e a amplificação do gene de fusão são incluídos no grupo de mecanismos dependentes do gene *BCR-ABL*. A segunda categoria é constituída pelos mecanismos independentes do gene fusão, nomeadamente por factores associados ao metabolismo e ao transporte do fármaco para as células-alvo (Quintás-Cardama *et al.* 2009).

### 1.4.1. Mecanismos Dependentes do Gene BCR-ABL

Em terapias direccionadas, a integridade do alvo terapêutico condiciona bastante a sua eficácia. O desenvolvimento de mutações pontuais e a sobre-expressão e/ou amplificação do gene são alguns dos mecanismos envolvidos no aparecimento de resistência (Volpe *et al.* 2009).

#### 1.4.1.1. Mutações Pontuais

O aparecimento de mutações no domínio cinase do gene BCR-ABL está associado a fenómenos de resistência a tratamentos com inibidores tirosina cinase, como o Imatinib (Milojkovic and Apperley 2009). O Imatinib para actuar necessita que a proteína se encontre no estado inactivo, também referido como estado *DFG-out*. Esta designação advém do facto dos resíduos Asp-Phe-Gly (DFG), que são altamente conservados, estarem expostos na conformação activa e ocultos (*out*) na forma inactiva, permitindo a associação do Imatinib (Quintás-Cardama and Cortes 2009).

São conhecidas mais de 100 mutações pontuais em doentes com LMC resistentes ao Imatinib, envolvendo a substituição de um aminoácido, e que conferem diferentes graus de resistência (Quintás-Cardama and Cortes 2009; Volpe *et al.* 2009).

Assim, as mutações no gene *BCR-ABL* são agrupadas em quatro categorias de acordo com a sua localização na molécula: no *Loop-P*, no local de Ligação do ATP/Imatinib, no domínio catalítico e no *Loop* de activação (A). Apesar da grande variedade de formas mutantes, estas são na maioria raras. As mais frequentes, em cerca de 85% dos casos, resultam de mutações em sete resíduos, nomeadamente, a M244V, a G250E, a Y253F/H, a E255K/V, a T315I, M351T e a F359V (Quintás-Cardama and Cortes 2009) (Tabela 3).

As mutações pontuais podem também ser associadas às diferentes fases da LMC. Assim, a M244, a L248, a F317, a H396 e a S417 são mutações frequentes na fase crónica, enquanto a Q252, a Y253, a E255, a T315, E459 e a F486 são características da fase de aceleração (Apperley 2007a).

**Tabela 3 - Mutações da oncoproteína BCR-ABL e sensibilidade ao Imatinib**

<i>Local</i>	<i>Mutação</i>	<i>Imatinib IC<sub>50</sub> (nM)</i>	<i>Sensibilidade</i>
	Wild-type <i>BCR-ABL</i>	260	Muito Sensível
<i>Loop-P</i>	M244V	2000	Sensibilidade Intermédia
	G250E	1350	Sensibilidade Intermédia
	Q252H	1325	Sensibilidade Intermédia
	Y253H	> 6400	Pouco Sensível
	Y253F	3475	Pouco Sensível
	E255K	5200	Pouco Sensível
	E255V	> 6400	Pouco Sensível
	V299L	540	Muito Sensível
<i>Local de Ligação ATP</i>	F311L	480	Muito Sensível
	T315I	> 6400	Pouco Sensível
	T315A	971	Muito Sensível
	F317L	1050	Sensibilidade Intermédia
	F317V	350	Muito Sensível
<i>Domínio Catalítico</i>	M351T	880	Muito Sensível
	E355G	2300	Sensibilidade Intermédia
	F359V	1825	Sensibilidade Intermédia
	V379I	1630	Sensibilidade Intermédia
<i>Loop- A</i>	L387M	1000	Muito Sensível
	H396R	1750	Sensibilidade Intermédia
	H396P	850	Muito Sensível

(adaptado de Quintás-Cardama *et al.* 2009)

É de destacar que a mutação no resíduo treonina da posição 315 da oncoproteína, que conduz à sua substituição pelo aminoácido isoleucina, foi a primeira a ser identificada como capaz de “restaurar” a via de transdução de sinal, mesmo na presença de Imatinib (Walz and Sattler 2006; Milojkovic and Apperley 2009), tendo por isso pior prognóstico. Esta ocorre no local de ligação do Imatinib, sendo o resíduo fundamental para a formação de uma ponte de hidrogénio com o fármaco e o local de ligação de ATP (*Loop-P*). Na forma mutada, o aminoácido isoleucina não forma esta ponte de hidrogénio, logo não permite a actuação do fármaco. A frequência deste tipo de mutação varia entre 4 e 19%, sendo a única mutação que nenhum dos inibidores de tirosina cinase aprovados consegue ultrapassar (Ramirez and DiPersio 2008). Actualmente, encontra-se em ensaios clínicos uma formulação denominada de Bosutinib, cujos resultados se tem mostrado promissores, revelando que

este fármaco tem capacidade de ultrapassar a resistência induzida pela mutação T315I (Kantarjian *et al.* 2007).

A presença destas alterações pode alterar o grau de resistência de cada um dos clones. Assim, podemos ter clones totalmente resistentes – os que possuem as mutações T315, Y253 e E255 - e outros parcialmente resistentes, ou seja, os que tem mutações M244, F317 e M351. No caso dos parcialmente resistentes, o aumento da dose do fármaco administrado pode ser eficaz a contornar a resistência à terapêutica (Volpe *et al.* 2009).

#### **1.4.1.2. Sobre-expressão e Amplificação**

Nas células em divisão, a frequência de ocorrência de amplificação génica é de  $10^4$  por cada divisão celular, enquanto a frequência para ocorrer uma mutação é de  $10^9$ . Em estudos com linhas celulares, comprovou-se que de facto era mais frequente a amplificação do gene de fusão do que a existência de mutações pontuais (Apperley 2007a). Contudo, nos doentes com LMC, o mecanismo de resistência mais frequente é o aparecimento de mutações pontuais, sugerindo que apesar de a amplificação ser mais frequente, esta pode por si própria ser letal para a célula neoplásica (Apperley 2007a).

A eficácia terapêutica do Imatinib está directamente associada à concentração de oncoproteína que a célula apresenta, isto porque em casos de sobre-expressão e/ou amplificação verifica-se menor disponibilidade de fármaco para inactivar toda a proteína BCR-ABL. As alterações no conteúdo proteico podem resultar da sobre-expressão por amplificação do gene *BCR-ABL*, em consequência do aumento do número de cópias do cromossoma *Ph*, ou por sobre-expressão sem amplificação génica (Apperley 2007a; Milojkovic and Apperley 2009). Deste modo, vai ocorrer a formação de clones insensíveis ao fármaco, que apresentam vantagem clonal, dominando sobre os clones não resistentes (Milojkovic and Apperley 2009; Quintás-Cardama *et al.* 2009). Ultrapassar esta resistência é possível com o recurso a doses mais elevadas de fármaco, visto que o número de moléculas de Imatinib que vai atingir as

células leucémicas é superior, havendo interação com toda a quantidade de oncoproteína presente (Apperley 2007b).

#### **1.4.2. Mecanismos Independentes do Gene *BCR-ABL***

Para que a eficácia de um fármaco seja a esperada, este tem que estar disponível para alcançar o seu alvo terapêutico. No caso do Imatinib, a sua biodisponibilidade pode ser alterada por metabolização, devido à acção de enzimas CYP - *cytochrome* P450; por interação com proteínas, como a AGP – *α1-acid glycoprotein*; ou por alteração do transporte do fármaco na célula leucémica, quer do influxo, quer do efluxo (Milojkovic and Apperley 2009).

Apesar dos mecanismos citados não serem os mais frequentes e de o conhecimento não ser muito vasto, estes podem ser de vital importância na previsão da resposta do doente à terapêutica aplicada.

##### **1.4.2.1. Metabolismo do Imatinib**

O sistema citocromo P450 (CYP) consiste num grupo de enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo dos fármacos, desempenhando um papel importante quer na activação quer na eliminação dos mesmos. Este grupo de 60 enzimas encontra-se dividido em subfamílias, que também catalisam a oxidação de produtos endógenos, como hormonas esteróides. Este sistema enzimático é maioritariamente expresso no fígado, embora algumas isoenzimas tenham expressão extra-hepática, como é o caso do CYP3A4, que existe no intestino (van Schaik 2008).

Entre os indivíduos existe uma grande variabilidade que altera os padrões de actividade, o que pode estar relacionado com a existência de vários polimorfismos para estas enzimas (van Schaik 2008). No entanto, existem outros factores que podem também condicionar a actividade/expressão dos CYP como a dieta, a exposição a fumo de tabaco e a co-administração de outros fármacos (van Schaik 2004; van Erp *et al.* 2007).

O Imatinib, após a ingestão, vai ser absorvido pelo sistema gastrointestinal, sendo metabolizado ao nível hepático pelo sistema

citocromo P450 (Milojkovic and Apperley 2009). O tempo de meia-vida do Imatinib é de cerca de 18 horas, sendo o seu principal metabolito o CGP74588, N-dimetil Imatinib, que *in vitro* apresenta actividade durante aproximadamente 40 horas. Conhecem-se outros metabolitos, como o CGP 71422 e o CGP 72383, cuja presença temporal é bastante reduzida, dado que são detectáveis apenas 2 horas após a administração do fármaco, e após 24 horas já não se encontram presentes (Peng *et al.* 2005).

O metabolismo do Imatinib é mediado pelo CYP3A4 e pelo CYP3A5, como provam os estudos efectuados com inibidores (*ketoconazole*) e indutores (*phenytoin*) do CYP3A4. Apesar de em menor escala, o Imatinib é também metabolizado pelo CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6, devido à redundância intrínseca deste sistema (O'Brien *et al.* 2003; van Erp *et al.* 2007; van Schaik 2008).

A isoenzima CYP3A4 é o maior membro da subfamília CYP3A, quer pelo número de substratos com que reage, quer pelas quantidades de proteína hepática. Para esta isoenzima em particular, encontram-se descritos 20 polimorfismos, sendo a forma alélica mais frequente a CYP3A4\*1B (392 A>G), originalmente denominada de CYP3A4-V. Apesar de as opiniões serem controversas, alguns autores sugerem que esta forma polimórfica se encontra associada ao aumento da actividade da proteína (van Schaik 2008).

Para a população portuguesa é necessário destacar o alelo CYP3A4\*2, cuja frequência na população caucasiana varia entre 0 e 5%, cuja incidência próxima do valor máximo (4,5%) (van Schaik 2004). Deste modo, nos doentes portugueses este pode ser um factor determinante na metabolização dos fármacos, visto esta forma se encontrar associada à diminuição da actividade da enzima.

Para o CYP3A5, outra isoenzima metabolizadora do imatinib, encontram-se descritos 13 polimorfismos, sendo a variante alélica com maior frequência a CYP3A5\*3. Em casos de homozigotia deste alelo, ocorre *splicing* alterado que se traduz na ausência da proteína (van Schaik 2008).

#### 1.4.2.2. Proteínas Plasmáticas

As proteínas plasmáticas têm a capacidade de se associar a pequenas moléculas, quer sejam de origem interna como de origem externa. A proteína mais abundante no plasma é a albumina, estando também presente a AGP – *α1-acid glycoprotein*. A possível interacção destas moléculas com fármacos, condiciona a eficácia da terapêutica, por diminuição da biodisponibilidade do fármaco para atingir as células-alvo (Jørgensen *et al.* 2002).

O Imatinib, que na sua constituição possui vários resíduos de carácter básico, apresenta um potencial de associação com a AGP superior ao da albumina. Esta ligação preferencial é justificável pelas características das diferentes proteínas plasmáticas, ou seja, enquanto a albumina se liga a fármacos ácidos, a AGP liga fármacos neutros e básicos numa proporção de 1:1 (Widmer *et al.* 2006). No entanto, não é consensual a importância da AGP no desenvolvimento de resistência ao Imatinib. Alguns autores defendem que os altos níveis de AGP podem facilitar a selecção de clones resistentes, ao alterarem as concentrações de Imatinib intracelular (Gambacorti-Passerini *et al.* 2003; Larghero *et al.* 2003; Weisberg and Griffin 2003).

Assim, mais estudos são necessários para se verificar a existência de correlação entre os níveis de AGP e a resposta ao Imatinib, com o objectivo de identificar um marcador da progressão de neoplasias *Ph<sup>+</sup>*.

#### 1.4.2.3. Transportadores de Influxo e Efluxo

A disponibilidade de um fármaco para atingir o seu alvo molecular nas células é altamente dependente de transportadores membranares, que medeiam o influxo e efluxo do fármaco. Esta limitação no transporte verifica-se devido às propriedades físico-químicas dos fármacos, uma vez que a maioria destes não são lipossolúveis (Hu *et al.* 2008b). O Imatinib é transportado para as células-alvo através de um processo activo (Thomas *et al.* 2004).

Assim, no que respeita ao influxo – transporte do meio extracelular para o meio intracelular – a superfamília de transportadores SLC (*Solute*

*carries*) é a principal envolvida (Giacomini *et al.* 2010), em particular os OCT. O efluxo é essencialmente mediado por membros da superfamília de transportadores ABC (*ATP binding cassette*). Normalmente, estes transportadores de efluxo encontram-se associados ao desenvolvimento de resistência por sobre-expressão, o clássico MDR (*multidrug resistance*), conduzindo à diminuição da biodisponibilidade de vários agentes terapêuticos (Ozben 2006).

O transporte do Imatinib para as células é mediado pelo OCT-1 e o OCTN2, sendo o efluxo mediado pelos transportadores ABCB1 (P-gp) e ABCG2 (BCRP) (Burger and Nooter 2004b).

O OCT-1 consiste num transportador de catiões orgânicos, cujo processo de transporte é electrogénico e independente do gradiente de sódio e de protões. Deste modo, para que um fármaco seja substrato do OCT1 necessita de apresentar carga positiva a pH fisiológico, o que acontece com o Imatinib (Hayer-Zillgen *et al.* 2002). Em termos estruturais, este transportador apresenta doze domínios transmembranares em  $\alpha$ -hélice (TMD), um domínio N-terminal no lado intracelular, bem como um terminal carboxílico. Ao longo da proteína, existe um *loop* extracelular altamente glicosilado, entre o domínio TMD 1 e 2, e um *loop* intracelular com vários locais de fosforilação, entre o domínio TMD 6 e 7 (Koepsell *et al.* 2007; Volpe *et al.* 2009) (Figura 12).



**Figura 12 - Representação esquemática da estrutura do hOCT-1.** Os locais de glicosilação encontram-se indicados por ( $\psi$ ). Os pontos verdes correspondem a locais de fosforilação (adaptado de Koepsell 2004).

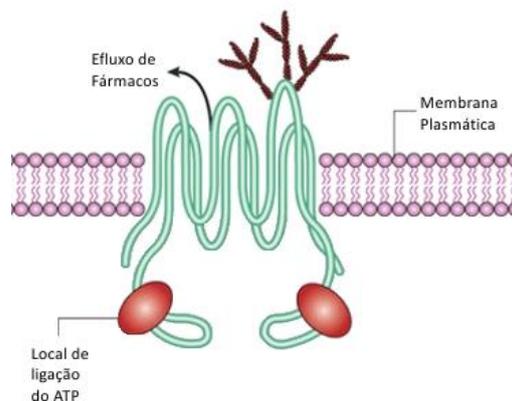
A detecção da expressão deste transportador em células tumorais sugere que a sua actividade pode condicionar a resposta a determinados agentes terapêuticos. De facto, em alguns estudos foi determinada uma

correlação entre a actividade do OCT-1 e a resposta ao Imatinib. Em casos de elevada actividade prevê-se uma boa resposta, mas em casos de menor actividade verifica-se uma dependência da dose administrada (Milojkovic and Apperley 2009; Quintás-Cardama *et al.* 2009).

Os ensaios com inibidores do OCT-1 revelaram que o transporte do fármaco não era totalmente inibido, indicando que esta função é comum a outro transportador, o OCTN2 (Apperley 2007a).

O OCTN2, também presente em células tumorais, é um transportador de carnitina e de catiões, amplamente expresso no fígado. O transporte pelo OCTN2 depende do substrato a transportar e das condições de transporte. Assim, este funciona de um modo dependente do gradiente de sódio ( $\text{Na}^+$ ) quando medeia o movimento de L-carnitina e acetil-L-carnitina, mas alternativamente funciona como transportador de catiões poliespecífico e independente do gradiente de  $\text{Na}^+$  (Koepsell *et al.* 2007).

O transportador ABCB1, também denominado de glicoproteína-P (P-gp) ou MDR1, é a bomba de efluxo mais comum e mais estudada no efluxo de variadíssimos compostos. É uma proteína transmembranar com 170 kDa, que na sua estrutura apresenta 12 domínios transmembranares (TMD) e 2 domínios de ligação de nucleótidos (NBD) no lado intracelular. Possui um *loop* extracelular entre o TMD<sub>1</sub> e o TMD<sub>2</sub>, com vários locais de glicosilação, encontrando-se os terminais N e C do lado intracelular (Figura 13) (Ambudkar *et al.* 2006).



**Figura 13 - Representação esquemática da estrutura da glicoproteína-P.** Os 12 domínios transmembranares (TMD) encontram-se na camada lipídica; os domínios de ligação de nucleótidos (NBD) correspondem às zonas a vermelho (adaptado de Sorrentino 2002).

A associação do ATP com os domínios NBD leva a uma alteração na conformação da proteína, aproximando os TMD, com formação de um poro central para os substratos (Krishna and Mayer 2000b). Estes substratos, nos quais se inclui o Imatinib, são moléculas hidrofóbicas e/ou hidrofílicas moderadas com um peso molecular entre os 300 e os 2000 kDa. Para as neoplasias hematológicas, como as leucemias, este mediador de efluxo pode ter uma elevada importância na resistência. Em condições fisiológicas, a P-gP é expressa nas células hematopoiéticas estaminais com uma função protectora. Assim, em casos de leucemia, é natural que este sistema de defesa esteja presente com os mesmos níveis de expressão ou até superiores, dificultando a acção de fármacos como o Imatinib (Mahon *et al.* 2003b).

No cromossoma 4 (4q22) encontra-se o gene *ABCG2*, também conhecido por MXR (gene resistente *miloxantrone*), BCRP (*breast cancer resistance protein*) ou ABC-P (transportador ABC da placenta), cujos substratos são o heme e as porfirinas, sendo a sua acumulação reduzida em casos de hipóxia (Choi 2005). Em termos estruturais, as proteínas ABCG2 estão organizadas em duas porções simétricas, cada uma com um domínio de ligação a nucleótidos (NBD) e seis domínios transmembranares (TMD). Assim, funcionam como semi-transportadores, sendo necessária a dimerização para serem activas, verificando-se tanto a formação de homodímeros como de heterodímeros (Mao 2005). Este transportador encontra-se abundantemente expresso no sistema gastrointestinal e serve de marcador para células hematopoiéticas primitivas. É também detectável em células estaminais cancerígenas de LMC, podendo condicionar a resposta à terapêutica (Burger *et al.* 2004).

A relação entre a proteína ABCG2 e o Imatinib é um pouco controversa, uma vez que em alguns estudos, surge como substrato e noutros como um potente inibidor (Burger and Nooter 2004b).

Para todos os transportadores descritos, encontram-se identificadas várias formas polimórficas nos genes que os codificam. De acordo com o efeito que os polimorfismos têm na actividade de transporte, estes podem

revelar uma maior ou menor importância para a resposta a agentes terapêuticos, tendo por isso um possível valor preditivo.

Deste modo, o conhecimento sobre os mecanismos implícitos no influxo e efluxo do Imatinib para as células leucémicas e da variabilidade intrínseca a cada doente, pode ser de extrema importância na avaliação da resposta à terapêutica e dos casos de resistência e na identificação de novos alvos terapêuticos (White *et al.* 2010).

### **1.5. Objectivos**

Os mecanismos envolvidos na resistência à terapêutica ainda não estão totalmente clarificados despertando, assim, um enorme interesse para os investigadores. Tentando responder a algumas das questões por esclarecer, o objectivo deste trabalho é o estabelecimento de modelos celulares *in vitro* de Leucemia mielóide crónica resistentes à terapêutica com Imatinib, de modo a proceder à sua caracterização a diferentes níveis, nomeadamente identificar o papel dos transportadores membranares de influxo e efluxo no desenvolvimento de resistência.

Numa segunda fase, pretendeu-se avaliar o potencial terapêutico de novos compostos, com o intuito de contornar/modular a resistência na LMC.



## ***Capítulo 2. Material e Métodos***



## **2.1. Caracterização de linhas celulares sensíveis e resistentes ao Imatinib**

### **2.1.1. Descrição da cultura celular**

Neste estudo foi utilizada, como modelo *in vitro* de Leucemia mielóide crónica, a linha celular K562, obtida no *American Type Culture Collection* (ATCC). A linha celular K562 foi estabelecida a partir de líquido pleural de uma doente do sexo feminino, com 53 anos de idade, diagnosticada com Leucemia mielóide crónica em crise blástica (Lozzio and Lozzio 1975).

Morfologicamente, as células K562 apresentam uma forma arredondada ou ovalada, com grânulos no citoplasma e com dimensões que variam entre os 14 e os 17 µm de diâmetro. No que respeita a alterações cromossómicas, as células K562 apresentam o cromossoma Filadélfia, com o transcripto b3-a2 para o gene *BCR-ABL*. Em termos imunofenotípicos, as células K562 são positivas para antígenos de superfície de células imaturas mielóides, CD13 e CD33, e negativas para marcadores de células B e T, como o CD19 e CD3.

A linha celular foi mantida em cultura no meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI 1640) a pH 7,4, contendo 2 mM L-Glutamina, 20 mM de HEPES-Na, 1,5 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e enriquecido com soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen) a 10%. As células foram mantidas em cultura à temperatura de 37°C numa atmosfera humedecida contendo 5 % de CO<sub>2</sub>, para uma densidade inicial de 0,5 milhões de células/mL (10<sup>6</sup> cel/mL).

### **2.1.2. Análise citogenética convencional**

A análise citogenética convencional foi efectuada nas células parentais K562, mantidas em metafase, seguindo-se a manipulação e preparação das lâminas de acordo com o descrito por Dracopoli *et al.* (1994). A análise do cariótipo foi realizada em bandagem GTG e os cariogramas estabelecidos de acordo com a nomenclatura da citogenética convencional (Shaffer and

Tommerup 2005) e com o descrito por Naumann *et al.* (2001) e Rush *et al.* (2002).

### **2.1.3. Indução de resistência**

A indução de resistência ao Mesilato de Imatinib foi efectuada na linha celular parental K562, recorrendo a duas estratégias distintas. Uma, por exposição gradual e contínua ao fármaco, visando mimetizar a toma correcta do fármaco, denominada resistência contínua (as células K562 RC). A segunda estratégia pretende espelhar o que a paragem da toma do fármaco e/ou a sua interrupção implicam, e designa-se por Resistência Descontínua (as células K562 RD). Ambos os processos foram iniciados com uma exposição a 10  $\eta$ M de Mesilato de Imatinib (Novartis), sendo a dose duplicada a cada 10 dias (Mahon *et al.* 2008; Okabe *et al.* 2008). Para a resistência descontínua, as células eram mantidas em cultura na presença do inibidor alternando com períodos de ausência do composto (10 dias).

Este processo decorreu durante 5 meses, até que o IC<sub>50</sub> das linhas resistentes fosse superior ao IC<sub>50</sub> da linha parental K562. As linhas celulares resistentes foram mantidas em meio RPMI 1640 (como descrito em 2.1.) suplementado com 250  $\eta$ M de Mesilato de Imatinib.

### **2.1.4. Avaliação do crescimento celular pelo teste de exclusão com azul de tripano**

O teste de exclusão com azul de tripano, um corante vital, é um método baseado na diferença da permeabilidade membranas das células viáveis e das células mortas. Assim, a membrana plasmática das células viáveis estando intacta é impermeável ao azul de tripano, impossibilitando a sua entrada para o citoplasma. Por outro lado, as células mortas que apresentam ruptura da membrana plasmática são permeáveis ao azul de tripano, permitindo a sua entrada para o citoplasma, o qual adquire coloração azul (Durkin *et al.* 1979). O perfil de crescimento de cada uma das linhas celulares foi determinado pela aplicação deste teste. Assim, as células foram

plaqueadas numa densidade inicial de  $0,5 \times 10^6$  cel/mL durante 96 horas. A cada período de 24 horas, foi retirada uma alíquota de suspensão celular e determinada a densidade celular após contagem das células vivas num hemocitómetro. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 5 ensaios independentes.

### **2.1.5. Análise da expressão de transportadores proteicos de influxo e efluxo por citometria de fluxo**

A citometria de fluxo é uma técnica que, através de um fluxo contínuo de células aliado a um sistema de laser, consegue avaliar o tamanho e a complexidade de cada célula individualmente. Esta técnica baseia-se na dispersão de luz provocada pela passagem da célula em frente de um laser. Daqui resulta a dispersão frontal que avalia o tamanho (*Forward Scatter Channel* – FSC) e a lateral (*Side Scatter Channel* – SSC) que avalia a complexidade. Dado que o sistema permite ainda a detecção de fluorescência, a marcação com anticorpos monoclonais associados a fluorocromos permite a identificação de proteínas e outras estruturas celulares. Um exemplo de moléculas que podem assim ser identificadas são os transportadores de influxo e efluxo quer a nível da membrana quer a nível intracelular.

Assim, foi analisada nas três linhas celulares a expressão dos transportadores proteicos envolvidos no influxo, OCT1 e OCTN2, e no efluxo, as proteínas P-gP e BCRP. Para o efeito, utilizaram-se anticorpos monoclonais conjugados directamente com sondas fluorescentes, o anti-PgP-FITC e o anti-BCRP-PE, ou indirectamente, o anti-OCT1 e o anti-OCTN2, tendo sido necessária a utilização de um anticorpo secundário, este sim conjugado com ficoeritrina (PE).

Para a detecção da expressão membranar de P-gP e de BCRP em cada uma das linhas,  $0,5 \times 10^6$  cel/mL células foram lavadas com PBS, por centrifugação a 300 xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi decantado e o sedimento (*pellet*) foi incubado durante 15 minutos ao abrigo da luz, com 1  $\mu$ g de anti-P-gP-FITC (BD Pharmingen) e 1  $\mu$ g de anti BCRP-PE (Santa Cruz

Biotechnology), respectivamente. Posteriormente, procedeu-se a uma nova lavagem com PBS (como descrito anteriormente) de forma a eliminar o anticorpo não ligado. As células foram ressuspensas em 400 µl de Facsflow e analisadas num citómetro de fluxo FACScalibur equipado com um laser de árgon. Os comprimentos de onda de excitação dos fluorocromos usados foram de 525 nm para a anti-P-gP-FITC e de 640 nm para o anti-BCRP-PE.

O mesmo procedimento foi realizado para o OCT1 e OCTN2 à excepção de uma etapa adicional necessária – a incubação com o anticorpo secundário. Para tal, após a incubação durante 15 minutos com os respectivos anticorpos, anti-OCT1 (Santa Cruz Biotechnology) e anti-OCTN2 (MBL- Medical & Biological Laboratories) e lavagem com PBS, procedeu-se à incubação com o anticorpo anti-*rabbit*-PE (Santa Cruz Biotechnology) durante 20 minutos ao abrigo da luz. Realizou-se de seguida uma nova lavagem para remover o excesso de anticorpo secundário, sendo o *pellet* ressuspensado em Facsflow e efectuada a análise descrita anteriormente.

Foram adquiridas 10000 células através do programa CellQuest™ e os dados analisados com recurso ao programa Paint-a-Gate™, sendo estes apresentados em unidade arbitrárias de média de intensidade de fluorescência (MIF) e em percentagem de células positivas para os respectivos transportadores.

#### **2.1.6. Estudos de cinética com Sestamibi**

O estudo de cinética com recurso a radiofármacos permite-nos inferir sobre a funcionalidade dos transportadores que mediam o movimento do composto na célula. O <sup>99m</sup>Tc-Sestamibi entra na célula por transporte passivo e depois para a mitocôndria, a favor do gradiente de potencial electroquímico, tendo em conta o potencial negativo da membrana. Por outro lado, a extrusão deste radiofármaco das células é mediada pelos transportadores da família ABC, entre os quais o ABCB1 (também designado por glicoproteína P (P-gP)) (Maffioli *et al.* 1996). Com o recurso a esta técnica

podemos avaliar a capacidade funcional do transportador P-gP, importante no desenvolvimento de resistência.

#### 2.1.6.1. Estudos de captação com $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi

Os estudos de captação foram realizados quer na linha parental, as células K562, quer nas sublinhas resistentes, as células K562 RC e K562 RD. Para tal, foi adicionado às células  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi (Bristol-Meyers and Squibb) numa actividade de 2 MBq/mL (Abrantes *et al.* 2010). Após a adição, foram retiradas aos 5, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos, alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  da suspensão celular para tubos de *ependorf* que continham solução tampão fosfato (PBS) gelado, de modo a reduzir o metabolismo celular. As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm durante 60 segundos para completa separação entre o *pellet* e o sobrenadante, tendo este sido recolhido para um novo tubo. Seguiu-se uma lavagem do *pellet* com 500  $\mu\text{L}$  de PBS gelado, repetindo-se o procedimento de separação do sobrenadante. Quer os sobrenadantes quer os *pellets* resultantes das centrifugações, foram recolhidos para tubos de *ependorf* devidamente identificados para posterior determinação da percentagem de captação. Após a última colheita, aos 150 minutos, recolheram-se 20  $\mu\text{L}$  da suspensão celular para determinar a viabilidade celular, pelo do método de exclusão do azul de tripano.

#### 2.1.6.2. Determinação da captação dos radiofármacos

Após a incubação das três linhas celulares com o  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi e a recolha separada dos *pellets* e sobrenadantes, foi possível calcular a captação do radiofármaco por parte das células para cada tempo e condição referidas. Para tal, no final do procedimento, todas as fracções (*pellets* e sobrenadantes) foram contadas no contador de poço, sendo então calculada a percentagem de captação de cada radiofármaco pelas células, utilizando a eq. 1.

$$\% \text{ Captação} = \frac{cpm_{\text{pellet}}}{cpm_{\text{pellet+sobrenadante}}} \times 100 \quad \text{eq. 1,}$$

onde cpm (contagens por minuto) corresponde à unidade de cintilação. Após este cálculo, os valores obtidos para a percentagem da captação foram normalizados para  $10^6$  de células.

## **2.2. Avaliação do potencial terapêutico de novos fármacos**

### **2.2.1. Cultura celular**

Para os estudos da avaliação do potencial terapêutico de novos fármacos, quer a linha parental como as linhas celulares resistentes foram mantidas em cultura na ausência de Mesilato de Imatinib, como descrito no ponto 2.1.1. Todos os estudos posteriores foram realizados com uma densidade inicial de  $0,5 \times 10^6$  cel/mL, variando o volume necessário de suspensão celular de acordo com a técnica a aplicar.

### **2.2.2. Incubação das linhas celulares de Leucemia mielóide crónica com fármacos anticancerígenos**

As células K562, K562 RC e K562 RD foram mantidas em cultura, como descrito na secção 2.1 na ausência e na presença de compostos anticancerígenos: o inibidor farnesiltransferase - L-744,832 (5  $\mu$ M a 75  $\mu$ M) (Calbiochem), inibidor do mTOR - Everolimus (5  $\mu$ M a 50  $\mu$ M) (Sigma-Aldrich), modulador da P-gP - Reversina 205 (ENZO) (5  $\mu$ M a 25  $\mu$ M) e com o fármaco convencional Imatinib (Novartis) (10 a 1000  $\eta$ M), durante um período de 72 horas.

### **2.2.3. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio metabólico com resazurina**

Com os estudos de viabilidade celulares é possível avaliar os efeitos citostáticos e citotóxicos exercidos pelos vários compostos nas diferentes linhas celulares, para tal, recorreu-se ao ensaio metabólico com resazurina (Sigma-Aldrich).

O teste metabólico com resazurina avalia a sobrevivência e a proliferação celular através da adição de um indicador redox fluorogénico à cultura. A forma oxidada é a resazurina, composto não fluorogénico de coloração azul escura, que é convertida em resorufina – forma que apresenta uma coloração roxa de elevada fluorescência. Assim, este teste baseia-se na redução enzimática do composto pelas mitocôndrias das células viáveis, existindo uma relação linear entre a fluorescência e a densidade/viabilidade celular. Uma vez que cada linha celular apresenta características metabólicas distintas, é necessário otimizar o teste para cada linha celular individualmente, mais precisamente no que se refere ao tempo de incubação, à diluição da resazurina e à densidade celular (Nakayama *et al.* 1997; Al-Nasiry *et al.* 2007).

A avaliação do efeito citotóxico na linha K562 e nas linhas resistentes foi determinado pelo teste anteriormente descrito, quer em monoterapia, quer em associação simultânea para as condições mencionadas em 2.2.2. As linhas celulares foram incubadas com os vários compostos numa densidade inicial de  $0,5 \times 10^6$  cel/mL durante 72 horas. A cada período de 24 horas de incubação adicionou-se às células um volume de resazurina a 0,1 mg/mL correspondente a 10% do volume de células em estudo. A leitura das absorvâncias nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm foi efectuada num espectrofotómetro leitor de placas (Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek Instruments). O efeito citotóxico foi calculado pela aplicação da eq. 2

$$\text{Actividade metabólica} = \frac{(A_{570}-A_{600})_{\text{Amostra}}-(A_{570}-A_{600})_{\text{Branco}}}{(A_{570}-A_{600})_{\text{controlo}}-(A_{570}-A_{600})_{\text{Branco}}} \times 100 \text{ eq. 2}$$

onde A570 corresponde à absorvância a 570 nm e A600 à absorvância a 600 nm de comprimento de onda. Os resultados de cada ensaio representam a média de 3 leituras, tendo-se realizado 5 ensaios independentes.

#### 2.2.4. Avaliação da morte celular

A avaliação do tipo de morte celular foi efectuada por microscopia óptica, através do estudo das características morfológicas, e por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo.

##### 2.2.4.1. Avaliação da morte celular por microscopia óptica

A morfologia celular, quer da linha parental K562 quer das linhas resistentes nas diferentes condições descritas em anteriormente, foi analisada por microscopia óptica após a realização de esfregaços de células e respectiva coloração de *May-Grünwald-Giemsa* (Sigma-Aldrich) (Houwen 2001).

Assim, para a realização dos esfregaços, procedeu-se à recolha de 50000 células e à sua centrifugação durante 5 minutos a 300 xg. De seguida foram lavadas com PBS, por centrifugação similar à anterior. De forma a melhorar a adesão das células à lâmina, estas foram ressuspensas numa pequena quantidade de Soro Fetal Bovino (FBS) e realizado o esfregaço.

Os esfregaços obtidos foram corados durante 3 minutos com solução de *May-Grünwald* (preparada em 0,3 % de metanol e diluída na proporção de 1:1 com água destilada, aquando da utilização). Seguidamente, adicionou-se solução de *Giemsa* (1 g de corante de *Giemsa* dissolvido em 66 mL de glicerol e 66 mL de metanol, diluído na proporção de 1:8 com água destilada, aquando da utilização) durante 15 minutos. Procedeu-se à lavagem dos esfregaços e, após a secagem, foi analisada a morfologia das células ao microscópio óptico. Para tal, utilizou-se um Microscópio Óptico *Nikon Eclipse 80i* acoplado a uma câmara digital *Nikon Digital Camera DXm 1200F*, que permitiu a aquisição de imagens e o seu processamento no programa *Nikon ACT-1*.

##### 2.2.4.2. Avaliação da morte celular por citometria de fluxo

A morte celular pode ser detectada com aplicação da técnica citometria de fluxo devido à existência de marcadores característicos dos

processos de apoptose e de necrose, como é o caso da anexina V e do iodeto propídeo. Assim, com esta dupla marcação é possível distinguir as células vivas das células mortas e, dentro das últimas, as células em necrose e/ou apoptose (Gorman *et al.* 1997; Bernas *et al.* 2006).

Um acontecimento característico das células em apoptose é a alteração dos fosfolípidos da bicamada lipídica, nomeadamente a transição para o folheto externo de moléculas exclusivas do folheto interno. Quando se desencadeia o processo de morte celular por apoptose ocorre a translocação da fosfatidilserina, um fosfolípido com carga negativa que habitualmente se encontra no folheto interno. A anexina V, quando em presença de cálcio, liga-se com grande afinidade a fosfolípidos com carga negativa, como a fosfatidilserina, permitindo então a determinação das células em apoptose.

O iodeto propídeo (IP) é um composto que tem a capacidade de se intercalar com o ADN de dupla cadeia, emitindo fluorescência. Contudo, a sua entrada só ocorre caso haja perda da integridade da membrana plasmática, característica da necrose. Este fenómeno de ruptura das membranas também pode acontecer numa fase tardia da apoptose. Quando expostas as células a estes dois compostos, torna-se possível distinguir as células viáveis (negativas para a anexina V e IP), as células em apoptose inicial (positivas para anexina V e negativas para IP), as células em necrose (negativas para anexina V e positivas para IP) e as células em necrose/apoptose tardia (positivas para anexina V e IP) (Aubry *et al.* 1999).

Assim, nas várias linhas celulares expostas à presença ou ausência dos compostos anteriormente descritos, foi avaliada a viabilidade e o tipo de morte celular. Para o efeito, recolheu-se o volume equivalente a um milhão de células em suspensão celular e lavou-se com tampão fosfato (PBS) durante 5 minutos a 1000 xg. O *pellet* foi ressuspensão em 100 µL de tampão de ligação frio e incubado com 5 µL de anexina V-FITC e 2 µL de IP, durante 15 minutos ao abrigo da luz de acordo com o descrito no *kit* de detecção de morte celular da Immunotech. Posteriormente, adicionou-se 400 µL de tampão de ligação e realizou-se a análise num citómetro de fluxo FACScalibur equipado com um

laser de árgon. Os comprimentos de onda de excitação foram de 525 nm para a anexina V-FITC e de 640 nm para o IP.

Foram adquiridas 10000 células através do programa CellQuest™ e os dados analisados com recurso ao programa Paint-a-Gate™. Os resultados são apresentados em percentagem de cada uma das populações celulares identificadas com base na positividade e/ou negatividade para a dupla marcação com anexina V e IP.

### **2.2.5. Avaliação da expressão de moléculas envolvidas na morte celular por citometria de fluxo**

A avaliação das moléculas envolvidas em processos de morte celular permite inferir sobre os mecanismos desencadeados pelos vários compostos em estudo. Por citometria de fluxo, e com o recurso a anticorpos monoclonais associados a fluorocromos, foram analisados os níveis de expressão de proteínas pró-apoptóticas FAS, FAS ligando, BAX e Caspases, e da anti-apoptótica, BCL-2. Assim, aproximadamente um milhão de células da linha parental e das sublinhas resistentes incubadas nas condições referidas anteriormente, foram lavadas por centrifugação com PBS pH=7,4 durante 5 minutos a 300 xg.

A expressão dos receptores FAS e do seu ligando é avaliado na superfície da membrana celular. Para tal, as suspensões celulares foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com 1 µg de anticorpo anti-FAS FITC (R&D) e 1 µg de anticorpo anti-FAS Ligando PE (Santa Cruz Biotechnology). Após o período de incubação com os anticorpos, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 300 xg durante 5 minutos e ressuspensas em 400 µL do mesmo tampão.

A avaliação da expressão intracelular de BCL-2 e BAX requer a fixação e permeabilização das células a analisar. De acordo com as instruções do fabricante do *kit* IntraCell (ImunnoStep), as células foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com 100 µL de solução de fixação. Após uma lavagem, as células foram incubadas em 100 µL

de solução de permeabilização, 1 µg de anticorpo anti-BCL2 FITC (Santa Cruz Biotechnology) e 1 µg de anticorpo anti-BAX PE (Santa Cruz Biotechnology), durante 15 minutos ao abrigo da luz. Finalmente, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 300 xg durante 5 minutos e ressuspensas em 400 µL do mesmo tampão.

Os níveis de caspases foram avaliados por um *kit* de detecção intracelular de caspases, ApoStat (R&D systems). Após a lavagem inicial das células, estas foram ressuspensas em 1 ml de PBS e incubadas com 10 µL de ApoStat, durante 30 minutos a 37°C. Seguidamente, as células foram lavadas em 4 ml de PBS por centrifugação a 300 xg durante 5 minutos e ressuspensas em 500 µL do mesmo tampão.

A detecção foi efectuada por citometria de fluxo usando o equipamento já descrito anteriormente. Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média de expressão das moléculas em análise nas células em estudo incubadas na ausência e na presença dos vários compostos. Os resultados representam a média ± desvio padrão (DP) de 3 ensaios independentes.

## **2.2.6. Avaliação de moléculas envolvidas no mecanismo de acção dos Fármacos**

### **2.2.6.1. Avaliação intracelular da expressão de laminas**

As laminas são moléculas que para serem activadas requerem a acção da enzima farnesiltransferase. Esta enzima transforma as prelaminas em laminas, sendo esta acção bloqueada pela presença dos inibidores farnesiltransferase. A análise da expressão das laminas na ausência e na presença do inibidor L-744,832 por citometria de fluxo permite inferir relativamente à actuação do composto sobre os seus alvos moleculares.

Assim, aproximadamente um milhão de células da linha parental e das sublinhas resistentes incubadas nas condições referidas anteriormente, foram lavadas por centrifugação com PBS pH=7,4 durante 5 minutos a 300 xg. Seguidamente, as suspensões celulares foram incubadas durante 15 minutos

à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com 100  $\mu\text{L}$  de solução de fixação. Após uma lavagem, as células foram incubadas em 100  $\mu\text{L}$  de solução de permeabilização e 1  $\mu\text{g}$  de anticorpo anti-laminas PE (Santa Cruz Biotechnology), durante 15 minutos ao abrigo da luz. Por último, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 300 xg durante 5 minutos e ressuspensas em 400  $\mu\text{L}$  do mesmo tampão. Os resultados são expressos em MIF e representam a média de expressão intracelular de laminas nas células em estudo incubadas na ausência e na presença dos L-744,832. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP) de 3 ensaios independentes.

#### **2.2.6.2. Avaliação intracelular da expressão de ciclina D1**

Alguns autores defendem que o Everolimus tem capacidade de interferir com o ciclo celular uma vez que bloqueia uma das vias de sinalização envolvidas na proliferação e progressão do ciclo celular. A avaliação da expressão de moléculas reguladoras deste processo celular permite analisar o efeito do composto no ciclo celular das células.

Assim, procedeu-se à análise por citometria de fluxo da expressão intracelular da ciclina D1, uma das proteínas envolvidas na passagem da fase G1 para S, na ausência e na presença de Everolimus. Como descrito anteriormente, procedeu-se à fixação e permeabilização das células utilizando o *kit* comercial IntraCell (ImunnoStep). Seguidamente, as células foram incubadas com 1  $\mu\text{g}$  de anticorpo anti-ciclina D1 PE (Santa Cruz Biotechnology), durante 15 minutos ao abrigo da luz, lavadas com PBS por centrifugação a 300 xg durante 5 minutos e ressuspensas em 400  $\mu\text{L}$  do mesmo tampão. Após a detecção por citometria de fluxo (no equipamento já descrito) os resultados são apresentados em MIF e representam a média de expressão intracelular de ciclina D1 nas células, nas condições descritas.

#### **2.2.6.3. Avaliação intracelular da expressão de glutatião reduzido**

A análise da expressão do glutatião reduzido (GSH), uma defesa antioxidante não enzimática, utilizada no co-transporte de alguns fármacos,

foi efectuada por citometria de fluxo utilizando o composto fluorescente alaranjado de mercúrio (1-(4-Chloromercuriophenylazo)-2-naphthol). Esta formulação corresponde a um composto mercurial que se liga estequiometricamente aos grupos sulfidril, com formação de ductos fluorescentes. No entanto, este composto reage mais rapidamente com o GSH (reacção ocorre em aproximadamente 5 minutos) do que com os grupos sulfidril das proteínas (tempo de reacção superior a 8 horas). Com base neste princípio, foi desenvolvida uma técnica que permite a determinação de GSH por citometria de fluxo utilizando o alaranjado de mercúrio, uma vez que o produto da reacção com a GSH emite intensa fluorescência vermelha quando excitado com um laser de árgon (O'Connor *et al.* 1988).

Para o efeito, aproximadamente um milhão de células da linha parental e das sublinhas resistentes incubadas na ausência e na presença de Reversina 205, foram lavadas por centrifugação com PBS pH=7,4 durante 5 minutos a 300 xg e posteriormente ressuspensas 1 mL do mesmo tampão. Seguidamente, as suspensões celulares foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com 4 µL de alaranjado de mercúrio (Sigma-Aldrich), preparado em acetona a 10 mM, de modo a se obter uma concentração final de 40 µM. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 300 xg durante 5 minutos e ressuspensas em 400 µL do mesmo tampão. A detecção foi efectuada no comprimento de onda de excitação de 620 nm, por citometria de fluxo. Os resultados são expressos em MIF e representam a média de expressão intracelular de GSH nas células incubadas nas condições do estudo. Os resultados representam a média ± desvio padrão (DP) de 3 ensaios independentes.

### 2.3. Análise estatística

Para a determinação dos respectivos IC<sub>50</sub> dos vários compostos, foi aplicada uma regressão não linear logística aos dados relativos às 48 horas de exposição. A avaliação de diferenças entre os IC<sub>50</sub> das diferentes linhas celulares em estudo foi determinada pela aplicação do teste *t-Student*.

Na análise estatística dos níveis de expressão dos transportadores membranares recorreu-se a análises de variância (ANOVA de uma via) e sempre que necessário aplicados testes de comparações múltiplas. O teste de Dunnett foi aplicado para efectuar as comparações com a condição controlo e o teste de Tukey para a comparação entre todas as condições em estudo.

O efeito das associações entre os vários compostos foi determinado pela aplicação do método Chou-Talalay (Chou and Talalay 1984; Chou 1991), através do cálculo do índice de combinação (CI; eq. 3)

$$CI = \sum_{j=1}^n \frac{(D)_j}{(EDx)_j} \quad \text{eq. 3}$$

na qual, D representa a dose do fármaco na combinação e EDx o efeito da dose do fármaco isolado. Valores de CI menores, iguais ou superiores a 1 representam respectivamente efeito sinérgico, aditivo ou antagonista entre os compostos. Dentro de cada um dos efeitos foram criadas sub-categorias de forma a melhor descrever a relação entre os compostos (Tabela 4)

Os resultados foram analisados utilizando o software GraphPad 5.0 e Microsoft Excel, sendo que em todas as análises efectuadas se considerou um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ). Os dados são apresentados sobre a forma de média  $\pm$  desvio padrão.

**Tabela 4 - Intervalos de valores do índice de combinação (CI)**

<i>Intervalos de CI</i>	<i>Descrição</i>
< 0,1	Sinérgismo muito forte
0,1 – 0,3	Sinérgismo forte
0,3 – 0,7	Sinérgismo
0,7 – 0,85	Sinérgismo moderado
0,85 - 0,9	Sinérgismo ligeiro
0,9 – 1,1	Aditivo
1,1-1,2	Antagonismo ligeiro
1,2 - 1,45	Antagonismo moderado

(adaptado de Chou 1987)

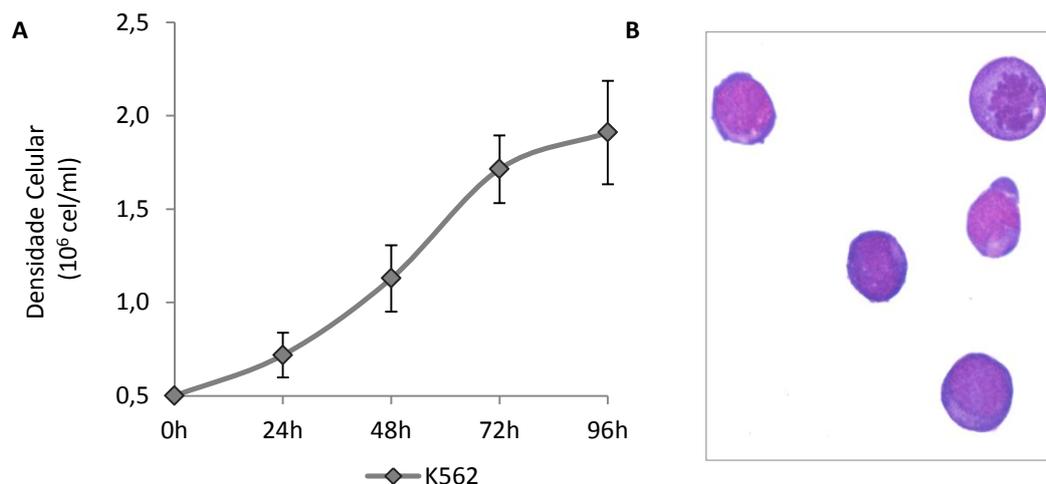
## ***Capítulo 3. Resultados***



### 3.1. Caracterização de células sensíveis e resistentes ao Imatinib

#### 3.1.1. Caracterização da linha celular K562 sensível ao Imatinib

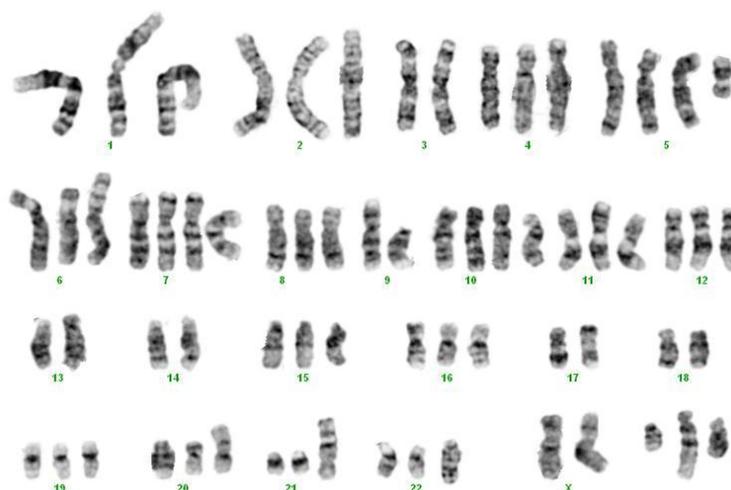
No presente estudo foi utilizada a linha celular humana K562 obtida a partir de líquido pleural de uma doente do sexo feminino, com 53 anos de idade, diagnosticada com Leucemia mielóide crónica em crise blástica. Estas células crescem em suspensão, quando mantidas em cultura num meio nutritivo e à temperatura de 37°C, em atmosfera humedecida, com 5% de CO<sub>2</sub>, de acordo com o perfil representado na figura 14-A. A fase exponencial de crescimento decorre ao longo de 72 horas, após a qual estas células entram em fase estacionária. A densidade celular observada nas células K562, durante a fase exponencial, duplica a cada 40 horas até a um máximo aproximado de  $1,9 \times 10^6$  células/mL



**Figura 14 - Curva de crescimento e aspecto morfológico das células K562.** Em (A) está representada a curva de crescimento das células K562 incubadas nas condições óptimas de crescimento ( $0,5 \times 10^6$  células por mL em meio RPMI 10% FBS). A cada 24h foi determinada a densidade celular pela técnica de azul de tripano, sendo que os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes. Em (B) estão representadas as características morfológicas das células, após a coloração de *May-Grünwald-Giemsa* e visualização por microscopia óptica com ampliação de 500x.

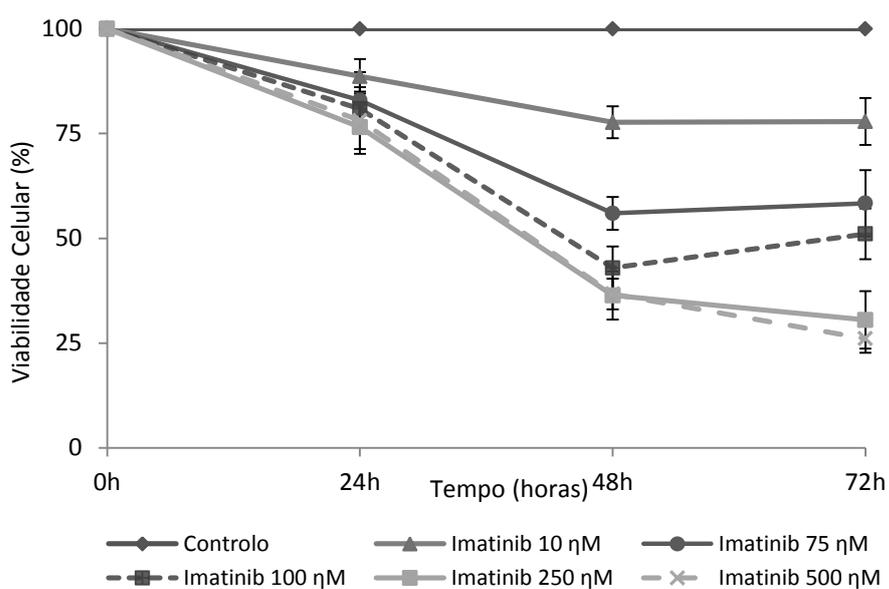
Morfologicamente, as células K562 apresentam características típicas de Leucemia mielóide crónica em crise blástica, nomeadamente a presença de células imaturas com citoplasma basófilo, elevada relação núcleo/citoplasma e presença de nucléolos (Figura 14-B). Através da análise citogenética,

realizada pela técnica *G-banding*, pode verificar-se pela observação do cariógrama que a linha celular K562 é essencialmente triplóide (Figura 15).



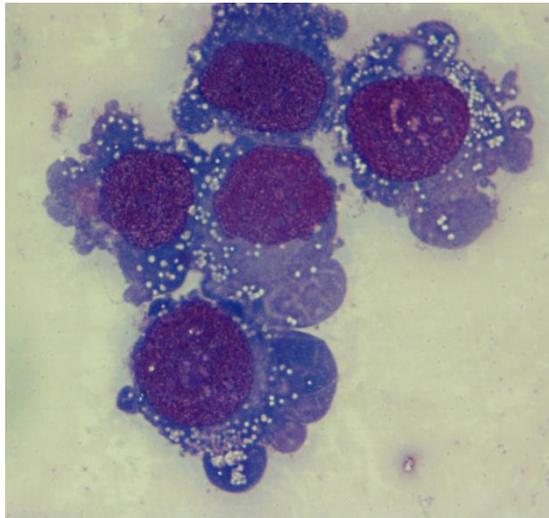
**Figura 15 - Cariograma das células K562 por análise citogenética de *G-banding*.** Análise das metáfases das células K562 revelou um cariótipo essencialmente triplóide. Os três últimos cromossomas não foram possíveis classificar, sendo necessária a aplicação de outras técnicas.

De seguida, avaliou-se nas células K562 o efeito do Imatinib, um inibidor de TK utilizado na terapêutica convencional da LMC. Como verificado na figura 16, a dose de Imatinib necessária para reduzir a viabilidade celular em 50%, o IC<sub>50</sub>, é de aproximadamente 75  $\eta$ M após 48 horas de exposição. No entanto, observa-se que este efeito é dependente da concentração e do tempo de incubação do composto.



**Figura 16 – Efeito do Imatinib na viabilidade das células K562.** As células foram incubadas numa densidade inicial de  $0,5 \times 10^6$  células/mL, na ausência (controlo) e na presença de concentrações crescentes de Imatinib, durante 72 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo método de resazurina, sendo os resultados expressos em percentagem (%) representando a média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes.

Posteriormente, foi avaliado se os efeitos do Imatinib na redução da viabilidade das células sensíveis ao Imatinib eram mediados por mecanismos de morte celular programada. Pela avaliação da morfologia da célula, verificou-se um aumento da vacuolização das células, característica típica de autofagia, e a presença de *blebbing* típico de apoptose (Figura 17).



**Figura 17 - Aspecto morfológico das células K562 expostas a 100 $\eta$ M de Imatinib.** O aspecto morfológico foi avaliado, após a coloração *May-Grünwald-Giemsa*, por microscopia óptica com ampliação de 500x. As formações ao nível da membrana celular, designadas por *blebbings*, confirmam o fenómeno de morte celular por apoptose e a maior vacuolização sugere autofagia.

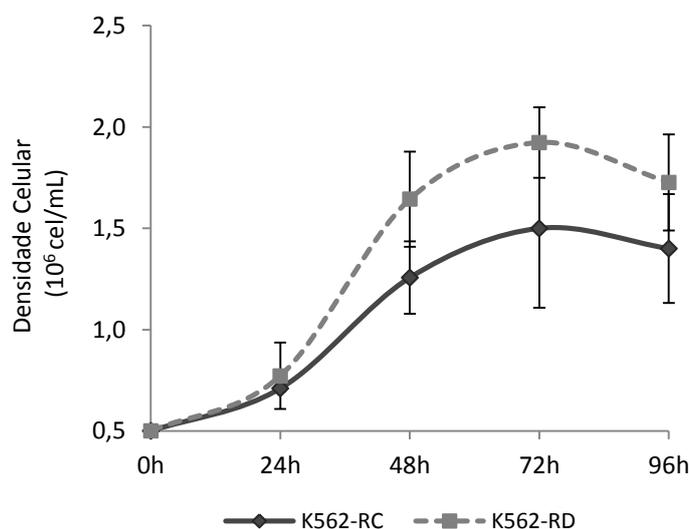
### 3.1.2. Caracterização das linhas celulares resistentes

A indução de resistência ao Mesilato de Imatinib foi realizada a partir da linha celular parental K562, tendo sido aplicadas duas estratégias distintas: a resistência contínua (K562 RC) e a resistência descontínua (K562 RD).

As sublinhas celulares resistentes, K562 RC e K562 RD, apresentam as mesmas condições de crescimento da linha celular parental, mas com suplemento de 250  $\eta$ M de Imatinib. O perfil de crescimento entre as sublinhas resistentes é ligeiramente distinto, apresentado a sublinha descontínua um crescimento mais acentuado (Figura 18). Assim, a fase exponencial de crescimento decorre ao longo de 72 horas, após a qual estas células entram em fase estacionária. A densidade celular observada nas células resistentes k562 RC, durante a fase exponencial, duplica a cada 36h até um máximo de

$1,5 \times 10^6$  células/mL, aproximadamente. Na sublinha K562 RD a densidade celular duplica a cada 30h, para um máximo de  $2,0 \times 10^6$  células/mL.

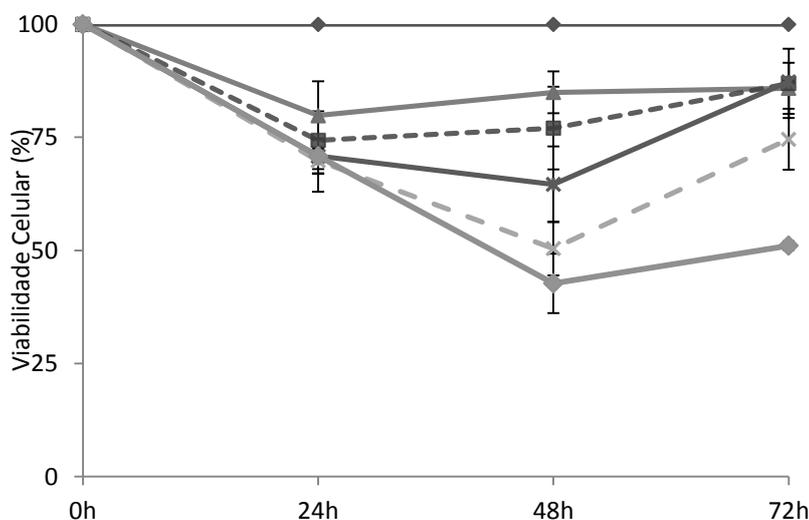
Em termos morfológicos, as células resistentes apresentam as mesmas características observadas na linha celular sensível, compatíveis com a patologia de LMC em crise blástica.



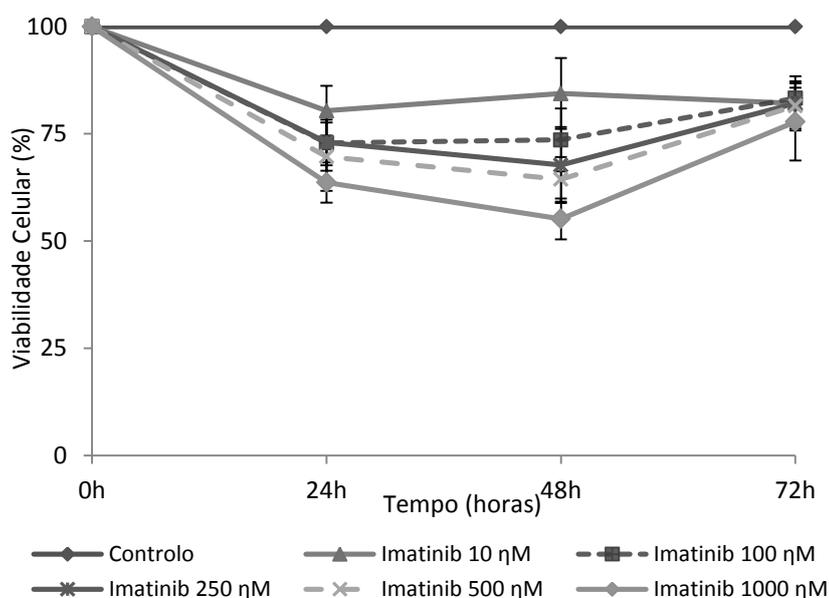
**Figura 18 - Curva de crescimento das sublinhas de K562 resistentes ao Imatinib.** As células resistentes, K562-RC e K562-RD, foram incubadas nas condições óptimas de crescimento ( $0,5 \times 10^6$  células por mL em meio RPMI 10% FBS acrescidas de 250 nM de Imatinib). A cada 24h foi determinada a densidade celular pela técnica de azul de tripano, sendo que os resultados se encontram expressos em nº de células  $\times 10^6$  cel/mL e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes

Para comprovar a resistência ao Imatinib, foi efectuada nas sublinhas resistentes a curva dose resposta para este inibidor TK (Figura 19). Assim, o efeito citotóxico é mais acentuado após 48 horas de exposição, sendo este revertido às 72 horas em ambas as sublinhas resistentes e contrariamente ao verificado na linha celular sensível. Assim, as K562 RC requerem uma dose de Imatinib superior à das células K562 para atingir uma redução na viabilidade de 50%, sendo o  $IC_{50}$  de 605  $\eta$ M de Imatinib após 48 horas de incubação (Figura 19-A). O mesmo acontece nas células K562 RD, em que a o  $IC_{50}$  só é atingido quando as células são expostas a uma dose de Imatinib de 1389  $\eta$ M (Figura 19-B).

### A - K562 RC



### B - K562 RD



**Figura 19 - Efeito do Imatinib na viabilidade das sublinhas K562 resistentes ao Imatinib.** As células foram incubadas numa densidade inicial de  $0,5 \times 10^6$  células/mL, na ausência (controlo) e na presença de doses crescentes de Imatinib, durante 72 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo método de resazurina, sendo os resultados expressos em percentagem (%) e representando a média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes.

Deste modo, o grau de resistência pode ser quantificado pela comparação entre os  $IC_{50}$  das várias linhas, consistindo no número de vezes que é necessário aumentar a dose administrada nas sublinhas resistentes, em relação à das células da linha parental para se atingir o mesmo efeito. Assim, as K562 RC requerem uma dose de Imatinib 8 vezes superior às células K562 e

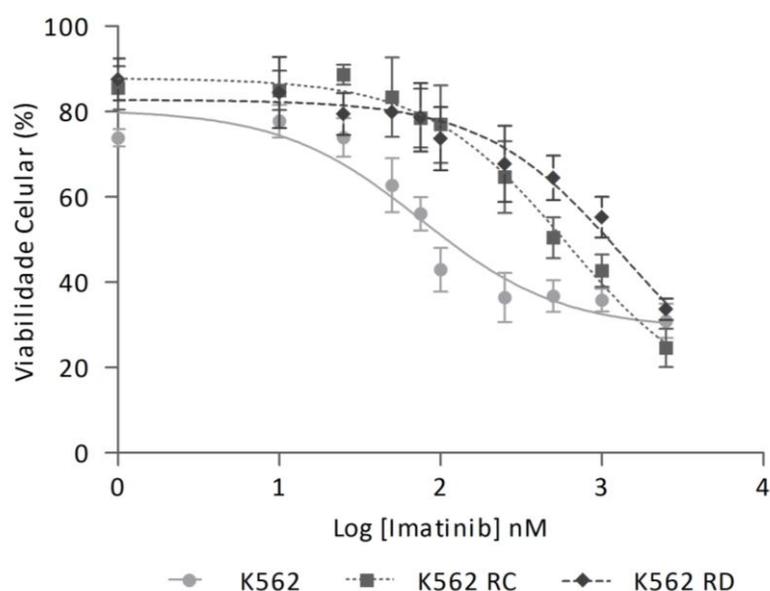
nas células K562 RD esta dose encontra-se 18,4 vezes aumentada. Como tal, as duas estratégias de exposição ao composto resultaram em diferentes graus de resistência, sendo as diferenças estatisticamente significativas comparativamente com a linha parental, como representado na Tabela 5.

**Tabela 5 - Sensibilidade e Resistência ao Imatinib nas linhas celulares de LMC**

	IC <sub>50</sub> Imatinib	Resistência	Teste <i>t</i>	Valor <i>p</i>
<b>K562</b>	75 ηM	n.a	n.a	n.a
<b>K562 RC</b>	605 ηM	8,0 x	$t_{(18)}=4,94$	$p<0,0001$
<b>K562 RD</b>	1389 ηM	18,4 x	$t_{(18)}=5,22$	$p<0,0001$

n.a.- não aplicável

A comparação do efeito citotóxico do Imatinib nas várias linhas celulares de LMC com diferentes sensibilidades ao Imatinib está expressa na figura 20. Como se observa pela figura, para doses mais baixas de composto, as células K562 RC apresentam viabilidade superior comparativamente com a sublinha RD. Contudo, este comportamento inverte-se para doses mais elevadas, sendo menos sensíveis as células K562 RD. Pelo contrário, as células da linha parental, K562, são muito sensíveis mesmo para doses inferiores às utilizadas para as linhas resistentes.

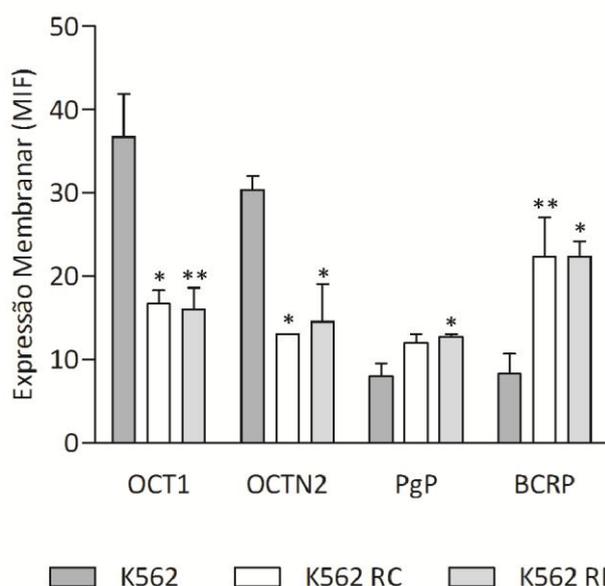


**Figura 20 - Comparação entre o efeito do Imatinib na viabilidade às 48 horas nas linhas celulares de LMC.** As células foram incubadas numa densidade inicial de  $0,5 \times 10^6$  células/mL, na ausência e na presença de diferentes concentrações de Imatinib. As curvas representam a regressão não linear que melhor traduz o comportamento de cada uma das linhas celulares face a doses crescentes de Imatinib.

### 3.1.3. Expressão de transportadores de influxo e efluxo

A resistência à quimioterapia é frequentemente associada a alterações no perfil de expressão de transportadores membranares envolvidos no transporte de inúmeros fármacos. Recorrendo à técnica de citometria de fluxo foi possível avaliar os padrões de expressão dos transportadores de influxo (OCT1 e OCTN2) e de efluxo (P-gP e BCRP) ao nível da membrana celular, quer nas células sensíveis quer nas células resistentes ao Imatinib.

Nas sublinhas celulares de K562 resistentes ao Imatinib, as células K562 RC e RD, observou-se uma diminuição acentuada nos níveis de expressão dos transportadores de influxo, OCT1 e OCTN2, quando comparado com a linha sensível, as células K562 (Figura 21). De facto, o OCT1 tem uma expressão de aproximadamente  $36,7 \pm 8,9$  MIF na linha celular K562, sendo este valor reduzido em aproximadamente 50% nas linhas resistentes K562 RC ( $16,7 \pm 2,8$  MIF,  $p < 0,05$ ) e K562 RD ( $16,0 \pm 5,2$  MIF,  $p < 0,01$ ). O mesmo padrão de alterações foi observado para o OCTN2, com uma expressão de  $30,3 \pm 8,9$  MIF nas K562, de  $13,0 \pm 0,0$  MIF nas K562 RC e de  $14,5 \pm 9,0$  MIF nas K562 RD (Figura 21). As diferenças entre os níveis de expressão são estatisticamente significativas (OCT1:  $F_{(2,7)}=11,78$ ,  $p=0,006$ ; OCTN2:  $F_{(2,7)}=7,68$ ,  $p=0,017$ ; P-gP:  $F_{(2,6)}=5,55$ ,  $p=0,043$ ; BCRP:  $F_{(2,4)}=21,66$ ,  $p=0,007$ ).

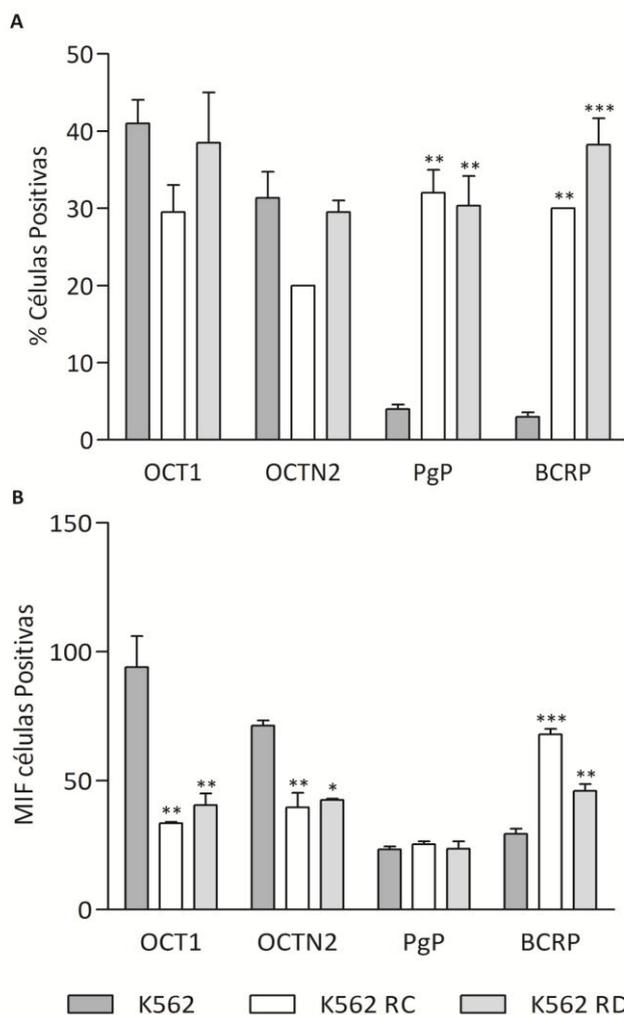


**Figura 21 - Expressão membranar de transportadores de influxo e efluxo.** A expressão membranar de OCT1, OCTN2, P-gP e BCRP encontra-se expressa em média de intensidade de fluorescência (MIF) total nas várias linhas celulares. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efectuada por comparação com a linha celular parental, utilizando o teste de Tuckey, sendo \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ .

O padrão de expressão dos transportadores de efluxo é inverso ao observado para os transportadores de influxo, verificando-se um aumento de expressão nas sublinhas resistentes. A linha celular sensível não expressa glicoproteína P (P-gP),  $8,0 \pm 2,6$  MIF, enquanto nas células K562 RC e K562 RD a expressão de P-gP aumenta para  $12,0 \pm 1,7$  e  $12,7 \pm 0,6$  MIF, respectivamente (Figura 21). No entanto, apenas entre as linhas K562 e a K562 RD as diferenças têm significado estatístico ( $p < 0,05$ ). Além da P-gP, o outro transportador de efluxo que foi avaliado foi a BCRP. Esta proteína tem uma expressão de  $10,5 \pm 2,1$  MIF nas K562, de  $27,0 \pm 1,4$  MIF nas K562 RC e de  $22,3 \pm 3,2$  MIF K562 RD (Figura 21). Este aumento da expressão é significativo entre a linha celular sensível e as sublinhas resistentes- K562 RC ( $p < 0,01$ ) e K562 RD ( $p < 0,05$ ).

Além dos níveis de expressão, é possível determinar em cada uma das linhas celulares em estudo a percentagem de células que expressam os transportadores avaliados (células positivas) (Figura 22-A) e os MIF desta população positiva para as moléculas em estudo, sendo os MIF a medida proporcional ao número de moléculas por células (Figura 22-B).

No que respeita aos transportadores de influxo, não existem diferenças significativas entre a percentagem de células que expressam OCT1 e OCTN2 nas diferentes linhas (OCT1:  $F_{(2,4)}=2,00$ ,  $p=0,25$ ; OCTN2:  $F_{(2,4)}=4,50$ ,  $p=0,095$ ). Contudo, verificam-se diferenças entre os níveis de moléculas presentes na população de células positivas (OCT1:  $F_{(2,3)}=75,36$ ,  $p=0,003$ ; OCTN2:  $F_{(2,5)}=19,99$ ,  $p=0,004$ ). Os níveis de OCT1 diminuem consideravelmente nas sublinhas resistentes, uma vez que as células sensíveis que expressam este transportador têm  $105,5 \pm 9,2$  MIF, comparativamente com os  $33,5 \pm 0,7$  MIF detectados nas células K562 RC ( $p < 0,01$ ) e os  $40,5 \pm 6,4$  MIF nas células K562 RD ( $p < 0,01$ ). A mesma situação ocorre para o OCTN2, embora a diminuição seja menos acentuada,  $39,7 \pm 9,8$  MIF nas K562 RC ( $p < 0,01$ ) e  $42,50 \pm 0,7$  MIF nas K562 RD ( $p < 0,05$ ), face aos níveis encontrados nas K562 ( $71,3 \pm 3,5$  MIF).



**Figura 22 - Percentagem de células que expressam transportadores de influxo e efluxo e respectivos MIF.** Em (A) a percentagem de células positivas para o transportador em estudo. Em (B) a expressão membranar dos transportadores nas células positivas encontra-se expressa MIF, medida proporcional ao número de moléculas reconhecidas pelo anticorpo, nas várias linhas celulares. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efectuada por comparação com a linha celular parental, utilizando o teste de Tuckey, sendo \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

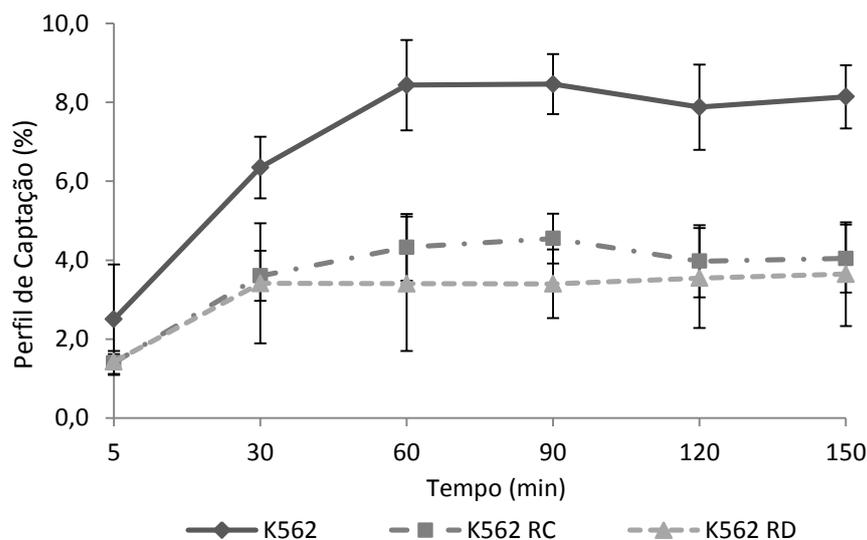
Nos transportadores de efluxo verifica-se um aumento significativo na percentagem de células que expressam P-gP e BCRP (Figura 22-A) (P-gP:  $F_{(2,5)}=31,52$ ,  $p=0,002$ ; BCRP:  $F_{(2,5)}=49,85$ ,  $p < 0,001$ ). Assim, na linha parental apenas 4% das células expressam P-gP e 3% BCRP. Comparativamente, a sublinha K562 RC apresenta 32% de células a expressar P-gP e 31,5% para a BCRP, sendo as diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com a linha sensível ( $p < 0,01$ ). As diferenças entre a sublinha K562 RD e a linha K562 são similares ao verificado anteriormente, sendo que 30,3% da células expressam Pg-P ( $p < 0,01$ ) e 40% BCRP ( $p < 0,001$ ). Além das diferenças em

termos percentuais, observa-se ainda diferenças nos níveis de expressão (MIF) do transportador BCRP (BCRP:  $F_{(2,6)}=73,06$ ,  $p<0,001$ ). De facto, enquanto os 3% de células positivas para o BCRP na população sensível apresentam uma média de intensidade de fluorescência de  $29,3 \pm 3,5$ , estes valores aumentam para  $68,0 \pm 3,6$  nas K562 RC e para  $46,0 \pm 4,6$  MIF nas K562 RD. Estas diferenças são estatisticamente significativas não só entre a linha sensível e as células K562 RC ( $p<0,001$ ) e as K562 RD ( $p<0,01$ ), como entre as sublinhas resistentes ( $p<0,01$ ).

#### 3.1.4. Estudos de cinética com Sestamibi

Os estudos com o radiofármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi permite-nos determinar qual a capacidade das células captarem o composto ao longo do tempo. O radiofármaco em uso entra na célula por difusão passiva e volta para o ambiente extracelular, quando exportado por acção de transportadores de efluxo, como a P-gP. Assim, este perfil de captação foi determinado para a linha parental e para as sublinhas resistentes (Figura 23). Como se pode observar na figura 23 verifica-se um pico de captação aos 60 minutos, sendo que a este tempo as células K562 captam aproximadamente 8% do radiofármaco. Comparativamente com a linha celular sensível, o perfil de captação das sublinhas resistentes apresenta valores de captação mais reduzidos em todos os tempos avaliados, correspondendo a metade da percentagem de captação aos 60 minutos ( $\approx 4\%$ ). As alterações entre o perfil de captação das sublinhas resistentes face ao das células K562 são estatisticamente significativas (K562 RC  $t_{(14)}=8,22$ ,  $p<0,001$  e nas K562 RD  $t_{(12)}=6,24$ ,  $p<0,001$ ).

A forma de desenvolvimento de resistência não parece influenciar o perfil de captação, uma vez que as células obtidas pelos dois esquemas de resistência revelam um comportamento bastante similar, sendo que nas células K562 RC o pico de captação é de 4,3% e 3,5% nas K562 RD aos 60 minutos.



**Figura 23 - Perfil de captação do radioligando  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi nas várias linhas celulares.** As células foram incubadas com o radioligando durante 150 minutos, sendo determinada a percentagem de captação de cada uma das linhas nos tempos indicados. Os resultados encontram-se expressos em percentagem (%) e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes.

### 3.2. Avaliação do potencial terapêutico de novos fármacos

O conhecimento sobre as vias de sinalização directamente afectadas pela presença da oncoproteína BCR-ABL proporciona a possibilidade de utilização de novos fármacos na LMC. Neste trabalho foram estudados três compostos distintos, nomeadamente os inibidores de vias de sinalização RAS/MAPK e mTOR: o inibidor farnesiltransferase (L-744,832) e o inibidor do mTOR (Everolimus); e a Reversina 205 como inibidor do transportador de efluxo P-gP, nas linhas celulares sensíveis e resistentes ao Imatinib. Para cada um dos compostos foram avaliados dois parâmetros distintos: o efeito na viabilidade celular e o tipo de morte celular induzida.

#### 3.2.1. Inibidores de vias de sinalização RAS/MAPK e PI3K/mTOR

##### 3.2.1.1. Inibidor farnesiltransferase

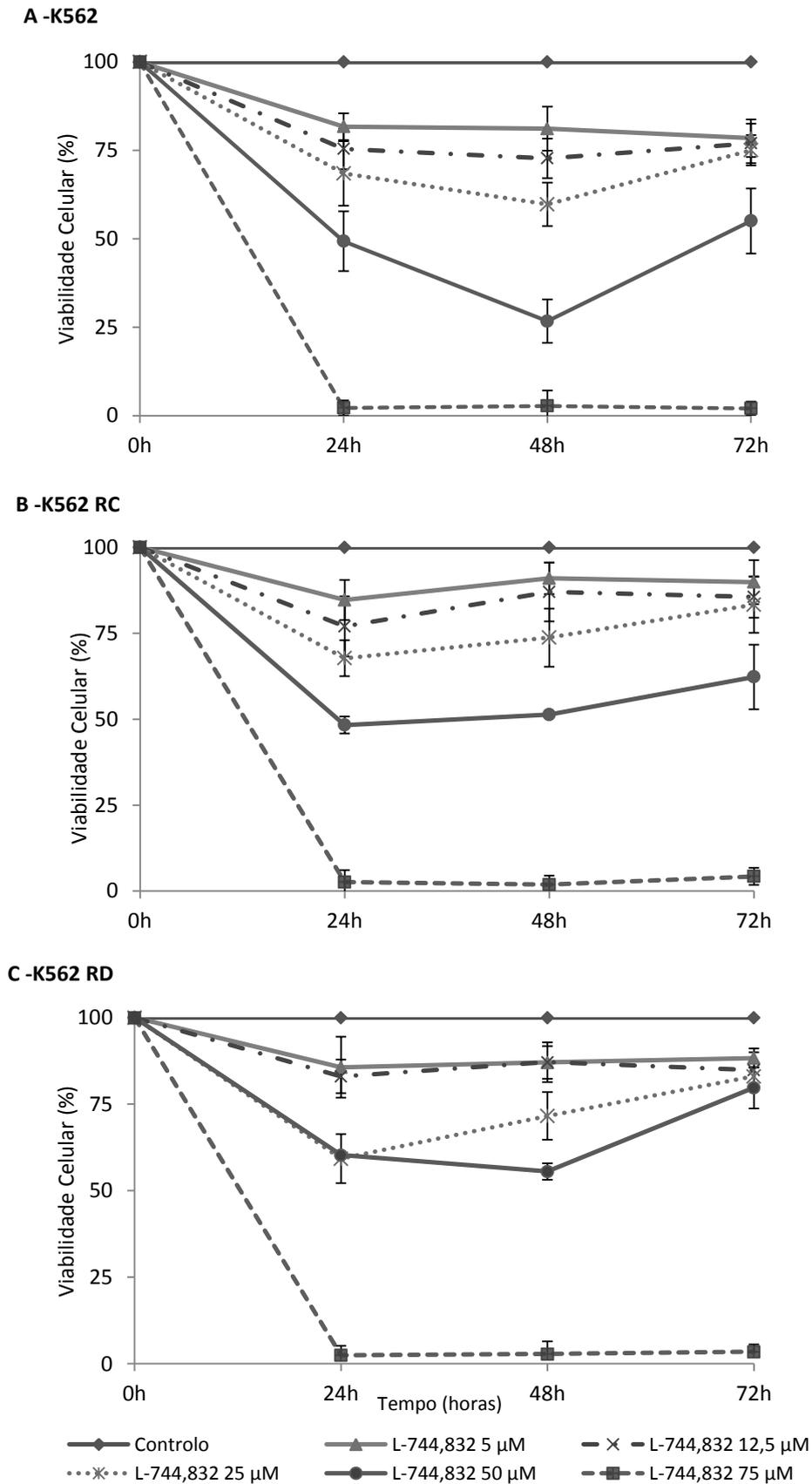
O efeito do composto L-744,832 na linha celular sensível e nas sublinhas resistentes foi determinado pelo método da resazurina, para o qual as células K562, K562 RC e K562 RD foram incubadas com doses crescentes de

L-744,832 (entre 5 $\mu$ M e 75 $\mu$ M) durante diferentes tempos de exposição. A figura 24 ilustra o efeito das doses crescentes na viabilidade celular. Assim, para cada uma das linhas celulares em estudo, o L-744,832 tem um efeito na viabilidade celular dependente da concentração e do tempo de exposição. Contudo, após as 48 horas de exposição, verifica-se que os efeitos são revertidos, tanto na linha celular sensível como nas sublinhas resistentes.

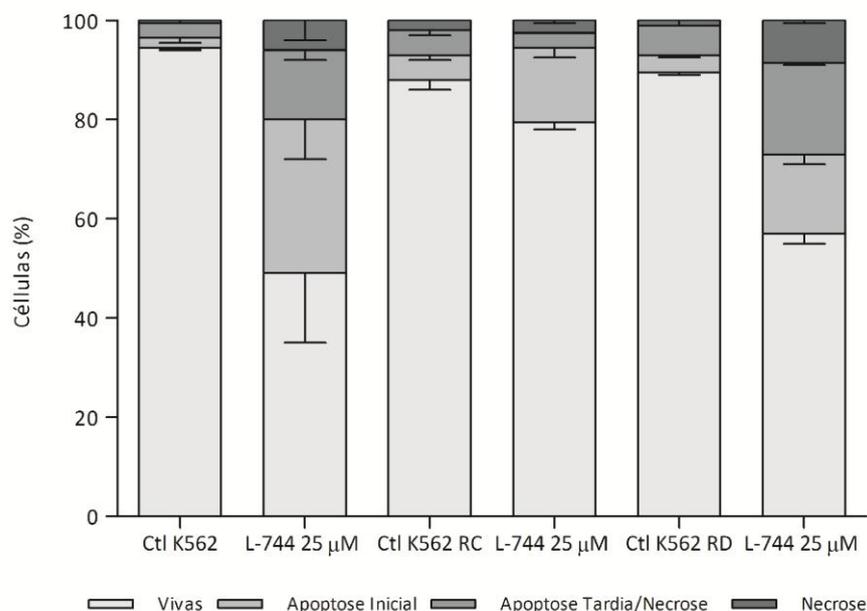
Com o recurso a modelos de regressão não linear logística, aplicados aos dados recolhidos nas curvas dose resposta, determinaram-se os IC<sub>50</sub> de cada uma das linhas. A linha celular K562 apresenta uma redução de 50% na sua viabilidade celular quando exposta a 35,4  $\mu$ M de L-744,832, após um período de 48 horas de incubação (Figura 24-A). As sublinhas resistentes requerem uma dose mais elevada para alcançar o IC<sub>50</sub>, sendo este de 52,0  $\mu$ M no caso das K562 RC e de 53,4  $\mu$ M para as K562 RD (Figura 24-B/C). Apesar das diferenças entre as dose requeridas por cada uma das linhas celulares para atingir o IC<sub>50</sub> às 48 horas, estas não são estatisticamente significativas.

## Resultados | 62

Além do possível efeito anti-proliferativo (citostático), os fármacos anticancerígenos podem ter ainda um efeito citotóxico que promove morte celular. Assim, por citometria fluxo com aplicação da dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo podem identificar-se as diferentes populações de células vivas e mortas, e dentro destas últimas em quais ocorreu morte celular por apoptose e/ou necrose. Após a incubação de 48 horas com L-744,832, verificou-se sobretudo morte celular por apoptose (Figura 25), que foi comprovada pela análise por microscopia óptica (Figura 26).

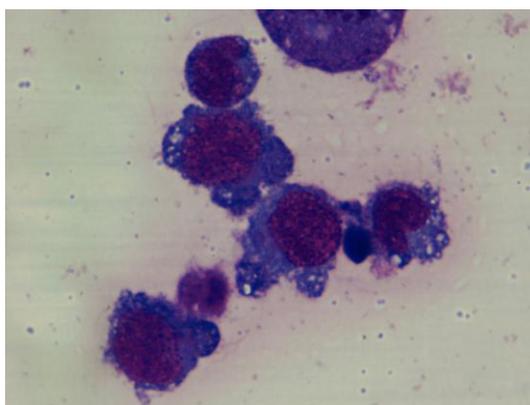


**Figura 24 - Efeito do L-744,832 na viabilidade das células K562 e sublinhas resistentes.** As células foram incubadas numa densidade inicial de  $0,5 \times 10^6$  células/mL, na ausência e na presença de doses crescentes de L-744,832, durante 72 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo método de resazurina, sendo os resultados expressos em percentagem (%) representando a média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes.



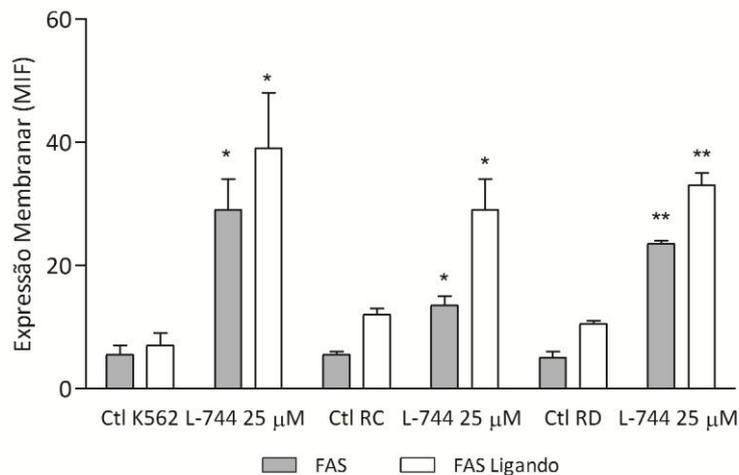
**Figura 25 - Avaliação do efeito citotóxico de 25µM de L-744,832 nas células K562, K562 RC, K562 RD por citometria de fluxo.** As células foram incubadas numa densidade inicial de  $0,5 \times 10^6$  células/mL, durante 48h na ausência (Ctl) e na presença de 25µM de L-744,832 (L-744), e posteriormente marcada com anexina V e iodeto de propídeo. Os resultados são expressos em percentagem (%) e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes.

A análise por microscopia óptica revelou a presença de alterações morfológicas condizentes com o processo apoptótico, como a contração nuclear e as projecções ao nível da membrana plasmática (Figura 26).



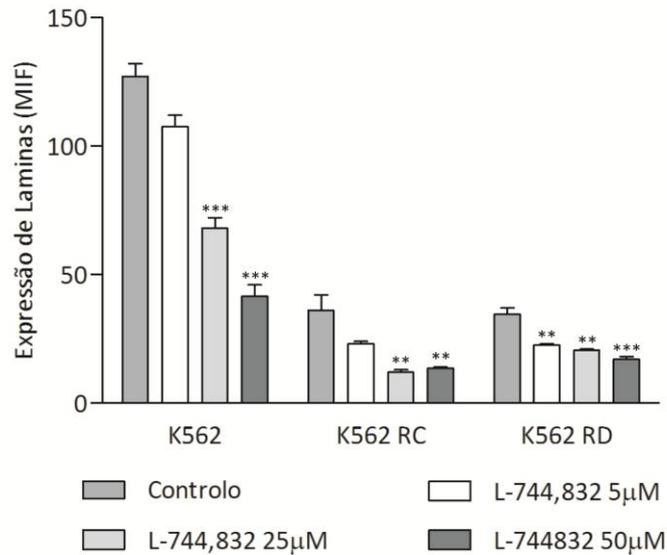
**Figura 26 - Aspecto morfológico de células K562 tratadas com 50 µM de L-744,832.** O aspecto morfológico foi avaliado, após a coloração *May-Grünwald-Giemsa*, por microscopia óptica com ampliação de 500x. As formações ao nível da membrana celular, designadas por *blebbings*, confirmam o fenómeno de morte celular por apoptose.

De forma a inferir sobre quais as vias apoptóticas envolvidas na citotoxicidade induzida pelo inibidor da farnesiltransferase, foram analisadas várias moléculas marcadoras destes processos. Em particular para o L-744,832 destaca-se o aumento da expressão do receptor FAS e do seu ligando nas células tratadas com 25 $\mu$ M de L-744,832, sugerindo que a via mais activa no processo de morte celular é a via extrínseca da apoptose (Figura 27).



**Figura 27 - Expressão membranar de FAS e respectivo ligando na ausência e na presença de L-744,832.** A expressão membranar de FAS e FAS ligando encontra-se representada em média de intensidade de fluorescência (MIF), medida proporcional ao número de moléculas reconhecidas pelo anticorpo, na ausência (Ctl) e na presença de L-744,832 (L-744) 25 $\mu$ M. Os resultados consistem na média  $\pm$  desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efectuada por comparação com a linha celular parental, utilizando o teste de Tuckey, sendo \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ .

Uma vez que a inibição da farnesilação por este IFT utilizado não é específica da proteína RAS, pode-se inferir sobre a actividade deste composto pelas diferenças verificadas noutras proteínas que requerem farnesilação, uma das quais as laminas. Com o aumento da dose de L-744,832 observou-se a diminuição dos níveis de laminas, comprovando a diminuição da conversão de prelaminas em laminas, por inibição da farnesiltransferase (Figura 28).

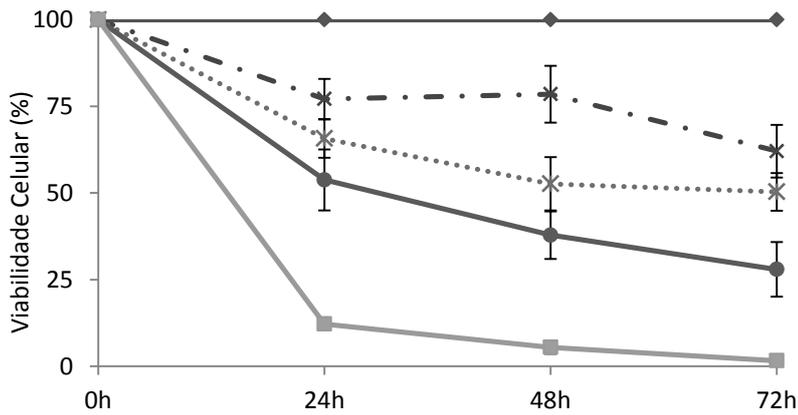


**Figura 28 - Expressão intracelular de laminas na ausência e na presença de L-744,832.** As células foram incubadas durante 48 horas com doses crescentes do IFT. A expressão intracelular de laminas encontra-se expressa em média de intensidade de fluorescência (MIF), na ausência e na presença de L-744,832. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efectuada por comparação com a linha celular parental, utilizando o teste de Tuckey, sendo \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

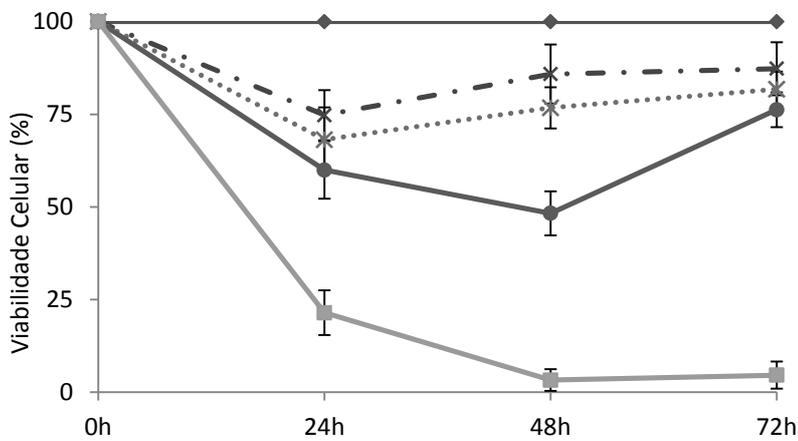
### 3.2.1.2. Inibidor da via do mTOR

O potencial terapêutico do inibidor do mTOR, Everolimus, foi determinado pelo método da resazurina, para uma gama de concentrações entre os 5 e os 50  $\mu\text{M}$ . Assim, a acção do Everolimus foi distinta nas diferentes linhas, sendo as células K562 um pouco mais sensíveis do as células congéneres resistentes. De facto, o  $\text{IC}_{50}$  na linha sensível ao Imatinib é atingido para uma concentração ligeiramente inferior, 20,9  $\mu\text{M}$ , em comparação com o das células K562 RC e K562 RD, 25,9  $\mu\text{M}$  e 29,1  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Além de ser necessário uma maior dose de fármaco para atingir uma redução de 50% na viabilidade, observa-se também a reversão do efeito após as 48 horas de exposição nas linhas celulares resistentes (Figura 29). À excepção da exposição a 50  $\mu\text{M}$  Everolimus, que independente da linha celular em questão induz uma redução de aproximadamente 95% na viabilidade celular, observa-se um efeito dependente do tempo e da dose.

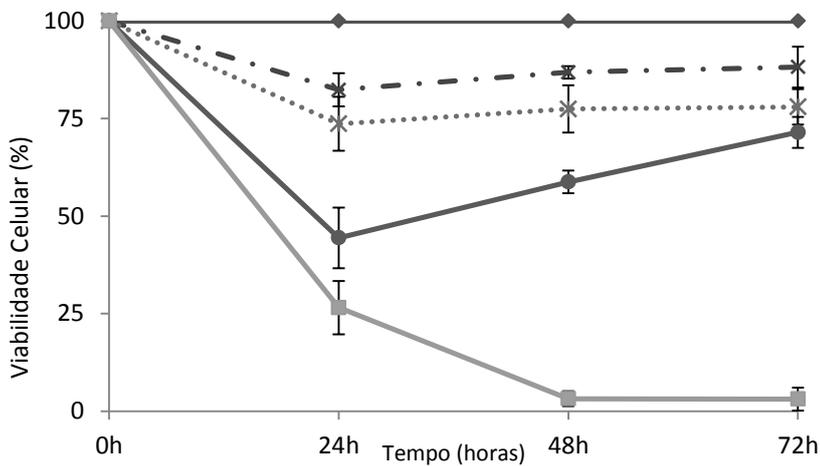
**A - K562**



**B - K562 RC**



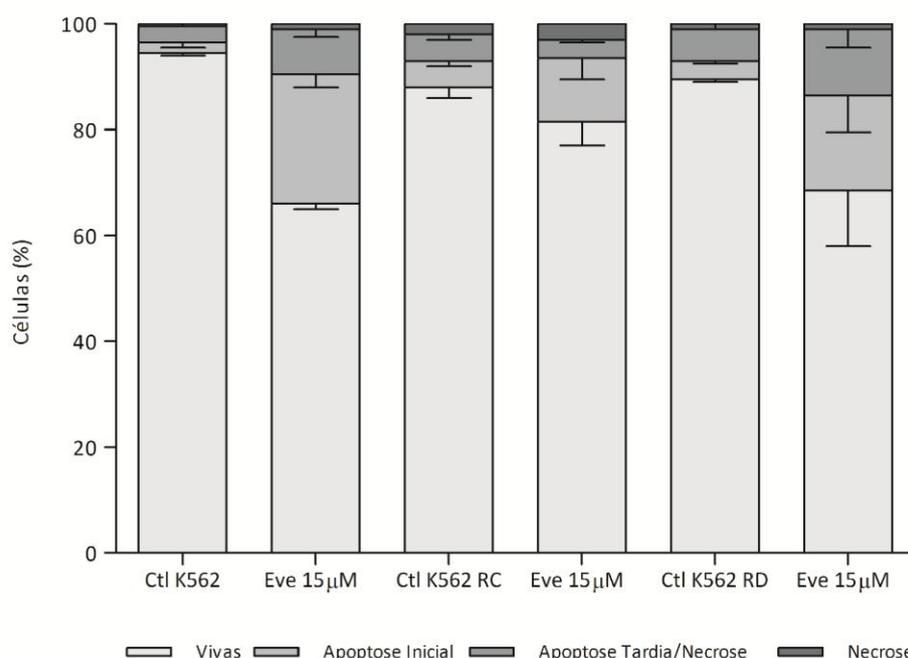
**C - K562 RD**



◆ Controlo      ✕ Everolimus 5µM      \* Everolimus 15µM  
● Everolimus 25µM      ■ Everolimus 50µM

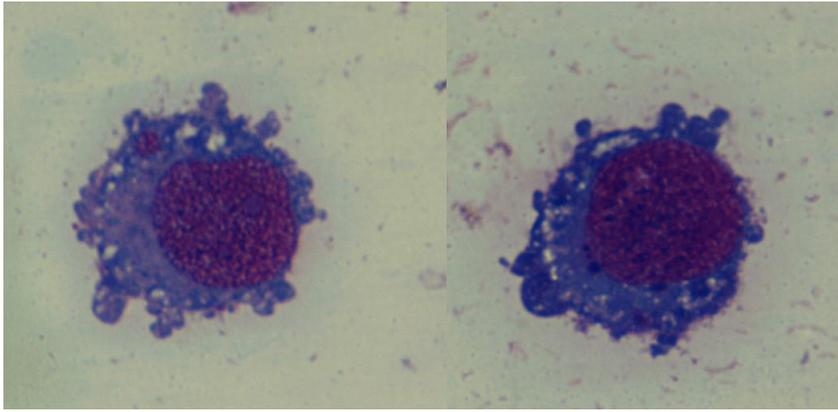
**Figura 29 - Efeito do Everolimus na viabilidade das células K562 e sublinhas resistentes.** As células foram incubadas numa densidade inicial de  $0,5 \times 10^6$  células/mL, na ausência e na presença de concentrações crescentes de Everolimus, durante 72 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo método de resazurina, sendo os resultados expressos em percentagem (%) representando a média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes.

De forma a avaliar qual o tipo de morte celular induzida por este composto procedeu-se a estudos de morfologia e de citometria de fluxo. Assim, a exposição das células sensíveis e resistentes ao Imatinib, ao fármaco Everolimus induz morte celular preferencialmente por apoptose (Figura 30). Na figura 30, verifica-se a diminuição da percentagem de células vivas e o aumento da percentagem de células em apoptose, de modo dependente do tipo celular.

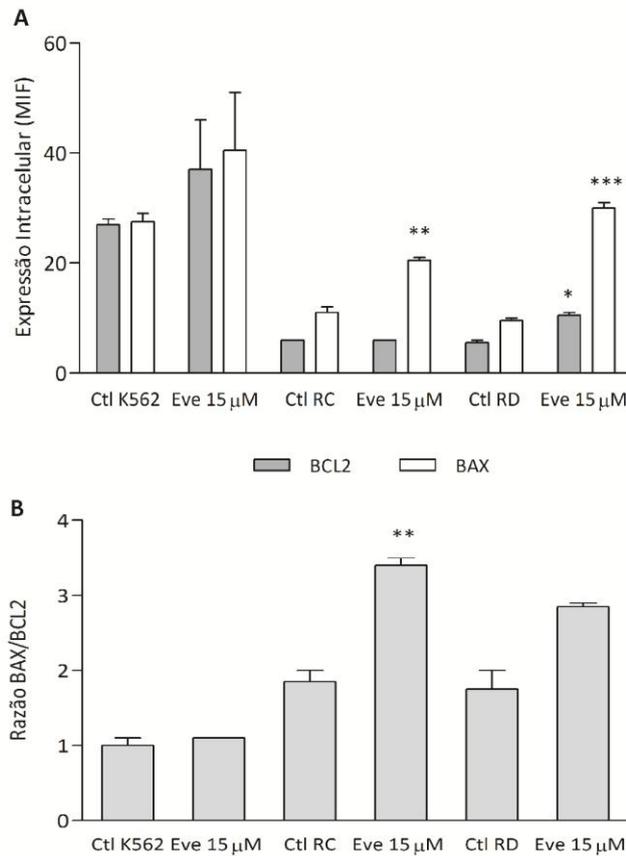


**Figura 30 - Avaliação do efeito citotóxico de 15µM de Everolimus nas células K562, K562 RC, K562 RD por citometria de fluxo.** As células foram incubadas numa densidade inicial de  $0,5 \times 10^6$  células/mL, durante 48h na ausência (Ctl) e na presença de 15µM de Everolimus (Eve), e posteriormente marcada com anexina V e iodeto de propídeo. Os resultados são expressos em percentagem (%) e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes.

Este processo foi comprovado pelos estudos de microscopia óptica, uma vez que, nas condições anteriores, se observaram alterações morfológicas características de apoptose, como *blebbing* e contracção celular, e também de autofagia, como vacuolização citoplasmática (Figura 31). Acrescidas a estas alterações, nas células tratadas com este inibidor do mTOR verifica-se o aumento da expressão de BAX, uma molécula pró-apoptótica (Figura 32).

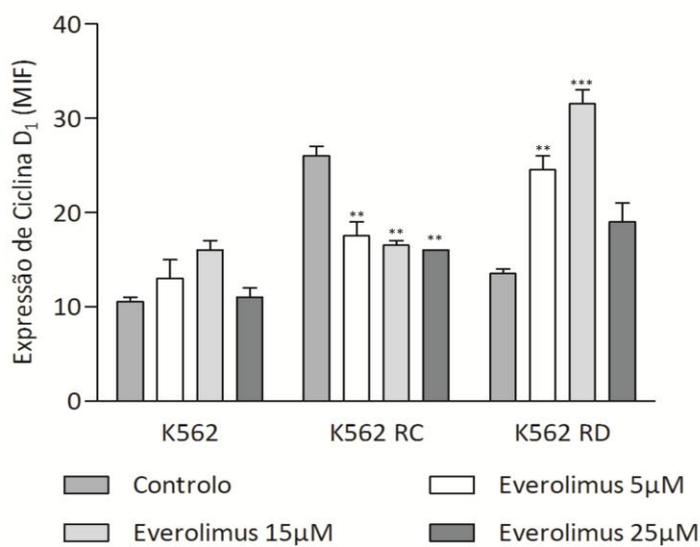


**Figura 31 - Aspectos morfológico das células K562 expostas a 15 $\mu$ M de Everolimus.** O aspecto morfológico foi avaliado, após a coloração *May-Grünwald-Giemsa*, por microscopia óptica com ampliação de 500x. As formações ao nível da membrana celular, designadas por *blebbings*, confirmam o fenómeno de morte celular por apoptose e a maior vacuolização, sugere autofagia.



**Figura 32 - Expressão intracelular de BCL2, de BAX e a razão BAX/BCL2 em células expostas a Everolimus, por citometria de fluxo.** (A) A expressão intracelular de BCL2 e BAX na ausência (Ctl) e na presença de Everolimus (Eve) 15 $\mu$ M, após 48 horas de exposição. Os resultados encontram-se expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes. (B) A razão BAX/BCL2 foi calculada através da razão entre os MIF de cada um das moléculas, nas diferentes condições de tratamento. A análise estatística foi efectuada por comparação com a linha celular parental, utilizando o teste de Tuckey, sendo \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

Por outro lado, verifica-se o aumento da expressão intracelular da proteína ciclina D1, uma proteína reguladora do ciclo celular, envolvida na passagem entre a fase G1 e S, comprovando a ausência de efeito citostático induzido pelo Everolimus nas linhas celulares K562 e K562 RD. O mesmo não se observa nas células K562 RC, em que além do efeito citotóxico, observa-se também um efeito citostático nas células tratadas com Everolimus (Figura 33).



**Figura 33 - Expressão intracelular de ciclina D1 na ausência e na presença de Everolimus.** As células foram incubadas durante 48 horas com Everolimus. A expressão intracelular de ciclina D1 encontra-se expressa em média de intensidade de fluorescência (MIF), na ausência e na presença de Everolimus. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efectuada por comparação com a linha celular parental, utilizando o teste de Tuckey, sendo \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

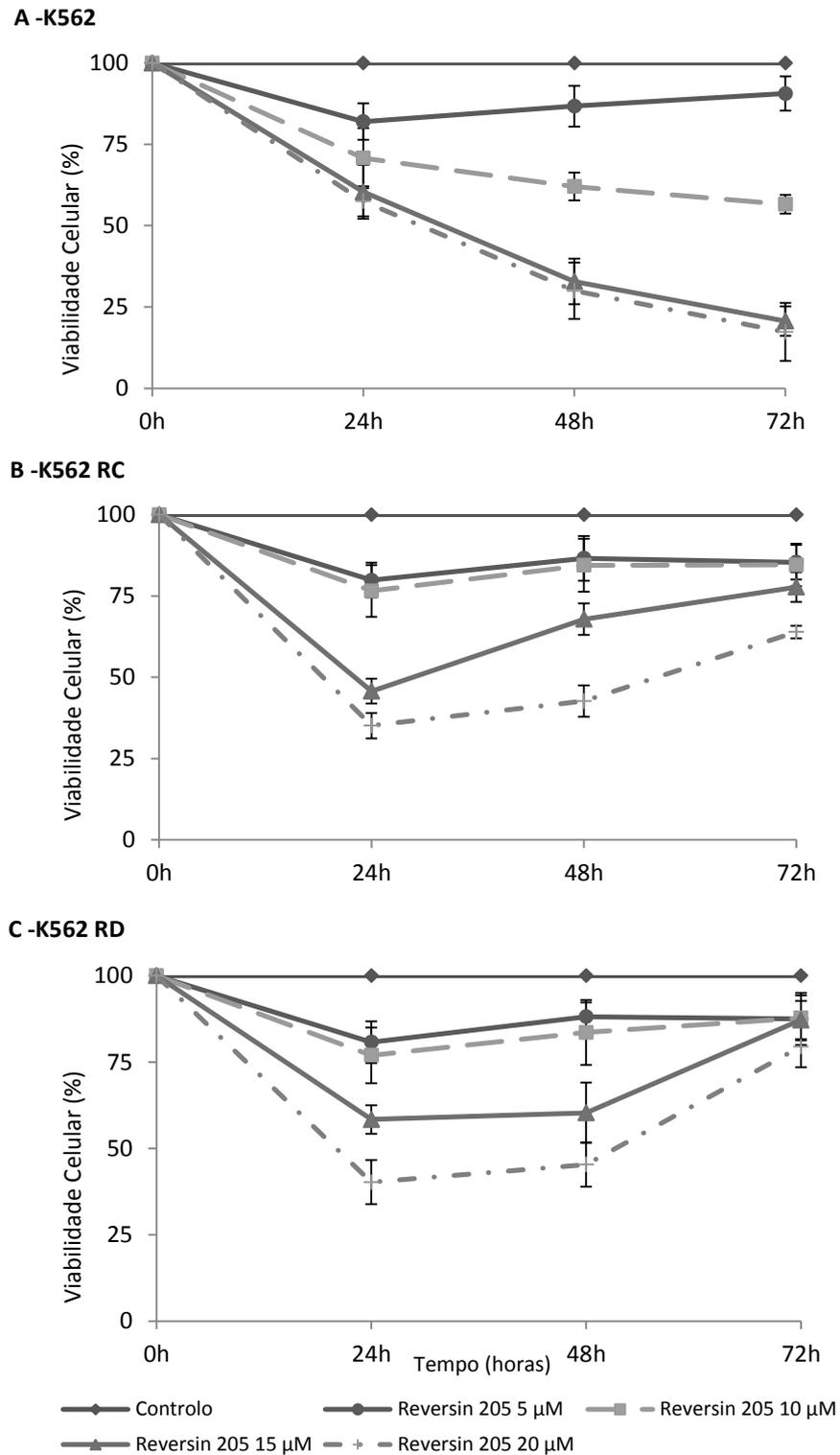
### 3.2.1.3. Inibidor da glicoproteína-P - Reversina 205

A inibição de transportadores de efluxo é uma possível abordagem terapêutica em LMC, visto que o perfil de expressão destes transportadores se encontra alterado. Para tal, foi avaliado o potencial terapêutico da Reversina 205, um inibidor da P-gP, quer na linha celular sensível ao Imatinib como nas sublinhas resistentes.

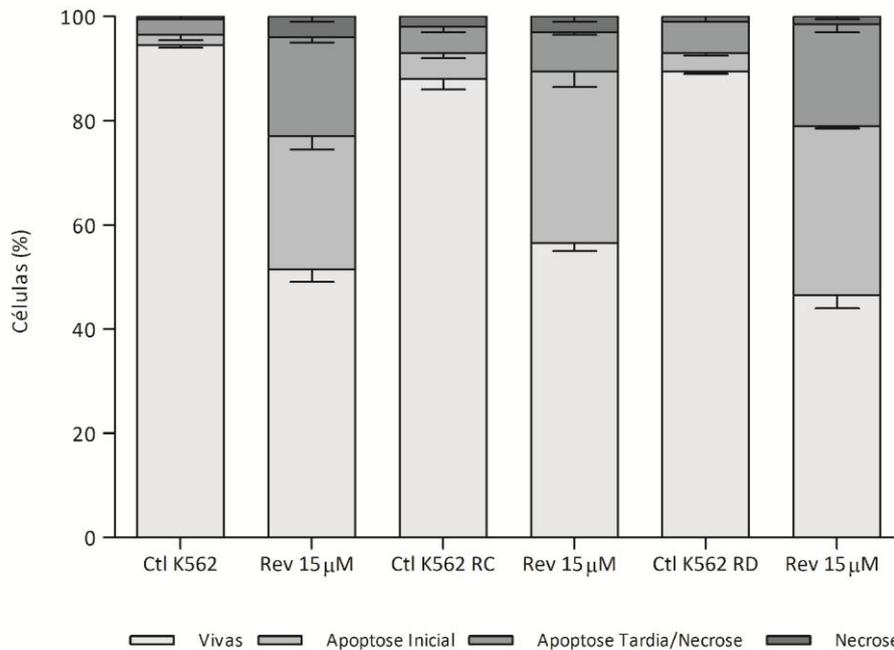
A Reversina 205 evidenciou uma redução da viabilidade dependente da dose, do tempo de incubação e da linha celular. De facto, a sensibilidade

das linhas celulares em estudo a este composto foi bastante distinta, sendo estas diferenças estatisticamente significativas (K562 RC:  $t_{(10)}=2,89$ ,  $p=0,016$ ; K562 RD:  $t_{(10)}=3,49$ ,  $p=0,006$ ). Assim, e de acordo com avaliação da viabilidade celular, e por aplicação de regressão não linear logística, verificou-se que a linha celular sensível ao Imatinib (células K562) necessita de  $12,1 \mu\text{M}$  de Reversina 205 após 48 horas de incubação de modo a reduzir em 50% a viabilidade celular. As sublinhas resistentes apresentam um  $\text{IC}_{50}$  às 48 horas similar entre si,  $18,9 \mu\text{M}$  para as células K562 RC e  $18,7 \mu\text{M}$  para as K562 RD, mas superior ao da linha K562 (Figura 34). Por outro lado, nas linhas resistentes ao Imatinib, para todas as doses testadas, observou-se uma reversão do efeito, em particular após as 48 horas de incubação.

De acordo com os resultados obtidos por citometria de fluxo (Figura 35) observa-se que a Reversina 205 induz morte celular por apoptose. Nas células tratadas com  $15 \mu\text{M}$  de Reversina 205, observou-se uma taxa de aproximadamente 30% de células em apoptose inicial e apenas um máximo de 5% de necrose, revelando que este último processo não é activado por este composto.

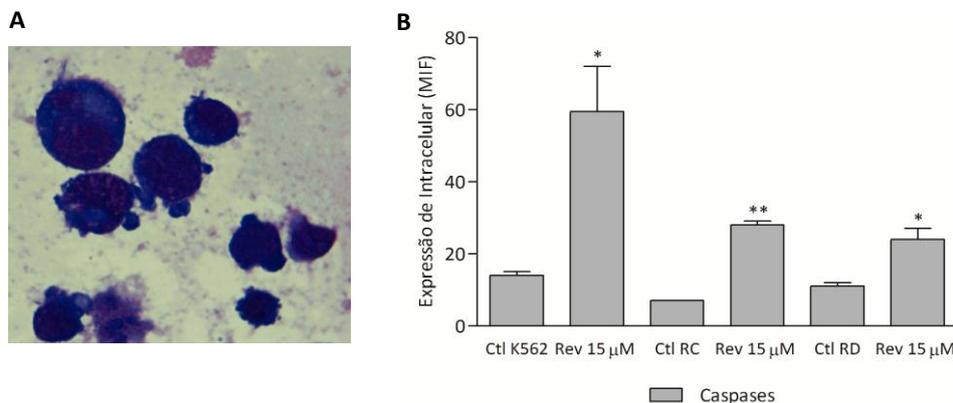


**Figura 34 - Efeito da Reversina 205 na viabilidade das linhas celulares sensíveis e resistentes ao Imatinib.** As células foram incubadas numa densidade inicial de  $0,5 \times 10^6$  células/mL, na ausência e na presença de doses crescentes de Reversina 205, durante 72 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo método de resazurina, sendo os resultados expressos em percentagem (%) representando a média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes



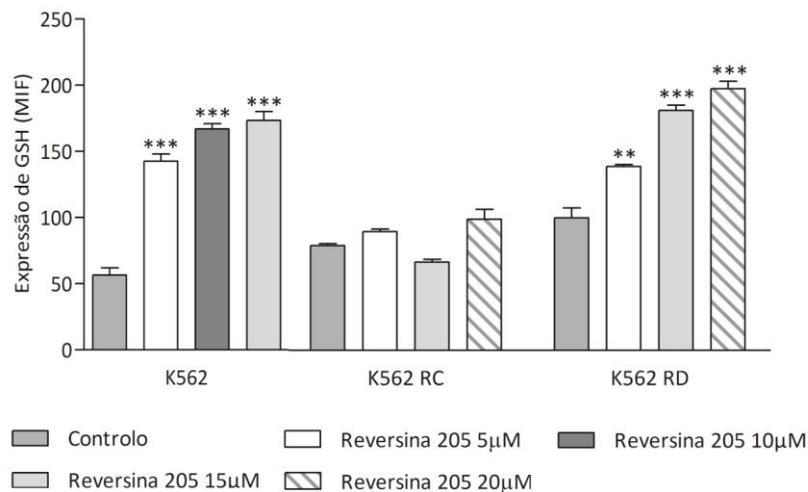
**Figura 35 - Avaliação do efeito citotóxico induzido por 15μM de Reversina 205 por citometria de fluxo.** As células foram incubadas numa densidade inicial de  $0,5 \times 10^6$  células/mL, durante 48h na ausência (Ctl) e na presença de 15μM de Reversina 205 (Rev), e posteriormente marcada com anexina V e iodeto de propídeo. Os resultados são expressos em percentagem (%) e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes.

As alterações morfológicas observadas na presença de Reversina 205 (Figura 36-A) confirmam a activação do processo apoptótico. Concordantemente com os resultados anteriores, observou-se um aumento da expressão de caspases nas células tratadas com Reversina 205 15 μM, comprovando a morte celular programada por apoptose (Figura 36-B).



**Figura 36 – Aspecto morfológico e expressão intracelular de caspases na ausência e na presença de Reversina 205.** (A) O aspecto morfológico das células K562 tratadas com 15μM de Reversina 205 foi avaliado, após a coloração *May-Grünwald-Giemsa*, por microscopia óptica com ampliação de 500x. As formações dos corpos apoptóticos confirmam o fenómeno de morte celular por apoptose. (B) A expressão intracelular de caspases na ausência (Ctl) e na presença de Reversina 205 (Rev) 15μM, após 48horas de exposição. Os resultados encontram-se expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efectuada por comparação com a linha celular parental, utilizando o teste de Tuckey, sendo \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ .

De forma a inferir alguns dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade induzida pela Reversina 205, foram avaliados os níveis de expressão intracelular da defesa antioxidante não enzimática GSH. Como representado na figura 37, na presença de doses crescentes de Reversina 205, observou-se um aumento dos níveis de GSH, de modo proporcional ao aumento de dose administrada. No entanto, a linha celular parental e a sublinha K562 RD apresentam níveis duas ou mais vezes superiores aos do controlo (células sem tratamento). Na sublinha de resistência contínua (K562-RC), o aumento dos níveis é bastante subtil para as várias doses, exceptuando o decréscimo observado nas células 15 $\mu$ M de Reversina 205 (Figura 37). As diferenças entre as células sem tratamento (controlo) e as expostas à Reversina 205 são estatisticamente significativas apenas nas linhas celulares K562 e K562 RD (Figura 37).



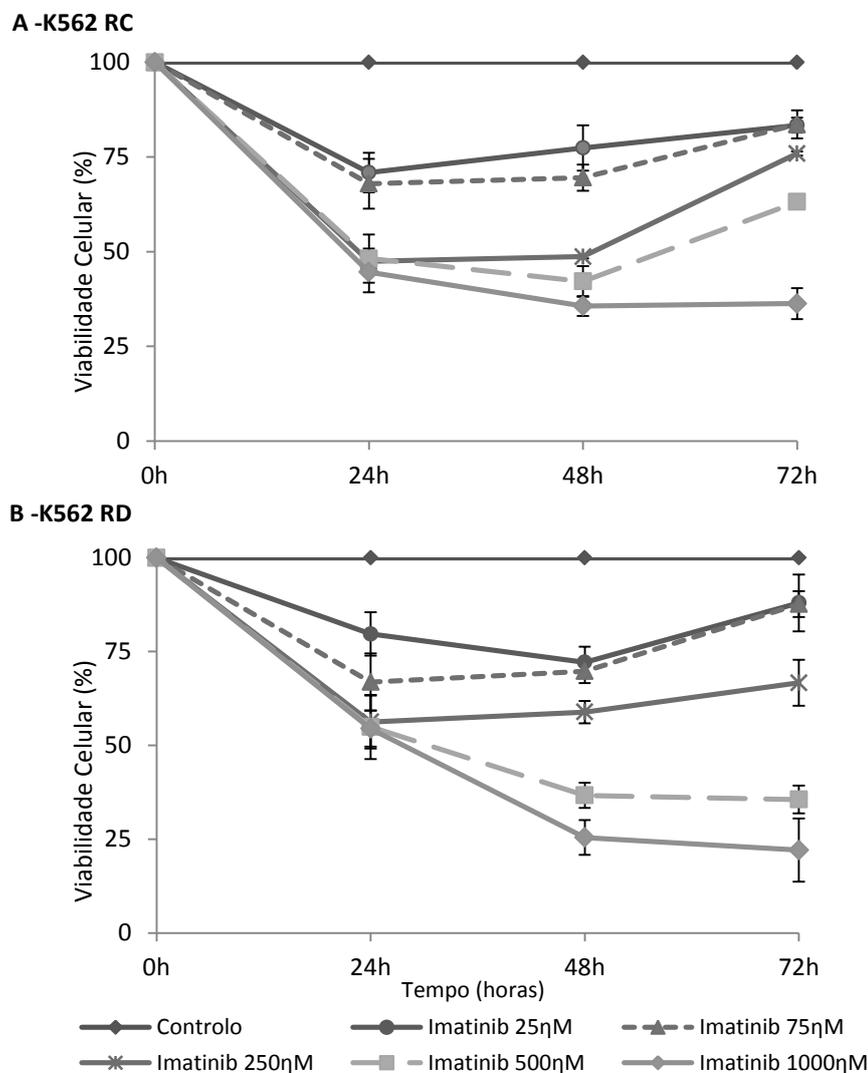
**Figura 37 - Expressão intracelular de glutatião reduzido na ausência e na presença de Reversina 205.** As células foram incubadas durante 48 horas com Reversina 205. A expressão intracelular de GSH encontra-se expressa em média de intensidade de fluorescência (MIF), na ausência e na presença de Reversina 205. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efectuada por comparação com a linha celular parental, utilizando o teste de Tuckey, sendo \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 3.2.1.4. Papel da Reversina 205 na modulação da resistência

Com o objectivo de avaliar o papel dos transportadores no processo de resistência, e a possibilidade da Reversina 205 modular essa resistência,

procedeu-se a um estudo em que as células resistentes foram cultivadas na presença de uma dose mínima de Reversina 205 (5 $\mu$ M) e incubadas com doses crescentes de Imatinib (entre 10 e 1000  $\eta$ M). Este estudo permitiu inferir sobre a capacidade de modular a resistência com novos compostos, re-sensibilizando as células resistentes à terapêutica convencional.

Assim, a curva dose resposta do Imatinib realizada na presença de 5 $\mu$ M Reversina 205 no meio de cultura, demonstrou um aumento do efeito do Imatinib quando em associação com a Reversina 205, relativamente ao efeito obtido com o Imatinib em monoterapia. (Figura 38).



**Figura 38 - Efeito da combinação de Imatinib e Reversina 205 na viabilidade celular das linhas celulares resistentes ao Imatinib.** As células foram incubadas numa densidade inicial de  $0,5 \times 10^6$  células/mL acrescidas de 5 $\mu$ M Reversina 205, na ausência e na presença de doses crescente de Imatinib, durante 72 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo método de resazurina, sendo os resultados expressos em percentagem (%) representando a média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes.

Nas K562 RC o IC<sub>50</sub> do Imatinib determinado após 48 horas de incubação foi de 605 ηM, conferindo um grau de resistência 8,0 vezes superior em relação à linha parental K562. Mas, na presença de Reversina 205, o IC<sub>50</sub> do Imatinib reduz para 170,8 ηM, passando estas células a apresentar um grau de resistência de apenas 2,0 vezes. De igual modo, nas células K562 RD verificou-se também a diminuição substancial no IC<sub>50</sub> inicial de 1389 ηM para 367 ηM de Imatinib. Neste caso, o grau de resistência diminuiu de 18,4 vezes para 4,8 vezes relativamente ao IC<sub>50</sub> da linha sensível. Estes resultados mostram que a Revesina 205 induziu re-sensibilização das células resistentes ao inibidor tirosina cinase.

### **3.2.2. Associação de novos fármacos com Imatinib**

Um dos problemas associados a muitos dos compostos utilizados no tratamento do cancro é o desenvolvimento de inúmeros efeitos secundários. Desta forma, a administração em associação de vários compostos, possibilita a obtenção do mesmo efeito terapêutico com redução das doses em relação às utilizadas em monoterapia, proporcionando melhor resposta com menor toxicidade.

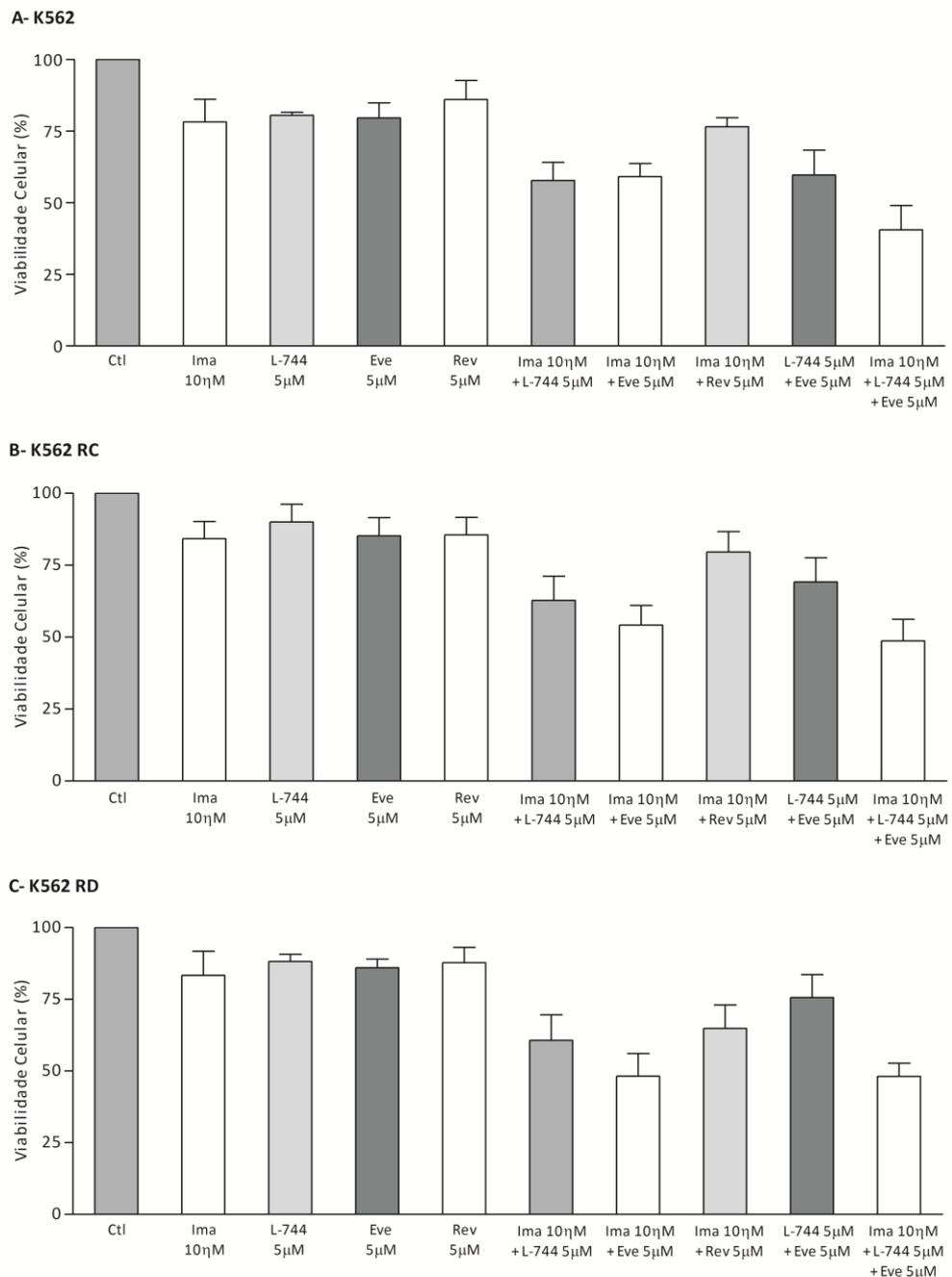
Assim, realizaram-se estudos de associação entre os vários compostos referidos anteriormente, visando avaliar o seu poder de utilização em simultâneo. Nas diferentes linhas foram avaliadas múltiplas combinações terapêuticas, recorrendo a doses muito reduzidas em relação às dos respectivos IC<sub>50</sub>, nomeadamente 10 ηM de Imatinib, 5 μM de L-744,832, de Everolimus e de Reversina 205. Para a selecção das doses a utilizar nas combinações entre os fármacos, foi previamente estabelecido que as doses escolhidas não poderiam, por si só, exercer um efeito superior a 25% na redução da viabilidade celular, sendo este determinado pelo método da resazurina. Para cada uma das combinações avaliadas, foi calculado o respectivo índice de combinação.

Como tal, na linha celular parental, as células K562 sensíveis ao Imatinib, obteve-se uma redução de aproximadamente 40% na viabilidade celular na maior parte das combinações. No caso da associação entre Imatinib, L-744,832 e Everolimus observa-se uma redução na viabilidade de 60% (Figura 39 A). Os vários esquemas de associação revelaram sempre efeito sinérgico, com excepção da combinação de Imatinib 10  $\eta$ M e Reversina 205 5  $\mu$ M, que pelo contrário revelou um efeito ligeiramente antagonista (CI=1,14) (Figura 40).

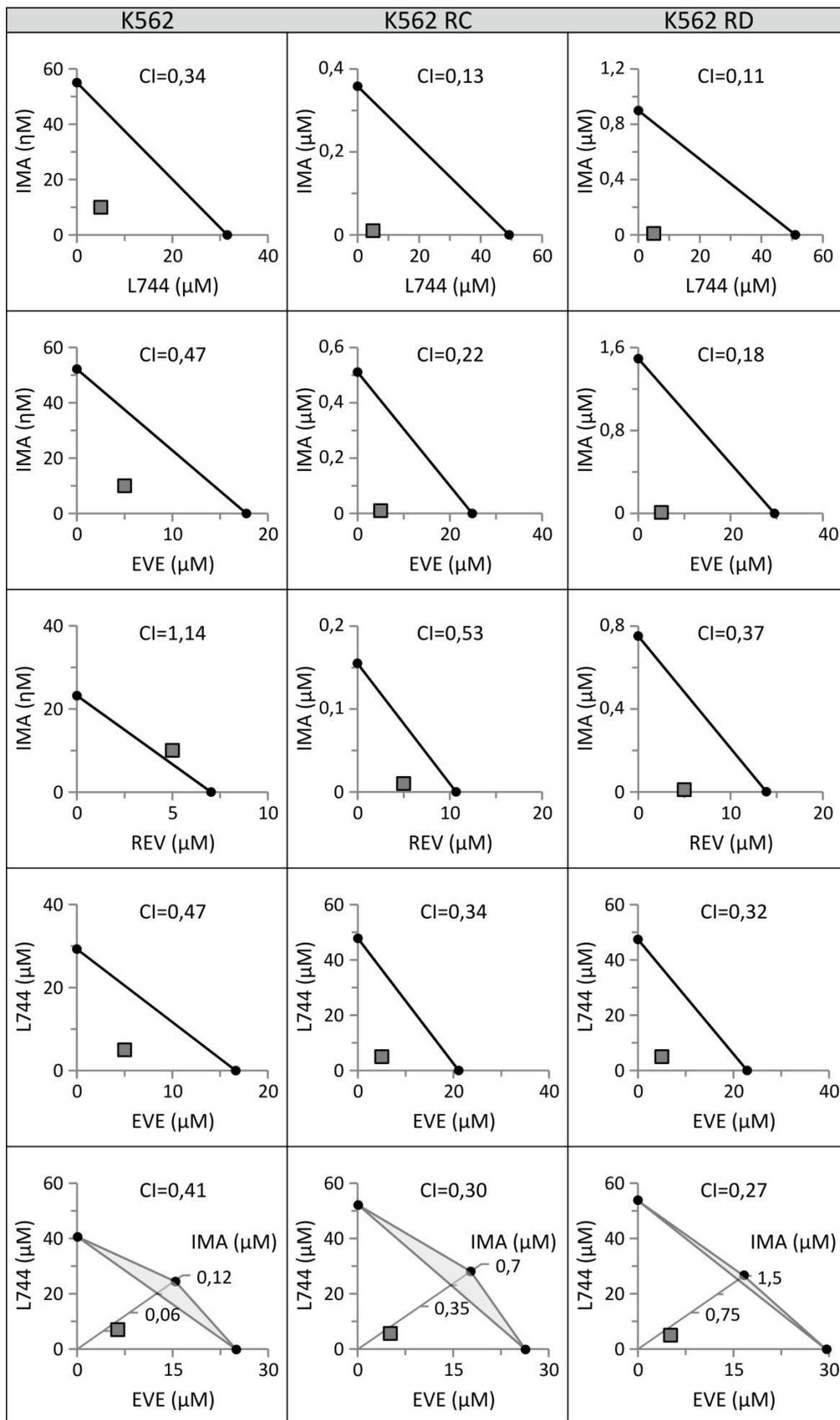
Apesar das sublinhas celulares K562 RC e RD serem resistentes ao Imatinib, obtiveram-se resultados bastante promissores com as associações testadas, e com as doses de Imatinib 60 vezes e 130 vezes inferiores aos respectivos IC<sub>50</sub> obtidos em monoterapia, respectivamente. Nas K562 RC, a combinação entre Imatinib na concentração de 10  $\eta$ M e 5  $\mu$ M de L-744,832 resultou na redução da viabilidade para 60% acompanhada por um CI de 0,13. Este facto indica um acentuado efeito sinérgico desta associação relativamente às doses requeridas individualmente para alcançar o mesmo efeito (Figura 40). Destacam-se ainda as associações de Imatinib 10  $\eta$ M e Everolimus 5  $\mu$ M, e entre Imatinib 10  $\eta$ M, o L-744,832 5  $\mu$ M e o Everolimus 5  $\mu$ M, que apresentam uma redução da viabilidade de 50% (figura 39-B). Nas K562 RD observou-se o mesmo benefício em termos de redução da viabilidade, sendo a combinação com maior efeito sinérgico, valor de CI bastante reduzido (CI=0,11), a combinação do Imatinib 10  $\eta$ M e do L-744,832 5  $\mu$ M. As combinações supra citadas para a linha K562 RC, permitiram nas K562 RD uma redução idêntica na viabilidade celular (48%) (Figura 39-C).

Apesar do efeito ligeiramente antagonista observado na linha celular parental, com a combinação de Imatinib 10  $\eta$ M e Reversina 205 5  $\mu$ M, esta evidenciou ter um efeito sinérgico nas sublinhas resistentes, sendo mais benéfico nas células K562 RD do que nas células K562 RC (Figura 40).

Todas as combinações entre os diferentes fármacos induzem nas células morte celular por apoptose, apresentando as mesmas características morfológicas observadas nas células tratadas isoladamente com cada um dos fármacos (Figura 41).

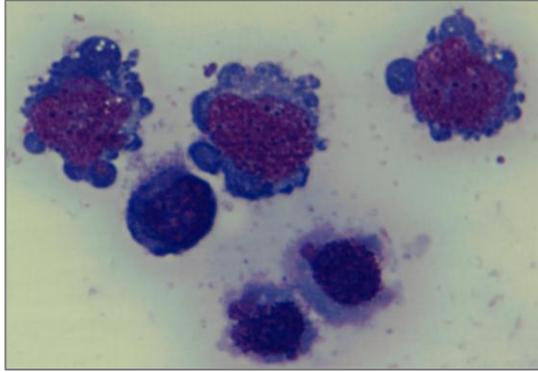


**Figura 39 - Efeito das associações entre vários fármacos na viabilidade celular das células K562, K562 RC e K562 RD.** As células foram incubadas numa densidade inicial de  $0,5 \times 10^6$  células/mL, na ausência e na presença de várias combinações de Imatinib (Ima), de L-744,832 (L-744), de Everolimus (Eve) e Reversina 205 (Rev), durante 48 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo método de resazurina, sendo os resultados expressos em percentagem (%) representando a média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes.

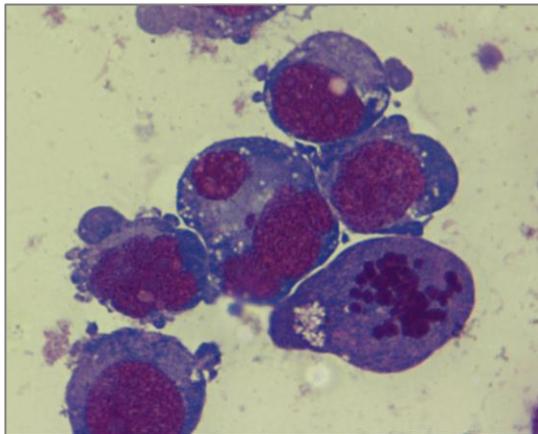


**Figura 40 - Índice de combinação e isoblogramas para as várias combinações entre os fármacos Imatinib, L-744,832, Everolimus e Reversina 205.** Os isoblogramas traduzem a relação de sinergismo ou antagonismo de cada combinação de fármacos. As rectas e os planos representam a dose necessária de cada fármaco individualmente par alcançar o mesmo efeito que o alcançado pela combinação. As doses aplicadas nas associações foram de 10 nM de Imatinib (IMA), 5 µM de L-744832 (L744), 5 µM de Everolimus (EVE) e 5 µM de Reversina 205 (REV). O índice de combinação (CI) quando superior a 1 traduz uma relação de antagonismo e se inferior a 1 corresponde a uma relação sinérgica entre compostos.

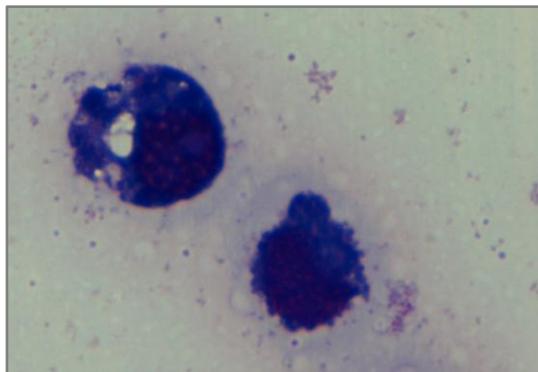
**A-Imatinib 10  $\eta$ M + L-744,832 5  $\mu$ M**



**B-Imatinib 10  $\eta$ M + Everolimus 5  $\mu$ M**



**C-Imatinib 10  $\eta$ M + Reversina 205 5  $\mu$ M**



**Figura 41 - Aspecto morfológico das células tratadas com combinações de fármacos. O aspecto morfológico foi avaliado, após a coloração *May-Grünwald-Giemsa*, por microscopia óptica com ampliação de 500x. As formações ao nível da membrana celular, designadas por *blebbings*, confirmam o fenómeno de morte celular por apoptose e a maior vacuolização, sugere a morte celular por autofagia.**

## ***Capítulo 4. Discussão***



#### **4.1. Avaliação dos mecanismos de sensibilidade e resistência ao Imatinib em células de Leucemia mielóide crónica em cultura**

A resistência natural ou adquirida das células neoplásicas a fármacos anticancerígenos é um dos problemas da oncologia médica responsável pela falência da terapêutica na maior parte dos tumores sólidos em estágio avançado e nalgumas neoplasias hematológicas, nomeadamente, em leucemias.

Os mecanismos envolvidos na síndrome de resistência a múltiplos fármacos (MDR) estão ainda pouco esclarecidos, sabendo-se que além da amplificação do gene MDR1, que codifica a glicoproteína P responsável pela extrusão celular de fármacos, e das alterações nos transportadores de influxo, outros factores estão envolvidos. Entre estes é de salientar, as alterações da membrana da célula tumoral, a formação de espécies reactivas de oxigénio e/ou a libertação de substâncias antioxidantes e as alterações na expressão de genes envolvidos na regulação da morte celular por apoptose (Sarmiento-Ribeiro 2000).

Assim, trata-se de um processo multi-factorial que pode dever-se a alterações no alvo terapêutico e/ou modificações na biodisponibilidade do composto. Neste contexto, é importante compreender porque é que as células tumorais se podem tornar resistentes à quimioterapia, ou seja, quais os mecanismos envolvidos na diminuição da concentração intracelular do fármaco anticancerígeno ou que determinam a impossibilidade deste atingir os seus alvos.

De todos os mecanismos descritos anteriormente, este trabalho apresenta como foco principal a importância dos transportadores membranares de influxo e efluxo e o potencial terapêutico de novos compostos em modular e/ou ultrapassar a resistência ao imatinib em LMC.

Como modelo celular *in vitro* para a LMC existem inúmeras linhas celulares estabelecidas, tendo-se neste estudo optado pela utilização da linha celular K562, uma linha que foi isolada de uma doente do sexo feminino com LMC em crise blástica, em que o transcripto mais comum da oncoproteína

BCR-ABL, o b3-a2, está presente. Através da análise citogenética pode-se classificar esta linha com essencialmente triplóide e com alterações cromossômicas adicionais, como descrito por Naumann *et al.* (2001).

Os resultados mostram que esta linha celular é bastante sensível ao Imatinib, sendo o IC<sub>50</sub> às 48 horas de 75 ηM. À semelhança do descrito por Can *et al.* (2011), o Imatinib para além de induzir nas células morte celular por apoptose, parece também activar o processo autofágico, uma vez que as células tratadas apresentam algumas características morfológicas típicas deste tipo de morte, como por exemplo a vacuolização do citoplasma.

Neste trabalho foram geradas duas sublinhas resistentes ao Imatinib a partir da linha celular parental K562, de forma a avaliar os mecanismos envolvidos na resistência a este inibidor de tirosina cinase. Uma das estratégias consistiu na exposição contínua ao Imatinib, que gerou uma sublinha resistente, as células K562 RC, como demonstrado pelo valor do IC<sub>50</sub> que é cerca de 8 vezes superior ao da linha sensível (605 ηM). A segunda estratégia de resistência consistiu na exposição descontínua da linha celular ao inibidor tirosina cinase, tendo-se obtido as células K562 RD. Este tipo de estratégia procurou mimetizar o efeito da descontinuação da terapêutica ou da sua toma incorrecta. A dose de Imatinib necessária administrar a esta sublinha para que se alcance uma redução de 50% na viabilidade celular é de 1389 ηM, dose esta 18,4 vezes superior ao IC<sub>50</sub> da linha celular sensível (células K562) e cerca de 2,2 vezes superior ao IC<sub>50</sub> das células resistentes K562 RC

Atendendo aos resultados, e com base nos diferentes graus de resistência das sublinhas resistentes de K562, pode-se inferir que a paragem da terapêutica poderá resultar no desenvolvimento de resistência ao fármaco mais acentuada, pelo que os doentes deverão ser alertados sobre o efeito da interrupção do tratamento. Nestes casos, os doentes necessitam de monitorização mais frequente, uma vez que este tipo de resistência, além de exigir doses mais altas do fármaco e, por conseguinte mais tóxicas, pode ser responsável pelas recidivas e, conseqüentemente, pela diminuição da sobrevivência destes doentes. Embora alguns autores defendam a interrupção

da terapêutica em doentes com LMC que tenham mantido a remissão molecular completa durante pelo menos dois anos (Cortes *et al.* 2004; Mahon *et al.* 2010; Barton 2011), tal procedimento só deverá ser adoptado em doentes com elevados níveis de resposta ao Imatinib e que não tenham evoluído da fase crónica da doença para a fase blástica, uma vez que os resultados experimentais obtidos em células em crise blástica revelaram níveis de resistência muito elevados.

Além da dependência da dose, o efeito do Imatinib é também dependente do tempo e do esquema de administração do fármaco. Assim, as células resistentes quando expostas a doses crescentes de Imatinib revertem o efeito após 48 horas, possivelmente justificado pela sua grande capacidade de proliferação. Estes resultados sugerem haver necessidade de reduzir o tempo entre as administrações de composto, de forma a manter o efeito na viabilidade celular. Alguns estudos com compostos anti-tumorais mostraram um aumento do efeito, ou pelo menos a manutenção do mesmo, em esquemas terapêuticos em que se utiliza a administração diária dos compostos (Sarmiento-Ribeiro 2000; Gonçalves 2008).

#### **4.1.1. Avaliação do papel dos transportadores de influxo e efluxo na resistência ao Imatinib.**

O desenvolvimento de resistência a vários fármacos anticancerígenos por parte das células tumorais é uma das causas da falência da terapêutica, podendo este fenótipo estar associado à diminuição dos transportadores de influxo e/ou ao aumento dos transportadores de efluxo (Mahon *et al.* 2003a).

A sensibilidade das células leucémicas ao Imatinib encontra-se amplamente associada à concentração intracelular do fármaco. Este factor é essencialmente regulado pelo equilíbrio entre o influxo e o efluxo do composto. Tem sido preconizado por alguns autores que o transportador OCT1 é o que mais condiciona o influxo de Imatinib, não só pela sua actividade mas também por alterações resultantes de SNP no gene que o codifica (*SLC22A1*) (Crossman *et al.* 2005; Kerb 2005; White *et al.* 2006).

Contudo, os estudos com inibidores do OCT1 revelaram que o transporte de Imatinib não era totalmente suprimido, sugerindo o envolvimento de outro transportador, o OCTN2 (Hayer-Zillgen *et al.* 2002; Hu *et al.* 2008a).

Nos modelos celulares em estudo, verificou-se nas sublinhas resistentes ao Imatinib um padrão de expressão dos transportadores distinto, relativamente aos obtido na linha celular parental. Assim, nas células K562 RC e RD, observou-se tanto na diminuição da expressão dos transportadores de influxo, OCT1 e OCTN2, como na percentagem de células que expressam estes transportadores. A diminuição da expressão de OCT1 e de OCTN2 nas células resistentes é de aproximadamente 50% da média de intensidade de fluorescência (MIF) está relacionada com a diminuição (directamente proporcional) do número de transportadores nas células. Estes resultados sugerem que um dos mecanismos envolvidos na resistência ao Imatinib nestas células pode estar relacionado com a redução da disponibilidade de Imatinib nas células. Assim, a alteração simultânea em ambos os transportadores de influxo indica a importância destes na aquisição de resistência ao Imatinib, podendo vir a funcionar como um factor preditivo da resposta à terapêutica. Deste modo, novas abordagens terapêuticas poderão passar pela aplicação de inibidores tirosina de segunda geração, como o Dasatinib, que não requerem a presença de transportadores de influxo para atingir as células leucémicas (Giannoudis *et al.* 2008; Hiwase *et al.* 2008).

Os transportadores de efluxo têm sido os mais associados ao fenótipo de MDR – *multidrug resistance*, conduzindo à extrusão de compostos anticancerígenos das células, com redução da sua concentração intracelular. Segundo alguns autores, o aumento de expressão de transportadores membranares da família das proteínas ABC, como a P-gP e a BCRP, pode estar relacionado com alterações epigenéticas resultantes da exposição a compostos quimioterapêuticos (Baker *et al.* 2005; Ji *et al.* 2010). No entanto, a relação dos transportadores de efluxo com a resistência ao Imatinib gera alguma controvérsia. Alguns autores referem que este inibidor de tirosina cinase é substrato da P-gP e um inibidor da proteína BCRP. Contudo, este último transportador desempenha um papel vital na protecção das células

estaminais hematopoiéticas contra diversos fármacos anticancerígeno (Robey *et al.* 2009; Graber-Maier *et al.* 2010). Atendendo às características químicas e estruturais do Imatinib, este apresenta condições para ser transportado pelo BCRP. Segundo Giacomini *et al.* (2010), este transportador está moderadamente envolvido na biodisponibilidade deste fármaco.

Neste estudo, além das alterações nos transportadores de influxo, observou-se simultaneamente, aumento dos níveis de expressão dos transportadores de efluxo e na percentagem de células positivas, em particular de BCRP. Apesar de este não ser o transportador mais descrito como mediador de resistência, ganha relevo neste estudo pois, os dois tipos de células obtidas pelos diferentes mecanismos de resistência apresentam valores de expressão muito superiores aos da linha parental. Assim, como descrito por Burger *et al.*(2004a) e concordante com os resultados obtidos, a exposição a longo prazo a Imatinib induz aumento de P-gP e BCRP, não alterando outros transportadores da família ABC, como por exemplo a proteína MRP.

Uma vez que, os transportadores proteicos, apesar de presentes na superfície das células, podem não estar funcionais, para confirmar a sua função realizaram-se estudos com radiofármacos, nomeadamente com o  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi. Este composto entra nas células por difusão activa, acumula-se na mitocôndria, e é exportado por transportadores da família ABC, entre os quais a glicoproteína-P. Em estudos anteriores observou-se que o pico de captação deste radiofármaco ocorria ao final de 60 minutos (Maffioli *et al.* 1996; Abrantes *et al.* 2010), o mesmo comportamento foi verificado tanto na linha K562 como nas sublinhas resistentes. No entanto, as sublinhas resistentes apresentam um perfil de captação bastante inferior face ao da linha parental, revelando alteração nos mecanismos que condicionam a sua acumulação celular. Uma vez que o  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi não necessita de nenhum transportador de influxo, a diminuição da percentagem de captação estará provavelmente relacionada com o aumento do número de transportadores de efluxo que medeiam a sua extrusão da célula. Assim, os resultados sugerem

que nas células resistentes ao Imatinib se observa não só um aumento nos níveis de transportadores de efluxo como estes são funcionalmente activos.

Ensaio específicos de avaliação de influxo e de efluxo com radiofármacos na ausência e na presença de moduladores destes transportadores, bem como estudos de modulação epigenética serão necessários para melhor compreender a relação entre os transportadores e a resistência.

#### **4.1.2. Avaliação do potencial terapêutico de novos fármacos**

Uma das problemáticas associadas ao desenvolvimento de resistência a um composto é a aquisição de resistência cruzada entre os diversos fármacos anticancerígenos. Este processo é uma causa frequente de falência da terapêutica no cancro e consiste na capacidade das células resistirem a fármacos aos quais ainda não foram expostas, condicionando as opções terapêuticas (Krishna and Mayer 2000a).

Os resultados mostraram que os novos fármacos em estudo, como o L-744,832, Everolimus e Reversina 205, induzem na linha celular sensível e nas linhas celulares resistentes ao Imatinib, um efeito citotóxico. Estes resultados sugerem a não existência de resistência cruzada entre o Imatinib e os fármacos inibidores da farnesiltransferase, da mTOR e da glicoproteína P. A existência de resistência cruzada entre os fármacos anticancerígenos mais convencionais, como as antraciclinas e alcalóides da vinca (Sarmiento-Ribeiro 2000) e os derivados dos nucleósidos é conhecida, enquanto para os novos fármacos ainda pouco se conhece.

##### **4.1.2.1. Inibidores das vias de sinalização RAS/MAPK e PI3K/mTOR**

Na LMC a presença da oncoproteína BCR-ABL pode conduzir à activação de múltiplas vias de sinalização intracelulares, entre as quais a via da RAS/MAPK e da PI3K/mTOR. Em particular, estas vias de sinalização são responsáveis pela proliferação celular e pela sobrevivência e modulação da apoptose celular, respectivamente.

Os inibidores da farnesiltransferase (inibidor da via RAS/MAPK) e da via mTOR utilizados neste estudo induzem uma diminuição da viabilidade celular por activação de morte celular por apoptose, de modo dependente da dose, do tempo, da linha celular e do fármaco utilizado.

Nos ensaios realizados com o inibidor farnesiltransferase, L-744,832, observou-se nas linhas celulares de LMC uma diminuição da viabilidade celular medida pelo tipo de morte celular I, a apoptose. Apesar de não serem totalmente conhecidos, os mecanismos de indução de apoptose revelaram estar associados com o aumento dos níveis de FAS e FAS ligando, tal como descrito por Braun *et al.* (2008). Outros autores defendem que os efeitos pró-apoptóticos dos IFTs se devem à comunicação intrínseca entre a via de sinalização da RAS e a via da PI3K, que medeia fenómenos de sobrevivência e apoptose celular (Lancet and Karp 2003; Appels *et al.* 2005).

Para avaliar a actividade funcional do L-744,832 como inibidor da farnesiltransferase, utilizou-se como marcador farmacodinâmico o nível de expressão de laminas. As laminas são proteínas da membrana nuclear que têm como função não só estabilizar o conteúdo nuclear, como também se encontram envolvidas em múltiplos processos, nomeadamente na proliferação celular (Gruenbaum *et al.* 2000). Assim, nas células resistentes verificou-se menor expressão basal de laminas em relação à linha sensível, o que provavelmente está associada à sua elevada capacidade de proliferação. Além disso, como referido, a expressão de laminas, bem como de muitas outras moléculas (*e.g.* RhoB), pode também funcionar como marcador da funcionalidade do inibidor L-744,832, uma vez que a farnesiltransferase é essencial para o processamento da prelamina em lamina (Adjei *et al.* 2001; Appels *et al.* 2005). De acordo com os estudos de outros autores (Adjei *et al.* 2001; Appels *et al.* 2005), em todas as células de LMC tratadas com este IFT observou-se uma diminuição da expressão de laminas (Figura 28), sugerindo inibição da FT pelo L744,832. No entanto, uma vez que os IFT funcionam como inibidores competitivos da proteína farnesiltransferase, estes compostos atingem múltiplos alvos, podendo a sua eficácia ser a combinação de efeitos a diferentes níveis (Lancet and Karp 2003).

Por outro lado, as células tumorais podem apresentar vantagem proliferativa relativamente às células normais devido à desregulação da taxa de proliferação e/ou pelo escape ao processo de morte celular programada. Alguns autores defendem que a Rapamicina e os seus derivados, como o Everolimus exercem, principalmente, um efeito citostático, implicando um bloqueio do ciclo celular na fase G1 (Athar and Gajra 2008). Contudo, em neoplasias hematológicas observou-se o desencadeamento de apoptose em células tratadas com Everolimus (Saunders *et al.* 2011), tal como o verificado neste trabalho.

A ciclina D1 é uma das moléculas reguladoras do ciclo celular essencialmente envolvida na passagem entre a fase G1 e a fase S e apresenta níveis de expressão variáveis de acordo com fase do ciclo em que se encontram as células. Após a fase G2/M verifica-se, quando necessária a proliferação, um estímulo na produção de ciclina D1, que aumenta durante a toda a fase G1 até uma redução abrupta concordante com a passagem para a fase de síntese do ciclo. Contudo, esta mesma molécula pode funcionar como oncogene, gerando proliferação desregulada, e estar envolvida no processo carcinogénico de alguns tumores, como descrito por Tashiro *et al.* (2007). Nas sublinhas resistentes observou-se um ligeiro aumento dos níveis basais desta molécula, quando comparados com o observado na linha parental, o que está de acordo com a elevada capacidade proliferativa das células resistentes. Além do aumento da expressão basal de ciclina D1, verificou-se um aumento da expressão desta proteína nas células K562 e K562 RD expostas a Everolimus. Estes resultados estão de acordo com a ausência de efeito citostático verificado nestas células, sugerindo que este inibidor da mTOR não induz bloqueio do ciclo celular. Contrariamente, na linha celular K562 RC verificou-se adicionalmente ao efeito citotóxico um efeito citostático.

Assim, por microscopia óptica foram observadas alterações morfológicas características de apoptose, além de alterações condizentes com autofagia, podendo este fenómeno funcionar como um mecanismo de morte celular adicional.

Os níveis de activação de mTOR encontram-se directamente associados ao processo autofágico, uma vez que a activação desta proteína implica diminuição da autofagia (Mancini *et al.* 2010). Na presença de Everolimus, um inibidor da via PI3K/mTOR, pode resultar no aumento do processo de morte celular tipo II, o qual se caracteriza pelo aumento de vacúolos no citoplasma das células. Associando todos estes factores verificou-se que, como o descrito pelo Di Nicolantonio *et al.* (2010), os inibidores do mTOR conduzem principalmente à estabilização da doença e não essencialmente à regressão do tumor.

Posteriormente, foi avaliada a eficácia terapêutica da associação do L-744,832, do Everolimus e do Imatinib. As combinações entre diversos fármacos anticancerígenos permitem administrar doses mais baixas de cada uma dos compostos, reduzindo a toxicidade associada, mas sem comprometer o efeito no combate à doença. Como descritos por vários autores, observou-se um efeito sinérgico na combinação do IFT com o Imatinib, entre o Everolimus e o Imatinib, e na associação dos três compostos em simultâneo. Os benefícios da associação entre o IFT e os inibidores do mTOR podem dever-se à elevada comunicação entre estas vias, não permitindo esta dupla inibição a activação de mecanismos alternativos de compensação (Radujkovic *et al.* 2006; Nagai *et al.* 2010; Kelly *et al.* 2011; Kuwatsuka *et al.* 2011). Apesar das células K562 RC e RD serem resistentes ao Imatinib, as associações dos novos fármacos com Imatinib e/ou entre eles foram eficazes na redução da viabilidade celular para doses bastante inferiores às utilizadas em monoterapia. Nos esquemas de associação testados, a dose de Imatinib para a linha celular K562 RD foi cerca de 140 vezes inferior e nas K562 RC foi 60 vezes inferior, comparativamente às doses necessários em monoterapia. Além disso, estes resultados sugerem que estes esquemas terapêuticos poderão ser eficazes como alternativa terapêutica nos doentes resistentes ao Imatinib.

#### 4.1.2.2. Inibidor do transportador de efluxo

O fenótipo MDR pode ser contornado pela exposição a inibidores dos transportadores de efluxo, sempre que estes sejam um dos mecanismos implicados na aquisição de resistência.

A Reversina 205 é um composto que inibe a P-gP por associação ao local onde ocorreria normalmente a ligação de ATP, bloqueando o acesso à energia requerida no efluxo dos substratos (Sharom *et al.* 1999; Hoffmann *et al.* 2008; Arnaud *et al.* 2010). Além disso, este estudo mostra que a Reversina 205 reduz a viabilidade celular em linhas celulares sensíveis e resistentes ao Imatinib, por activação dos mecanismos de morte celular programada, comprovados pelo aumento dos níveis de caspases. No entanto, na linha celular parental o IC<sub>50</sub> é de 12,6 µM, estando este valor aumentado para aproximadamente 19 µM nas sublinhas resistentes. A necessidade de doses superiores pode dever-se à quantidade de alvo disponível, isto porque nas K562 apenas 4% das células expressam P-gP comparativamente com as linhas resistentes que possuem aproximadamente 30% da população positiva para a P-gP.

Acrescido ao efeito na viabilidade celular, a exposição a doses crescentes de Reversina 205 conduziu à alteração nos níveis de GSH, uma defesa anti-oxidante não enzimática. Alguns trabalhos relacionam os níveis de GSH com a aquisição de resistência à radiação ionizante e a fármacos anticancerígenos (Sarmiento-Ribeiro 2000; Hitchler and Domann 2007).

Nos resultados obtidos neste estudo verificou-se que as sublinhas resistentes, em especial na sublinha K562 RD, possuem níveis basais de GSH superiores às células sensíveis K562 (aproximadamente o dobro). A GSH tem inúmeras funções fisiológicas, entre as quais a manutenção do equilíbrio redox das células e a protecção contra espécies reactivas de oxigénio (ROS). Contudo, em células tumorais estas funções podem estar alteradas. A depleção de GSH encontra-se associada a fenómenos de apoptose, motivados pelo aumento do stresse oxidativo, estando o seu aumento relacionado com a resistência (Sarmiento-Ribeiro 2000; Hitchler and Domann 2007).

No entanto, após o tratamento das células com Reversina 205 observou-se um aumento de GSH nas células, sugerindo uma resposta ao stresse oxidativo induzido pela acumulação dos substratos da P-gP não transportados.

As diferenças nos níveis de expressão de P-gP nas sublinhas resistentes justificaram a realização do estudo de modulação da resistência com este composto. Pretendeu-se avaliar a capacidade de sensibilizar novamente as células ao Imatinib pela inibição simultânea da P-gP com Reversina 205.

Neste estudo, as células resistentes foram incubadas com uma dose reduzida (5  $\mu\text{M}$ ) de Reversina 205, que por si só não induzia um efeito citotóxico significativo (menos de 20% de morte celular), em simultâneo com doses crescentes de Imatinib. A redução do  $\text{IC}_{50}$  do Imatinib nas sublinhas resistentes, K562 RC e RD, comprovou a capacidade dos inibidores de transportadores de efluxo voltarem a sensibilizarem as células ao Imatinib. Assim, nas células K562 RC, o  $\text{IC}_{50}$  reduziu de 605  $\eta\text{M}$  para 171  $\eta\text{M}$ , na presença de Reversina 205. A sensibilização foi superior nas células K562 RD, em termos proporcionais, passando o  $\text{IC}_{50}$  de 1389  $\eta\text{M}$  para 305  $\eta\text{M}$  de Imatinib, após 48 horas de exposição. Contudo, esta re-sensibilização não foi total, uma vez que em nenhuma das sublinhas foi alcançado o  $\text{IC}_{50}$  de 75  $\eta\text{M}$  requerido pelas células K562.

A associação de Imatinib 10  $\eta\text{M}$  com Reversina 205 5  $\mu\text{M}$  mostrou ser ligeiramente antagonista na linha celular K562, mas o mesmo não se observou nas sublinhas resistentes. Os resultados sugerem que a aplicação de inibidores de transportadores de efluxo será benéfica apenas nas sublinhas resistentes, com expressão aumentada do transportador em questão.

Para finalizar, os resultados de uma forma geral foram ao encontro do esperado e permitiram elucidar sobre alguns mecanismos de resistência ao Imatinib menos explorados na LMC, sendo de destacar a importância dos transportadores de influxo e efluxo.



## ***Capítulo 5. Conclusão***



A resistência à terapêutica com Imatinib avaliada pelos modelos *in vitro* em estudo permitiu esclarecer algumas das variáveis envolvidas em todo este processo, ainda tão pouco explorado. Assim, deste trabalho pode-se inferir que a descontinuação da terapêutica com este inibidor de tirosina cinase poderá ser uma opção arriscada na prática clínica. De facto, nos modelos *in vitro* a interrupção da terapêutica conduziu a resistência adquirida a este fármaco, o que pode levar à recidiva da doença e à falência da terapêutica.

Independente do tipo de resistência desenvolvido por exposição ao Imatinib, observou-se um aumento dos níveis de expressão dos transportadores membranares de efluxo da família ABC, em particular da P-gP e da BCRP, e diminuição dos de influxo (OCT1 e OCTN2) demonstrando o seu importante papel no desenvolvimento de resistência a este fármaco.

Deste modo, e extrapolando o verificado nos modelos *in vitro*, este estudo sugere que os doentes que apresentem os níveis de transportadores de influxo diminuídos e os de efluxo aumentados, possuem teoricamente uma maior probabilidade de resistência ao Imatinib. A avaliação destes parâmetros e a determinação da sua importância, poderão conduzir a alterações na terapêutica a administrar e/ou ao aumento da dose de forma a contornar a resistência mediada pelos transportadores de influxo e efluxo.

Pelos resultados deste trabalho, constatou-se que a utilização de inibidores específicos de transportadores de efluxo, como a Reversina 205, ao permitirem aumentar a biodisponibilidade dos fármacos, será de extrema importância uma vez que consegue restaurar a resposta à terapêutica convencional.

A aplicação de novos fármacos na abordagem terapêutica da LMC pode ser uma mais-valia, dada a capacidade destes interferirem com processos celulares alternativos à oncoproteína BCR-ABL. Tanto o inibidor da farnesiltransferase como o inibidor do mTOR revelaram ter uma actividade essencialmente citotóxica, quer nas linhas celulares sensíveis quer nas resistentes. Destaca-se ainda a relação sinérgica entre os vários compostos e o Imatinib, permitindo a diminuição da toxicidade associada e conseguindo

alcançar igualmente resultados bastante positivos na redução da viabilidade celular. Conclui-se assim, que a administração de terapêuticas combinadas de vários fármacos dirigidos a alvos moleculares poderá ser uma estratégia promissora a aplicar como opção terapêutica na LMC.

No entanto, e apesar dos efeitos alcançados com terapêuticas dirigidas às vias de sinalização celulares, RAS/MAPK e PI3K/mTOR, poderá existir uma limitação no seu uso clínico, uma vez que estas vias não são exclusivas das células leucémicas. As vias em estudo regulam processos fisiológicos em múltiplos tipos celulares, estando constitutivamente activas por acção da oncoproteína BCR-ABL nas células de LMC.

Em toda esta temática muito ainda fica por esclarecer, contudo algumas das evidências constatados nestes modelos *in vitro*, e caso se revelem de igual modo importantes nos doentes, poderão proporcionar novas abordagens terapêuticas na LMC.

## ***Capítulo 6. Bibliografía***



- Abrantes, A. M., M. E. S. Serra, A. C. Gonçalves, J. Rio, B. Oliveiros, M. Laranjo, A. M. Rocha-Gonsalves, A. B. Sarmiento-Ribeiro and M. F. Botelho (2010). **"Hypoxia-induced redox alterations and their correlation with 99mTc-MIBI and 99mTc-HL-91 uptake in colon cancer cells."** Nuclear medicine and biology 37(2): 125-132.
- Adjei, A. A., J. N. Davis, L. M. Bruzek, C. Erlichman and S. H. Kaufmann (2001). **"Synergy of the Protein Farnesyltransferase Inhibitor SCH66336 and Cisplatin in Human Cancer Cell Lines."** Clinical Cancer Research 7(5): 1438-1445.
- Advani, A. S. and A. M. Pendergast (2002). **"Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects."** Leukemia Research 26(8): 713-720.
- Al-Nasiry, S., N. Geusens, M. Hanssens, C. Luyten and R. Pijnenborg (2007). **"The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells."** Human Reproduction 22(5): 1304-1309.
- Ambudkar, S. V., I.-W. Kim and Z. E. Sauna (2006). **"The power of the pump: Mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1)."** European Journal of Pharmaceutical Sciences 27(5): 392-400.
- Appels, N. M. G. M., J. H. Beijnen and J. H. M. Schellens (2005). **"Development of farnesyl transferase inhibitors: a review."** The oncologist 10(8): 565.
- Apperley, J. F. (2007a). **"Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia."** The lancet oncology 8(11): 1018-1029.
- Apperley, J. F. (2007b). **"Part II: management of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia."** The lancet oncology 8(12): 1116-1128.
- Arnaud, O. I., A. Koubeissi, L. Ettouati, R. I. Terreux, G. Alamé, C. Grenot, C. Dumontet, A. Di Pietro, J. I. Paris and P. Falson (2010). **"Potent and Fully Noncompetitive Peptidomimetic Inhibitor of Multidrug Resistance P-Glycoprotein."** Journal of Medicinal Chemistry 53(18): 6720-6729.
- Athar, U. and A. Gajra (2008). **"Role of mTOR in Hematological Malignancies."** Current Cancer Therapy Reviews 4(3): 211-218.
- Atkins, M. B., U. Yasothan and P. Kirkpatrick (2009). **"Everolimus."** Nat Rev Drug Discov 8(7): 535-536.
- Aubry, J.-P., A. Blaecke, S. Lecoanet-Henchoz, P. Jeannin, N. Herbault, G. Caron, V. Moine and J.-Y. Bonnefoy (1999). **"Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity."** Cytometry 37(3): 197-204.

- Baker, E. K., R. W. Johnstone, J. R. Zalcborg and A. El-Osta (2005). "**Epigenetic changes to the *MDR1* locus in response to chemotherapeutic drugs.**" *Oncogene* 24(54): 8061-8075.
- Barton, M. K. (2011). "**Discontinuation of imatinib may be possible in chronic myelogenous leukemia.**" *CA A Cancer Journal of Clinicians* 61(2): 65-66.
- Bernas, T., G. Grégori, E. K. Asem and J. P. Robinson (2006). "**Integrating Cytomics and Proteomics.**" *Molecular & Cellular Proteomics* 5(1): 2-13.
- Braun, T. and P. Fenaux (2008). "**Farnesyltransferase inhibitors and their potential role in therapy for myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia.**" *British journal of haematology* 141(5): 576-586.
- Burchert, A. (2007). "**Roots of imatinib resistance: A question of self-renewal?**" *Drug Resistance Updates* 10(4-5): 152-161.
- Burger, H. and K. Nooter (2004a). "**Pharmacokinetic Resistance to Imatinib Mesylate: Role of the ABC Drug Pumps ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) in the Oral Bioavailability of Imatinib.**" *Cell Cycle* 3(12): 1502-1505.
- Burger, H. and K. Nooter (2004b). "**Pharmacokinetic resistance to imatinib mesylate: role of the ABC drug pumps ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) in the oral bioavailability of imatinib.**" *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 3(12): 1502.
- Burger, H., H. van Tol, A. W. M. Boersma, M. Brok, E. A. C. Wiemer, G. Stoter and K. Nooter (2004). "**Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump.**" *Blood* 104(9): 2940-2942.
- Calabretta, B. and D. Perrotti (2004). "**The biology of CML blast crisis.**" *Blood* 103(11): 4010.
- Can, G., H. A. Ekiz and Y. Baran (2011). "**Imatinib induces autophagy through *BECLIN-1* and *ATG5* genes in chronic myeloid leukemia cells.**" *Hematology* 16(2): 95-99.
- Choi, C. H. (2005). "**ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal.**" *Cancer cell international* 5(1): 30.
- Chou, J. a. C., T.-C. (1987). *Dose-effect analysis with microcomputers: Quantitation of ED50, LD50, synergism, antagonism low-dose risk, receptor-ligand binding and enzyme kinetics.* Manual and Software. Cambridge, U.K, Biosoft.

- Chou, T. (1991). **"The median-effect principle and the combination index for quantitation of synergism and antagonism."** Synergism and antagonism in chemotherapy. Academic Press, San Diego, Calif: 61-102.
- Chou, T. C. and P. Talalay (1984). **"Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors."** Advances in enzyme regulation 22: 27-55.
- Cortes, J., M. Albitar, D. Thomas, F. Giles, R. Kurzrock, A. Thibault, W. Rackoff, C. Koller, S. O'Brien and G. Garcia-Manero (2003). **"Efficacy of the farnesyl transferase inhibitor R115777 in chronic myeloid leukemia and other hematologic malignancies."** Blood 101(5): 1692.
- Cortes, J., S. O'Brien and H. Kantarjian (2004). **"Discontinuation of imatinib therapy after achieving a molecular response."** Blood 104(7): 2204-2205.
- Crossman, L. C., B. J. Druker, M. W. N. Deininger, M. Pirmohamed, L. Wang and R. E. Clark (2005). **"hOCT 1 and resistance to imatinib."** Blood 106(3): 1133-1134.
- Crossman, L. C. and S. O'Brien (2004). **"Clinical results with imatinib in chronic myeloid leukaemia."** Leukemia research 28: 3-9.
- Dalerba, P., R. W. Cho and M. F. Clarke (2007). **"Cancer stem cells: models and concepts."** Annual Review of Medicine 58: 267-284.
- Deininger, M., E. Buchdunger and B. J. Druker (2005). **"The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia."** Blood 105(7): 2640-2653.
- Deininger, M. W. N., J. M. Goldman and J. V. Melo (2000). **"The molecular biology of chronic myeloid leukemia."** Blood 96(10): 3343-3356.
- Di Nicolantonio, F., S. Arena, J. Tabernero, S. Grosso, F. Molinari, T. Macarulla, M. Russo, C. Cancelliere, D. Zecchin and L. Mazzucchelli (2010). **"Deregulation of the PI3K and KRAS signaling pathways in human cancer cells determines their response to everolimus."** The Journal of Clinical Investigation 120(8): 2858.
- Dracopoli, N. C., J. L. Haines and B. R. Korf (1994). **"Current protocols in human genetics."**
- Druker, B. J. (2008). **"Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML."** Blood 112(13): 4808.

- Durkin, W. J., V. K. Ghanta, C. M. Balch, D. W. Davis and R. N. Hiramoto (1979). **"A Methodological Approach to the Prediction of Anticancer Drug Effect in Humans."** *Cancer research* 39(2 Part 1): 402-407.
- Faderl, S., M. Talpaz, Z. Estrov, S. O'BRIEN, R. Kurzrock and H. M. Kantarjian (1999). **"The biology of chronic myeloid leukemia."** *The New England Journal of Medicine* 10: 11.
- Faroni, L., G. Wilson, G. Gerrard, J. Mason, D. Grimwade, H. E. White, D. G. de Castro, S. Austin, A. Awan and E. Burt (2011). **"Guidelines for the measurement of BCR ABL1 transcripts in chronic myeloid leukaemia."** *British journal of haematology*.
- Fox, S. I. (1996). **"Human Physiology. Wm. C."** Brown. Publishers. USA.
- Frazer, R., A. E. Irvine and M. F. McMullin (2007). **"Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century."** *Ulster Medicine Journal* 76(1): 8-17.
- Gambacorti-Passerini, C., M. Zucchetti, D. Russo, R. Frapolli, M. Verga, S. Bungaro, L. Tornaghi, F. Rossi, P. Pioltelli, E. Pogliani, D. Alberti, G. Corneo and M. D'Incalci (2003). **" $\alpha$ 1 Acid Glycoprotein Binds to Imatinib (STI571) and Substantially Alters Its Pharmacokinetics in Chronic Myeloid Leukemia Patients."** *Clinical Cancer Research* 9(2): 625-632.
- Giacomini, K. M., S. M. Huang, D. J. Tweedie, L. Z. Benet, K. L. R. Brouwer, X. Chu, A. Dahlin, R. Evers, V. Fischer and K. M. Hillgren (2010). **"Membrane transporters in drug development."** *Nature Reviews Drug Discovery* 9(3): 215-236.
- Giannoudis, A., A. Davies, C. M. Lucas, R. J. Harris, M. Pirmohamed and R. E. Clark (2008). **"Effective dasatinib uptake may occur without human organic cation transporter 1 (hOCT1): implications for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukemia."** *Blood* 112(8): 3348-3354.
- Goldman, J. M. (2009). **"Treatment strategies for CML."** *Best practice & research. Clinical haematology* 22(3): 303-313.
- Gonçalves, A. C. (2008). **Avaliação do stresse oxidativo na Síndrome Mielodisplásica: Papel da mitocôndria e dos agentes antioxidantes.** Master, University of Coimbra.
- Gorman, A. M., A. Samali, A. J. McGowan and T. G. Cotter (1997). **"Use of flow cytometry techniques in studying mechanisms of apoptosis in leukemic cells."** *Cytometry* 29(2): 97-105.
- Graber-Maier, A., H. Gutmann and J. Drewe (2010). **"A New Intestinal Cell Culture Model To Discriminate the Relative Contribution of P-gp and**

**BCRP on Transport of Substrates Such as Imatinib.** Molecular Pharmaceutics 7(5): 1618-1628.

Gruenbaum, Y., K. L. Wilson, A. Harel, M. Goldberg and M. Cohen (2000). **"Review: Nuclear Lamins--Structural Proteins with Fundamental Functions."** Journal of Structural Biology 129(2-3): 313-323.

Hayer-Zillgen, M., M. Brüss and H. Bönisch (2002). **"Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3."** British Journal of Pharmacology 136(6): 829-836.

Hehlmann, R., A. Hochhaus and M. Bacarani (2007). **"Chronic myeloid leukaemia."** The Lancet 370(9584): 342-350.

Hitchler, M. J. and F. E. Domann (2007). **"An epigenetic perspective on the free radical theory of development."** Free Radical Biology and Medicine 43(7): 1023-1036.

Hiwase, D. K., V. Saunders, D. Hewett, A. Frede, S. Zrim, P. Dang, L. Eadie, L. B. To, J. Melo, S. Kumar, T. P. Hughes and D. L. White (2008). **"Dasatinib Cellular Uptake and Efflux in Chronic Myeloid Leukemia Cells: Therapeutic Implications."** Clinical Cancer Research 14(12): 3881-3888.

Hoffbrand, A. V., D. Catovsky, E. G. D. Tuddenham and A. R. Green, Eds. (2011). Postgraduate Haematology.

Hoffbrand, A. V., P. A. H. Moss and J. E. Pettit (2006). **Essential haematology**, Blackwell Pub.

Hoffmann, K., R. Bekeredjian, J. Schmidt, M. W. Büchler and A. Märten (2008). **"Effects of the High-Affinity Peptide Reversin 121 on Multidrug Resistance Proteins in Experimental Pancreatic Cancer."** Tumor Biology 29(6): 351-358.

Houwen, B. (2001). **"The differential cell count."** Laboratory Hematology 7(2): 89-100.

Hu, S., R. M. Franke, K. K. Filipowski, C. Hu, S. J. Orwick, E. A. de Bruijn, H. Burger, S. D. Baker and A. Sparreboom (2008a). **"Interaction of Imatinib with Human Organic Ion Carriers."** Clinical Cancer Research 14(10): 3141-3148.

Hu, S., R. M. Franke, K. K. Filipowski, C. Hu, S. J. Orwick, E. A. de Bruijn, H. Burger, S. D. Baker and A. Sparreboom (2008b). **"Interaction of imatinib with human organic ion carriers."** Clinical Cancer Research 14(10): 3141.

- Huntly, B. J. P. and D. G. Gilliland (2004). **"Blasts from the past:: New lessons in stem cell biology from chronic myelogenous leukemia."** *Cancer cell* 6(3): 199-201.
- Ji, N., J. Yuan, J. Liu and S. Tian (2010). **"Developing multidrug-resistant cells and exploring correlation between BCRP/ABCG2 over-expression and DNA methyltransferase."** *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 42(12): 854-862.
- Jordan, C. T., M. L. Guzman and M. Noble (2006). **"Cancer Stem Cells."** *The New England Journal of Medicine* 355(12): 1253-1261.
- Jørgensen, H. G., M. A. Elliott, E. K. Allan, C. E. Carr, T. L. Holyoake and K. D. Smith (2002). **" $\alpha$ 1-Acid glycoprotein expressed in the plasma of chronic myeloid leukemia patients does not mediate significant in vitro resistance to STI571."** *Blood* 99(2): 713-715.
- Kantarjian, H. M., F. Giles, A. Quintás-Cardama and J. Cortes (2007). **"Important Therapeutic Targets in Chronic Myelogenous Leukemia."** *Clinical Cancer Research* 13(4): 1089-1097.
- Kelly, K., J. Rowe, S. Padmanabhan, S. Nawrocki and J. Carew (2011). **"Mammalian target of rapamycin as a target in hematological malignancies."** *Targeted oncology* 6(1): 53-61.
- Kerb, R. (2005). **"Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy."** *Cancer Letters* 234(1): 4-33.
- Koepsell, H. (2004). **"Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs."** *Trends in Pharmacological Sciences* 25(7): 375-381.
- Koepsell, H., K. Lips and C. Volk (2007). **"Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications."** *Pharmaceutical research* 24(7): 1227-1251.
- Krishna, R. and L. D. Mayer (2000a). **"Multidrug resistance (MDR) in cancer: Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs."** *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 11(4): 265-283.
- Krishna, R. and L. D. Mayer (2000b). **"Multidrug resistance (MDR) in cancer:: Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs."** *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 11(4): 265-283.
- Kuwatsuka, Y., M. Minami, Y. Minami, K. Sugimoto, F. Hayakawa, Y. Miyata, A. Abe, D. Goff, H. Kiyoi and T. Naoe (2011). **"The mTOR inhibitor,**

**everolimus (RAD001), overcomes resistance to imatinib in quiescent Ph-positive acute lymphoblastic leukemia cells." Blood Cancer Journal 1(5): e17.**

Lancet, J. E. and J. E. Karp (2003). **"Farnesyltransferase inhibitors in hematologic malignancies: new horizons in therapy."** Blood 102(12): 3880.

Larghero, J., T. Leguay, S. Mourah, I. Madelaine-Chambrin, A.-L. Taksin, E. Raffoux, J.-N. Bastie, L. Degos, P. Berthaud, J.-P. Marolleau, F. Calvo, C. Chomienne, F.-X. Mahon and P. Rousselot (2003). **"Relationship between elevated levels of the alpha 1 acid glycoprotein in chronic myelogenous leukemia in blast crisis and pharmacological resistance to imatinib (Gleevec®) *in vitro* and *in vivo*."** Biochemical Pharmacology 66(10): 1907-1913.

Lobo, N. A., Y. Shimono, D. Qian and M. F. Clarke (2007). **"The Biology of Cancer Stem Cells."** Annual Review of Cell and Developmental Biology 23(1): 675-699.

Lodish, H., A. Berk, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, A. Bretscher, H. Ploegh and P. Matsudaira (2008). **Cancer. Molecular cell biology.** New York, WH Freeman and Company: 1107-1150.

Lozzio, C. and B. Lozzio (1975). **"Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome."** Blood 45(3): 321-334.

107 | Bibliografia

Maffioli, L., J. Steens, E. Pauwels and E. Bombardieri (1996). **"Applications of 99mTc-sestamibi in oncology."** Tumori 82(1): 12.

Mahon, F.-X., F. Belloc, V. Lagarde, C. Chollet, F. Moreau-Gaudry, J. Reiffers, J. M. Goldman and J. V. Melo (2003a). **"MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models."** Blood 101(6): 2368-2373.

Mahon, F.-X., S. Hayette, V. Lagarde, F. Belloc, B. Turcq, F. Nicolini, C. Belanger, P. W. Manley, C. Leroy, G. Etienne, S. Roche and J.-M. Pasquet (2008). **"Evidence that Resistance to Nilotinib May Be Due to BCR-ABL, Pgp, or Src Kinase Overexpression."** Cancer research 68(23): 9809-9816.

Mahon, F.-X., D. Réa, J. Guilhot, F. Guilhot, F. Huguet, F. Nicolini, L. Legros, A. Charbonnier, A. Guerci, B. Varet, G. Etienne, J. Reiffers and P. Rousselot (2010). **"Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial."** The Lancet Oncology 11(11): 1029-1035.

- Mahon, F. X., F. Belloc, V. Lagarde, C. Chollet, F. Moreau-Gaudry, J. Reiffers, J. M. Goldman and J. V. Melo (2003b). **"MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models."** Blood 101(6): 2368.
- Mancini, M., S. Petta, G. Martinelli, E. Barbieri and M. A. Santucci (2010). **"RAD 001 (everolimus) prevents mTOR and Akt late re-activation in response to imatinib in chronic myeloid leukemia."** Journal of Cellular Biochemistry 109(2): 320-328.
- Mao, Q. (2005). **"Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport."** The AAPS journal 7(1): 118-133.
- Melo, J. V., T. P. Hughes and J. F. Apperley (2003). **"Chronic Myeloid Leukemia."** Hematology 2003(1): 132-152.
- Milojkovic, D. and J. Apperley (2009). **"Mechanisms of Resistance to Imatinib and Second-Generation Tyrosine Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia."** Clinical Cancer Research 15(24): 7519-7527.
- Myatt, S. S. and E. W. Lam (2007). **"Promiscuous and lineage-specific roles of cell cycle regulators in haematopoiesis."** Cell Division 2(1): 6.
- Nagai, T., K. Ohmine, S. Fujiwara, M. Uesawa, C. Sakurai and K. Ozawa (2010). **"Combination of tipifarnib and rapamycin synergistically inhibits the growth of leukemia cells and overcomes resistance to tipifarnib via alteration of cellular signaling pathways."** Leukemia research 34(8): 1057-1063.
- Nakayama, G. R., M. C. Caton, M. P. Nova and Z. Parandoosh (1997). **"Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in vitro*."** Journal of Immunological Methods 204(2): 205-208.
- Naumann, S., D. Reutzel, M. Speicher and H.-J. Decker (2001). **"Complete karyotype characterization of the K562 cell line by combined application of G-banding, multiplex-fluorescence in situ hybridization, fluorescence in situ hybridization, and comparative genomic hybridization."** Leukemia research 25(4): 313-322.
- Nowell, P. C. and D. A. Hungerford (1960). **"Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes."** Journal of the National Cancer Institute 25: 85.
- O'Brien, S. G., P. Meinhardt, E. Bond, J. Beck, B. Peng, C. Dutreix, G. Mehring, S. Milosavljev, C. Huber, R. Capdeville and T. Fischer (2003). **"Effects of imatinib mesylate (STI571, Glivec) on the pharmacokinetics of simvastatin, a cytochrome P450 3A4 substrate, in patients with chronic myeloid leukaemia."** British Journal of Cancer 89(10): 1855-1859.

- O'Connor, J. E., B. F. Kimler, M. C. Morgan and K. J. Tempas (1988). **"A flow cytometric assay for intracellular nonprotein thiols using mercury orange."** Cytometry 9(6): 529-532.
- Okabe, S., T. Tauchi and K. Ohyashiki (2008). **"Characteristics of Dasatinib- and Imatinib-Resistant Chronic Myelogenous Leukemia Cells."** Clinical Cancer Research 14(19): 6181-6186.
- Ozben, T. (2006). **"Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer."** FEBS letters 580(12): 2903-2909.
- Pelengaris, S. and M. Khan (2006). **The molecular biology of cancer**, Wiley-Blackwell.
- Peng, B., P. Lloyd and H. Schran (2005). **"Clinical pharmacokinetics of imatinib."** Clinical pharmacokinetics 44(9): 879-894.
- Quintás-Cardama, A. and J. Cortes (2009). **"Molecular biology of *bcr-abl1*-positive chronic myeloid leukemia."** Blood 113(8): 1619-1630.
- Quintás-Cardama, A., H. Kantarjian and J. Cortes (2009). **"Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia."** Cancer Control 16(2): 122.
- Radujkovic, A., J. Topaly, S. Fruehauf and W. J. Zeller (2006). **"Combination Treatment of Imatinib-sensitive and -resistant *BCR-ABL*-positive CML Cells with Imatinib and Farnesyltransferase Inhibitors."** Anticancer research 26(3A): 2169-2177.
- Ramirez, P. and J. F. DiPersio (2008). **"Therapy options in imatinib failures."** The oncologist 13(4): 424.
- Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke and I. L. Weissman (2001). **"Stem cells, cancer, and cancer stem cells."** Nature 414(6859): 105-111.
- Robey, R. W., K. K. K. To, O. Polgar, M. Dohse, P. Fetsch, M. Dean and S. E. Bates (2009). **"ABCG2: A perspective."** Advanced Drug Delivery Reviews 61(1): 3-13.
- Rohrbacher, M. and J. Hasford (2009). **"Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML)."** Best practice & research. Clinical haematology 22(3): 295-302.
- Rowley, J. D. (1973). **"Letter: a new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining."** Nature 243: 290-293.
- Rush, L. J., K. Heinonen, K. Mrozek, B. J. Wolf, M. Abdel-Rahman, J. Szymanska, P. Peltomaki, F. Kapadia, C. D. Bloomfield and M. A.

Caligiuri (2002). **"Comprehensive cytogenetic and molecular genetic characterization of the TI-1 acute myeloid leukemia cell line reveals cross-contamination with K-562 cell line."** Blood 99(5): 1874.

Sarmiento-Ribeiro, A. B. (2000). **Alterações fenóticas da célula tumoral e a sua relação com a resistência à quimioterapia** PhD, University of Coimbra.

Saunders, P., A. Cisterne, J. Weiss, K. F. Bradstock and L. J. Bendall (2011). **"The mammalian target of rapamycin inhibitor RAD001 (everolimus) synergizes with chemotherapeutic agents, ionizing radiation and proteasome inhibitors in pre-B acute lymphocytic leukemia."** Haematologica 96(1): 69-77.

Shaffer, L. G. and N. Tommerup (2005). **ISCN 2005: an international system for human cytogenetic nomenclature (2005): recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature**, S Karger Pub.

Sharom, F. J., X. Yu, P. Lu, R. Liu, J. W. K. Chu, K. Szabó, M. Müller, C. D. Hose, A. Monks, A. Váradi, J. Seprôdi and B. Sarkadi (1999). **"Interaction of the P-glycoprotein multidrug transporter (MDR1) with high affinity peptide chemosensitizers in isolated membranes, reconstituted systems, and intact cells."** Biochemical Pharmacology 58(4): 571-586.

Sorrentino, B. P. (2002). **"Gene therapy to protect haematopoietic cells from cytotoxic cancer drugs."** Nat Rev Cancer 2(6): 431-441.

Swerdlow, S. H., E. Campo, N. L. Harris, E. S. Jaffe, S. A. Pileri, H. Stein, J. Thiele and J. W. Vardiman (2008). **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**, International Agency for Research on Cancer Lyon.

Tashiro, E., A. Tsuchiya and M. Imoto (2007). **"Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression."** Cancer science 98(5): 629-635.

Tefferi, A. and D. G. Gilliland (2007). **"Oncogenes in Myeloproliferative Disorders."** Cell Cycle 6(5): 550-566.

Thomas, J., L. Wang, R. E. Clark and M. Pirmohamed (2004). **"Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance."** Blood 104(12): 3739.

van Erp, N. P., H. Gelderblom, M. O. Karlsson, J. Li, M. Zhao, J. Ouwkerk, J. W. Nortier, H.-J. Guchelaar, S. D. Baker and A. Sparreboom (2007). **"Influence of CYP3A4 inhibition on the Steady-State Pharmacokinetics of Imatinib."** Clin. Cancer Res. 13(24): 7394-7400.

- van Schaik, R. H. N. (2004). "**Implications of cytochrome P450 genetic polymorphisms on the toxicity of antitumor agents.**" Therapeutic drug monitoring 26(2): 236.
- van Schaik, R. H. N. (2008). "**CYP450 pharmacogenetics for personalizing cancer therapy.**" Drug Resistance Updates 11(3): 77-98.
- Volpe, G., C. Panuzzo, S. Ulisciani and D. Cilloni (2009). "**Imatinib resistance in CML.**" Cancer letters 274(1): 1-9.
- Walz, C. and M. Sattler (2006). "**Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML).**" Critical Reviews in Oncology/Hematology 57(2): 145-164.
- Weisberg, E. and J. D. Griffin (2003). "**Resistance to imatinib (Glivec): update on clinical mechanisms.**" Drug Resistance Updates 6(5): 231-238.
- White, D. L., P. Dang, J. Engler, A. Frede, S. Zrim, M. Osborn, V. A. Saunders, P. W. Manley and T. P. Hughes (2010). "**Functional Activity of the OCT-1 Protein Is Predictive of Long-Term Outcome in Patients With Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia Treated With Imatinib.**" Journal of Clinical Oncology 28(16): 2761.
- White, D. L., V. A. Saunders, P. Dang, J. Engler, A. C. W. Zannettino, A. C. Cambareri, S. R. Quinn, P. W. Manley and T. P. Hughes (2006). "**OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib.**" Blood 108(2): 697-704.
- Widmer, N., L. A. Decosterd, C. Csajka, S. Leyvraz, M. A. Duchosal, A. Rosselet, B. Rochat, C. B. Eap, H. Henry, J. Biollaz and T. Buclin (2006). "**Population pharmacokinetics of imatinib and the role of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein.**" British Journal of Clinical Pharmacology 62(1): 97-112.
- Wiernik, P. H. (2003). Neoplastic diseases of the blood, Cambridge Univ Pr.
- Zhou, G.-B., J. Zhang, Z.-Y. Wang, S.-J. Chen and Z. Chen (2007). "**Treatment of acute promyelocytic leukaemia with *all-trans* retinoic acid and arsenic trioxide: a paradigm of synergistic molecular targeting therapy.**" Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 362(1482): 959-971.

