



FLAVIANA RUADE DE SOUZA REIS

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE SURVIVINA E SMAC/DIABLO  
NA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA**

---

Rio de Janeiro

2007

**FLAVIANA RUADE DE SOUZA REIS**

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE SURVIVINA E SMAC/DIABLO  
NA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação do Instituto Nacional de  
Câncer como requisito parcial para  
obtenção do título do Mestre em  
Oncologia.

Orientadora: Raquel Ciuvalschi Maia.

FLAVIANA RUADE DE SOUZA REIS

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE SURVIVINA E SMAC/DIABLO  
NA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de  
**MESTRE EM ONCOLOGIA**  
e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Oncologia do  
Instituto Nacional de Câncer.

---

Marcelo Barcinski  
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Oncologia do INCA

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Carlos Gil Moreira Ferreira  
Serviço de Pesquisa Clínica - Coordenação de Pesquisa - INCA

---

Prof. Miguel Angelo Martins Moreira  
Divisão de Genética - Coordenação de Pesquisa - INCA

---

Prof. Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek  
Laboratório de Imununologia Tumoral - Instituto de Bioquímica Médica - URFJ

**Rio de Janeiro, 05 de abril de 2007.**

*Dedico este trabalho a Tereza, Eli, Fabiane, Marianna, Adib e Hugo Leonardo:*

*MEUS PILARES*

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço à minha orientadora, Dra. Raquel C. Maia. Não fosse sua sensibilidade, seu profissionalismo e sua vocação para formar pessoas este trabalho não seria possível. Agradeço por ter acrescentado conhecimento à minha formação e valores à minha vida. Agradeço por ter acreditado em mim.

À Coordenadora da CPQ/INCA, Dra. Marisa Breitenbach pela ajuda e por não ter se omitido quando mais precisei de apoio.

Às amigas: Gisele Vasconcelos, Vânia Leigue, e Jamila Perini pelo apoio e amizade em todas as horas.

Aos amigos do Serviço de Pesquisa Clínica/CPQ por toda colaboração e pelos muitos favores.

Aos amigos do Laboratório de Genética Aplicada-HC-I, em especial à querida amiga Vanessa Sandim por toda ajuda e pelo companheirismo de sempre.

Ao Dr. João Viola por toda atenção e pela ajuda com minhas queridas proteínas.

Ao Prof. Pedro Carvalho pela atenção e pela primordial ajuda na análise dos dados estatísticos deste trabalho.

Ao Prof. Hector Seuanez, Dr. Miguel Moreira e Juliano Javerth pela acolhida na Divisão de Genética para realização dos experimentos de PCR em tempo real.

À Dra. Claudete Klumb pela atenção e por toda ajuda sempre.

Aos professores dos cursos da Pós-Graduação pelo conhecimento adquirido.

Ao Dr. Marcelo Barcinski.

Às secretárias da Pós-Graduação em Oncologia do INCA por toda atenção.

À CAPES pela bolsa sem a qual eu não poderia prosseguir em meus estudos.

Aos funcionários da Radiologia – HC-I, que sempre foram muito solícitos e amistosos.

Aos colegas dos Laboratórios do CEMO pela sempre pronta colaboração.

Aos amigos e colegas que fiz ao longo desses anos na Coordenação de Pesquisa/INCA.

Aos médicos do Serviço de Hematologia do INCA pelo envio das amostras dos pacientes.

Aos colegas do Laboratório de Hematologia Celular e Molecular em especial à Karina Lani Silva, Flavia da Cunha Vasconcelos e Marcos Scheiner pela ajuda nos meus primeiros passos no laboratório.

À Débora Pereira por toda ajuda.

Aos amigos Eliane Magluta e Alex Sandro Machado pela amizade, pelo respeito e por toda ajuda.

Aos funcionários do INCA que de alguma forma colaboraram com meu trabalho.

Aos pacientes e doadores voluntários que possibilitaram a realização deste trabalho através da autorização para utilização de suas amostras.

Ao Swissbridge Project, PRONEX, CNPq, pelo apoio financeiro.

Por fim, devo fazer um agradecimento especial aos meus familiares e amigos, sem os quais eu não teria chegado tão longe. Muito obrigada pela paciência, compreensão, carinho e ajuda. Obrigada por acreditarem no meu sonho.

## RESUMO

REIS, Flaviana Ruade de Souza. **Estudo da expressão de survivina e Smac/DIABLO na leucemia mielóide crônica.** Orientadora: Raquel Ciualschi Maia. Rio de Janeiro: Pós-Graduação em Oncologia/INCA, 2007. Dissertação (Mestrado em Oncologia).

Leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa com expansão clonal de células malignas. O cromossomo Philadelphia, derivado da translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22, resulta em um gene quimérico chamado *BCR-ABL*, encontrado em 90% dos pacientes com LMC, sendo atribuída a essa quimera a patogênese da LMC. Imatinibe, um fármaco alvo-específico, liga-se e estabiliza a forma inativa da Bcr-Abl impedindo os efeitos da proteína. O desenvolvimento de resistência ao Imatinibe e a persistência de doença residual mínima tem desanimado os investigadores, além disso, respostas ao Imatinibe são menos freqüentes e mais curtas em pacientes que se encontram nos estágios mais avançados da LMC. Levando em conta que a resistência ao Imatinibe poder ser multifatorial, a identificação dos mecanismos de envolvidos na resistência pode levar a ganhos em sobrevida para os pacientes. Nesse contexto, proteínas envolvidas na regulação da apoptose são de grande interesse biológico e alvos terapêuticos em potencial. Nosso objetivo principal foi avaliar pela primeira vez a expressão da survivina e da Smac/DIABLO, simultaneamente, em células de 68 pacientes com LMC, uma vez que dados da literatura apontam a survivina como marcador tumoral em outras neoplasias e a Smac/DIABLO como sua antagonista. Verificou-se também o efeito sobre a expressão dessas proteínas em células de uma linhagem celular após exposição ao Imatinibe. Avaliamos o perfil de expressão de survivina e Smac/DIABLO mediante exposição ao Imatinibe associado ao ARA-C, para verificar a alteração na citotoxicidade. A citotoxicidade e a indução de apoptose foram observadas através dos ensaios de MTT e citometria de fluxo com Anexina V. Para detecção da expressão das proteínas foi utilizada a técnica de *Western blotting* e para análise da expressão gênica, PCR em tempo real. Observamos a expressão da survivina em 85% das nossas amostras e de Smac/DIABLO em 83%. Não foi encontrada correlação da expressão da survivina com Smac/DIABLO, no entanto observaram-se diferenças significativas da expressão dessas proteínas nas células dos pacientes agrupados de acordo com suas características clínicas. Os pacientes com fenótipo mais agressivo da doença apresentaram maiores níveis de Smac/DIABLO. Aqueles que receberam algum tipo de tratamento quimioterápico apresentaram níveis menores de Smac/DIABLO do que aqueles que não

receberam tratamento prévio. Foram observados maiores níveis de expressão de ARNm da Smac/DIABLO em pacientes em relação aos doadores saudáveis. Imatinibe e ARA-C promoveram, em associação, um efeito aditivo na citotoxicidade. Após incubação com os fármacos o perfil de expressão da survivina e da Smac/DIABLO foi alterado, sugerindo que os quimioterápicos interferem na via de morte celular. Concluimos que a expressão de Smac/DIABLO não tem correlação com a expressão de survivina em LMC, sugerindo que a interação entre essas duas proteínas pode não ser o principal mecanismo de resistência à apoptose nesse tipo de neoplasia. Entretanto, a variação da expressão dessas proteínas em função das características clínicas dos pacientes nos leva a crer, que survivina e Smac/DIABLO possam desempenhar papéis distintos no contexto de morte celular das células neoplásicas.

**Palavras-chave:** leucemia mielóide crônica, survivina, Smac/DIABLO.



## ABSTRACT

REIS, Flaviana Ruade de Souza. **Study of the survivin and Smac/DIABLO expression in chronic myeloid leukemia**. Thesis Adviser: Raquel Ciuvalschi Maia. Rio de Janeiro: Pós-Graduação em Oncologia/INCA, 2007. Thesis (Master in Oncology).

Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal proliferative disease originated from a pluripotential stem cell in which a 9:22 translocation, Philadelphia chromosome, results in the production of BCR-ABL fusion protein that has a constitutive tyrosine activity and desregulates signal transduction pathways, causing leukemia. Imatinib, a selective inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase, has been demonstrated to provide complete cytogenetic response and prolonged survival in CML patients. Although, clinical results seem to be promising resistance to imatinib has been observed. Taking into consideration that resistance to imatinib may be a multifactorial phenomenon, identifying possible resistance to this drug may provide the development of more adequate therapeutic protocols. Within this context, proteins involved in the apoptotic regulation are of great biological interest as they act both as prognostic markers as well as potential therapeutic targets in tumors. For survivin is presented in literature as a tumor marker in cancer and Smac/DIABLO is understood as its antagonist, the present work focus on evaluating the expressions of both survivin and Smac/DIABLO in cells from 68 CML patients using Western blotting assay. It was observed that survivin and Smac/DIABLO were detected in 85% and 83% of samples, respectively. No correlation between these two proteins was observed. CML patients in the most advanced phases presented the highest levels of Smac/DIABLO, although those who had previously been exposed to chemotherapeutic drugs of some kind presented the lowest levels of this protein. Higher levels of mRNA of Smac/DIABLO, analyzed by real-time quantitative RT-PCR, when compared to samples from healthy donors, were also observed. In parallel, we analyzed the imatinib and imatinib associated to ARA-C effects in K562 CML cell line using MTT and annexin V assays. Imatinib in association with ARA-C promoted an additive effect in the cytotoxicity in the CML cell line. The expression profile of survivin and Smac/DIABLO was modified after incubation of the cells with these drugs, which suggests that these drugs have interfered in the cell death pathway. We concluded that the Smac/DIABLO expression is not correlated with the survivin expression indicating that the interaction between these two proteins in CML does not consist in the main mechanism of resistance to apoptosis. However, the variation of expression of these proteins in accordance with the clinical features of CML

patients makes us believe that survivin and Smac/DIABLO play different roles in the context of cell death.

**Keywords:** chronic myeloid leukemia, survivin, Smac/DIABLO

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>21</b>
1.1. Leucemia Mielóide Crônica	21
1.1.1. Definição	21
1.1.2. Aspectos históricos e epidemiológicos	21
1.1.3. Patogênese	24
1.1.4. Tratamento da LMC	28
1.1.4.1. “Era” pré-Imatinibe	28
1.1.4.2. Imatinibe na LMC	30
1.1.4.2.1. Resistência ao Imatinibe	32
1.2. Apoptose	33
1.2.1. Proteínas inibidoras da apoptose	38
1.2.1.1 Survivina	39
1.2.2. Inibição das IAPs	49
1.2.2.1. Smac/DIABLO	49
<b>2. Objetivos</b>	<b>53</b>
2.1. Objetivo Principal	53
2.2. Objetivos Específicos	53
<b>3. Materiais e Métodos</b>	<b>54</b>
3.1. Seleção da amostras	54
3.1.1. Pacientes	54
3.1.2. Amostras controle	55
3.2. Metodologia	56
3.2.1. Separação de células dos indivíduos saudáveis e pacientes	56
3.3.1.1 Armazenamento das amostras	57
3.2.2. Quantificação de proteínas totais pelo método de Lowry	57
3.2.3. Determinação da expressão da survivina e da Smac/DIABLO por Western blotting	58
A.Eletroforese das proteínas	59
B.Transferência das bandas protéicas para membrana de nitrocelulose	60
C.Marcação com anticorpo monoclonal anti-survivina e anti-Smac/DIABLO	61
D.Revelação	61

3.2.4. Extração de RNA pelo método do TRIZOL	63
3.2.5. Síntese de cDNA com kit T-Primed First-Strand Ready-to-Go (Amersham Biosciences)	63
3.2.6. Determinação da expressão de <i>survivina</i> e <i>Smac/DIABLO</i> por PCR em tempo real ( <i>Real time PCR</i> ) .	64
3.2.7. Estudo da associação entre Imatinibe e ARA-C na linhagem K562	66
3.2.7.1. Viabilidade celular pelo método do MTT	66
3.2.7.2. Ensaio de citotoxicidade: determinação da apoptose espontânea e induzida pelo Imatinibe e ARA-C por Anexina V	67
3.2.7.3. Determinação da expressão da <i>survivina</i> e <i>Smac/DIABLO</i> na linhagem K562 por Western blotting mediante exposição aos quimioterápicos	70
3.2.8. Análise estatística	72
<b>4. Resultados</b>	<b>73</b>
4.1. Características dos pacientes	73
4.2. Expressão das proteínas <i>survivina</i> e <i>Smac/DIABLO</i>	75
4.3. Expressão de <i>survivina</i> e <i>Smac/DIABLO</i> por PCR em tempo real	85
4.4. Efeito da associação entre Imatinibe e ARA-C na linhagem K562	91
4.4.1. Análise da Viabilidade Celular pelo método do MTT	91
4.4.2. Apoptose espontânea e induzida pelo Imatinibe e ARA-C com Anexina V em citometria de fluxo	94
4.4.3. Expressão da <i>survivina</i> e <i>Smac/DIABLO</i> na linhagem K562 por <i>Western blotting</i> mediante exposição aos quimioterápicos	96
<b>5. Discussão</b>	<b>98</b>
<b>6. Conclusões</b>	<b>108</b>
<b>7. Referências Bibliográficas</b>	<b>117</b>
<b>8. Anexo I – Termo de consentimento livre e esclarecido</b>	<b>121</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Incidência mundial da LMC.

Figura 2- Incidência mundial da LMC idade-específica.

Figura 3- Esquema ilustrando os genes *BCR* e *ABL*.

Figura 4- Representação esquemática das vias apoptóticas.

Figura 5- IAPs encontradas nos mamíferos.

Figura 6- Localização da survivina em uma célula em mitose.

Figura 7- *Survivina* e suas variantes.

Figura 8- *Smac/DIABLO* e suas variantes.

Figura 9- Esquema ilustrando a função proapoptótica da *Smac/DIABLO* contra a XIAP.

Figura 10- Curva padrão da BSA.

Figura 11- Membrana de nitrocelulose após transferência.

Figura 12- Análise em citômetro de fluxo da apoptose na linhagem K562.

Figura 13- Figura ilustrando expressão das proteínas survivina e *Smac/DIABLO* em pacientes com LMC por Western blotting.

Figura 14- Expressão de survivina e *Smac/DIABLO* entre pacientes do sexo feminino e masculino.

Figura 15- Correlação da expressão de survivina com *Smac/DIABLO* na LMC.

Figura 16- Correlação da expressão da survivina e da *Smac/DIABLO* em pacientes com leucemia mielóide crônica na fase crônica.

Figura 17- Expressão da survivina e da *Smac/DIABLO* entre os pacientes com leucemia mielóide crônica na fase crônica e crise blástica agrupados com os pacientes na fase acelerada.

Figura 18- Correlação da expressão da survivina e da *Smac/DIABLO* em pacientes com leucemia mielóide crônica e Sokal de baixo risco.

Figura 19- Correlação da expressão da survivina e da *Smac/DIABLO* em pacientes com

leucemia mielóide crônica e Sokal de risco alto e intermediário.

Figura 20- Expressão da Smac/DIABLO entre os pacientes com leucemia mielóide crônica e Sokal de risco baixo e alto + intermediário.

Figura 21- Expressão da survivina entre os pacientes com leucemia mielóide crônica e Sokal de risco baixo e alto + intermediário

Figura 22- Expressão da survivina entre os pacientes com leucemia mielóide crônica dos grupos “Não tratados” e previamente “Tratados”.

Figura 23- Expressão da Smac/DIABLO entre os pacientes com leucemia mielóide crônica dos grupos “Não tratados” e previamente “Tratados”

Figura 24- Expressão da survivina entre os pacientes com leucemia mielóide crônica na fase crônica, previamente tratados e não tratados.

Figura 25- Expressão da Smac/DIABLO entre os pacientes com leucemia mielóide crônica na fase crônica, previamente tratados e não tratados.

Figura 26- Curva demonstrando o perfil de expressão da *survivina*, *Smac/DIABLO* e  $\beta$ -*actina* na linhagem K562 por PCR em tempo real.

Figura 27- Curva demonstrando o perfil de expressão da  $\beta$ -*actina* em indivíduos saudáveis por PCR em tempo real.

Figura 28- Curva demonstrando o perfil de expressão da *survivina* em indivíduos saudáveis por PCR em tempo real.

Figura 29- Curva demonstrando o perfil de expressão da Smac/DIABLO em indivíduos saudáveis por PCR em tempo real.

Figura 30- Curva demonstrando o perfil de expressão da  $\beta$ -*actina* em pacientes com leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real.

Figura 31- Curva demonstrando o perfil de expressão da *survivina* em pacientes com

leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real.

Figura 32- Curva demonstrando o perfil de expressão da Smac/DIABLO em pacientes com leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real.

Figura 33- Porcentagem de redução da viabilidade celular após 24, 48 e 72 horas de incubação da linhagem celular K562 com Imatinibe 5  $\mu$ M e ARA-C 10  $\mu$ M

Figura 34- Porcentagem de redução da viabilidade celular após 24, 48 e 72 horas de incubação da linhagem celular K562 com Imatinibe 1  $\mu$ M e ARA-C 10  $\mu$ M

Figura 35- Porcentagem de indução de apoptose após 24 e 48 horas de incubação da linhagem celular K562 com Imatinibe 1 e 5  $\mu$ M e ARA-C 10  $\mu$ M

Figura 36- Expressão das proteínas survivina e Smac/DIABLO após 24 h de exposição aos quimioterápicos Imatinibe (1 e 5 $\mu$ M) e ARA-C (10 $\mu$ M).

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades das IAPS humanas

Tabela 2 – Características clínicas dos pacientes com LMC.

Tabela 3 – Expressão dos genes *survivina* e *Smac/DIABLO* em pacientes com LMC.



## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

aa – aminoácido  
*ABL* - *Oncogene Abelson murine leukemia*  
Ac – anticorpo  
AcMo - anticorpo monoclonal  
ADN - ácido desoxirribonucleico  
ADNc – ácido desoxirribonucleico complementar  
ARA-C - citarabina / arabinosídeo de citosina  
ARNm - ácido ribonucleico mensageiro  
Asp – aspartato  
ATP - adenosina trifosfato  
 $\beta$ -actina - beta actina  
Bcl-2 - oncogene *B-cell leukemia 2*  
*BCR* - gene *Breakpoint cluster region*  
*BCR-ABL* - gene quimérico  
Bcr-Abl - proteína quimérica  
*BIR* - *baculovirus IAP repeat*  
*BIRC1* - *baculoviral iap repeat-containing protein 1*  
*BIRC-2* - *baculoviral iap repeat-containing protein 2*  
*BIRC-3* - *baculoviral iap repeat-containing protein 3*  
*BIRC-4* - *baculoviral iap repeat-containing protein 4*  
*BIRC-5* - *baculoviral iap repeat-containing protein 5*  
*BIRC-6* - *baculoviral iap repeat-containing protein 6*  
*BIRC-7* - *baculoviral iap repeat-containing protein 7*  
BSA - albumina sérica bovina  
*CARD* - *caspase recruitment domain*  
Caspase - *cysteine-aspartic-acid-proteases*  
Casp - caspase  
CB - crise blástica da LMC  
*CD-95* - *cluster domain 95*  
*ced-3* - *cysteine-dependent aspartate-specific proteases 3*  
c-IAP1 - proteína celular inibidora da apoptose 1  
c-IAP2 - proteína celular inibidora da apoptose 2  
cm - centímetro  
CMN - células mononucleares  
*c-MYC* - *oncogene da mielocitomatose viral celular*  
COOH – grupamento carboxila  
CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono  
C<sub>T</sub> - *Cycle Threshold*  
dATP - 2'-deoxiadenosina 5'- trifosfato  
dCTP - 2'-deoxicitidina 5'- trifosfato  
*DED* - *death effector domain*  
DEPC - dietil pirocarbonato  
dGTP - 2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato  
*DIABLO* - *direct IAP binding protein with low pI*

DISC - complexo sinalizador de morte celular  
DMSO - dimetilssulfóxido  
D.O. – densidade ótica  
dTTP - 2'-deoxitimidina 5'-trifosfato  
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético  
EPR-1- *efector cell protease receptor-1*  
F – sexo feminino  
FA - fase acelerada da LMC  
FACS - *Fluorescence Activated Cell Sorter*  
Fas-L - Fas ligante  
FC - fase crônica da LMC  
FDA - *Food and Drug Administration*  
Fig. - Figura  
FITC - isotiocianato de fluoresceína  
FL-1 - canal de fluorescência 1  
FS - fosfatidilserina  
FSC - *forward scatter*  
g - gravidade  
G1 - Gap-1  
G2/M – Gap-2/Mitose  
h - horas  
HC-I - Hospital do Câncer I  
HCl - ácido clorídrico  
HeLa - (*Henrietta Lacks*) linhagem celular de câncer cervical  
HIAP1 - proteína humana inibidora da apoptose 1  
HIAP2 - proteína humana inibidora da apoptose 2  
hILP - *iap-like protein* humana  
hILP-2 - *iap-like protein* humana 2  
HLA - *human major histocompatibility complex*  
hOCT1- *human organic cation transporter 1*  
HRP - *Horseradish Peroxidase*  
HY - hidroxúria  
i – inversão cromossômica  
IAP - gene inibidor da apoptose  
IAP - proteína inibidora da apoptose  
IB - Imatinibe  
ICE - *Interleukin-1 $\beta$ -Converting Enzyme*  
IFN - interferon  $\alpha$   
IgG - imunoglobulina do tipo G  
IL-1 $\beta$  - interleucina 1 beta  
INCA - Instituto Nacional de Câncer  
Int - intermediário  
IRIS - *International Randomized Study of Interferon versus STI571*  
K562 - linhagem celular de leucemia mieloide crônica em crise blástica  
Kb - quilobase

kbp - quilo pares de base  
KD - domínio quinase  
kDa - quilodalton  
KIAP1 - *inhibitor of apoptosis protein, kidney*  
KIT - oncogene KIT  
L - litro  
LHCM - Laboratório de Hematologia Celular e Molecular  
LMC - leucemia mielóide crônica  
LL - *low left* (quadrante inferior esquerdo)  
LR - *low right* (quadrante inferior direito)  
Sexo M – sexo masculino  
M - molar  
mA - miliampére  
MALT - tecido linfóide associado à mucosa  
M-bcr - *major breakpoint cluster region*  
 $\mu$ -bcr – *major breakpoint cluster region*  
Mdm2 - *mouse double minute 2 homolog*  
MDR - resistência a múltiplas drogas  
mg - miligrama  
mg/mL – miligrama por mililitro  
MGB - *minor groove binder*  
MHIC - *mammalian iap homolog b*  
MIHA - *mammalian iap homolog a*  
MIHB - *mammalian iap homolog b*  
mL - mililitro  
ML-IAP - proteína inibidora da apoptose associada ao melanoma  
mM - milimolar  
MMR - *molecular major*  
M-Mulv - *Moloney Murine Leukemia Virus*  
MO - medula óssea  
MTT - 3-(4,5-dimetilazolil-2)-2,5-difeniltetrazolium  
NaCl - cloreto de sódio  
NAIP - proteína inibidora da apoptose neuronal  
nM - nanomolar  
nm - nanômetro  
NaOH - hidróxido de sódio  
NH<sub>2</sub> - grupamento amino  
ORF - *open reading frame*  
p – braço curto do cromossomo  
P.I. - iodeto de propídeo  
PBS - salina tamponada com fosfato  
P – nível de significância estatística  
PCR - *polymerase chain reaction*  
PDGF-R - *platelet-derived growth factor receptor*  
Pgp - glicoproteína P

Ph - cromossomo Philadelphia  
pH - potencial de hidrogênio  
pI – ponto isoelétrico  
pro-IL- pro-interleucina 18  
p53 – proteína tumoral com peso molecular de 53 kDa  
*q* – braço longo do cromossomo  
q.s.p. – quantidade suficiente para  
*RB* - retinoblastoma  
*RING* - *really interesting new gene*  
rpm - rotações por minuto  
RPMI-1640 - *Roswell Park Memorial Institute*  
RT-PCR - *reverse transcription polymerase chain reaction*  
S – síntese, no ciclo celular  
SDS - dodecil sulfato de sódio  
SDS-PAGE - *sodium dodecyl sulfate-poliacrylamide gel electrophoresis*  
SFB - soro fetal bovino  
Smac - *second mitochondria-derived activator of caspase*  
SP - sangue periférico  
SSC - *side scatter*  
*t* – translocação cromossômica  
TBS - salina tamponada com tris  
TBST - Tween20-TBS  
TEMED - N,N,N',N'-Tetrametil-1,2-diaminometano  
TIAP1 - proteína tumoral inibidora da apoptose 1  
T<sub>m</sub> - temperatura de fusão  
TMO - transplante de medula óssea  
TNF - fator de necrose tumoral  
TR - tampão de ressuspensão  
Tris - trishidroximetilaminometano (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanediol)  
UL - *up left* (quadrante superior esquerdo)  
UR - *up right* (quadrante superior direito)  
XIAP - *inhibitor of apoptosis, X-linked*  
10X – dez vezes  
5' – porção carboxiterminal em um gene  
3' – porção aminoterminal em um gene  
°C – graus Celsius  
% - por cento  
Δ - Delta  
μL - microlitro  
μM - micromolar  
μm - micrômetro  
> - maior que  
< - menor que  
6-FAM - 6-carboxilfluoresceína

## **1-INTRODUÇÃO**

### **1.1-Leucemia Mielóide Crônica**

#### **1.1.1-Definição**

Leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa originada de uma célula-tronco hematopoiética anormal, resultando na expansão clonal de células malignas mielóides e no aumento do número de células mielóides em todos os estágios maturativos (SAWYERS, 1999).

#### **1.1.2- Aspectos históricos e epidemiológicos**

A LMC foi descrita pela primeira vez em 1845 (BENNETT, 1845; CRAGIE 1845; VIRCHOW, 1845 apud WONG & WITTE, 2004) quando diversos casos de esplenomegalia, anemia e granulocitose foram descritos. Anos mais tarde, Neumann sugeriu que a origem da doença seria na medula óssea e propôs o nome “leucemia mielóide” (NEUMANN, 1878 apud INOKUCHI, 2006), entretanto somente na década de 60 quando o cromossomo Philadelphia (Ph) foi descoberto é que a patogênese da doença passou a ser melhor entendida (INOKUCHI, 2006). Dados epidemiológicos mostram que a LMC é uma doença rara com incidência variando de 1 a 2 por 100.000 indivíduos (Fig. 1). Nos Estados Unidos, aproximadamente 3440-4500 novos casos são diagnosticados anualmente. A LMC corresponde de 7 a 20% de todas as leucemias (REDAELLI et al, 2004) e embora possa ocorrer em qualquer idade, a incidência aumenta com a idade, sendo mais comum entre 40-60 anos (SAWYERS, 1999) (Fig. 2).

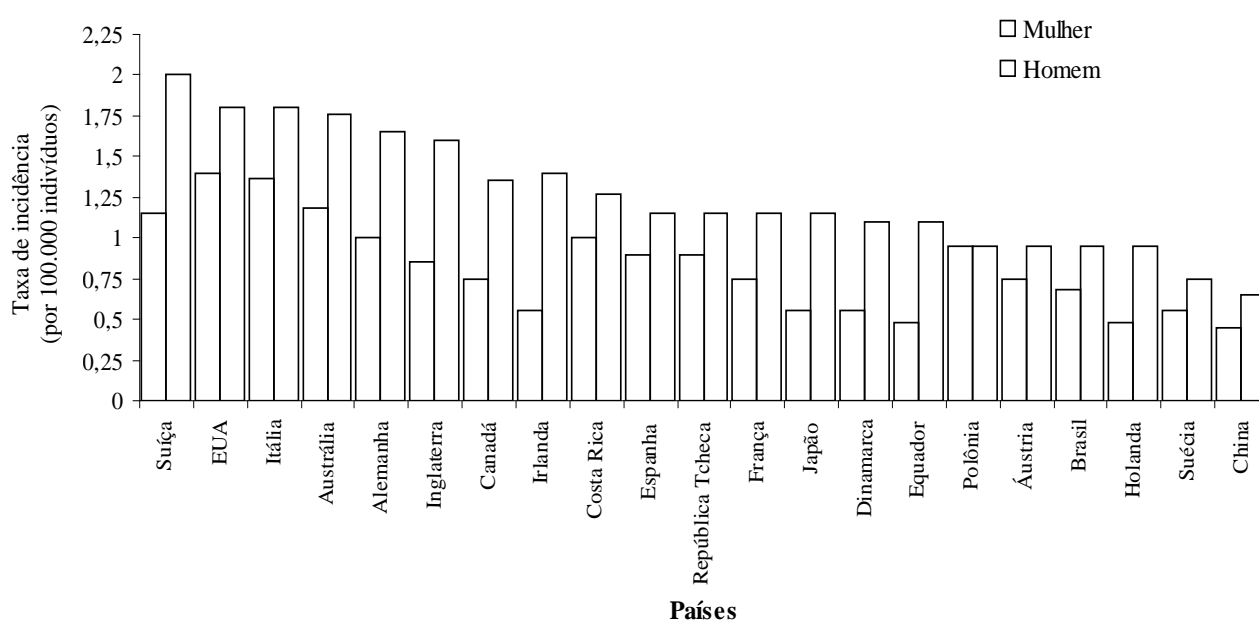


FIGURA 1- Incidência mundial de LMC (1997) (adaptado de PARKIN, 1993 apud REDAELLI et al, 2004).

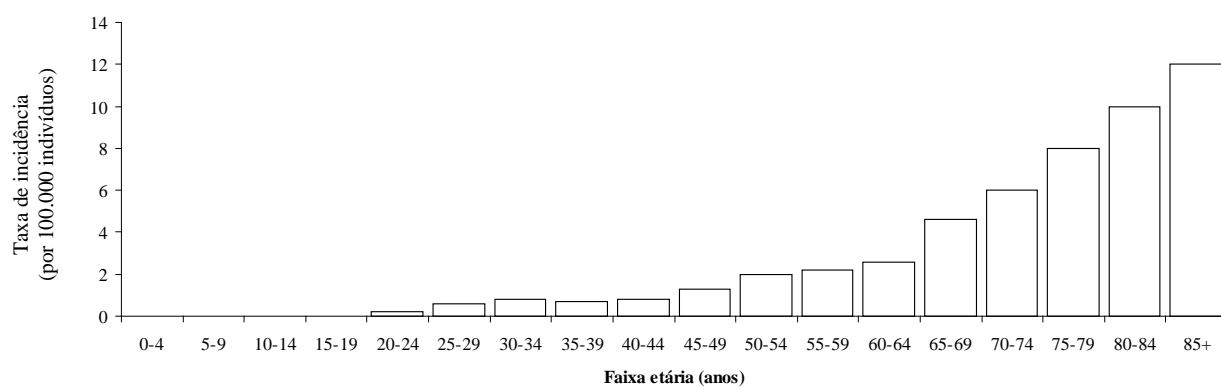


FIGURA 2- Incidência da LMC idade-específica (1995-1999) (adaptado de RIES, 2002 apud REDAELLI et al, 2004).

### **1.1.3-Patogênese**

Os únicos fatores de risco conhecidos são altas doses de radiação ionizante e exposição ocupacional ao benzeno. Isso é evidenciado pela incidência 20 a 25 vezes maior de todas as leucemias nos sobreviventes à bomba atômica. Apesar disso, não são conhecidas predisposições genéticas para a LMC, não há vírus oncogênicos associados, e não há medidas profiláticas contra esta doença (REDAELLI et al, 2004).

O curso natural da LMC pode ser dividido em três fases: uma estável ou fase crônica (FC), uma fase acelerada (FA) e uma fase blástica ou crise blástica (CB). O diagnóstico pode ser feito em qualquer fase da doença, embora a maioria dos pacientes (85%) tem o diagnóstico confirmado na FC da doença (REDAELLI et al, 2004; FADERL et al, 1999). A progressão da FC para FA e para a CB ocorre geralmente 3-5 anos após o diagnóstico (GRATWOHL et al, 1998).

Cerca de 40 % dos pacientes são assintomáticos, sendo diagnosticados por alterações em hemogramas de rotina. Ao exame clínico são comuns queixas como fadiga, perda de apetite, febre, perda de peso, esplenomegalia ou hepatomegalia, trombocitopenia, infecções, manifestações hemorrágicas cutâneas, leucocitose, trombocitose e anormalidades extramedulares (FADERL et al, 1999).

Tanto a FA quanto a CB são caracterizadas por uma redução da diferenciação celular, com a substituição de células maduras por blastos imaturos no sangue periférico. A duração média da fase acelerada é de 3 a 18 meses (FADERL et al, 1999). A CB tem como principal característica a presença de 30 % ou mais de células blásticas no SP ou na medula óssea. Os pacientes em CB sobrevivem em média de 4 a 6 meses (REDAELLI et al, 2004 & FADERL et al, 1999). O fenótipo agressivo da CB sugere que diferentes alterações oncogênicas são responsáveis pela transição da FC para a CB. Vários eventos oncogênicos têm sido associados



com a CB tais como: trissomia do cromossomo 8, i(17q) (11,12), perda da função da p53, rearranjo/deleção do *RB*, amplificação de *MYC* entre outros (WONG & WITTE, 2004).

Apesar das diversas aberrações genéticas associadas à CB da LMC o grande responsável pela patogênese da doença é o cromossomo Ph. Em 1960, Nowel e Hungerford (apud WONG & WITTE, 2004) identificaram o cromossomo Ph e sua associação com a LMC. Neste trabalho, os autores examinaram células de pacientes com LMC na FC e compararam com outras leucemias. As células de todos os pacientes com LMC apresentavam um pequeno cromossomo anormal, que eles denominaram de cromossomo Philadelphia, cidade onde se localiza o centro de pesquisa no qual a aberração foi descoberta. Nas outras leucemias, porém, não foi encontrada a mesma anormalidade. Pela primeira vez, foi demonstrado, então, que um rearranjo cromossômico estaria ligado à patogênese de um tipo específico de câncer. Esse achado abriu caminho para pesquisas em busca de novos rearranjos relacionados à determinada neoplasia em particular (WONG & WITTE, 2004).

O cromossomo Ph é derivado da translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 t(9;22)-(q34;q11) (ROWLEY, 1973 apud KURZROCK et al, 2003). A porção 3' do gene *ABL* é translocada do cromossomo 9 (posição normal) para o cromossomo 22 e é justaposta ao segmento proximal do gene *BCR* alterado nesse cromossomo, resultando em um gene quimérico chamado *BCR-ABL*.

O local de quebra no cromossomo 22 é variável. Na LMC, a maior parte ocorre em posição mais central entre os éxons 12 e 16 (também chamados éxons b1 e b5), em uma região denominada como região *major* de quebra (M-bcr – *major breakpoint cluster region*). Em um pequeno número de pacientes a quebra pode ocorrer em posição mais distal (entre os éxons 19 e 20), dando origem a uma quebra do tipo *minor* (m-bcr). As diferentes posições de quebra envolvendo éxons diferentes dão origem, após o evento de *splicing* alternativo, a 3

proteínas Bcr-Abl, com tamanhos variáveis (190, 210 e 230 kDa). A proteína menor (p190<sup>Bcr-Abl</sup>) contém menor parte de Bcr que as maiores p210<sup>Bcr-Abl</sup> e p230<sup>Bcr-Abl</sup> (Fig. 3). Todas possuem a mesma quantidade de Abl. Graças a essa variação na contribuição do gene Bcr em cada proteína quimérica, diferentes efeitos biológicos são obtidos, podendo ser cruciais para o fenótipo da doença (KURZROCK et al, 2003).

Apesar da exposição à radiação ionizante ser um fator de risco para a LMC e a fusão *BCR-ABL* ocorrer *in vitro* em células hematopoiéticas irradiadas (DEININGER et al, 1998), a ocorrência da translocação pode não ser um evento totalmente estocástico. Não são completamente conhecidos os mecanismos que favorecem o evento de translocação (KURZROCK et al, 2003).

A proteína Abl funciona como uma enzima tirosino-quinase, que participa da sinalização e remodelamento do citoesqueleto. Além disso, pode participar da regulação do ciclo celular. As tirosino-quinases são enzimas que fosforilam um resíduo de tirosina em um substrato. A fosforilação normal de Abl é controlada, fisiologicamente, e provavelmente por modificações na cauda N-terminal da proteína. A perda dessa região, durante a formação da quimera *BCR-ABL*, resulta em alta atividade tirosino-quinase constitutiva, um dos principais fatores no potencial oncogênico da transformação de proteínas Abl (KURZROCK et al, 2003).

O primeiro éxon do gene *BCR* é importante na oncogênese. Esse é o único éxon do *BCR* incluído em todas as fusões de Bcr-Abl (ARLINGHANS, 1998). O gene *BCR* tem atividade serina e treonina quinase no seu primeiro éxon. A proteína Bcr pode se autofosforilar, bem como outros substratos chave e com isso propagar a sinalização celular, além disso, pode participar do mecanismo de reparo ao ADN.

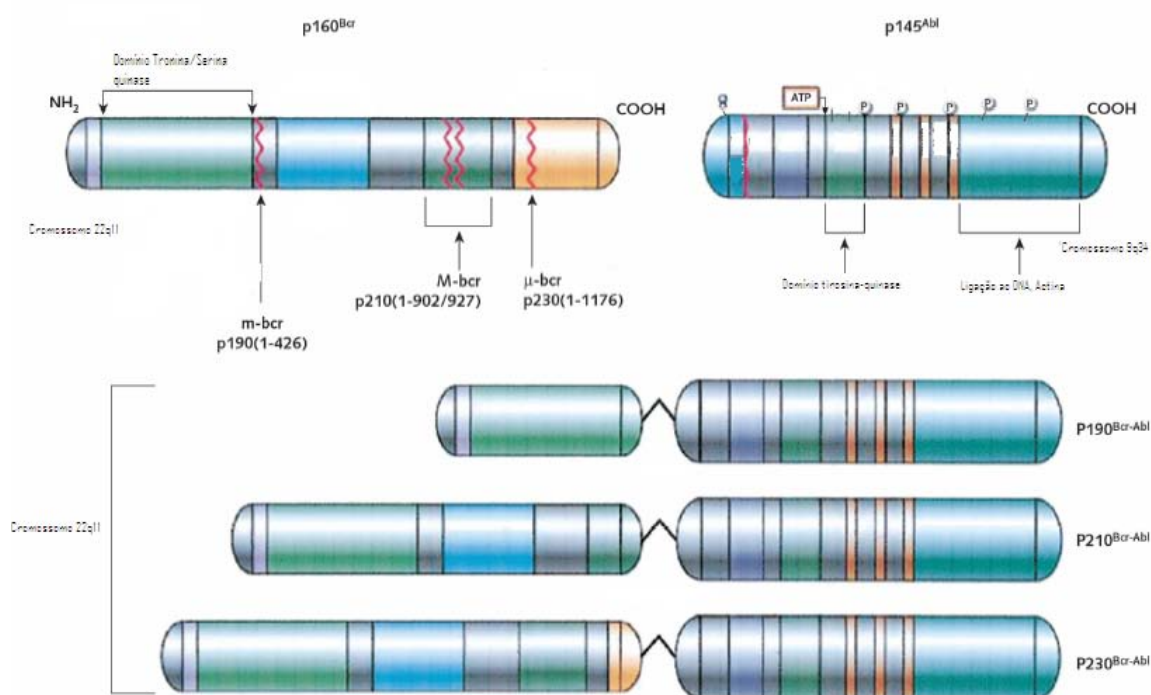


FIGURA 3- Esquema ilustrando o gene *BCR* com seus respectivos pontos de quebra m-bcr, M-bcr e μ-bcr, que darão origem após fusão com o gene *ABL*, respectivamente, às proteínas P190<sup>Bcr-Abl</sup>, P210<sup>Bcr-Abl</sup> e P230<sup>Bcr-Abl</sup> (KURZROCK et al, 2003).

As proteínas p210<sup>Bcr-Abl</sup> e p190<sup>Bcr-Abl</sup> são moléculas pleiotrópicas e têm atividades similares, suas diferenças ainda estão sendo estudadas. Estudos sugerem que não só a proteína p210<sup>Bcr-Abl</sup> é crítica para o desenvolvimento da LMC, mas também seus efeitos no processo de reparo ao ADN podendo ser responsável pela instabilidade genômica, contribuindo para a progressão da doença (KURZROCK et al, 2003).

A atividade tirosino-quinase é importante para a sinalização e crescimento celular e é fisiologicamente controlada. Níveis constitutivamente altos de atividade tirosino-quinase têm sido associados com transformação em vários sistemas. A atividade tirosino-quinase de Bcr-Abl é constitutivamente elevada. O grau de atividade da Bcr-Abl é diretamente proporcional ao seu nível de atividade tirosino-quinase. A proteína p190<sup>Bcr-Abl</sup>, que tem maiores níveis de atividade tirosino-quinase está associada ao desenvolvimento de leucemias com fenótipo mais agressivo, já p210<sup>Bcr-Abl</sup> participa da patogênese nas leucemias crônicas com fenótipos mais indolentes (LUGO et al, 1990).

#### **1.1.4-Tratamento da LMC**

##### **1.1.4.1- “Era” pré-Imatinibe**

A média de sobrevida para pacientes com LMC na fase crônica, não tratados, é de 2 a 3 anos. Nos anos 80, os fármacos busulfan e a hidroxiuréia foram considerados os melhores agentes para o tratamento da LMC. Embora o busulfan possa causar melhora clínica, este agente não interfere no curso da doença ao contrário da hidroxiuréia que pode prolongar a sobrevida de pacientes com LMC (HEHLMANN et al, 1994).

Nos anos 90, o interferon tornou-se o tratamento padrão para os pacientes que não podiam submeter-se ao TMO. O Interferon é capaz de induzir resposta hematológica completa em aproximadamente 60-80% dos pacientes com LMC na FC. Entretanto, as respostas

citogenéticas são menores que as respostas hematológicas, mesmo considerando-se aqueles que apresentam resposta citogenética completa (YOFFE et al, 1987; ALLAN et al, 1995).

De acordo com um trabalho conduzido por Allan et al (1995), onde os pesquisadores analisaram a resposta ao interferon, a média de sobrevida dos pacientes que receberam esse agente foi de 61 meses *versus* 41 meses para os aqueles que não receberam este agente. Entretanto, os pacientes que tiveram resposta citogenética sobreviveram por mais tempo do que aqueles que não mostraram resposta.

Em um trabalho compreendendo 512 pacientes com LMC na FC foi observado que 27% dos pacientes alcançaram remissão citogenética completa. A taxa de sobrevida em 10 anos, para aqueles que atingiram a remissão citogenética foi de 78%. Estudos empregando a técnica de RT-PCR, nesse grupo, mostraram que 20 pacientes ainda persistiam com resposta citogenética (ausência do cromossomo Ph), após 10 anos de evolução clínica. Este resultado demonstrou que o tratamento com interferon estava relacionado com longas sobrevidas. Em outro estudo verificou-se que a taxa de resposta ao interferon, empregando doses variadas ou em combinação com outros fármacos, foi bastante heterogênea (BACCARANI et al, 2002).

Não há dúvida que o prognóstico dos pacientes com LMC melhorou de 20% para 50% de sobrevida global em 5 anos, após o emprego do Interferon (KANTARJIAN et al, 1994). No entanto, sabe-se que a maioria dos pacientes, na FC, que exibe resposta citogenética completa, ainda apresenta o transcrito *BCR-ABL*, que pode ser detectável por PCR durante muitos anos configurando o quadro de doença residual mínima (LEE et al, 1992). Tal achado sugere a presença de células malignas com conseqüente progressão da doença (GAIGER et al, 1995). Embora o interferon seja efetivo, em pacientes na FC, os resultados são significativamente inferiores na FA. Somente 20-30% dos pacientes exibem alguma resposta hematológica e a resposta citogenética é rara (KANTARJIAN et al, 1992). Entretanto, o

interferon é capaz de reduzir, de maneira considerável, a progressão da FC para a CB (KANTARJIAN et al, 2000).

Apesar do interferon ter melhorado a sobrevida dos pacientes com LMC, o TMO, empregado há mais de 20 anos, é considerado o único tratamento curativo em todas as fases da LMC. O TMO alogênico pode proporcionar o aumento da sobrevida livre de doença em aproximadamente 45% dos pacientes e cura em torno de 16% (GRATWOHL et al, 1993). Em pacientes na fase crônica que recebem TMO alogênico, sem depleção de células T, de um doador irmão HLA idêntico, a probabilidade de recaída em 5 anos é da ordem de 10 a 20%. Esse percentual sobe para 50% em pacientes que se encontram em fases avançadas ou para aqueles que recebem enxerto com depleção de células T (GOLDMAN et al, 1988; McCLURE & LITZ, 1994). Apesar da taxa de cura verificada em pacientes com LMC submetidos ao TMO, esta modalidade de tratamento é limitada a um pequeno número de pacientes que possui doador de medula compatível e freqüentemente está relacionada com altos índices de morbidade e mortalidade, o que dificulta a sua indicação de forma ampla.

#### **1.1.4.2-Imatinibe na LMC**

A introdução do Imatinibe causou mudanças rápidas nos protocolos, configurando uma nova era no tratamento da LMC. Imatinibe é uma pequena molécula, inibidora de sinais de transdução que, especificamente, inibe um grupo limitado das enzimas tirosino-quinases: Abl, Arg, KIT, PDGF-R e a forma oncogênica Bcr-Abl. Este fármaco foi criado usando a estrutura do sítio de ligação de ATP da proteína quinase Abl. Imatinibe liga-se e estabiliza a forma inativa do Bcr-Abl ao invés de ocupar o sítio de ligação do ATP como previamente se acreditava. Imatinibe impede os efeitos da proteína Bcr-Abl através da inibição da autofosforilação, inibição da proliferação e indução da apoptose (DRUKER et al, 1996).

No primeiro trabalho clínico, de fase I com Imatinibe, conduzido em 1998 e aprovado

pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos, foi observado que 98% dos pacientes resistentes ao interferon alcançaram remissão hematológica e 31% resposta citogenética *major*. No estudo de fase II houve confirmação desses resultados sendo observada 95% de resposta hematológica e 60% de resposta citogenética *major* (KANTARJIAN et al, 2002; KANTARJIAN et al, 2002). É sabido, entretanto, que as respostas ao Imatinibe são menos freqüentes e mais curtas em pacientes que se encontram nos estágios mais avançados da LMC (SAWYERS et al, 2002). Os trabalhos clínicos de fase III demonstraram que o Imatinibe foi muito superior ao interferon, em relação à resposta hematológica e citogenética e tempo para progressão para FA e CB, em pacientes recém diagnosticados (O'BRIEN et al, 2002).

Com o emprego de Imatinibe em pacientes refratários ao interferon foi possível verificar resposta citogenética completa, na FC, em 50% dos pacientes (KANTARJIAN et al; 2002). Na FA, 80% de resposta hematológica pôde ser alcançada. Esta, porém, foi obtida em somente 30% daqueles que se encontram em CB (TALPAZ et al, 2002). No trabalho denominado IRIS (*International Randomized Study of Interferon versus STI571*), a remissão citogenética foi observada em 69% dos pacientes e a remissão molecular *major* (MMR), definida como a obtenção da redução de 3 ou mais log de *BCR-ABL*, foi obtida em 40% dos pacientes após 12 meses. Nesses pacientes, 12 meses de remissão molecular correlacionou-se com a probabilidade de uma sobrevida livre de transformação para estágios mais avançados de 100% em 60 meses (SIMONSSON et al, 2005). Entretanto, apesar dos resultados promissores observados, 30% dos pacientes não apresentaram MMR e 15% evoluíram com doença progressiva (GOLDMAN et al, 2005).

#### 1.1.4.2.1-Resistência ao Imatinibe

Pacientes em CB continuam apresentando curta sobrevida com média de duração de resposta de 3-6 meses e metade dos pacientes em FA progride para a CB ou se tornam resistentes ao tratamento (KANTARJIAN et al, 2002; SAWYERS et al, 2002). Portanto, a despeito dos excelentes resultados observados com Imatinibe, principalmente na FC, a resistência a este fármaco continua um sério problema hematológico. Um trabalho recente descreveu os principais mecanismos de resistência ao Imatinibe, já extensivamente estudados e identificados. Os dois principais mecanismos de resistência ao Imatinibe estão relacionados com o gene *BCR-ABL*: mutação no domínio tirosino-quinase ou a superexpressão da proteína Bcr-Abl. Outros mecanismos não são dependentes do Bcr-Abl e incluem a expressão de bombas de efluxo de drogas tal como a glicoproteína P (Pgp) e outros menos estudados (MELO & CHUAH, 2006). Poucos estudos têm investigado o papel das proteínas transportadoras de drogas. Essas proteínas têm um papel chave na absorção, distribuição e eliminação de drogas (KIM, 2002). Thomas et al (2004) verificaram que a captação de Imatinibe na célula, ao invés de ser um processo passivo, é predominantemente ativo e parece ser dependente de hOCT1, um mecanismo de resistência pouco estudado. OCT são proteínas responsáveis pela captação e excreção de diversas substâncias (KOEPSELL, 1998). Além da captação reduzida de Imatinibe, Thomas et al (2004) verificaram que este fármaco também é um substrato da Pgp confirmando os achados anteriormente publicados por Dai et al, (2003) e Illmer et al, (2004).

A associação da resistência ao Imatinibe com mutações no componente *ABL* do gene *BCR-ABL* foi descrita por Schindler et al (2000). Até o momento diversos tipos de mutações foram descritas. Algumas interferem na ligação do Imatinibe em pontos críticos ou na conformação molecular que impede a droga de se ligar no domínio KD (domínio quinase).

O *European Leukaemia Net* categorizou em dois grupos os critérios de resistência ao



Imatinibe: A) pacientes que apresentam falência terapêutica: são aqueles que não apresentam resposta hematológica ou não apresentam resposta citogenética completa ou ainda aqueles que evoluem com progressão da doença. B) pacientes que respondem de forma sub-ótima e que ainda podem se beneficiar do tratamento embora com um curso clínico menos favorável (BACCARANI et al, 2006). Esses autores observaram que a continuação do tratamento não traz benefício para os pacientes que apresentam falha ao tratamento com o Imatinibe. A resistência primária é definida como a falência de se alcançar resposta hematológica ou citogenética. A resistência secundária é o reaparecimento do clone leucêmico após a resposta inicial ao tratamento.

## 1.2-Apoptose

Na metade do século 19 alguns estudos já indicavam que a morte celular desempenhava um importante papel nos processos fisiológicos de organismos multicelulares, principalmente durante a embriogênese e a metamorfose (GLUECKSMANN, 1951 apud LOCKSHIN & ZAKERI, 2001). O termo “morte celular programada” foi utilizado pela primeira vez em 1964, sugerindo que a célula possuía mecanismos controlados de morte e que tal evento não ocorria acidentalmente (LOCKSHIN & WILLIAMS, 1964 apud LOCKSHIN & ZAKERI, 2001).

O termo apoptose (do grego *apoptosis*, que significa “queda”) foi introduzido por Kerr et al (1972 apud WONG & WITTE, 2004), fazendo uma analogia com a queda das pétalas de flores e das folhas das árvores como eventos naturais e intrínsecos a manutenção da homeostase dos organismos multicelulares. A morte celular por apoptose é um processo ativo que desempenha um importante papel no desenvolvimento de organismos multicelulares e na manutenção de populações celulares em tecidos sob condições fisiológicas ou patológicas

(LEIST, 2001).

Em resumo, a apoptose é um processo biológico muito importante envolvido no desenvolvimento, na diferenciação, na proliferação celular e controle da homeostase, na regulação do sistema imune e na remoção de células defeituosas e possivelmente danosas. Logo, disfunções ou desregulação no processo de morte celular programada implicam em inúmeras condições patológicas (FADEEL, 1999).

Os mecanismos genéticos de morte celular programada começaram a ser elucidados através dos estudos com o verme *Caenorhabditis elegans*. Sydney Brenner, um dos ganhadores do Prêmio Nobel de 2002, observou que 131 das 1090 células somáticas que formam o *C. elegans*, sempre morrem durante o seu desenvolvimento. Em 1982, foi publicado o primeiro trabalho mostrando evidências que a morte das 131 células no verme é causada por um processo especificamente orientado para morte celular e que não desenvolve outros papéis, sinalizando a existência de um mecanismo que remove apenas células não mais necessárias (HORVITZ, 1982 apud VAUX, 2002).

O primeiro marcador de morte celular fisiológica surgiu com a observação de que o evento de apoptose vinha sempre acompanhado por uma rápida ativação de endonucleases (WILLIAMS et al, 1974 apud VAUX 2002). Outro marcador identificado foi a exposição da fosfatidilserina (FS) na célula em processo de morte celular que a leva a ser identificada e fagocitada por macrófagos (FADOK et al, 1992; VAUX, 2002).

As proteases efetoras da apoptose, conhecidas como caspases são homólogas ao ced-3 do *C.elegans* e desenvolvem um papel central na via de apoptose (BRATTON, 2000). O termo caspase (do inglês *cysteine-dependent aspartate-specific protease*) deriva de sua atividade catalítica dependente de um resíduo de cisteína localizado em um sítio altamente conservado que cliva seus substratos após resíduos de aspartato (Asp). Foram identificados 14

caspases diferentes em células de mamíferos, sendo que a caspase-11 e a caspase-12 foram identificadas apenas em camundongos (DENAULT, 2002; RICHARDSON, 2002). Uma nomenclatura unificada enumera as caspases de acordo com a ordem de publicação: caspase-1 é também chamada ICE (do inglês, *Interleukin-1 $\beta$ -Converting Enzyme*) sendo a primeira caspase descrita em mamíferos para o homólogo a ced-3 (CREAGH, 2001; MIURA, 1993 apud VAUX, 2002). As caspases -1,-4, -5 -11 e -12 são chamadas de caspases inflamatórias, participando principalmente da maturação proteolítica de citocinas pro-inflamatórias tais como IL-1 $\beta$  e pro-IL-18 e sua participação na apoptose permanece questionável (DENAULT, 2002). Já as caspases -3, -9, -8, -2, -6, -7 e -10 têm importante atuação no maquinário de sinalização de morte celular programada (EARNSHAW, 1999).

As caspases são sintetizadas como zimogênios de cadeia simples, inativos e consistindo de quatro subunidades. A clivagem proteolítica dos precursores das caspases resulta na separação das subunidades maior e menor com a produção de um complexo heterotetramérico que constitui a enzima ativa, formada por duas subunidades maiores e duas menores (SCHIMMER et al, 2003). As caspases diferem entre si pelo tamanho e pela seqüência dos aminoácidos (aa) no seu domínio NH<sub>2</sub> terminal, que pode variar de curto (20-30 aa) a longo (> 90 aa). Nas caspases há dois módulos essenciais para interação com outras proteínas: a região DED (do inglês, *death effector domain*), responsável pela interação com proteínas hidrofóbicas e a região CARD (do inglês, *caspase recruitment domain*), envolvida com interações eletrostáticas nos contatos com proteínas hidrofílicas (PHILCHENKOV et al, 2004).

Tendo como base as suas características proapoptóticas, as caspases são subdivididas em dois grupos, as iniciadoras e as efetoras. As iniciadoras (-2, -8, -9, -10 e -11) ativam o segundo grupo, as caspases efetoras (-3 -6 e -7). As caspases efetoras são capazes de degradar

diversos substratos incluindo as proteínas estruturais e regulatórias no núcleo celular, citoplasma e citoesqueleto. A clivagem proteolítica de alvos celulares pelas caspases efetoras leva a desregulação de processos vitais culminando na morte celular (PHILCHENKOV et al, 2004).

A cascata de caspases (Fig. 4) pode ser receptor dependente, sendo ativada via ligação do TNF (do inglês, *Tumor Necrosis Factor*) e Fas-L aos seus respectivos receptores, denominados receptores de morte celular, dentre eles, TNF-R1 e Fas (CD-95), induzindo a formação de um complexo sinalizador de morte celular (DISC). Uma vez ativado, DISC recruta a caspase-8 e promove o início da cascata de ativação das procaspases. Essa via de ativação da cascata de morte celular é conhecida como extrínseca (KISCHKEL et al, 1995).

De maneira alternativa, a cascata que culmina em apoptose pode ser iniciada independentemente de receptores, por inúmeros estímulos, incluindo agentes quimioterápicos, estresse extra e intracelular, tais como hipóxia, dano ao ADN e indução de oncogenes (ZARAFFONI *et al*, 2005). Os sinais proapoptóticos podem ser originados em várias organelas incluindo o núcleo, o retículo endoplasmático, a mitocôndria, os lisossomos e o complexo de Golgi (FERRI & KROEMER, 2001; PHILCHENKOV et al, 2004).

As mitocôndrias são organelas especializadas, constituídas por uma membrana externa separadas de uma membrana interna pelo espaço intermembranoso, onde estão muitas das proteínas envolvidas na indução de morte celular por liberação através de efluxo mitocondrial. Muitos dos estímulos que induzem injúria convergem para a via mitocondrial de apoptose. Tais estímulos agem direta ou indiretamente sobre a permeabilidade da membrana externa mitocondrial levando à liberação de citocromo *c*. O efluxo de citocromo *c* para o citosol é o evento principal na ativação da via mitocondrial de apoptose, também conhecida como via intrínseca. As proteínas da família Bcl-2 são as principais reguladoras desta via (NEWTON

& STASSER, 2000).

Na via intrínseca, o citocromo *c* age em conjunto com dois fatores protéicos citosólicos, Apaf-1 e procaspase-9, formando o apoptossoma, com o objetivo de ativar a caspase-3 (LI et al, 1997; BUDIARDJO et al, 1999). Após ativação, as caspases efetoras amplificam o sinal de morte celular programada com condensação da cromatina, redução do citoplasma, fragmentação nuclear, formação de corpos apoptóticos e zeiose (formação de *blebs* na membrana citoplasmática).

O mecanismo de ativação da via intrínseca pode ser regulado somente durante o processo de permeabilização da mitocôndria pelos membros da família antiapoptótica Bcl-2. Após a liberação do citocromo *c* e início da cascata apoptótica a ativação das caspases é irreversível (OKADA & MAK, 2004).

A organização quase hierárquica da cascata proteolítica das caspases faz lembrar o sistema que rege a cascata da coagulação sangüínea, por exemplo, de modo que garanta rápida execução, mesmo que alguns membros da cascata estejam faltando. Existe, portanto um sistema de superexpressão compensatória que viabiliza a cascata na maioria das situações. As caspases têm diversos substratos, sendo responsáveis por alterações no citoesqueleto, na sinalização celular e no reparo ao ADN (PHILCHENKOV et al, 2004).

A ativação molecular da apoptose é um ponto de convergência para a maioria dos agentes citotóxicos, independente dos seus mecanismos primários de ação. A análise da apoptose, tanto em termos moleculares quanto celulares, tem levado a conclusão de que a mitocôndria desenvolve o papel mais importante, determinando se uma célula entrará na via apoptótica ou não. Muitos mecanismos de resistência a fármacos têm sido descritos, nos quais a eficiência do dano, correlacionado à apoptose induzida pelo medicamento, tem sido reconhecida como um ponto chave da quimiorresistência. Isso enfatiza a importância da

avaliação de todos os componentes da via apoptótica na susceptibilidade das células neoplásicas a apoptose. Provavelmente, todos esses componentes podem ser alvos para o desenvolvimento de quimiorresistência (OLIVER & VALLETE, 2005).

### **1.2.1-Proteínas inibidoras da apoptose**

A patogênese de muitas doenças está associada com o desequilíbrio funcional dos componentes que regulam o delicado balanço entre proliferação e morte celular. Proteínas envolvidas na regulação da apoptose são de grande interesse biológico e alvos terapêuticos atraentes (DEVERAUX & REED, 1999).

Os genes inibidores da apoptose (*IAP*) foram descritos em 1993 no genoma de um baculovirus. Foi feita uma investigação para identificar os reguladores que mantinham as células do hospedeiro, um inseto, viáveis durante a infecção viral (CROOK et al, 1993). Duas estruturas foram identificadas nas proteínas codificadas pelos genes *IAPs* dos baculovirus: os domínios BIR (*baculovirus IAP repeat*) e RING. BIR é um domínio com aproximadamente 70 aa, ligado ao zinco. Mais de três domínios BIR *in tandem* podem ser encontrados numa família de proteínas chamada de *IAPs* (proteínas inibidoras da apoptose) em diversas espécies, incluindo o homem. Para ser membro da família das *IAPs* a proteína deverá ter domínios BIR e inibir a apoptose (DEVERAUX & REED, 1999) (Fig. 5).

Os domínios BIR são essenciais para as propriedades antiapoptóticas das *IAPs*, e em muitos casos eles se ligam diretamente às caspases.

O segundo tipo de estrutura ligada ao zinco, chamada domínio RING também participa da inibição da apoptose e pode selecionar proteínas como as caspases para ubiquitinação e por conseqüência, inativá-las (VAUX & SILKE,2005; SALVESEN & DUCKETT, 2002).

Há oito IAPs descritas em humanos, todas produtos de genes *IAPs*: XIAP (hILP/MIHA/BIRC4), hILP-2 (TS-IAP), celular IAP1 (c-IPA1/HiAP2/MIHB/BIRC2), celular IAP2 (c-IAP2/HiAP1/MIHC/BIRC3), IAP associada ao melanoma (ML-IAP/Livin/KIAP1/BIRC7), neuronal IAP (NAIP/BIRC1), survivina (TIAP1/BIRC5) e Apollon (BRUCE/BIRC6) (Tabela 1).

O primeiro gene *BIR* identificado foi o *NAIP* em um grupo de pacientes com doença neurodegenerativa (ROY et al, 1995). A expressão aberrante ou a anormalidade funcional de outras proteínas codificadas pelo *BIR* passou, então, a ser estudada. É o caso do gene da c-IAP2 que perde um domínio RING após sofrer uma translocação descrita em MALT (tecido linfóide associado à mucosa).

### 1.2.1.1-Survivina

A survivina é uma proteína ácida ( $pI=5,1$ ) com massa de 16,5 kDa. É essencial e evolucionariamente conservada entre as espécies. O gene da *survivina* humano tem 15 kb e está localizado no braço longo do cromossomo 17 na posição q25. A descoberta desse gene ocorreu após a busca em uma biblioteca humana de ADNc por uma sonda para *EPR-1* (*effector cell protease receptor-1*) (AMBROSINI et al, 1997). A região do gene que compreende uma sequência possivelmente codificadora de proteína, ORF (do inglês, *open reading frame*), na *survivina*, tem orientação inversa à sequência do *EPR-1* sendo a ela essencialmente complementar. A relevância desse achado único no genoma humano ainda não é totalmente compreendida (UREN et al, 2000; WHEATLEY & MCNEISH, 2005), embora tenha sido proposto que *EPR-1* atuaria como um regulador natural de *survivina*, exercendo uma atividade antisense (AMBROSINI et al, 1998).

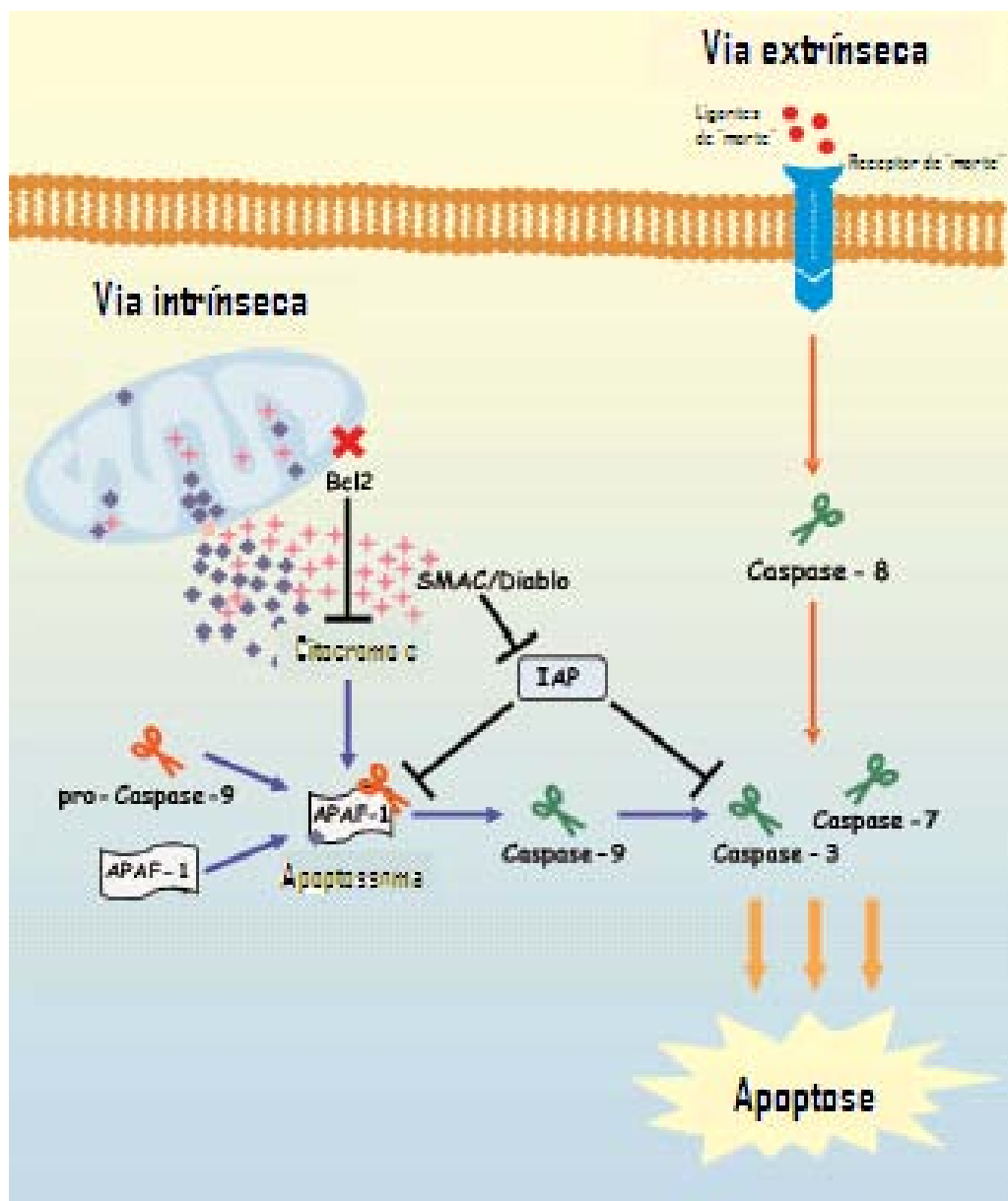


FIGURA 4- Representação esquemática das duas principais vias apoptóticas em células humanas. Via intrínseca: Liberação pela mitocôndria de fatores apoptogênicos (citocromo *c* e Smac/DIABLO) que dão início à clivagem das caspases (representada pelas tesouras (tesouras vermelhas – zimogênio; tesouras verdes – caspases ativadas), a partir da formação do apoptossoma. Via extrínseca: Ativação da caspase 8 pelo receptor de morte (p.e. TNF-R ou Fas, ativados por seus respectivos ligantes, TNF ou Fas-L) (adaptado de ZARAFFONI *et al*, 2005).



A survivina é expressa em tecidos embrionários e em diferenciação, entretanto é indetectável em tecidos diferenciados e células quiescentes. Nas células em proliferação, a expressão da survivina é dependente da fase do ciclo celular, sendo virtualmente indetectável nas fases G1 e S, com picos em G2/M. Em 2000 foi descrito que a survivina teria uma importante função como *chromosomal passenger*, exercendo também um papel altamente orquestrado e focalizado durante as várias fases da mitose (WHEATLEY & MCNEISH, 2005) (Fig. 6). Foi descrita a participação da survivina em dois momentos do ciclo celular. Um *pool* nuclear localizado nos cinetócoros dos cromossomos em metáfase e no fuso acromático durante a anáfase. O *pool* citosólico foi associado com microtúbulos interfásicos. Esses achados, aliados à descrição do fenótipo *knockout* para o gene da survivina de camundongos caracterizados pela catástrofe mitótica, com defeitos nos microtúbulos, formação de células multinucleadas e 100% de letalidade embrionária são consistentes com um papel crítico da survivina na mitose, preservando seu aparato e permitindo uma progressão mitótica normal (ZARAFFONI *et al*, 2005).

A expressão da survivina foi induzida em uma linhagem de carcinoma cervical epitelial chamada HeLa, mostrando a sua influência na dinâmica dos microtúbulos e também causando estabilização dos mesmos contra a indução de despolimerização provocada pelo nocodazol, indicando então que a survivina pode facilitar a evasão dos mecanismos de *checkpoint* de interrupção no crescimento celular e, conseqüentemente, promover resistência a fármacos cujo alvo seja o fuso mitótico (GIODINI *et al*, 2002).

A região ORF da survivina humana é formada por 4 éxons, com 426 bases e codifica uma proteína de 142 aminoácidos (MAHOTKA *et al*, 1999).

Três isoformas foram descritas em células humanas, produtos de *splicing* alternativo do pré ARNm de um único gene: survivina-2 $\beta$  (isoforma 3- 165 aminoácidos), survivina- $\Delta$ Ex3 (isoforma 2- 138 aminoácidos) e survivina selvagem (isoforma 1- 142 aminoácidos). A

survivina selvagem é a mais expressa, embora haja relatos de expressão diferencial das isoformas, de acordo com o tipo de câncer (MAHOTKA et al, 1999). Tanto a survivina selvagem quanto a survivina- $\Delta$ Ex3 possuem características antiapoptóticas, no entanto, a survivina-2 $\beta$  tem deficiente atividade antiapoptótica, podendo naturalmente ocorrer como uma antagonista às variantes antiapoptóticas (SAH et al, 2006) (Fig. 7).

Na tentativa de explicar os mecanismos responsáveis pela expressão da survivina algumas pesquisas foram realizadas. Em ovários normais, o éxon 1 da *survivina* é silenciado por metilação e foi demonstrado que esse éxon está demetilado e transcricionalmente ativo em câncer de ovário (ALTIERI, 2001).

Outras alterações têm sido investigadas, entre elas a participação da p53 na regulação da survivina. Em muitos tumores o acúmulo da p53 tem sido correlacionado com a expressão da survivina. P53 é um fator de transcrição que induz apoptose pela regulação de genes apoptóticos. A survivina é regulada negativamente pela p53. Entretanto, a survivina pode influenciar na atividade de p53 através da regulação de mdm2 e do proteassoma. Apesar dessa relação ser pouco compreendida, sabe-se que o promotor da *survivina* tem um elemento de ligação à p53. Não é descartada a possibilidade de que p53 se ligue diretamente ao promotor da *survivina* para reprimir a expressão dessa proteína (O'CONNOR et al, 1995).

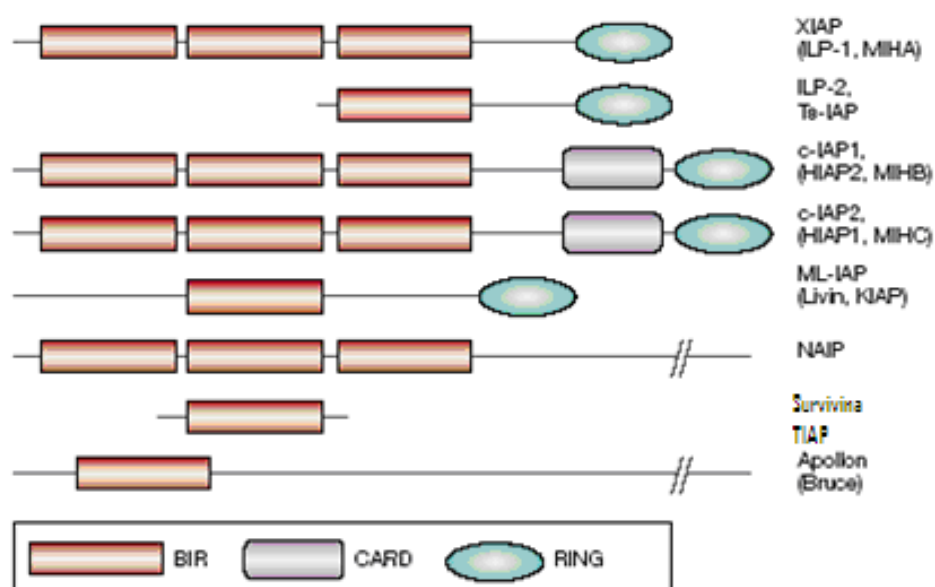


FIGURA 5- IAPs encontradas nos mamíferos. Entre parênteses, as denominações alternativas. BIR, *baculovirus iap repeat*; CARD, *caspase-recruitment domain*; ILP, *iap-like protein*; MIHA, *mammalian iap homologue a*; NAIP, *neuronal apoptosis inhibitory protein* (SALVESEN & DUCKETT, 2002).

TABELA 1- Propriedades das IAPs humanas

IAPs humanas	Tamanho (kDa)	Posição do gene	Expressão do ARNm
XIAP (hILP/MIHA/BIRC4)	57	Xq25	Detectada em tecidos adultos
c-IPA1 (HIAP2/MIHB/BIRC2)	70	11q22-q23	Detectada em tecidos adultos com altos níveis no timo, testículos e ovários.
c-IAP2 (HIAP1/MIHC/BIRC3)	68	11q22-q23	Detectada em tecidos adultos com altos níveis no baço e timo.
ML-IAP (Livin/KIAP1/BIRC7)	31	20q13.3	Detectada em tecido embrionário e alguns tecidos adultos. Elevados níveis em linhagens celulares de câncer, particularmente linhagens de melanoma.
NAIP/BIRC1	156	5q13.1	Detectada somente no fígado e placenta por northern blotting, mas foi detectada na coluna espinhal por RT-PCR.
Survivina/BIRC5	17	17q25	Expressão dependente do ciclo celular, restrita a tecidos onde há células se dividindo, por exemplo: tecidos embrionários, tumores sólidos e linhagens celulares transformadas. A expressão está ausente nos tecidos normais adultos.
BRUCE/BIRC6	528	2p21-p22	Expressão de ARNm é detectável na maioria dos tecidos adultos, com altos níveis no cérebro e rins.

(adaptado de VERHAGEN et al, 2001)

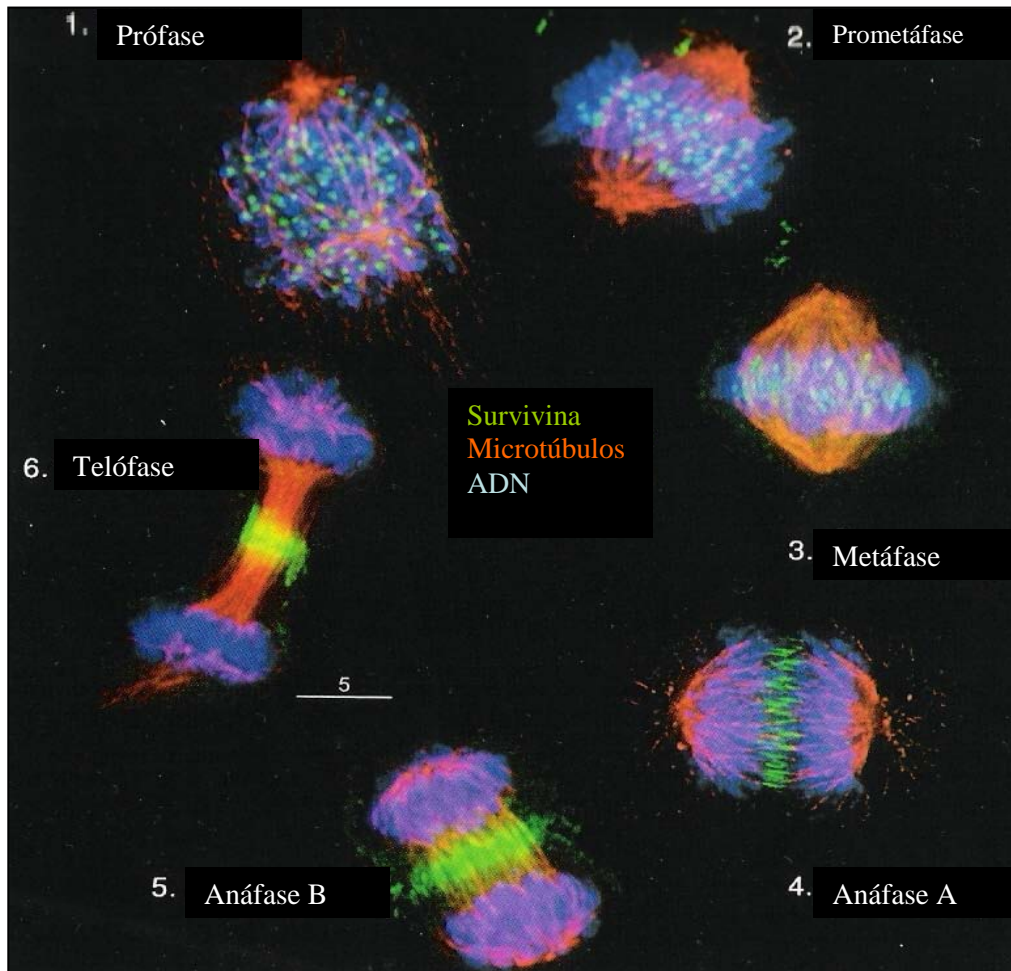


FIGURA 6- Localização da survivina em uma célula em mitose: Linhagem celular HeLa expressando survivina marcada na porção C-terminal com fluorocromo verde, fixada em diferentes fases da mitose e imunomarcada para demonstrar os microtúbulos (vermelho) cromossomos (azul) (WHEATLEY & McNEISH, 2005) (Escala na barra, 5 $\mu$ m).

A expressão da survivina tem sido demonstrada na maioria dos tipos de tumores humanos incluindo câncer de pulmão, mama, cólon, estômago, orofaringe, pâncreas, fígado, bexiga, útero e ovários, linfomas, leucemias, neuroblastoma, tumores cerebrais, feocromocitoma, sarcomas, melanomas e outros tumores de pele (ALTIERI, 2005). Além disso, a expressão da survivina tem sido detectada em uma variedade de lesões pré-malignas ou benignas incluindo pólipos do cólon, adenomas de mama e outros, sugerindo que a expressão dessa proteína possa ocorrer durante a transformação maligna ou após um distúrbio no equilíbrio entre proliferação e morte celular. Na maioria dos tumores sólidos, altos níveis da survivina foram preditivos de progressão tumoral e tiveram impacto na sobrevida livre de doença e sobrevida global, fornecendo importantes informações prognósticas. Nas hemopatias malignas, maiores níveis de survivina foram relacionados a um pior prognóstico, como no caso de um grupo de pacientes com leucemia mielóide aguda (ZARAFFONI *et al*, 2005).

Na LMC, um trabalho recente mostrou elevados níveis de survivina predominantemente na FA e CB. Dentre as diversas características clínicas analisadas, a alta taxa de leucócitos e uma menor concentração de hemoglobina no sangue periférico correlacionaram-se com a expressão elevada dessa proteína. Não há dados na literatura sobre a influência da survivina na sobrevida global dos pacientes com LMC e por isso ainda não é possível validar a relevância prognóstica atribuída a esta proteína. Entretanto, os níveis de expressão do gene *survivina* correlacionaram-se de forma significativa com a porcentagem de células cromossomo Ph<sup>+</sup> bem como com a quantidade de transcrito Bcr-Abl, sugerindo uma possível relação do gene *BCR-ABL* com a superexpressão da survivina nos pacientes com LMC (CONTE *et al*, 2005; SAH *et al*, 2006). Em um dos primeiros trabalhos correlacionando a carcinogênese com a survivina, Allen *et al* (2003) demonstraram que a superexpressão da survivina resultava no aumento da conversão de papilomas para carcinomas de células escamosas, embora papilomas fossem formados, menos frequentemente, no grupo de

camundongos com maior expressão de survivina do que no grupo controle. Isso sugeriu que a survivina estivesse envolvida com a progressão tumoral. Em linfomas, a administração de oligonucleotídeos antisense contra survivina preveniu o desenvolvimento de tumores, bem como o crescimento dos já existentes (UREN et al, 2000).

Diversos estudos têm relatado que tumores com alto nível de survivina são associados com piores prognósticos, em pacientes com diferentes tipos de câncer. Isso é relevante, embora a maior parte dos trabalhos faça referência a um pequeno número de pacientes e tenham sido realizados de maneira retrospectiva. Em muitos desses estudos não foram realizadas análises multivariadas, com isso não foi possível estabelecer a survivina como um fator prognóstico independente para a resposta terapêutica. Apesar disso, em um estudo analisando 275 pacientes com câncer de mama, foi possível apontar a survivina como fator prognóstico (SPAN et al, 2004). Outro estudo analisando 420 pacientes com câncer de mama também mostrou significância estatística da expressão da survivina como marcador prognóstico independente, para sobrevida global e sobrevida livre de doença, das pacientes que expressaram a proteína (RYAN et al, 2006).

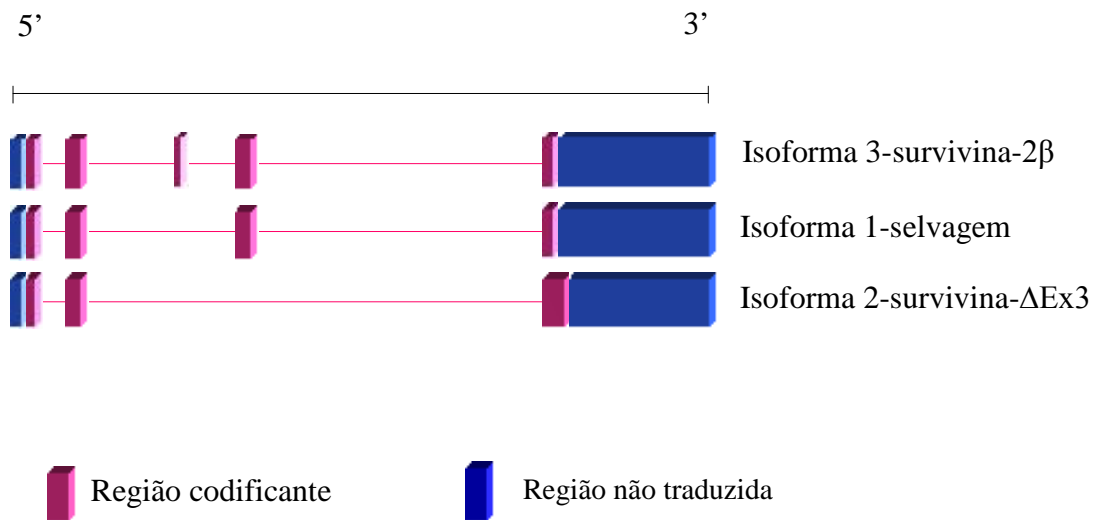


FIGURA 7- *Survivina* e suas variantes

(adaptado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=Display&DB=gene>).



### 1.2.2-Inibição das IAPs

As IAPs podem ser reguladas por três mecanismos distintos: 1) mecanismos transcricionais e pós transcricionais, 2) regulação da estabilidade e 3) controle da atividade por proteínas regulatórias. No primeiro caso, certas IAPs estão sujeitas a regulação transcricional para manter os níveis de expressão sob controle. Por exemplo, a expressão da survivina é dependente do ciclo celular e pode ser induzida em células normais na fase G2/M (AMBROSINI et al, 1997). O controle pós-transcricional pode ser exemplificado pela participação do domínio RING na ubiquitinação de proteínas provavelmente servindo como adaptador para a transferência de uma enzima que efetuará a ubiquitinação do substrato alvo (SALVESEN & DUCKETT, 2002). A degradação das IAPs pode ocorrer com o objetivo de reduzir o limiar de apoptose em uma célula, isto é, torná-la mais susceptível à morte celular programada. Pouco é conhecido sobre como a estabilidade das IAPs é regulada, no entanto, dados indicam que a ubiquitinação das IAPs pode ser induzida pela associação com certas proteínas, como por exemplo a Smac/DIABLO.

#### 1.2.2.1-Smac/DIABLO

Uma proteína proapoptótica foi descrita por dois grupos distintos, utilizando abordagens diferentes, resultando na identificação e caracterização da Smac (*Second mitochondria-derived activator of caspase*) (DU et al, 2000) ou DIABLO (*direct IAP binding protein with low pI*) (VERHAGEN et al, 2000). Smac/DIABLO é também liberada da mitocôndria no citosol. O citocromo *c* induz a ativação da cascata das caspases e a proteína Smac/DIABLO tem a responsabilidade de eliminar o efeito inibitório das IAPs. Smac/DIABLO interage com as IAPs, incluindo a survivina (CHAI et al, 2000).

O gene *Smac/DIABLO* está localizado no braço longo do cromossomo 12, q24.31,

com 6 éxons, 18,3 kb, codifica uma molécula precursora de 239 aminoácidos, produz um ARNm com ~1,5 kbp. Entretanto, os 55 resíduos aminoterminais da proteína servem como uma seqüência que encaminha a Smac/DIABLO para armazenamento na mitocôndria, sendo removidos após influxo mitoconcrial. A forma madura da Smac/DIABLO contém 184 aminoácidos que se organizam como um oligômero em solução, com uma massa de 25 kDa e  $pI = 5,3$ .

Foram descritas 3 isoformas de Smac/DIABLO: Smac- $\alpha$  (isoforma 1); Smac- $\Delta$  (isoforma 3) e Smac- $\beta$ /Smac/DIABLO-S (isoforma 2). Todas as isoformas mantêm o potencial proapoptótico, entretanto, a isoforma 2 é tipicamente citosólica e não se liga às IAPs (FU et al, 2003) (Fig. 8).

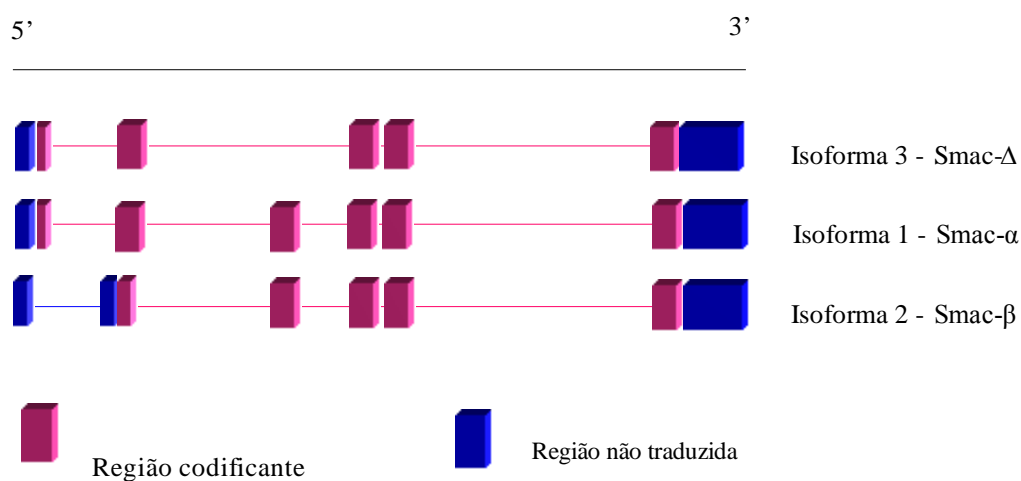


FIGURA 8- *Smac/DIABLO* e suas isoformas

(adaptado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=Display&DB=gene>).

Quando liberada no citosol, Smac/DIABLO se liga a várias IAPs, de maneira que protege as caspases da ação das proteínas inibidoras da apoptose. Por isso, Smac/DIABLO é uma reguladora negativa dessas proteínas e uma molécula pro-apoptótica.

Smac/DIABLO é capaz de se ligar aos domínios BIR da XIAP, c-IAP1, c-IAP2 e ML-IAP (EKERK et al, 2001; VERHAGEN et al, 2000; WHEATLEY e MCNEISH, 2005) (Fig. 9).

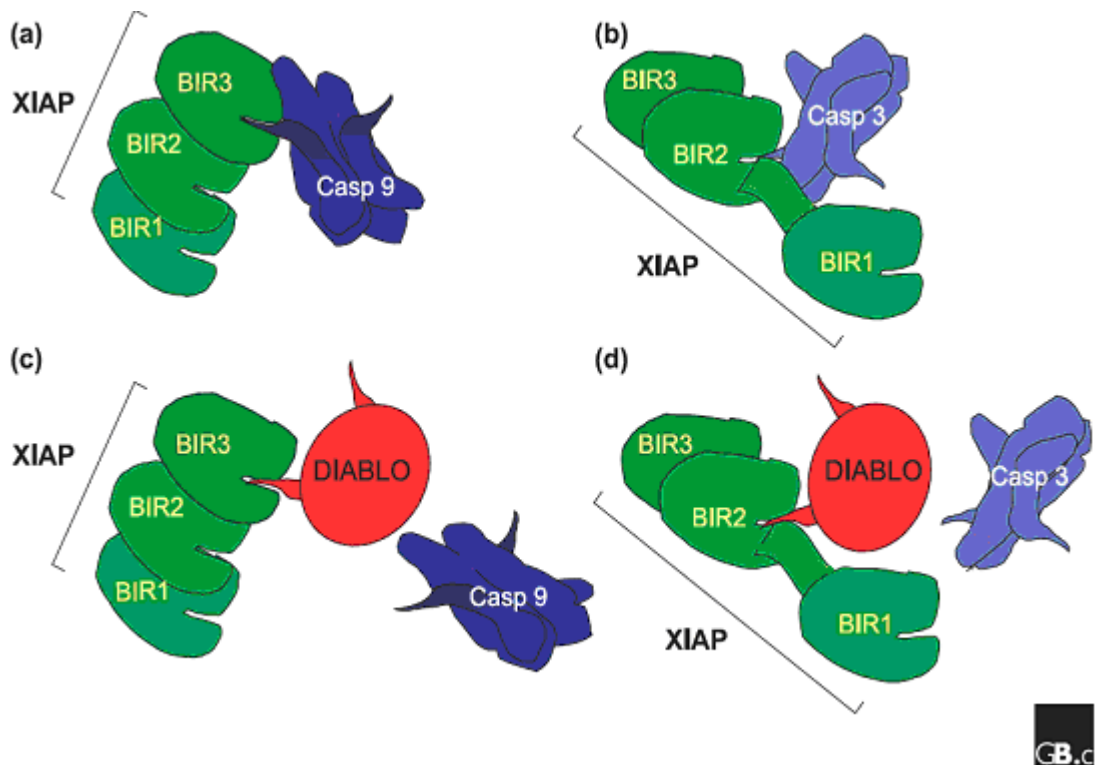


FIGURA 9- Esquema ilustrando a função proapoptótica da Smac/DIABLO, impedindo a ligação de uma IAP às caspases. Casp 3, caspase-3 e casp 9 , caspase-9. BIR 1, 2 e 3 ilustram os domínios BIR formadores da XIAP. (a) Ligação da caspase 9 ao domínio BIR3 na XIAP. (b) Caspase-3 se ligando ao domínio BIR2 da XIAP. (c) Ligação da Smac/DIABLO ao domínio BIR3, deixando a caspase-9 livre. (d) Smac/DIABLO se ligando ao domínio BIR2 deixando a caspase-3 livre (VERHAGEN *et al*, 2000).

Song et al (2003) demonstraram que a Smac/DIABLO também se liga à survivina, em um experimento induzindo apoptose por uso de quimioterápico. Em 2005, Sun et al. demonstraram a interação entre survivina e Smac/DIABLO.

A superexpressão da Smac/DIABLO aumenta a sensibilidade celular ao estímulo apoptótico (DU *et al.*, 2000). A expressão induzida do gene *Smac/DIABLO* em células de carcinoma cervical (HeLa), foi significativamente associada ao aumento da atividade celular da caspase-3 e potencialização da apoptose induzida, mostrando então ser uma estratégia eficiente para melhorar o efeito da radioterapia no tratamento de câncer cervical (ZHENG *et al.*, 2005).

A expressão da Smac/DIABLO também foi associada com a avaliação prognóstica, demonstrada em carcinoma de células renais. Nesse trabalho, a análise da expressão da proteína feita, por Western blot, mostrou que a Smac/DIABLO estava com a expressão reduzida nas células de pacientes. Foi visto ainda que as células transfectadas com *Smac/DIABLO* foram sensíveis ao tratamento com cisplatina. Esses resultados sugerem que a expressão da Smac/DIABLO, nesse tipo celular de câncer, pode ser usada como um parâmetro prognóstico, e que essa expressão pode potencializar a imuno e a quimioterapia (MIZUTANI *et al.*, 2005).

## 2- OBJETIVOS

### 2.1- Objetivo principal

Verificar a expressão gênica e protéica da survivina e da Smac/DIABLO em células de pacientes com LMC.

### 2.2- Objetivos secundários

- Analisar a expressão basal das proteínas survivina e Smac/DIABLO em amostras de pacientes com LMC e na linhagem celular K562.
- Analisar a expressão das proteínas survivina e Smac/DIABLO após exposição a estímulo de morte celular com os quimioterápicos Imatinibe e ARA-C.
- Analisar a expressão dos genes *survivina* e *Smac/DIABLO* em amostras de pacientes com LMC e na linhagem K562.
- Comparar o nível de expressão das proteínas com a expressão gênica da survivina e da Smac/DIABLO.
- Verificar se existe um padrão de expressão das proteínas survivina e Smac/DIABLO de acordo com as fases da LMC, com o Índice de Sokal e com a presença ou não de tratamento prévio.
- Verificar uma possível correlação entre a expressão das proteínas e dos genes *survivina* e *Smac/DIABLO* com a resposta obtida após tratamento clínico da LMC.
- Verificar um possível papel modulador da expressão da survivina através da ação do Imatinibe associado ao ARA-C na linhagem K562.

### **3- MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 – Seleção das amostras**

##### **3.1.1 – Pacientes**

Amostras de sangue periférico (SP) e/ou de medula óssea (MO) dos pacientes com diagnóstico de LMC foram selecionadas de maneira prospectiva e retrospectiva, no Laboratório de Hematologia Celular e Molecular do Serviço de Hematologia do Hospital do Câncer I (HC-I), Instituto Nacional de Câncer – RJ (INCA)aa. Foram utilizadas 68 amostras de pacientes com LMC dos quais 6 estavam em CB, 10 em FA e 52 na FC da doença.

O diagnóstico de LMC foi baseado em critérios clínicos e laboratoriais, tais como hemograma, mielograma, imunofenotipagem celular para caracterização da ontogenia das células leucêmicas, biópsia de medula óssea, análise citogenética e pesquisa do gene *BCR/ABL*. O hemograma e dosagens bioquímicas foram realizados no Serviço de Patologia Clínica do HC-I; a imunofenotipagem no Laboratório de Marcadores Celulares da Divisão de Medicina Experimental da Coordenação de Pesquisa; o perfil citogenético e a pesquisa de *BCR/ABL* nos Laboratórios de Citogenética e Biologia Molecular, respectivamente, do Centro de Transplante de Medula Óssea; os mielogramas no Serviço de Hematologia do HC-I, as lâminas das biópsias de MO foram analisadas por patologistas do Serviço de Anatomia Patológica e o estudo proposto no presente trabalho, no Laboratório de Hematologia Celular e Molecular (LHCM) do HC-I.

Todos os dados demográficos e clínicos dos pacientes (idade, sexo, data do diagnóstico, fase da LMC, leucometria, tipo do tratamento empregado e tipo da resposta alcançada) foram obtidos através da análise dos prontuários, conduzida por médicos hematologistas clínicos. Foram incluídas as amostras de pacientes com diagnóstico confirmado de LMC em qualquer faixa etária. Também foram incluídos pacientes submetidos

a qualquer tipo de protocolo terapêutico. A fase da LMC foi determinada no momento em que as amostras foram registradas no LHCM.

Os pacientes foram também agrupados segundo risco baixo risco, risco intermediário e alto risco levando em conta os critérios estabelecidos pelo índice de Sokal (SOKAL *et al*, 1984). Este índice, obtido através de um modelo matemático, xamina a combinação de inúmeras variáveis prognósticas, que representam em conjunto um *status* de risco. O modelo leva em conta a idade do paciente (anos), o tamanho do baço (cm), a contagem de plaquetas ( $\times 10^9/L$ ) e a quantidade de blastos no sangue periférico (%). Os cálculos são feitos segundo a fórmula:

$$\frac{\lambda_i(t)}{\lambda_0(t)} = \text{EXP} 0,0116 (Idade - 43,4) + 0,0345 (Baço - 7,51) + 0,188 \left[ \left( \frac{Plaquetas}{700} \right)^2 - 0,563 + 0,0887 (Blastos - 2,10) \right]$$

De acordo com esse modelo matemático os pacientes são divididos em três subgrupos segundo os valores para o risco obtido, onde Sokal < 0,8 indica baixo risco, Sokal entre 0.8-1,2 indica risco intermediário e Sokal > 1,2 indica alto risco.

### 3.1.2-Amostras controle

#### Indivíduos saudáveis

Células mononucleares (CMN) de 10 indivíduos saudáveis (doadores do Serviço de Hematologia do HC-I - INCA) serviram como controle negativo, para a expressão da proteína survivina e positivo para a Smac/DIABLO.

As amostras dos pacientes e indivíduos saudáveis foram coletadas após os indivíduos ou seus representantes legais terem sido esclarecidos a respeito dos objetivos do presente trabalho e assinado o termo de consentimento pós-informado (Anexo I).

## **Linhagem celular**

Nesse estudo, a linhagem celular humana K562 (LMC em CB) (LOZZIO & LOZZIO, 1975) foi utilizada como controle positivo da expressão da survivina e da Smac/DIABLO. A linhagem foi mantida em meio de cultura (RPMI-1640, Sigma), suplementada com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco-Invitrogen, Brasil), e mantida em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, segundo a recomendação do American Type Culture Collection (ATCC) (<http://www.atcc.org>).

## **3.2- METODOLOGIA**

### **3.2.1-Separação de células de pacientes e indivíduos saudáveis**

Células leucêmicas foram obtidas a partir de amostras de SP e MO colhidas em tubos heparinizados, separadas em gradiente de densidade por Ficoll-Paque (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare), em centrífuga refrigerada durante 20 minutos a 2000 rpm. As amostras foram distribuídas em tubos cônicos estéreis (Tubos Falcon, Becton Dickison and Company, Franklin Lopes, NJ, USA) com capacidade para 15 mL contendo Ficoll-Paque, sendo delicadamente sobrepostas ao Ficoll de modo a evitar a mistura dos líquidos. A quantidade de Ficoll-Paque colocada no fundo do tubo seguiu a proporção de 3 volumes de Ficoll-Paque para 4 volumes de sangue. Após a centrifugação, o anel celular da interface foi cuidadosamente aspirado com uma pipeta Pasteur e acondicionado em um novo tubo cônico estéril.

Após separação, as células leucêmicas foram lavadas 3 vezes com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e ressuspendidas nessa mesma solução ajustadas a uma concentração final de 5,0 x 10<sup>6</sup> células/mL.

O mesmo procedimento foi adotado para as células do SP de indivíduos saudáveis.



### 3.2.1.1-Armazenamento das amostras

Após ajuste da concentração as células foram armazenadas. Dois protocolos distintos de armazenamento foram utilizados, de acordo com a finalidade da amostra. As células destinadas aos ensaios de Western blotting foram armazenadas lisadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para isso, 1 mL da suspensão celular ajustada foi distribuída em *ependorfs* e centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20  $\mu\text{L}$  de tampão de ressuspensão (TR) contendo 40 mM Tris-HCl, pH 7,5 e 10 mM EDTA. Em seguida foram acrescentados 20  $\mu\text{L}$  de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%. As amostras foram então expostas a uma temperatura de  $100^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, para desnaturação completa das proteínas e quebra do ADN, reduzindo assim, a viscosidade da amostra. As amostras foram armazenadas para posterior quantificação de proteína. Outra alíquota das amostras dos pacientes foi destinada ao armazenamento em Trizol (Invitrogen) segundo a orientação do fabricante, para preservação do RNA e utilização nos ensaios de expressão gênica. 1 mL da suspensão contendo  $5 \times 10^6$  /mL de células foi centrifugada a 2000 rpm por 30 segundos. O sobrenadante foi desprezado e sobre o *pellet* foi adicionado 1 mL de Trizol. A amostra foi homogeneizada e armazenada em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Os mesmos procedimentos foram feitos para armazenamento das células de indivíduos saudáveis e da linhagem celular K562.

### 3.2.2-Quantificação de proteínas totais pelo método de Lowry

As amostras lisadas foram submetidas à quantificação utilizando o kit *DC protein assay* (BIO-RAD) segundo o método de Lowry (LOWRY *et al* 1951), de acordo com instruções do fabricante. Uma curva padrão com proteína BSA (albumina sérica bovina) foi feita nas concentrações de 0,2 – 1,4 mg/L (Fig. 10).

Antes da quantificação os reagentes foram preparados. Adicionaram-se 20  $\mu\text{L}$  de reagente S (SDS) a cada mL de reagente A (NaOH) (reagente A'). O reagente S foi utilizado porque as amostras lisadas encontravam-se em SDS 5%. Diluições de BSA foram preparadas de 0,2 mg/mL a 1,4 mg/mL. A curva padrão foi preparada no mesmo tampão utilizado para lisar as células (TR + SDS 10%). 5 $\mu\text{L}$  das diluições-padrão foram pipetados em uma microplaca de 96 poços. Adicionaram-se 25  $\mu\text{L}$  do reagente A' a cada poço. Em seguida, 200  $\mu\text{L}$  do reagente B (Reagente Folin) foram adicionados em cada poço. A placa foi gentilmente agitada para misturar os reagentes. Após 15 minutos de incubação as absorvâncias foram lidas em um comprimento de onda de 690 nm.

Os valores de absorvância obtidos foram comparados entre si na curva por semelhança de triângulos para obtenção do fator (f), que multiplicado pela absorvância da amostra fornece a correspondente massa de proteína em miligramas (Fig. 10). Para determinar a concentração de proteína em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de amostra dividiu-se a quantidade em microgramas por 5  $\mu\text{L}$ , volume de amostra utilizado para quantificação, e multiplicou-se por 10, já que a amostra foi 10 vezes diluída antes da quantificação.

Após obtenção do f, as amostras foram quantificadas para posterior utilização no ensaio Western blot.

### **3.2.3-Determinação da expressão da survivina e da Smac/DIABLO por Western blotting**

Foram utilizados 70  $\mu\text{g}$  de proteína de cada amostra. Foram acrescentados 10  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra contendo 0,06 M Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS, 10% glicerol e 0,025% Azul de bromofenol. A cada 1 mL dessa solução foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de 2-mercaptoetanol (950  $\mu\text{L}$  de solução + 50  $\mu\text{L}$  de 2-mercaptoetanol) antes do uso.

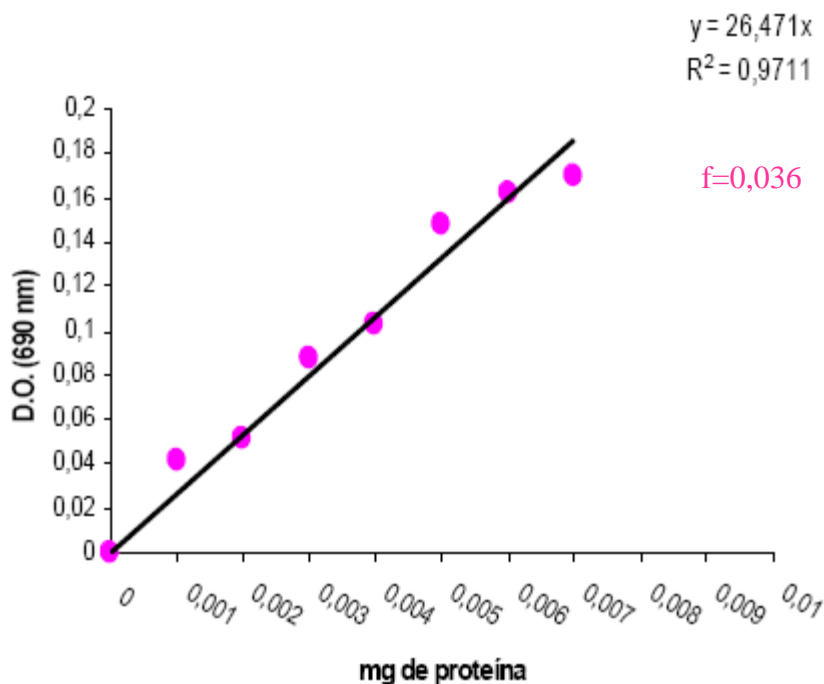


FIGURA 10- Curva padrão feita com diluições de BSA utilizando o kit DC Protein Assay de acordo com o método de Lowry.

### A- Eletroforese das proteínas

As amostras foram então submetidas à eletroforese unidimensional, segundo protocolo de Laemmli *et al* 1970 (apud DEUTSCHER, 1990). O Laemmli SDS-PAGE (do inglês, *sodium dodecyl sulfate-poliacrylamide gel electrophoresis*) tem como princípio a separação em gel redutor das proteínas submetidas à corrente elétrica, de acordo com seu peso, mensurado em kDa. Isso possibilita diferentes padrões de corrida e viabiliza o *immunoblotting* da proteína de interesse através do uso de anticorpos (Ac). Foram utilizadas cubas de eletroforese verticais. Nelas, foram preparados dois géis com concentrações diferentes. O inferior, gel de resolução (*resolving gel*) separou as proteínas de acordo com seus pesos. O gel a 12% era constituído de 3,35 mL de água destilada, 2,5 mL de Tris-HCl, pH 8,8, 1,5 M; 100

μL de SDS 10%; 4 ml de acrilamida/bisacrilamida (30%); 50 μL de Persulfato de amônio 10% e 5 μL de TEMED. Sobre o gel de resolução, após polimerização, foi feito o gel de empilhamento (*stacking gel*), constituído de 6,1 mL de água destilada, 2,5 mL de Tris-HCl, pH 6,8, 0,5M; 1,3 mL da solução de acrilamida/bisacrilamida 30% e 100 μL de SDS 10%. No gel de empilhamento foi colocado o pente que forma os poços para aplicação das amostras. Após completa polimerização (aproximadamente 30 minutos), foi acrescentado o tampão de eletroforese composto por Tris 0,025 M, glicina 0,0192 M, SDS 0,1% (p/v), pH 8,3. As amostras foram aplicadas de maneira que sempre havia no gel um poço preenchido pelo padrão de peso molecular Rainbow (Amersham Biosystems/GE Healthcare), um poço preenchido pela linhagem controle (K562) e um poço para a amostra controle (de um doador). Os demais poços eram destinados às amostras dos pacientes. Ao término da aplicação das amostras, teve início a eletroforese das proteínas em gel de 14 cm x 16 cm a 25 mA constantes por 4 horas.

### **B-Transferência das bandas protéicas para membrana de nitrocelulose**

Após eletroforese as bandas protéicas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond<sup>TM</sup>ECL, Amersham Biosciences) utilizando-se tampão contendo Tris 25 mM, Glicina 193 mM e 20 % de metanol. A membrana foi colocada sobre dois pedaços de papel de filtro umedecido com tampão e por cima da mesma foi colocado o gel, que por sua vez foi sobreposto por mais dois pedaços de papel de filtro com as mesmas dimensões do gel. Esse “sanduíche” foi levado a cuba de transferência úmida a 100 V por 1,5 h. Após transferência a membrana foi lavada duas vezes com TBST (Tris –HCl, pH 8,0 10 mM, NaCl 150 mM e Tween-20 0,02%). Para verificar se a transferência foi eficiente as membranas foram coradas com Vermelho de *Ponceau* (*Ponceau S* 50mg, Ácido Acético glacial 5%, água Milli-Q q.s.p. 50 mL). O corante tem alta afinidade por proteínas e cora as bandas na membrana, indicando assim que a transferência foi bem sucedida (Fig.11).

### **C- Marcação com anticorpo monoclonal anti-survivina e anti-Smac/DIABLO**

Após lavagem com TBST a membrana foi incubada por 1 hora com uma solução contendo TBST e 5% de leite em pó desnatado à temperatura ambiente sob agitação leve e depois lavada 2 vezes em tampão TBST por 15 minutos cada. Em seguida, a membrana foi incubada com o Ac anti-survivina (R&D Systems), Ac anti Smac/DIABLO (Sigma) ou AcMo anti  $\beta$ -actina (Sigma) (usada como controle constitutivo de expressão protéica basal), diluídos 1:2000 em TBST leite 5% por 2 horas à temperatura ambiente. Após incubação com o AcMo primário, a membrana foi lavada 3 vezes por 15 minutos cada, em TBST sob agitação leve em temperatura ambiente e incubada com o AcMo secundário anti-coelho para survivina e Smac/DIABLO (HRP-Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Zymed) e anti-camundongo para  $\beta$ -actina (HRP-Rat Anti-Mouse IgG, Zymed), diluídos 1:1000 em TBST leite por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação suave, e seguida de 6 lavagens de 15 minutos cada em TBST. Para cada AcMo foi feita uma marcação individual seguindo sempre a mesma ordem: survivina, Smac/DIABLO e  $\beta$ -actina.

### **D – Revelação e densitometria das bandas de proteína**

A banda das proteínas de interesse foi revelada utilizando-se o Kit ECL (Amersham Biosciences) de acordo com as especificações do fabricante e exposição da membrana a um filme de raio X (Mamo-M Kodak) por tempos variáveis de acordo com a proteína. Para survivina 3 minutos, para Smac/DIABLO 2 minutos e para  $\beta$ -actina 1 minuto. A revelação foi feita em reveladora de raio-X (Kodak).

Após a revelação, as bandas foram quantificadas por densitometria (densidade ótica, D.O.), no programa Labworks 4.0. A expressão das proteínas survivina e Smac/DIABLO foi normalizada pela expressão da  $\beta$ -actina.

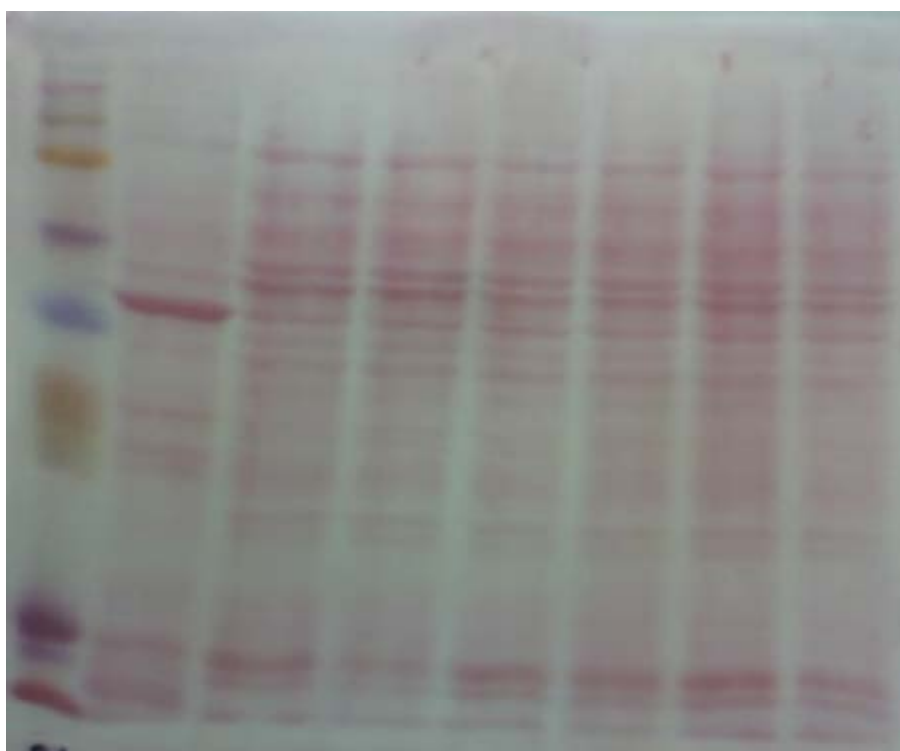


FIGURA 11- Membrana de nitrocelulose após transferência das bandas protéicas corada com Ponceau (vermelho). Do lado esquerdo encontra-se o padrão de peso molecular Rainbow (*Amersham Biosciences*).

### **3.2.4.-Extração de RNA pelo método do TRIZOL**

As amostras preservadas em Trizol™ (Invitrogen) foram retiradas do freezer a -80 °C e incubadas por 5 minutos a 30° C. Adicionaram-se 200 µL de clorofórmio para cada mL de Trizol na amostra. O *ependorf* foi agitado manualmente por alguns segundos e incubado por 3 minutos a 30 °C. A amostra foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. Em seguida a fase aquosa (sobrenadante) foi cuidadosamente retirada para evitar contaminação com ADN, e transferida para outro tubo. A fase orgânica foi novamente armazenada para posterior extração de ADN. O RNA foi então precipitado pela adição de 500 µL de isopropanol e incubado por 10 minutos a 30 °C.

A seguir a amostra foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4° C. O RNA formou um pellet no fundo do tubo quase imperceptível a olho nu. Após precipitação, o RNA foi lavado através da remoção do sobrenadante e adição de 1 mL de etanol 75%. A amostra foi misturada no vórtex e centrifugada a 7500 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o tubo foi seco ao ar por 10 minutos sem, no entanto, deixá-lo secar completamente. O RNA foi dissolvido em 30 µL água DEPC (dietil pirocarbonato, Sigma), homogeneizado e desnaturado a 60° por 10 minutos. O RNA foi estocado em freezer a -80°C até ser usado.

### **3.2.5-Síntese de ADNc com kit T-Primed First-Strand Ready-to-Go (Amersham Biosciences)**

O Kit T-Primed First-Strand utiliza transcriptase reversa do vírus da leucemia murina (M-MuLV) e um oligo(dT) iniciador para formar a fita única de ADNc. A mistura reacional contém uma preparação vitrificada de uma solução tampão contendo dATP, dCTP, dGTP, dTTP, FPLC*pure*™ M-MuLV *reverse transcriptase*, RNAGuard™(porcine), BSA livre de

ADNse/ADNse e iniciador. Para síntese de ADNc as amostras de ARN foram previamente tratadas com ADNse, para remoção de ADN genômico contaminante. Foi utilizada a enzima DNase I RNase Free (Ambion) segundo orientação do fabricante. Em um tubo autoclavado foram adicionados 5 µL de RNA, 2,9 µL de tampão 10 x, 20,95 µL de água DEPC e 0,15 µL de ADNse (0,01 U / µL). A amostra foi incubada por 30 minutos a 37 °C. Para inativar a ADNse foram acrescentados 4 µL de EDTA 20mM e incubou-se o tubo a 75 °C por 10 minutos. Após inativação, o tubo foi incubado a 37 °C por 5 minutos. Em paralelo, o tubo do kit foi levado à incubação a 37 °C por 5 minutos. Ao final da incubação o RNA tratado com ADNse foi acrescentado ao tubo do kit que foi levado à incubação por 1 hora para síntese do ADNc.

### **3.2.6-Determinação da expressão de *survivina* e *Smac/DIABLO* por PCR em tempo real (Real time PCR)**

Para analisar a expressão gênica da survivina e Smac/DIABLO os níveis de ARNm foram avaliados por PCR em tempo real (*Real Time Polymerase Chain Reaction*). Higuchi e colaboradores foram os primeiros a analisar a cinética da PCR pela construção de um sistema que detectava os produtos de PCR à medida que eles se acumulavam (HIGUCHI *et al*, 1992).

O presente trabalho utilizou a metodologia TaqMan descrita por Nogvan *et al* (1991). Os componentes da reação são dois iniciadores não marcados para amplificação da seqüência de interesse (concentração final de 900 nM cada) (*Applied Biosystems*), uma sonda TaqMan MGB (*Applied Biosystems*) (com fluorocromo *reporter* 6-FAM (6-carboxilfluoresceína)) ligado a porção 5' da sonda, um *quencher* não fluorescente na porção 3' da sonda para detecção da seqüência de interesse (concentração final de 250 nM) (MGB (*minor groove binder*), que aumenta a temperatura de fusão ( $T_m$ ) sem aumentar o tamanho da sonda)),



Master Mix com AmpErase UNG (Applied Biosystems), ADN polimerase (Applied Biosystems) e ADNc. Durante a PCR, a sonda TaqMan (marcada com 6-FAM) anela especificamente na seqüência complementar entre os iniciadores senso e antisenso. Quando a sonda está intacta, a proximidade do fluorocromo *reporter* ao *quencher* resulta em supressão da fluorescência primária. A ADN polimerase cliva somente sondas que estão hibridizadas ao alvo. A clivagem separa o fluorocromo *reporter* do *quencher*, resultando em aumento da fluorescência emitida pelo *reporter*. O aumento do sinal de fluorescência ocorre somente se a seqüência alvo é complementar à sonda, sendo amplificado durante a PCR. Por exigir essa especificidade nenhuma ligação inespecífica é detectada. A polimerização da fita continua, mas a porção 3' da sonda é bloqueada para prevenir a extensão da sonda durante a PCR (TaqMan Gene Expression Assay Protocol, Applied Biosystems).

As sondas TaqMan dependem da atividade 5' nuclease da ADN polimerase usada na PCR para hidrolisar um oligonucleotídeo que está hibridizado no alvo do ADNc.

As sondas foram sintetizadas pela Applied Biosystems. O controle endógeno escolhido foi a  $\beta$ -actina, utilizada como controle de expressão gênica basal. Todas as sondas foram marcadas com o fluoróforo 6-FAM.

Empregou-se uma reação de volume final 20  $\mu$ L no poço, contendo 1  $\mu$ L de sonda (20X TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems), 10  $\mu$ L de Master Mix ( 2X TaqMan Universal Mix), 2  $\mu$ L de ADNc.

Após distribuição dos reagentes na placa, a mesma foi fechada com tampas ópticas (Applied Biosystems). A placa foi então levada para o termociclador (PTC -200, BIO-RAD) e a reação teve início com as seguintes condições: 2 minutos a 50°C (ativação da AmpErase UNG), 10 minutos a 95 °C (ativação da Enzima AmpliTaq Gold) e 40 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 95 °C e 1 minuto de anelamento e extensão a 60 °C. Essa programação foi

feita no software Opticon Monitor 2.

Depois de finalizados os ciclos, os valores de  $C_T$  (*Cycle Threshold*) foram exportados para uma planilha do Excel e analisados pelo método do  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . Os valores de  $C_T$  indicam o número fracionário de ciclos em que a quantidade de alvo amplificado ultrapassa um limiar fixado (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

### **3.2.7-Estudo da associação entre Imatinibe e ARA-C na linhagem K562**

Para avaliar o tipo de interação entre o Imatinibe e o ARA-C, foi desenhado um ensaio que visava expor as células da linhagem K562 ao Imatinibe e ao ARA-C, em associação e separadamente. Os efeitos dessa exposição foram analisados por diferentes técnicas. A influência da ação dos quimioterápicos na expressão das proteínas survivina e Smac/DIABLO também foi investigada.

#### **3.2.7.1-Viabilidade celular pelo método do MTT**

Para determinar o efeito citotóxico de cada droga, isolada ou simultaneamente, foi realizado o ensaio de viabilidade celular por MTT.

O método de MTT é um ensaio que mensura a viabilidade celular de acordo com a atividade da enzima desidrogenase na mitocôndria. É um método colorimétrico baseado na capacidade que as células viáveis têm de reduzir o sal brometo de 3-(4,5-dimetilazolil-2)-2,5-difeniltetrazolium ao produto formazana, cristais de cor violeta localizados na porção intracelular após metabolização, que podem ser solubilizados e quantificados por espectrofotometria (MOSMANN, 1983).

As células da linhagem K562 na concentração de  $2 \times 10^4$  células por poço foram

plaqueadas em 200  $\mu\text{L}$  de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB. Foram adicionados então 10  $\mu\text{L}$  das drogas isolada ou simultaneamente previamente diluídas de modo que a concentração final nos poços fosse de 1  $\mu\text{M}$  de Imatinibe, 5  $\mu\text{M}$  de Imatinibe, 10  $\mu\text{M}$  de ARA-C, 1  $\mu\text{M}$  de Imatinibe e 10  $\mu\text{M}$  de ARA-C e por fim 5  $\mu\text{M}$  de Imatinibe e 10  $\mu\text{M}$  de ARA-C. No grupo controle não foi adicionada droga. As placas foram mantidas em estufa de atmosfera úmida contendo 5% de  $\text{CO}_2$  a 37 °C por 24, 48 e 72 horas. Quatro horas antes de terminar os tempos estabelecidos, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de MTT (Sigma) (concentração final 10  $\mu\text{g}$  /mL em PBS pH 7,4). As placas foram mantidas na estufa pelas quatro horas restantes. Retiraram-se 180  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada poço e 150  $\mu\text{L}$  de dimetilssulfóxido (DMSO) (Sigma) foram adicionados a cada poço homogeneizando o suficiente, para a completa dissolução dos cristais de sal formados pelo metabolismo mitocondrial resultando, assim num produto corado. A coloração obtida possuía densidades ópticas diferentes de acordo com o metabolismo mitocondrial após o tratamento das células com as diferentes concentrações dos fármacos e sem eles. A placa de 96 poços foi lida pelo espectrofotômetro (ELISA *Spectra* MAX), utilizando o comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram analisados através da seguinte fórmula: [(Absorvância das células tratadas / Absorvância das células não tratadas) x 100]. As concentrações finais e tempos foram obtidos através da média de três experimentos independentes com triplicatas para cada concentração.

### **3.2.7.2-Ensaio de citotoxicidade: determinação da apoptose espontânea e induzida pelo Imatinibe e ARA-C por Annexina V**

O ensaio de citotoxicidade, através da marcação com anexina V e posterior análise em citômetro de fluxo, foi realizado para determinar a ação citotóxica do Imatinibe e do ARA-C em associação ou não, em células da linhagem K562.

A anexina V faz parte de uma família de proteínas que possuem a capacidade de ligar-se a fosfolipídios da membrana plasmática de forma dependente de cálcio. Durante a apoptose, ocorrem várias alterações celulares dentre elas a exposição de fosfatidilserina (FS) na face externa da membrana celular. A inversão da FS da face interna para a face externa da membrana plasmática é um evento precoce da apoptose (VERMES I *et al*, 1995; van ENGELAND *et al*, 1998). Portanto, a anexina V é capaz de ligar-se à FS indicando apoptose.

Para análise em citômetro de fluxo a anexina V foi conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Kit ApopNexin da Onco). A anexina V-FITC não é capaz de penetrar na membrana plasmática de células viáveis, logo, nas células que não sofreram ruptura da membrana celular, não há marcação pelo fluorocromo. Entretanto, nas células apoptóticas, cuja integridade de membrana foi perdida, a anexina V -FITC pode marcar tanto a FS expressa na face externa, quanto aquela presente na face interna da membrana celular. Para separar a população de células vivas, células em apoptose inicial e tardia, e células em necrose, é necessária a utilização de um marcador de ácidos nucleicos. Neste trabalho foi utilizado como marcador de ADN o fluorocromo iodeto de propídeo (PI) 50 µg/mL (Sigma). Desta forma, células vivas não são marcadas nem por anexina V nem por PI; células em apoptose inicial apresentam marcação positiva para anexina V e negativa para PI; células que se encontram em apoptose tardia são positivas tanto para anexina V quanto para PI; e células em necrose apresentam marcação positiva somente para PI (van ENGELAND *et al*, 1998; VERMES I *et al*, 1995) (Fig. 12). Para determinação do índice de apoptose espontânea ou induzida, as células foram mantidas em cultura em meio RPMI-1640 contendo 10% de SFB em placa de 96 poços a 37° C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> (TABRIZI *et al*, 2002) na concentração de 2 x 10<sup>4</sup> células/poço em volume final de 200 µL. As células foram incubadas por 24 e 48 horas, com ou sem adição de 1 e 5 µM de Imatinibe e 10 µM de ARA-C em associação e separadamente. Após esse tempo, as células foram submetidas ao ensaio de

marcação com anexina V-FITC para análise do índice de apoptose espontânea e induzida pelos fármacos. O conteúdo de três poços de cada grupo (1  $\mu$ M Imatinibe, 5  $\mu$ M de Imatinibe, 1  $\mu$ M de Imatinibe e 10  $\mu$ M de ARA-C, 5  $\mu$ M Imatinibe e 10  $\mu$ M de ARA-C e por fim ARA-C exclusivamente) foi colocado em um tubo para citômetro (FACS - *Fluorescence Activated Cell Sorter*), adicionando-se 1 mL de PBS (salina tamponada com fosfato) a 4° C e centrifugando-se por 7 minutos a 1200 rpm a temperatura de 20 °C. Ao sedimento foi adicionado uma solução contendo 10  $\mu$ L de tampão de ligação 10X (Apoptosis Detection Kit – Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA), 0,5  $\mu$ L de anexina V-FITC (Apoptosis Detection Kit) e 79  $\mu$ L de água deionizada e incubou-se por 15 minutos na ausência de luz em temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 300  $\mu$ L de tampão de ligação 1X (Apoptosis Detection Kit). No momento da leitura no citômetro de fluxo, (FACScan – Becton Dickinson) adicionou-se 10  $\mu$ L de PI. A leitura foi efetuada nos canais FL-1 (530nm) para a anexina V e FL-2 (585nm) para o PI. Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra, sendo os dados analisados pelo programa Cell Quest (Becton Dickinson).

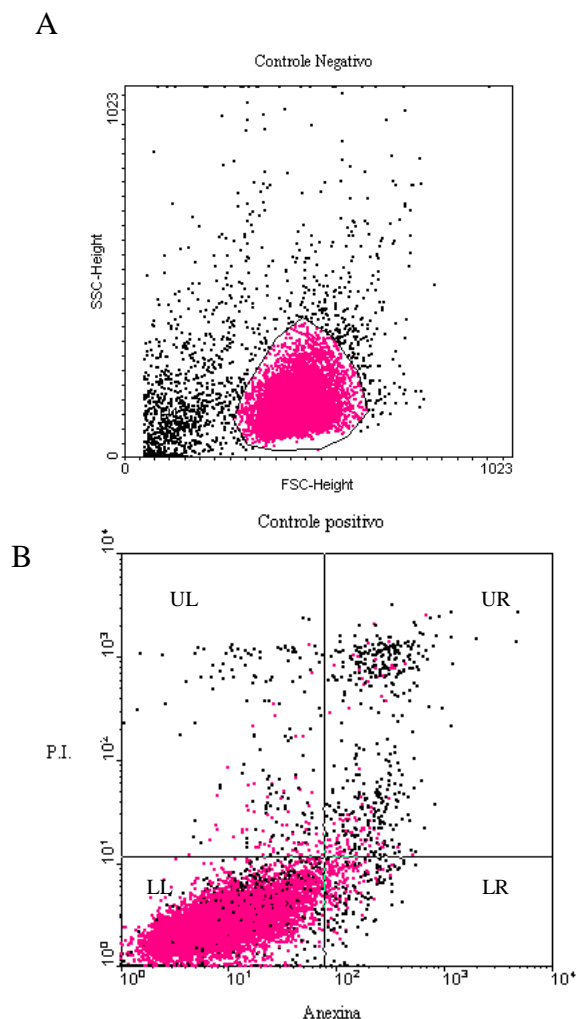
O índice de apoptose induzida pelos fármacos após 24 e 48 horas de cultura foi obtido da seguinte forma: percentual de células em apoptose induzida (tratadas com os fármacos isoladamente ou em associação) menos o percentual de células em apoptose espontânea (não tratadas com os fármacos). Assim foi possível observar a real indução de apoptose pelos fármacos. Essa metodologia vem sendo empregada amplamente em diversos trabalhos, inclusive em estudos recentes desenvolvidos por nosso grupo (SILVA *et al*, 2003; SILVA *et al*, 2006). Um ponto de corte maior ou igual a 10% foi estabelecido para separar as amostras com alta taxa de apoptose espontânea ou induzida pelos fármacos (SILVA *et al*, 2003; SILVA *et al*, 2006).

Somente as amostras que tiveram pelo menos 60% de células vivas no controle negativo, após incubação pelos períodos estabelecidos, foram analisadas quanto à morte

celular.

### **3.2.7.3-Determinação da expressão da survivina e Smac/DIABLO na linhagem K562 por Western blotting mediante exposição aos quimioterápicos**

As células da linhagem K562 foram expostas ao Imatinibe e ao ARA-C por 24 horas, como relatado anteriormente para os ensaios de citotoxicidade. Após exposição aos fármacos, as células foram lavadas com solução fisiológica (NaCl 0,9%) duas vezes e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram lisadas com o mesmo protocolo utilizado para lisar as células de pacientes. As proteínas foram quantificadas pelo método de Lowry com o kit da BIO-RAD. Foram aplicados 70 µg de proteína em gel de poliacrilamida 12%. As proteínas foram transferidas para um membrana de nitrocelulose e marcadas com AcMo anti-survivina, anti-Smac/DIABLO e anti-β-actina, como descrito previamente.



Quadrante	Eventos	% Total	% Gated
UL	238	2.38	2.38
UR	495	4.95	4.95
LL	9044	90.44	90.44
LR	223	2.23	2.23

FIGURA 12- Ilustração de uma análise em citômetro de fluxo para verificação da apoptose na linhagem celular K562. Figura A: *dot plot* demonstrando a população de células delimitada pelo *gate* R1 em rosa. O *gate* só foi utilizado para visualização da localização das células vivas ou em apoptose inicial. FSC= tamanho; SSC= complexidade interna. Figura B: *dot plot* demonstrando a análise da marcação pelos fluorocromos anexina V e iodeto de propídeo (PI). A região em rosa corresponde às células do *gate* R1 da Figura A. Ao lado está representado um quadro mostrando as estatísticas de cada quadrante. LL= células vivas; LR= células em apoptose inicial; UR= células em apoptose tardia ou necrose secundária; UL= células em necrose.

### **3.2.8-Análise estatística**

Para comparação da expressão das proteínas survivina e Smac/DIABLO entre os subgrupos de pacientes com LMC, foram utilizados os seguintes testes não paramétricos devido a acentuada variabilidade dos seus valores:

- a) Correlação de Sperman: quando correlacionamos a expressão das proteínas;
- b) Teste de Mann-Withney: quando comparamos a expressão das proteínas;
- c) Teste de Kruskall-Wallis: quando comparamos as expressões envolvendo as três fases da doença, bem como, quando envolvendo os três níveis de risco, de acordo com o índice de Sokal.
- d) Teste de Dunn: quando o teste de Kruskall-Wallis for estatisticamente significativo, servindo como teste de confirmação.
- e) Teste de tendência Qui-quadrado: para verificar a significância estatística de uma tendência.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .



## **4-RESULTADOS**

### **4.1- Características dos pacientes**

Foram coletadas, de forma prospectiva e retrospectiva, 68 amostras de pacientes com LMC. Dos 68 pacientes estudados 26 eram do sexo feminino e 42 do sexo masculino. As variáveis clínicas analisadas, para fins de comparação com a expressão das proteínas survivina e Smac/DIABLO foram: idade, fase da LMC, índice de Sokal e tratamento prévio ou não. A idade dos pacientes variou de 7 a 81 anos (mediana = 45 anos). De acordo com a fase da doença, 6 pacientes estavam em CB, 10 em FA e 52 em FC. Trinta e quatro tiveram índice de Sokal menor que 0,8, sendo classificados no grupo de baixo risco (Low), 23 apresentaram índice de Sokal igual ou maior que 0,8 e menor que 12, sendo classificados no grupo de risco intermediário (Int) e 11 pacientes apresentaram Sokal maior 1,2, considerados de alto risco para progressão de doença (High). Metade dos pacientes não havia recebido nenhum tratamento anterior à coleta das amostras, sendo classificados no grupo que foi denominado “Não tratados” (34/68). Os pacientes que receberam tratamento prévio foram agrupados como Tratados (34/68). Dentre os quimioterápicos empregados estão: hidroxiuréea (HY) (10/68); ARA-C (citarabina) (3/68); Imatinibe (IB) (15/68) e interferon  $\alpha$  (IFN) (15/68). Os pacientes foram incluídos no grupo dos Tratados quando haviam recebido pelo menos um dos fármacos. As características clínicas estão listadas na Tabela 2.

TABELA 2- Características clínicas dos pacientes com leucemia mielóide crônica

Pacientes	Idade (anos)	Sexo	Fase	Índice de Sokal	Tratamento prévio
1	44	M	CB	0.98	NÃO
2	19	M	FC	0.75	NÃO
3	50	F	FC	1.21	HY
4	30	M	FC	1.2	HY, ARA-C
5	34	M	FC	0.48	IFN,IB
6	34	M	FC	0.52	HY
7	56	F	FC	1.37	NÃO
8	34	F	FC	0.54	HY
9	26	M	FC	1.1	HY
10	7	M	CB	0.86	HY, INF, IB
11	71	M	FA	1.1	HY, INF
12	58	F	FC	0.79	NÃO
13	43	M	FC	0.82	NÃO
14	45	M	FC	0.7	NÃO
15	53	M	FA	0.78	NÃO
16	41	M	FC	0.69	HY, INF
17	53	M	FA	0.78	HY
18	18	M	FC	0.51	NÃO
19	29	F	FC	0.69	NÃO
20	53	F	FC	0.63	NÃO
21	66	M	FC	0.76	NÃO
22	58	M	FC	0.68	NÃO
23	58	F	FC	1.17	NÃO
24	68	F	FA	3.8	HY, INF, IB
25	65	M	FC	1.04	NÃO
26	40	M	FC	0.58	NÃO
27	37	F	FC	0.57	NÃO
28	70	M	FC	1.12	HY, ARA-C
29	67	M	CB	1.35	HY, ARA-C
30	58	M	FC	0.71	NÃO
31	9	F	FC	0.79	NÃO
32	43	M	FC	0.64	HY, INF
33	46	M	FC	0.8	NÃO
34	30	F	FC	2.34	HY, INF
35	51	M	FC	1.65	HY, INF, IB
36	54	F	FC	1.99	HY
37	44	M	FC	0.78	NÃO
38	81	F	FC	0.91	HY
39	15	F	FC	0.52	NÃO
40	45	M	FC	0.94	NÃO
41	27	F	FC	0.8	HY
42	56	F	FC	0.77	NÃO
43	29	M	FC	0.49	NÃO
44	45	M	FA	2.5	NÃO
45	33	M	FC	0.75	NÃO
46	48	M	FC	1.1	HY
47	56	F	FC	0.69	HY
48	28	M	FC	0.63	NÃO
49	38	F	FC	0.76	NÃO
50	48	M	CB	0.91	HY, INF
51	39	M	FC	0.57	NÃO
52	26	F	FA	0.5	NÃO
53	26	M	FC	0.83	NÃO
54	61	F	FC	1.0	HY, IB
55	30	M	FC	1.2	HY, ARA-C
56	49	M	FA	0.8	HY, INF
57	18	M	FC	0.63	HY, INF, IB
58	31	M	FC	0.9	NÃO
59	46	M	FC	0.8	INF, IB
60	42	M	FC	0.7	HY, INF, IB
61	50	F	FC	3.7	HY, IB
62	51	F	FC	1.1	NÃO
63	50	F	FA	1.45	HY, IB
64	30	F	CB	0.93	HY, IB
65	36	F	CB	1.08	HY, IB
66	48	F	FA	0.67	HY, INF, IB
67	46	M	FC	0.71	HY, INF, IB
68	76	M	FA	5.1	HY, IB

NÃO, amostras de pacientes não tratados previamente; HY, hidroxiuréia; ARA-C, citarabina; IB, Imatinibe; INF, interferon- $\alpha$ . F, feminino; M, masculino. FC, fase crônica; FA, fase acelerada; CB, crise blástica.

#### 4.2- Expressão das proteínas survivina e Smac/DIABLO

O perfil de expressão das proteínas survivina e Smac/DIABLO nos pacientes foi analisado por Western blotting. Esse estudo demonstrou que a maioria dos pacientes apresentou expressão da survivina (58/68) e Smac/DIABLO (57/68). Em paralelo, foi analisado o perfil de expressão das mesmas proteínas em 10 indivíduos saudáveis. Nessas amostras não se observou a expressão da survivina, ao contrário da Smac/DIABLO, cuja expressão foi encontrada em todos os casos (Fig. 13).

Foi realizada análise estatística para a comparação entre os diversos grupos de pacientes. A expressão da survivina e da Smac/DIABLO foi analisada em cada grupo, individualmente. Não houve diferença significativa de expressão entre o sexo masculino e feminino ( $p > 0,05$ ) (Fig. 14 A e B).

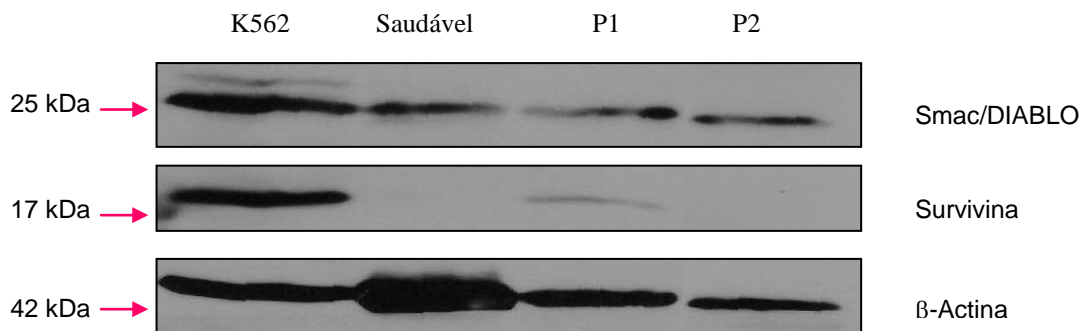


FIGURA 13- Expressão detectadas por Western blot das proteínas survivina e Smac/DIABLO. As marcações mostram a expressão constitutiva da Smac/DIABLO e survivina na linhagem K562, em células do sangue periférico de um indivíduo saudável e em células leucêmicas de dois pacientes com LMC. A proteína controle de expressão foi a  $\beta$ -actina.



Não houve correlação entre a expressão da survivina e da Smac/DIABLO nas amostras dos pacientes com LMC ( $P=0,477$ ) (Fig. 15).

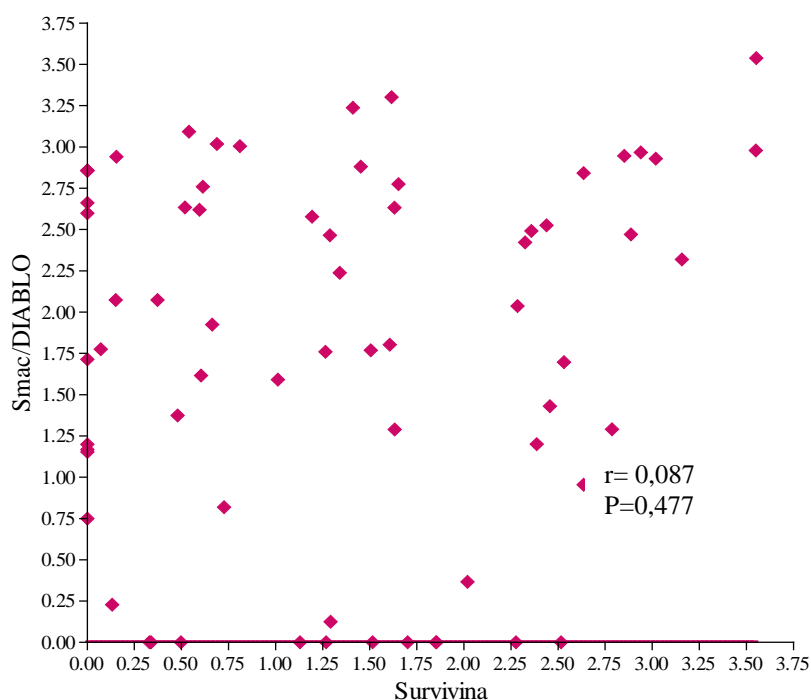


FIGURA 15- Correlação da expressão da survivina e da Smac/DIABLO em pacientes com leucemia mielóide crônica ( $P=0,477$ ). A expressão das proteínas foi normalizada pela expressão da B-actina.

Não foi observada correlação entre a expressão da survivina e da Smac/DIABLO nos indivíduos na FC da doença (Fig. 16). Não foi possível realizar a análise da expressão das proteínas survivina e Smac/DIABLO na FA e CB, em separado, devido ao baixo número de amostras em cada um dos grupos que inviabilizou a aplicação de testes estatísticos. Entretanto, quando ambas (FA e CB) foram analisadas como um único grupo pertencente à fase avançada da LMC, pelo teste de Kruskal-Wallis, em comparação ao grupo pertencente somente a FC não se observou diferença significativa ( $P=0,05$ ) (Fig. 17).

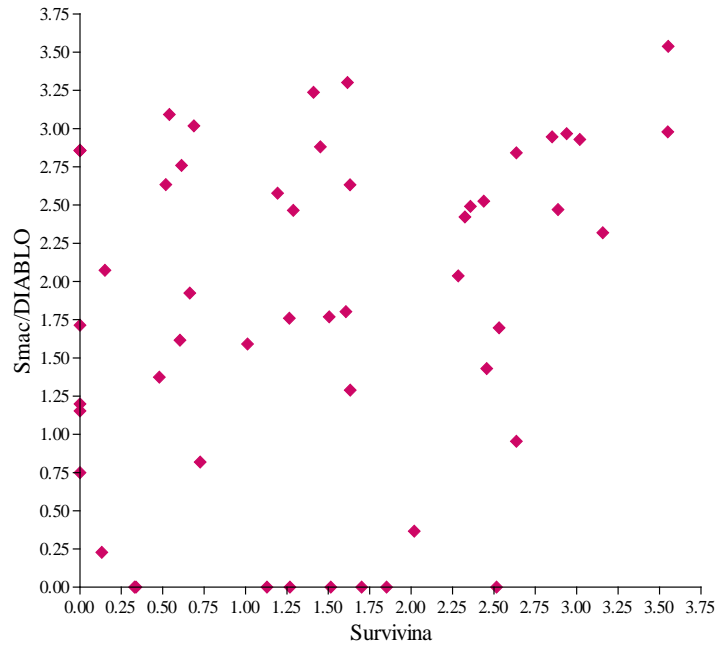


FIGURA 16- Correlação da expressão da survivina e da Smac/DIABLO em pacientes com leucemia mielóide crônica na fase crônica. A expressão das proteínas foi normalizada pela expressão da B-actina.

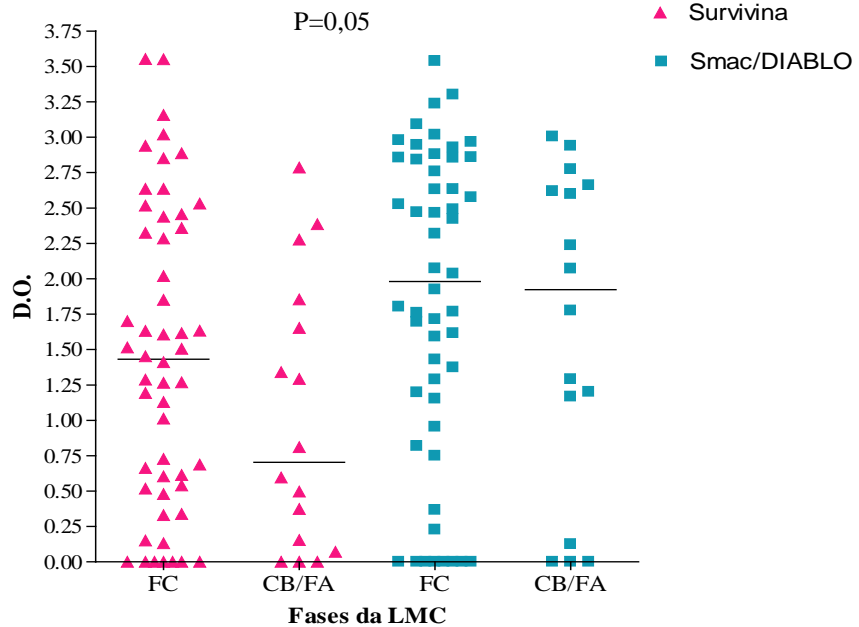


FIGURA 17- Expressão da survivina e da Smac/DIABLO entre os pacientes com leucemia mielóide crônica na fase crônica e crise blástica agrupados com os pacientes na fase acelerada.

Com relação ao índice de Sokal, não houve correlação entre as proteínas survivina e Smac/DIABLO ( $P=0,77$ ;  $r=0,051$ ) (Fig. 18). Quando comparadas no grupo de risco alto ou intermediário (High/Int) também não houve correlação entre as duas proteínas ( $P=0,317$ ;  $r=0,176$ ) (Fig. 19).

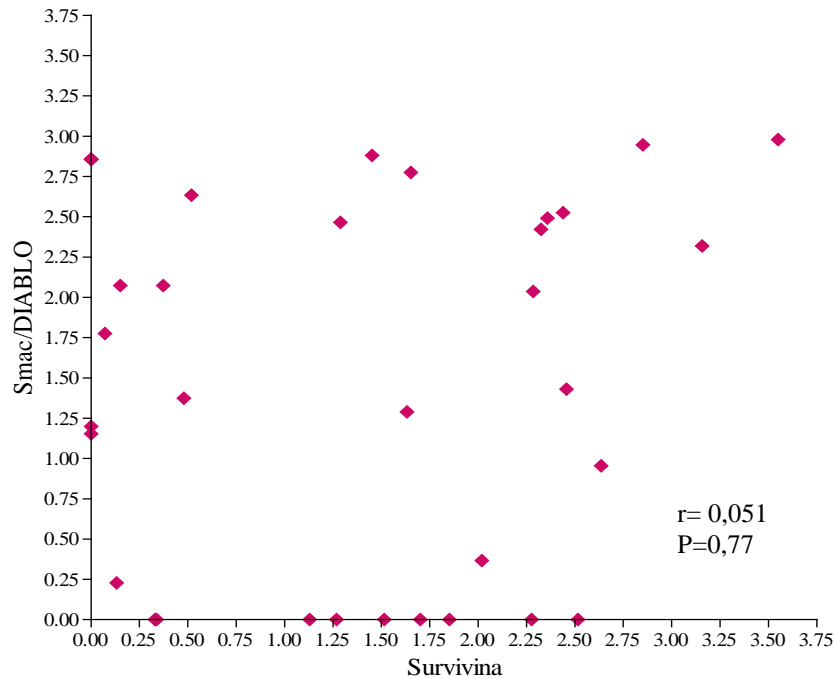


FIGURA 18- Correlação da expressão da survivina e da Smac/DIABLO em pacientes com leucemia mielóide crônica e Sokal de baixo risco.

Comparando a expressão da Smac/DIABLO entre os pacientes com baixo risco (Low) e risco intermediário e alto (Int+High), verificou-se que os pacientes do grupo Low apresentaram menor expressão da proteína que os pacientes do grupo Int+High ( $P=0,0334$ ) (Fig. 20). Fazendo a mesma comparação entre esses grupos, em relação à survivina, não houve diferença significativa da expressão desta proteína entre os grupos ( $P=0,9024$ )(Fig. 21).

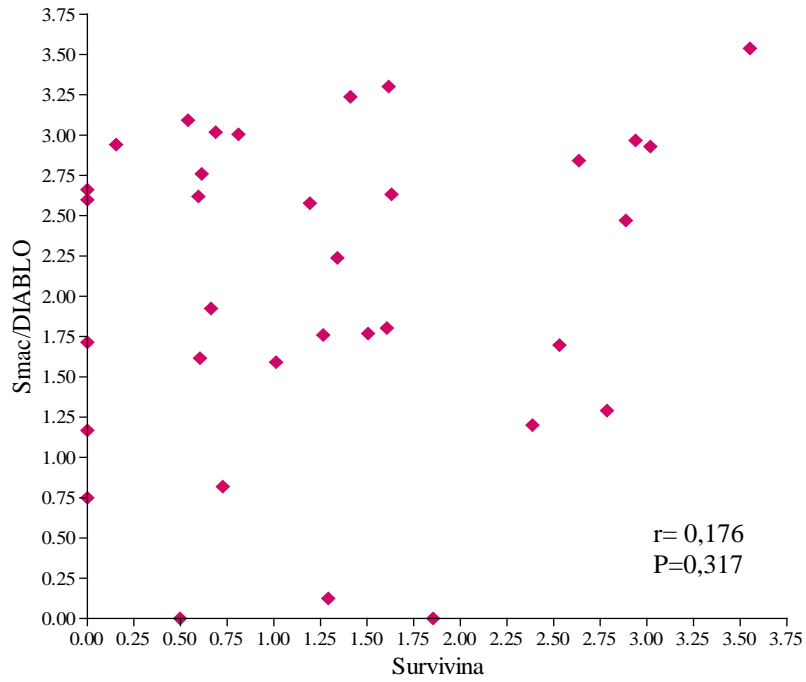


FIGURA 19- Correlação da expressão da survivina e da Smac/DIABLO em pacientes com leucemia mielóide crônica e Sokal de risco alto e intermediário.

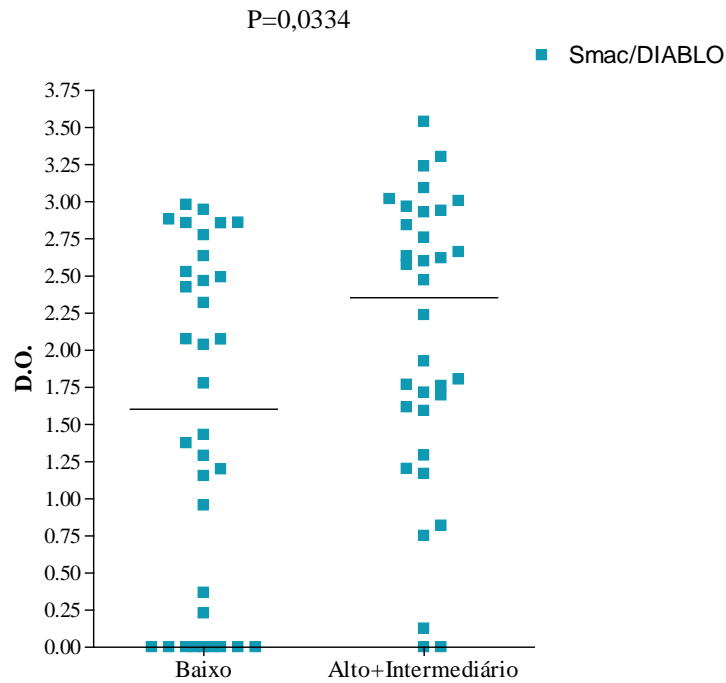


FIGURA 20- Expressão da Smac/DIABLO entre os pacientes com leucemia mielóide crônica e Sokal de risco baixo e alto + intermediário.









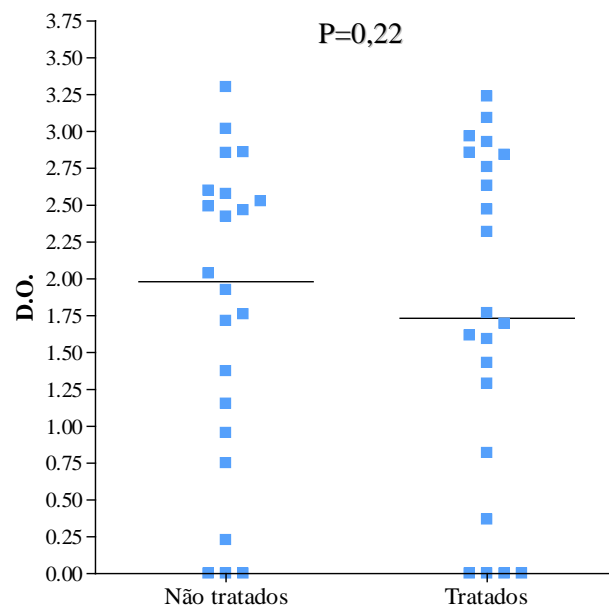


FIGURA 25- Expressão da Smac/DIABLO entre os pacientes com leucemia mielóide crônica na fase crônica, previamente tratados e não tratados.

#### 4.3- Expressão de *survivina* e *Smac/DIABLO* por PCR em tempo real (*Real time PCR*)

O nível de expressão de ARNm codificado pelos genes *survivina* e *Smac/DIABLO* foi analisado nas amostras dos pacientes e de 10 indivíduos saudáveis. A linhagem K562 foi utilizada apenas como controle positivo da amplificação dos genes (Fig. 26).

Foram realizados experimentos prévios para a escolha do melhor gene constitutivo. Os níveis de expressão foram mensurados através dos valores de  $C_T$ . O gene constitutivo escolhido foi  $\beta$ -*actina* por apresentar menor variação do valor de  $C_T$  entre pacientes e indivíduos saudáveis. Foi utilizado o ADNc de 10 indivíduos saudáveis para traçar o perfil de expressão normal. O  $C_T$  médio para  $\beta$ -*actina* foi de  $23,47 \pm 2,05$ , para *Smac/DIABLO*  $27,32 \pm 1,03$  e *survivina* não foi amplificado. O padrão de expressão dos indivíduos saudáveis foi então considerado calibrador (Fig. 27, 28 e 29).

Foram analisadas 19 amostras de pacientes que apresentaram valores médios de  $C_T$  para *actina* de  $27,82 \pm 2,69$ , para *Smac/DIABLO*  $30,56 \pm 2,67$  e *survivina*  $36,38 \pm 1,78$  (Fig. 30 e 31). Todos os pacientes amplificaram *Smac/DIABLO*. No entanto, somente 6 amplificaram *survivina*.

Aplicando o método de  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  para analisar a diferença da expressão da *Smac/DIABLO* nos pacientes em relação aos indivíduos saudáveis (calibrador), foi observado que alguns pacientes apresentaram expressão da *Smac/DIABLO* maior que o calibrador, indicando que o gene estaria mais expresso nos pacientes (Fig. 32). Não foi possível utilizar o mesmo método para o gene da *survivina*. Para análise da expressão da *survivina*, considerou-se apenas a positividade ou não da amostra testada (Tabela 3).

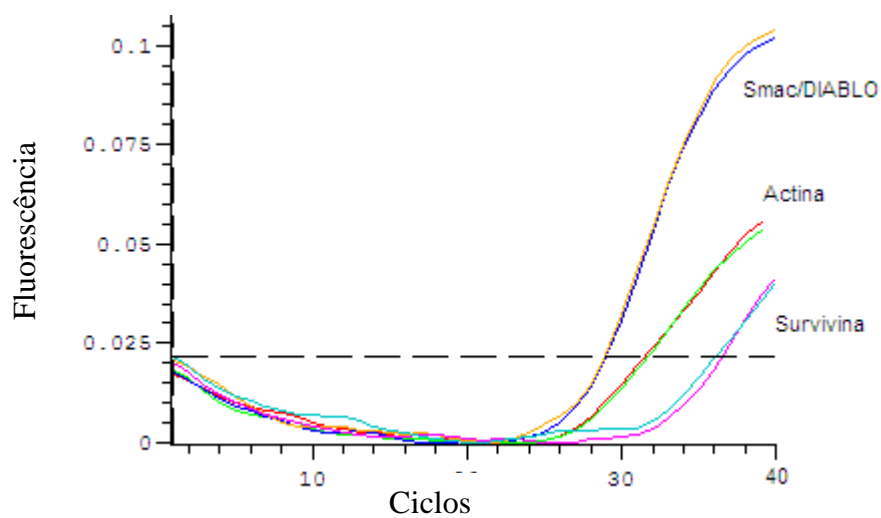


FIGURA 26- Curva demonstrando o perfil de expressão da *survivina*, *Smac/DIABLO* e  $\beta$ -*actina* na linhagem K562 por PCR em tempo real.

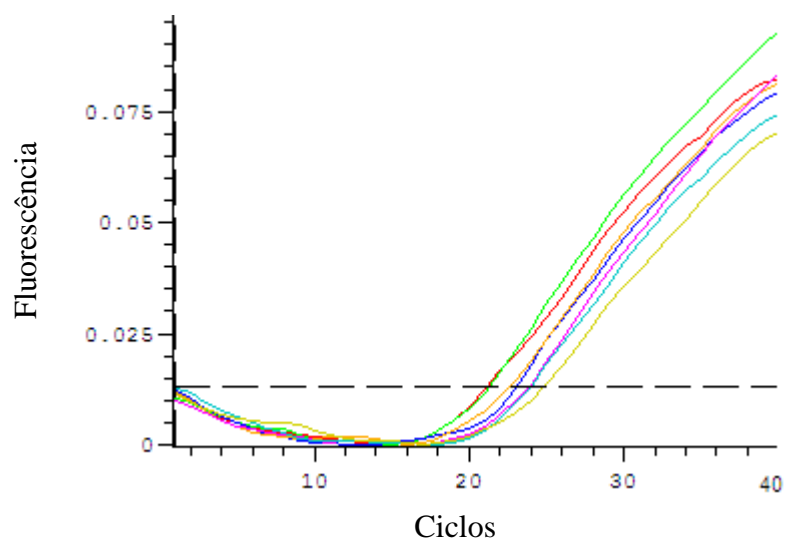


FIGURA 27- Curva demonstrando o perfil de expressão da  $\beta$ -*actina* em indivíduos saudáveis por PCR em tempo real.

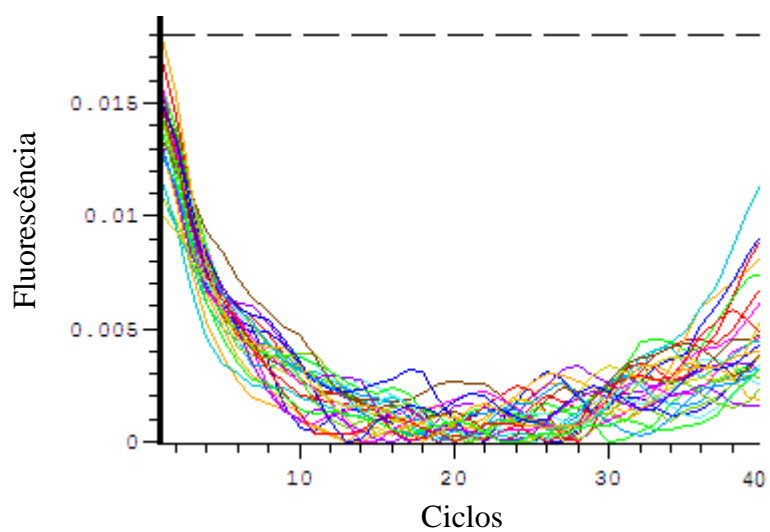


FIGURA 28- Curva demonstrando o perfil de expressão da *survivina* em indivíduos saudáveis por PCR em tempo real.

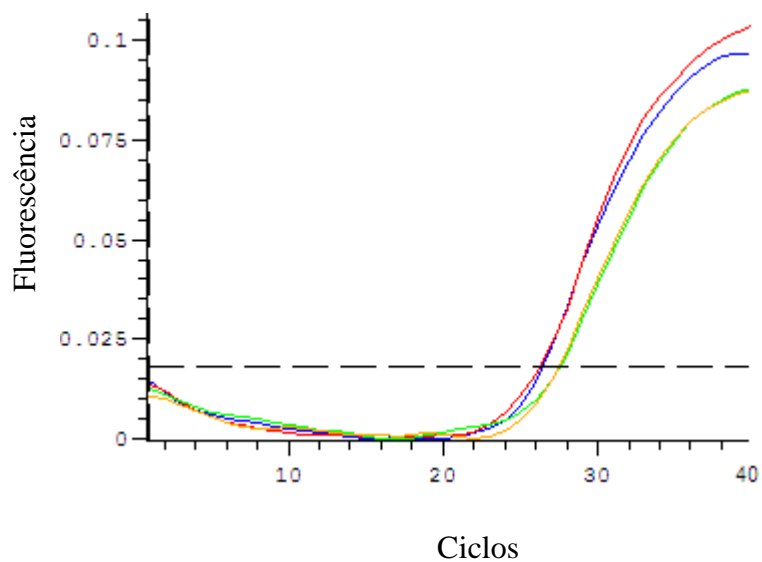


FIGURA 29- Curva demonstrando o perfil de expressão da Smac/DIABLO em indivíduos saudáveis por PCR em tempo real.

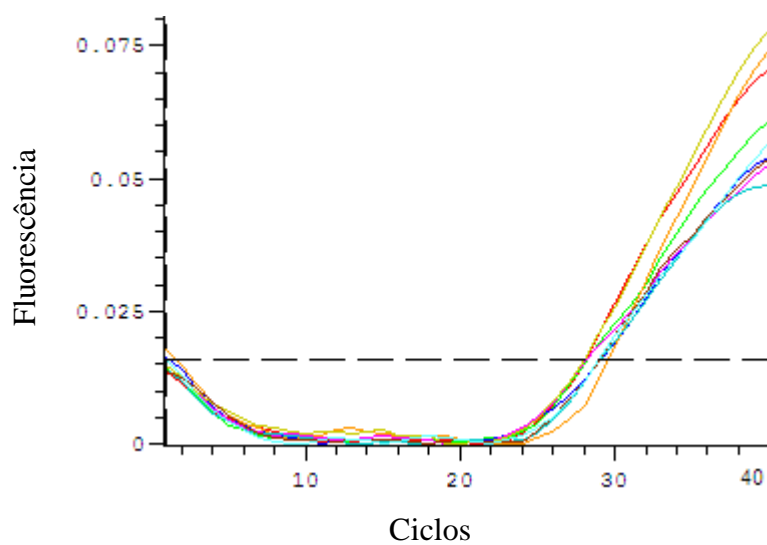


FIGURA 30- Curva demonstrando o perfil de expressão da  $\beta$ -actina em pacientes com leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real.

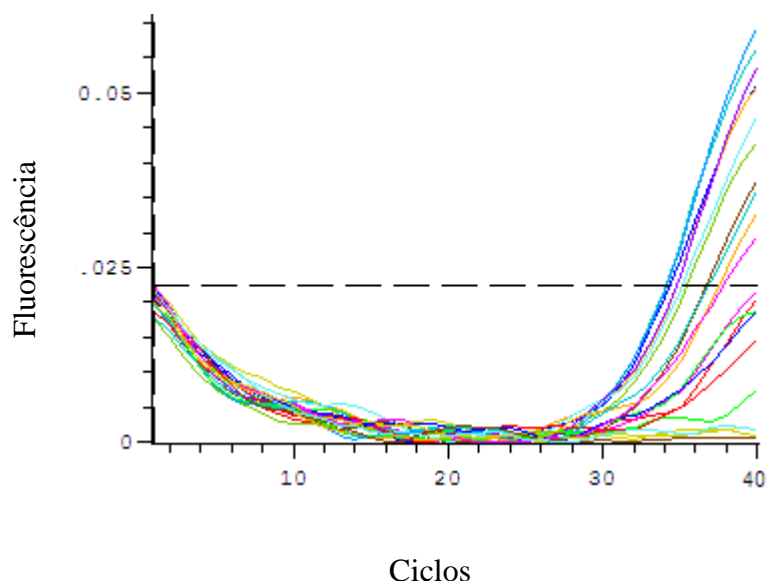


FIGURA 31- Curva demonstrando o perfil de expressão da *survivina* em pacientes com leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real.



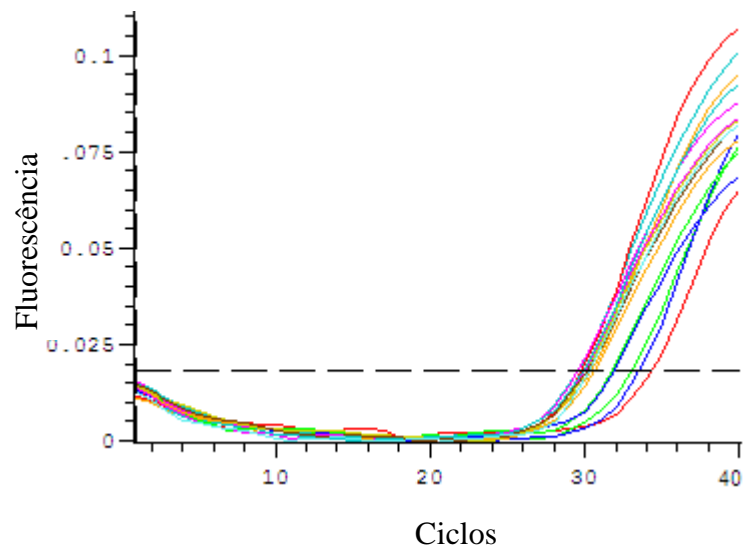


FIGURA 32- Curva demonstrando o perfil de expressão da Smac/DIABLO em pacientes com leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real.

Tabela 3- Expressão da survivina e Smac/DIABLO em 19 pacientes com LMC.

Paciente	Survivina		Smac/DIABLO	
	ARNm	proteína (D.O.)	ARNm	proteína (D.O.)
P1	+	1,45	1,4	2,88
P2	-	0	0,7	2,60
P3	-	0,52	0,8	2,63
P4	-	0,54	45,1	3,09
P15	-	0	0,7	2,66
P17	-	0	0,9	2,28
P22	-	0,13	0,4	0,22
P23	-	0	4	1,71
P25	-	0	0,1	0,75
P27	-	0	0,2	2,86
P44	+	2,39	4,7	1,20
P45	+	1,85	3,5	0,8
P47	-	0	5	2,86
P48	+	2,33	19,7	2,42
P50	-	1,26	0,3	1,76
P51	+	1,63	5,3	2,63
P52	+	2,28	1,1	0
P62	-	1,34	3	2,24
P68	-	0,37	0	0,1

#### **4.4- Efeito da associação entre Imatinibe e ARA-C na linhagem K562**

##### **4.4.1- Análise da viabilidade celular pelo método do MTT**

Os experimentos para determinar a citotoxicidade do Imatinibe e do ARA-C foram feitos em triplicatas e repetidos 3 vezes, de forma independente. Em cada ensaio as células foram incubadas por 24, 48 e 72 horas (Fig. 33 e 34). Foram utilizadas duas concentrações de Imatinibe (1 e 5  $\mu\text{M}$ ) e uma de ARA-C (10  $\mu\text{M}$ ). A porcentagem de redução (média  $\pm$  desvio padrão) da viabilidade celular pela exposição a 1 e 5  $\mu\text{M}$  de Imatinibe em 24 horas foi, respectivamente,  $30 \pm 2,5$  e  $40 \pm 1,1\%$ . O ARA-C (10 $\mu\text{M}$ ) não alterou a viabilidade celular em 24 horas. Quando as células foram expostas simultaneamente ao Imatinibe e ao ARA-C, em 24 horas a redução com 1  $\mu\text{M}$  de Imatinibe e ARA-C foi de  $34 \pm 0,32\%$ , enquanto com 5  $\mu\text{M}$  de Imatinibe e ARA-C foi de  $33 \pm 2,4\%$ . Após 48 horas de exposição a redução com 1 e 5  $\mu\text{M}$  foi, respectivamente de  $71 \pm 7,3$  e  $75 \pm 7,6\%$ . Quando se acrescentou ARA-C a 1 e 5  $\mu\text{M}$  de Imatinibe em 48 horas houve uma redução de  $69 \pm 7,1$  e  $69,1 \pm 6,7\%$  na viabilidade, respectivamente. Durante as 72 horas de incubação, finalmente, com 1 e 5  $\mu\text{M}$  a redução foi de  $82,8 \pm 1,98$  e  $83 \pm 1,3\%$ . Após incubação simultânea com ARA-C, 1 e 5 $\mu\text{M}$  observou-se  $81,3 \pm 2$  e  $78 \pm 4,5\%$  de redução na viabilidade, respectivamente.

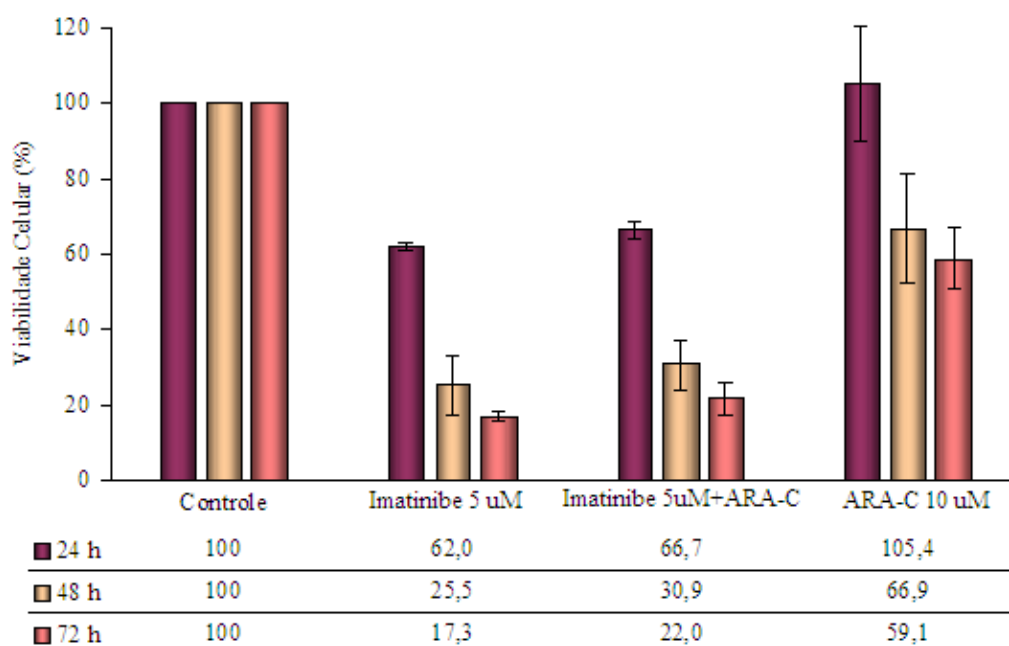


FIGURA 33- Porcentagem de redução da viabilidade celular após 24, 48 e 72 horas de incubação da linhagem celular K562 com Imatinibe 5  $\mu$ M e ARA-C 10  $\mu$ M (Média de 3 experimentos  $\pm$  desvio padrão).

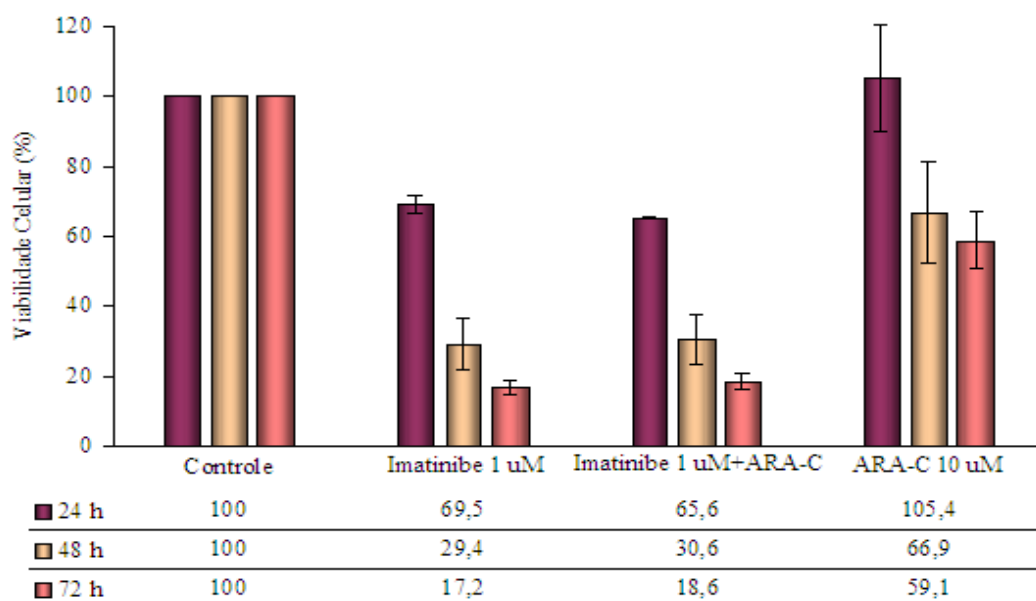


FIGURA 34- Porcentagem de redução da viabilidade celular após 24, 48 e 72 horas de incubação da linhagem celular K562 com Imatinibe 1  $\mu$ M e ARA-C 10  $\mu$ M (Média de 3 experimentos  $\pm$  desvio padrão).

#### **4.4.2- Apoptose espontânea e induzida pelo Imatinibe e ARA-C com Anexina V em citometria de fluxo**

A determinação da indução de apoptose pelos quimioterápicos foi feita através do ensaio com Anexina V em citometria de fluxo utilizando a média de dois experimentos independentes. Tanto o Imatinibe quanto o ARA-C induziram apoptose na linhagem K562 após 24 e 48 horas de incubação. Os níveis de apoptose induzida por Imatinibe 1 e 5  $\mu$ M foram de 6 e 7% em 24 horas e 17 e 37,3% em 48 horas, respectivamente. A apoptose induzida pelo ARA-C foi de 4 % em 24 horas e 10,5% em 48 horas. Quando os dois quimioterápicos foram utilizados simultaneamente, a indução de apoptose com Imatinibe 1 $\mu$ M + ARA-C foi de 14,92% em 24 horas e 38,68% em 48 horas. Contudo, essas taxas foram aproximadamente o dobro daquelas observadas quando somente o Imatinibe foi testado. Após exposição ao Imatinibe 5 $\mu$ M + ARA-C os níveis de apoptose foram de 13,4% em 24 horas e 36,85% em 48 horas (Fig. 35).

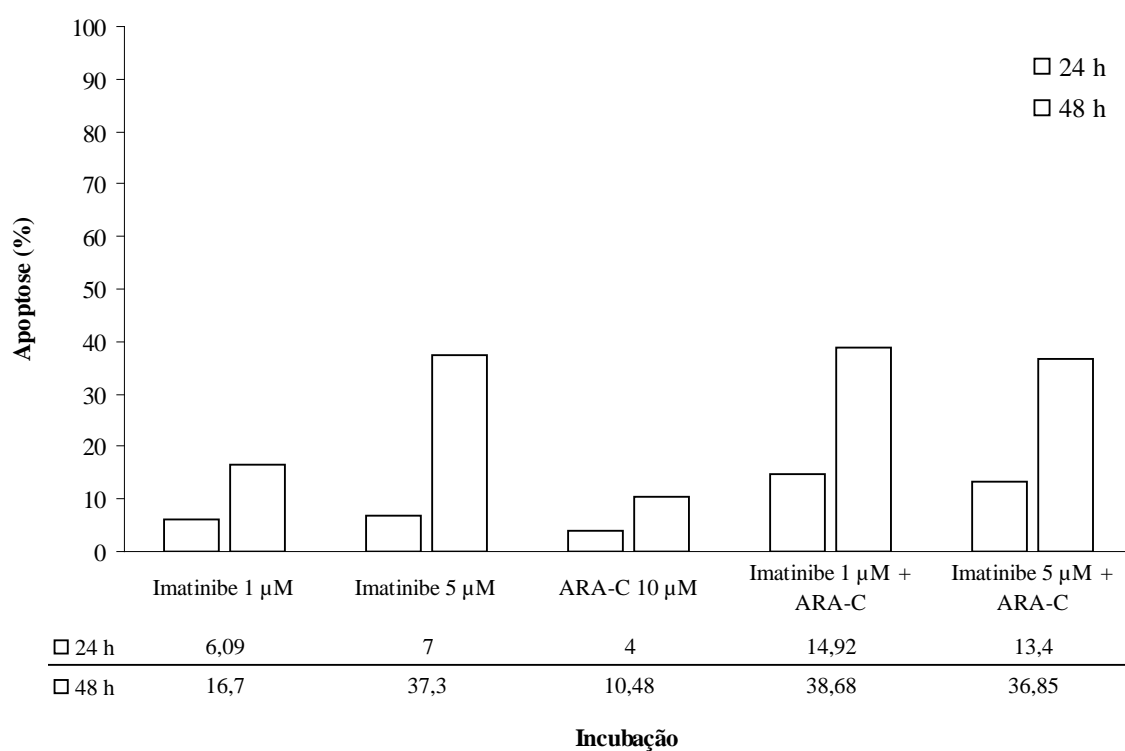


FIGURA 35- Porcentagem de indução de apoptose após 24 e 48 horas de incubação da linhagem celular K562 com Imatinibe 1 e 5 μM e ARA-C 10 μM (Média de 2 experimentos).

#### **4.4.3-Expressão da survivina e Smac/DIABLO na linhagem K562 por Western blotting mediante exposição aos quimioterápicos.**

As células da linhagem K562 foram incubadas com os fármacos Imatinibe e ARA-C por 24 horas nas mesmas condições estabelecidas para os ensaios de citotoxicidade. Esse tempo foi determinado após análise da citotoxicidade dos fármacos no ensaio com Anexina V sendo considerado o tempo mais apropriado para determinação da ocorrência de apoptose inicial. Após incubação, o perfil de expressão da survivina e Smac/DIABLO foi analisado por Western blotting (Fig. 37).

A densitometria das bandas foi feita utilizando o programa Labworks 4.0. A expressão das proteínas survivina e Smac/DIABLO nas células tratadas com os quimioterápicos foi comparada com a expressão nas células não tratadas. Tanto o Imatinibe quanto o ARA-C foram capazes de induzir a redução da expressão da survivina. Entretanto, quando as células foram tratadas com os dois fármacos simultaneamente observou-se o aumento da expressão dessa da survivina. Da mesma forma Imatinibe, isoladamente ou em associação com ARA-C, foi capaz de induzir o aumento na expressão da proteína Smac/DIABLO. Por outro lado foi observado que ARA-C, isoladamente, induziu a diminuição dessa proteína nas células da linhagem K562.



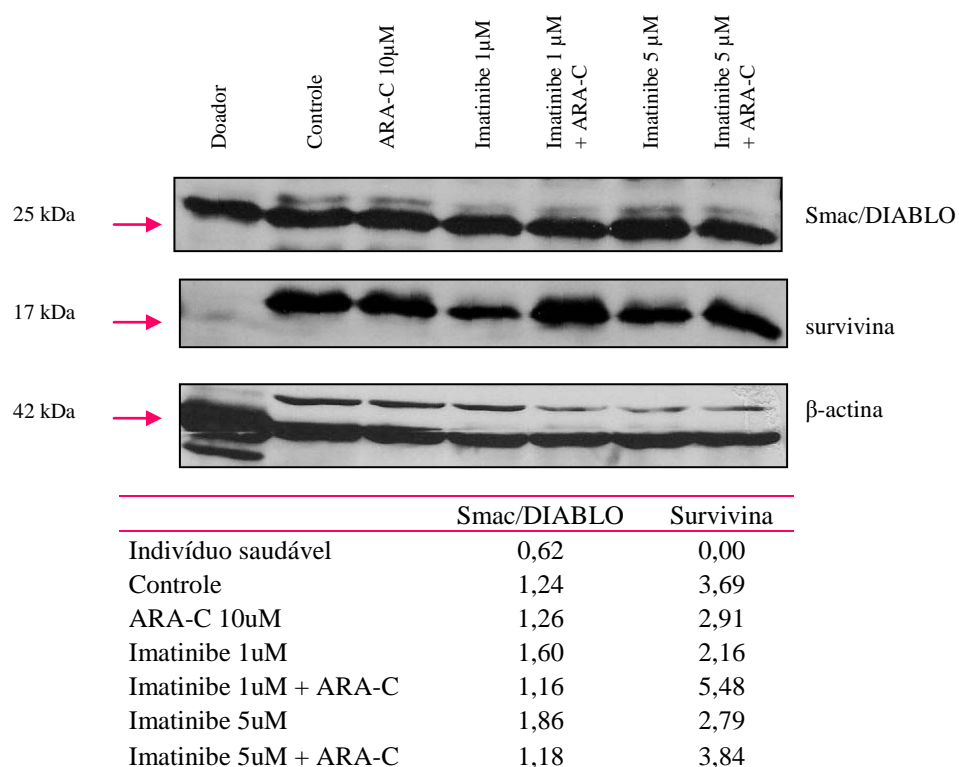


FIGURA 36- Expressão das proteínas survivina e Smac/DIABLO após 24 h de exposição aos quimioterápicos Imatinibe (1 e 5µM) e ARA-C (10µM). A expressão da survivina e da Smac/DIABLO foi normalizada pela expressão da B-actina por densitometria das bandas protéicas.

## 5- DISCUSSÃO

A LMC é uma doença originada de um clone maligno de células tronco hematopoiéticas. Na atualidade, somente o TMO alogênico proporciona erradicação da doença e sobrevida prolongada, embora seja limitado a poucos pacientes devido à morbidade e mortalidade relacionadas ao tratamento e a indisponibilidade de doadores compatíveis. O TMO tem sido restrito a pacientes jovens e sem disfunção orgânica e, portanto, somente uma minoria é elegível para TMO alogênico convencional.

Apesar de inúmeros resultados clínicos animadores, o Interferon- $\alpha$  está associado com toxicidade significativa e a inconveniência de injeções subcutâneas.

Recentemente, o Imatinibe, desenvolvido como um agente cuja administração é oral, tem revolucionado o tratamento de pacientes com LMC recém diagnosticada. Imatinibe atua por inibir a atividade quinase da oncoproteína Bcr-Abl e, por conseguinte reverte a ativação da via de transdução de sinal levando à morte as células afetadas.

No cenário clínico, o Imatinibe proporciona aproximadamente 80% de remissão citogenética completa e longas sobrevidas (O'BRIEN, 2003). Contudo, um número apreciável de pacientes, que alcança resposta inicial, torna-se resistente a este agente. Essa resistência surge de uma população de células-tronco quiescentes Ph<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> e Lin<sup>-</sup> (HOLYOAKE et al,1999; GRAHAN et al, 2002). Entretanto, o fenótipo de resistência não é limitado a quiescência das células, como também não está relacionado somente ao Imatinibe podendo ser induzido por diversos estímulos (HOLTZ et al, 2005).

Os mecanismos de resistência ao Imatinibe podem ser classificados como *BCR-ABL* dependentes e *BCR-ABL* independentes. Mutações no domínio quinase (KD) são as mais freqüentes, especialmente aquelas presentes na alça de ligação com fosfato do KD (*P-loop*) cuja alteração parece estar relacionada com a progressão da doença (BRANDFORD et al,

2003). Entretanto, sabe-se que a presença de mutação no gene *BCR-ABL* nem sempre explica a resistência ao Imatinibe visto que pacientes que apresentam determinadas mutações respondem de forma variável (KHORASHAD et al, 2006). Portanto, parece provável que outros mecanismos de resistência, tais como a superexpressão da proteína Bcr-Abl ou da glicoproteína P (THOMAS et al, 2004; BARNES & MELO, 2006) podem, eventualmente, ser responsáveis pela evolução clínica desfavorável e pela falha terapêutica. Na verdade, evidências recentes sugerem que a resistência à quimioterapia em pacientes com LMC é um fenômeno heterogêneo, podendo ser intrínseco à doença ou reflexo de um determinado componente genético do próprio paciente. Todas essas especulações e comprovações científicas, em conjunto, demonstram a limitada capacidade do Imatinibe em erradicar os clones Bcr-Abl positivos (KHORASHAD et al, 2006; BARNES & MELO, 2006). Nessa situação, novas pesquisas voltadas para identificar fatores envolvidos com a resistência e sensibilidade às drogas na LMC são necessárias.

Pesquisas realizadas sugerem que altos níveis da proteína anti-apoptótica survivina estão associados com prognóstico desfavorável em diversos tipos de neoplasias (SPAN et al, 2004; RYAN et al, 2006). Além disso, a survivina pode ser considerada como um novo e promissor alvo terapêutico contra o câncer, (MONZO et al, 1999; LU et al, 1988; ADIDA et al, 1998; ISLAM et al, 2000; KAWASAKI et al, 1998; TANAKA et al, 2000).

Até o presente momento, existem somente três trabalhos publicados mostrando a expressão do gene da survivina em pacientes com LMC (BADRAN et al, 2003; CONTE et al, 2005; BOLUDA et al, 2005). Recentemente, foi publicado um artigo descrevendo a relação existente entre a expressão da survivina e Smac/DIABLO em pacientes com carcinoma hepatocelular, sugerindo que a redução dos níveis de Smac/DIABLO poderia estar diretamente relacionada ao aumento da expressão da survivina, redução de apoptose e por consequência, a progressão tumoral (BAO et al, 2006).

Neste trabalho, analisamos pela primeira vez, a expressão gênica e protéica de ambas - survivina e Smac/DIABLO - em pacientes com LMC. Não há informações sobre a relação existente entre a expressão dessas proteínas em pacientes com LMC.

Nossa hipótese de trabalho levou em conta os importantes papéis desempenhados por essas proteínas na via de morte celular. A investigação da participação da Smac/DIABLO e da survivina no curso da LMC poderia eventualmente fornecer informações relevantes sobre um possível padrão de expressão nas diferentes fases clínicas da doença e sobre a evolução clínica. Além disso, poderia apontar a survivina como um potencial marcador preditivo da resposta ao Imatinibe e sinalizar que esta proteína poderia ser um possível alvo terapêutico.

Em nosso trabalho foi possível verificar a expressão dessas proteínas, pela técnica de Western blot, em pacientes com LMC. Entre os 68 pacientes avaliados, 85,3% expressaram survivina e 83,8% expressaram Smac, nas mesmas amostras leucêmicas.

Yoo e colaboradores (2003) demonstraram, por imunohistoquímica, que Smac/DIABLO não estava expressa na maioria dos tecidos comprometidos por diversos tipos de carcinomas (estômago, colorretal, pulmão, ovário e próstata) e sarcomas. Em nosso estudo foi possível observar, através da técnica de Western blot, que a expressão da Smac/DIABLO estava presente na maioria dos pacientes com LMC. Segundo YANG et al (2003), alguns tipos de carcinoma superexpressam tanto proteínas pro-apoptóticas quanto anti-apoptóticas e o aumento da expressão de uma proteína pro-apoptótica seria uma tentativa de equilibrar os estímulos em favor da morte celular. Recentemente foi sugerido que a interação entre Smac/DIABLO e survivina seria essencial para a inibição de apoptose mediada por exposição ao Taxol em células da linhagem HeLa, oriunda de câncer cervical (SONG et al, 2003). Em outro estudo, verificou-se a importância da expressão da Smac/DIABLO na indução de apoptose em linhagem celular de câncer de ovário. A participação da survivina no mecanismo

de resistência à apoptose, nesse caso, não protegeu a célula dos efeitos proapoptóticos da Smac/DIABLO (McNEISH et al, 2005). Song e colaboradores (2003) propuseram um mecanismo pelo qual a survivina estaria inibindo a apoptose. Sugeriram que a survivina se ligaria a Smac/DIABLO, reduzindo a inibição da XIAP pela Smac, possibilitando, então à XIAP interagir com as caspases, bloqueando a apoptose. Dessa forma, a survivina teria uma atividade dependente da via mitocondrial. XIAP é uma proteína citosólica antiapoptótica amplamente expressa, envolvida na inibição da morte celular em resposta a inúmeros estímulos apoptóticos, tais como, irradiação ultravioleta, TNF, Fas-ligante e fármacos citotóxicos (VERHAGEN et al, 2001). A regulação da XIAP através da utilização de oligonucleotídeos antisense em combinação com ARA-C induziram a ativação das caspases e sensibilizaram as células da linhagem HL-60 à morte celular induzida pelo quimioterápico (WRZESIEN-KUS et al, 2004). Pacientes com LMA e menores níveis de XIAP apresentaram sobrevida global significativamente maior. Os níveis de expressão de XIAP também influenciaram nas taxas de remissão completa e recidiva entre pacientes com altos e baixos níveis de XIAP, embora não tenha havido diferenças estatisticamente significativas (SCHIMMER et al, 2004). Por outro lado, Carter et al (2005) não observaram significância prognóstica da expressão de XIAP em pacientes com LMA. Uma variante da proteína Smac/DIABLO, a Smac3, antagoniza a função antiapoptótica da XIAP promovendo a ubiquitinação e degradação desta proteína, de maneira independente da isoforma selvagem. A outra isoforma conhecida, Smac $\beta$ , porém, não tem habilidade de se ligar às IAPs (FU et al, 2003). A inibição da XIAP pela Smac/DIABLO pode ser mimetizada pela utilização de pequenos peptídeos quimicamente sintetizados promovendo a ativação das caspases -3 e -7, induzindo apoptose (GUO et al, 2002).

Os pacientes analisados em nosso trabalho foram agrupados de acordo com algumas características clínicas, com o objetivo de se identificar correlações entre os níveis das

proteínas com estas características.

Em nosso estudo, ao contrário do que foi descrito por Conte e colaboradores (2005) e Boluda e colaboradores (2005), os níveis da survivina não estavam aumentados nos pacientes que estavam nas fases avançadas da LMC (FA e CB) em relação aos pacientes na FC. No entanto, os trabalhos anteriores avaliaram somente a expressão de ARNm. Em nossas amostras, gene e proteína foram analisados. Existem evidências mostrando que mecanismos pós transcricionais regulam a expressão da survivina. Em células leucêmicas, a expressão dessa proteína é regulada por citocinas e agentes que induzem diferenciação. Dados preliminares demonstraram que células da leucemia mielóide aguda, que sobreviveram ao tratamento antisense, para Bcl-2 - uma proteína antiapoptótica - expressaram maiores níveis da survivina. Possivelmente, Bcl-2 e survivina fazem parte de uma via complementar que é regulada pelo ciclo celular em progenitores leucêmicos (CARTER et al, 2001). Uma possível explicação para as diferenças encontradas em nosso estudo e de Conte e colaboradores (2005) e Boluda e colaboradores (2005) seria a presença de mecanismos pós transcricionais regulando a expressão da survivina. Dessa forma, em nosso trabalho, a semelhança encontrada nos níveis de expressão da survivina nas três diferentes fases da LMC poderia ser atribuída a mecanismos tal como *splicing* alternativo dando origem tanto a proteínas antiapoptóticas quanto apoptóticas.

Outra abordagem em nosso trabalho foi verificar a relação existente entre o índice de Sokal e a expressão das proteínas survivina e Smac/DIABLO. O índice de Sokal é um sistema de avaliação, desenvolvido por Sokal na década de 80, que classifica os pacientes com LMC em três grupos de risco (baixo, intermediário e alto) baseados nas características da doença, possibilitando a projeção da duração da sobrevida dos pacientes (SOKAL et al, 1984).

Os níveis de expressão da Smac/DIABLO foram menores nos indivíduos do grupo de

baixo risco que no grupo de alto risco ( $p=0,0334$ ), sugerindo um mecanismo de superexpressão da Smac/DIABLO na tentativa de equilibrar os estímulos diversos de um possível fenótipo desfavorável nas células de pacientes com risco intermediário e alto, já que tal diferença não foi identificada nos indivíduos com perfil de doença menos agressivo. Sabe-se que pacientes com LMC e pior prognóstico são aqueles que frequentemente exibem alterações citogenéticas adicionais e mutações que levariam as células a produzirem uma resposta apoptogênica exacerbada tal como a superexpressão da molécula proapoptótica Smac/DIABLO. Os níveis da survivina entre os dois grupos do índice de Sokal foram semelhantes, o que também pode indicar que apenas a superexpressão da survivina, em relação às células normais, já poderia estar associada à patogênese neoplásica da LMC e que outros fatores poderiam estar colaborando para o fenótipo mais ou menos agressivo da doença.

Os pacientes também foram agrupados de acordo com a existência ou não de tratamento quimioterápico prévio. Observou-se uma tendência de maior expressão da survivina nos pacientes previamente tratados comparados com aqueles não tratados ( $p=0,045$ ). Esses dados reforçam a idéia da existência de um mecanismo de superexpressão da survivina nas fases mais avançadas da doença. A tendência de aumento da expressão da survivina nos pacientes que receberam algum tipo de tratamento quimioterápico sugere que essa proteína possa estar diretamente envolvida nos mecanismos de quimiorresistência. Esse achado não foi demonstrado anteriormente por Conte e colaboradores (2005) e Boluda e colaboradores (2005), pois esses autores avaliaram somente a expressão da survivina em pacientes previamente tratados.

Em nosso trabalho, também analisamos a expressão dos genes da *survivina* e da *Smac/DIABLO* em um grupo de pacientes com LMC. Foi observada uma dissociação entre expressão gênica e protéica. Isso pode ser explicado pela presença de variantes de splicing

para ambos os genes. A discrepância observada entre o nosso trabalho e o desses autores pode ser devida ao fato de que esses autores analisaram um maior número de pacientes em crise blástica. Em contraste com o que foi descrito anteriormente, não detectamos a expressão de *survivina* em indivíduos saudáveis. Os trabalhos onde a expressão de *survivina* detectaram níveis de expressão muito baixos, não detectados por nós nas mesmas condições. Experimentos adicionais são necessários para elucidar tais diferenças. A maioria dos nossos pacientes apresentou níveis da *Smac/DIABLO* mais elevados que a média dos indivíduos saudáveis, embora não tenha sido possível verificar a significância estatística devido ao diminuto número de pacientes analisados.

Não há dados na literatura relatando resultados da expressão da *Smac/DIABLO* em LMC. Contudo, foi descrito recentemente que em carcinoma renal os baixos níveis da *Smac/DIABLO* estão associados com um pior prognóstico (MIZUTANI et al, 2005). Em linfomas não-Hodgkin foi descrita a expressão heterogênea da *Smac/DIABLO*, sugerindo que os mecanismos de morte celular programada podem estar envolvidos de maneira diferente na patogênese dessa doença (REN et al, 2006).

Alguns trabalhos têm demonstrado a relevância prognóstica da expressão da *Smac/DIABLO*. Em células escamosas cervicais de pacientes a expressão dessa proteína sugeriu um possível papel como marcador para recorrência da doença, uma vez que foi significativamente correlacionada com os marcadores de angiogênese (ARELLANO-LLAMAS et al, 2006). Além disso, foi verificado que o prognóstico de pacientes com câncer de pulmão que exibiam baixos níveis de ARNm da *Smac/DIABLO*, foi desfavorável (SEKIMURA et al, 2004). Em nosso estudo, até o presente momento, não foi possível efetuarmos estudos de prognóstico.

Outro aspecto analisado em nosso trabalho foi o perfil de expressão da *survivina* e *Smac/DIABLO* mediante a exposição a quimioterápicos. Para tal, foram feitos ensaios de



citotoxicidade e da expressão protéica utilizando uma linhagem celular estabelecida de LMC em CB (K562). Como relatado anteriormente, Imatinibe é um agente antileucêmico que tem como alvo específico a proteína quimérica Bcr-Abl, apontada como responsável principal pela patogênese da LMC. Diversos fármacos têm sido utilizados em conjunto com o Imatinibe com o intuito de se evitar e combater a resistência à quimioterapia, através da redução do número de clones malignos. Em nosso trabalho escolhemos o ARA-C para testar o possível aumento da citotoxicidade e o possível reflexo desse efeito na alteração da expressão das proteínas Smac/DIABLO e survivina. Os resultados na literatura têm sido controversos com respeito ao efeito final da exposição simultânea aos dois quimioterápicos (Imatinibe e ARA-C) na LMC pelo método de MTT. Há relatos demonstrando um efeito sinérgico e um efeito aditivo entre os dois fármacos (THIESING et al, 1999; KANO et al, 2001). Em nosso trabalho, verificamos que o Imatinibe foi capaz de induzir redução da viabilidade celular tempo-, mas não dose-dependente pelo método do MTT, por outro lado, não encontramos efeito sinérgico nem aditivo quando Imatinibe e ARA-C foram associados. As divergências entre os achados podem ser atribuídas a diferentes condições experimentais e métodos analíticos.

A análise da indução de apoptose através do método da Anexina V em citometria de fluxo, mostrou um efeito aditivo nas células incubadas com Imatinibe 1 $\mu$ M e ARA-C. Entretanto, quando as células foram incubadas com Imatinibe 5  $\mu$ M e ARA-C, em associação, não foi verificada citotoxicidade farmacologicamente aditiva. Esses dados sugerem que a administração simultânea de Imatinibe, em menores concentrações, e ARA-C pode ser favorável à citotoxicidade das células da LMC.

Observamos que Imatinibe induziu a redução da expressão da survivina, confirmando os dados de um trabalho recente onde a expressão da survivina foi inibida pelo Imatinibe em células Bcr-Abl positivas (CARTER et al, 2006). O fármaco ARA-C também

induziu a inibição da expressão da survivina, embora, quando associado ao Imatinibe, tenha induzido o aumento da expressão dessa proteína nas células tratadas.

Imatinibe, isoladamente e em associação com ARA-C, foi capaz de induzir o aumento na expressão da proteína Smac/DIABLO, embora tenha sido observado que ARA-C isoladamente induziu a diminuição dessa proteína nas células da linhagem K562. Esses resultados estão de acordo com trabalhos na literatura que demonstraram o aumento da liberação de Smac/DIABLO no citosol em consequência da presença de Imatinibe em células Bcr-Abl positivas, fato que não ocorreu em outras células leucêmicas Bcr-Abl negativas (YU et al, 2003; YU et al, 2002).

As combinações de quimioterápicos interferem de maneira direta na resposta que a célula dá ao estímulo citotóxico. Em nosso estudo, a combinação dos quimioterápicos alterou, claramente, o perfil de expressão das proteínas estudadas. Não se sabe se a redução da expressão das proteínas foi devido a mecanismos transcricionais ou pós-transcricionais. Uma possível explicação seria a de que os fármacos estariam induzindo uma sinalização celular que suprimiria a expressão dos genes, por exemplo via p53 (MIRZA et al, 2002) e NF $\kappa$ B, que poderiam estar associados à superexpressão das IAPs (NACHMIAS et al, 2004).

Há diversos relatos na literatura (NACHMIAS et al, 2004; DUFFY et al, 2007; SHARIAT et al, 2004; ADIDA et al, 1998; MONZO et al, 1999; RODEL et al, 2005; ADIDA et al, 2000; SARELA et al, 2000; KAPPLER et al 2001; CHAKRAVARTI et al, 2002; SPAN et al, 2004; RYAN et al, 2006) sugerindo que a survivina tem um papel importante como marcador prognóstico nas neoplasias. Em nosso trabalho, tal aspecto somente poderá ser mostrado, em um futuro próximo, mediante a continuação do seguimento clínico dos pacientes arrolados no presente estudo. Nesta situação, teremos um maior número de pacientes tratados com Imatinibe e com um tempo mais longo de observação o que sem dúvida possibilitará a realização das análises de progressão de doença e da curva de

sobrevida.

Um achado interessante, entretanto, foi o nível mais elevado da Smac/DIABLO nos pacientes que apresentavam alto índice de Sokal. Isso pode ser um indicador da existência de algum mecanismo compensatório que estaria falhando quando as células não respondem à quimioterapia fazendo com que o paciente progrida para as fases mais avançadas acelerada e blástica da LMC.

Diante dos resultados encontrados em nosso estudo, acreditamos ser possível que os níveis da Smac/DIABLO possam ser tão esclarecedores e importantes no estudo da resistência à quimioterapia e da progressão da LMC quanto os níveis da survivina. A interação entre essas duas proteínas poderá, eventualmente, contribuir para a análise de prognóstico nessa doença. A continuação do presente estudo, envolvendo um maior número de pacientes e maior tempo de acompanhamento clínico possibilitará a avaliação simultânea da expressão das duas proteínas como fator prognóstico na LMC.

## **6- CONCLUSÕES**

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho podemos concluir que:

- As proteínas survivina e Smac/DIABLO estão expressas na maioria dos pacientes com LMC.
- A expressão da proteína e do gene da Smac/DIABLO foi observada em todas as amostras de indivíduos saudáveis, ao contrário da survivina, cuja expressão protéica e gênica não foi detectada.
- Em pacientes com LMC não houve correlação entre a expressão das proteínas survivina e Smac/DIABLO.
- Pacientes com o índice de Sokal de baixo risco apresentaram menores níveis de Smac/DIABLO em relação aos pacientes com riscos alto e intermediário.
- A proteína survivina apresentou níveis mais elevados nos pacientes tratados do que nos pacientes que não receberam tratamento prévio.
- Imatinibe induziu a redução da viabilidade celular (MTT) e aumento da morte celular por apoptose (Anexina V) de forma tempo dependente. Porém, quando associado ao ARA-C não causou efeito aditivo quando avaliada a viabilidade celular, mas aumentou a taxa de morte celular de maneira tempo dependente.
- Imatinibe foi capaz de induzir a diminuição da expressão da survivina e o aumento da expressão de Smac/DIABLO na linhagem K562.
- ARA-C foi capaz de induzir a redução da expressão das proteínas survivina e Smac/DIABLO. Por outro lado, quando associado ao Imatinibe, induziu o aumento da expressão da survivina e o aumento de Smac/DIABLO.
- A expressão da survivina e Smac/DIABLO parece ter um importante papel na quimiorresistência à apoptose, embora não tenha sido encontrada correlação significativa entre essas proteínas.

## 7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, S.M., FLORELL, S.R., HANKS, N.A., et al. Survivin expression in mouse skin prevents papilloma regression and promotes chemical-induced tumor progression. *Cancer Research*, v.63, p. 567-572, 2003.
- ADIDA, C., BERREBI, D., PEUCHMAUR, M., et al. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet*, v. 351, p. 882-883, 1998.
- ADIDA, C., RECHER, C., RAFFOUX, E., DANIEL, M.T., TAKSIN, A.L., ROUSSELO, T. P., et al. Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, v. 111, n. 1, p. 196-203, 2000.
- ALLAN, N.C., RICHARDS, S.M., SHEPHERD, P.C.A., et al. Results of the Medical Research Council randomized multi-centre trial of interferon- alfa for chronic myeloid leukaemia: improved survival irrespective of cytogenetic response. *Lancet*, v. 345, p. 1392-1397, 1995.
- ALTIERI, D.C. The molecular basis and potential role of surviving in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol Med*, v. 12, p. 542-547, 2001.
- AMBROSINI, G., ADIDA, C., ALTIERI, D.C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Med*, v. 3, p. 917-921, 1997.
- AMBROSINI, G., ADIDA, C., SIRUGO, G. et al. Induction of apoptosis and inhibition of proliferation by survivin gene targeting. *J Biol. Chem*, v. 273, p. 11177-11182, 1998.
- ARELLANO-LLAMAS, A., GARCIA, F.J., PEREZ, D., et al. High Smac/DIABLO expression is associated with early local recurrence of cervical cancer. *BMC Cancer*, v. 26, n. 6, p. 256, 2006.
- ARLINGHANS, R.B. The involvement of Bcr in leukemias with Philadelphia chromosome. *Crit Rev Oncog*, v. 9, p. 1-18, 1998.
- BACCARANI, M., ROSTI, G., DE VIVO, A., et al. A randomized study of interferon-alpha versus interferon-alpha and low-dose arabinosyl cytosine in chronic myeloid leukemia. *Blood*, v. 99, p. 1527-1535, 2002.
- BADRAN, A., YOSHIDA, A., WANO, Y., IMAMURA, S., KAWAI, Y., TSUTANI, H., et al. Expression of the antiapoptotic gene survivin in chronic myeloid leukemia. *Anticancer Res*, v. 23, n. 1B, p. 589-592, 2003.
- BAO, SHI-TING, GUI, SHUI-QING, LIN, MU-SHENG. Relationship between expression of Smac and Survivin and apoptosis of primary hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, v. 5, p. 580-583, 2006.
- BARNES, D.J., MELO, J.V. Primitive, quiescent and difficult to kill: the role of non-proliferating stem cells in chronic myeloid leukemia. *Cell Cycle*, v. 5, n. 24, p. 2862-6, 2006.
- BENNET, J.H. Case of hypertrophy to the spleen and liver, in wich death took place from suppuration of the blood. *Edinburgh Medical and Surgical Journal*, v. 64, p. 413-423, 1845.

apud WONG, S., WITTE, O.N. The BCR-ABL story: Bench to bedside and back. *Annu. Rev. Immunol.* v. 22, p. 247-306, 2004.

BRANDFORD, S., RUDZKI, Z., WALSH, S., PARKINSON, I., GRIGG, A., SZER, J., et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance and mutations in the ATP phosphate-binding loop are associated with a poor prognosis. *Blood*, v. 102, p. 276-283, 2003.

BRATTON, S.B., MACFARLANE, M., CAIN, K., et al. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res*, v. 256, n. 1, p. 27-33, 2000.

BUDIARDJO, I., OLIVER, H., LUTTER, M., et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, v. 15, p. 269-90, 1999.

CARTER, B.Z., GRONDA, M., WANG, Z., WELSH, K., PINILLA, C., ANDREEFF, M., et al. Small-molecule XIAP inhibitors derepress downstream effector caspases and induce apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Blood*, v. 105, n. 10, p. 4043-50, 2005.

CARTER, B.Z., MAK, D.H., SCHOBBER, W.D., et al. Regulation of survivin expression through Bcr-Abl/MAPK cascade: targeting survivin overcomes imatinib resistance and increases imatinib sensitivity in imatinib-responsive CML cells. *Blood*, v. 107, n. 4, p. 1555-63, 2006.

CARTER, B.Z., MILELLA, M., ALTIERI, D.C., et al. Cytokine-regulated expression of survivin in myeloid leukemia. *Blood*, v. 97, p. 2784-2790, 2001.

CHAI, J., DU, C., WU, J.W., et al. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, v. 406, n. 6798, p. 855-62, 2000.

CHAKRAVARTI, A., NOLL, E., BLACK, P.M., FINKELSTEIN, D.F., FINKELSTEIN, D.M., DYSON, N.J., et al. Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. *Clin Oncol*, v. 20, n. 4, p. 1063-8, 2002.

CONTE, E., STAGNO, F., GUGLIELMO, P., et al. Survivin expression in chronic myeloid leukemia. *Cancer Letters*, v. 225, p. 105-110, 2005.

CRAGIE, D. Case of disease of the spleen, in witch death took place in consequence of the presence of purulent matter in blood. *Edinburgh Medical and Surgical Journal*, v. 64, p. 400-413, 1845. apud WONG, S., WITTE, O.N. The BCR-ABL story: Bench to bedside and back. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 22, p. 247-306, 2004.

CREAGH, E.M., MARTIN, S.J. Caspases: cellular demolition experts. *Biochem. Soc. Trans.* v. 29, n. Pt 6, p. 696-702, 2001.

CROOK, N.E., CLEM, R.J., MILLER, L.K. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger motif. *J. Virol*, v. 67, p. 2168-2174, 1993.

DAI, H., MARBACH, P., LEMAIRE, M., HAYES, M., ELMQUIST, W.F. Distribution of STI-571 to the brain is limited by P-glycoprotein-mediated efflux. *J Pharmacol Exp Ther.*, v. 304, p. 1085-1092, 2003.

- DEININGER, M.W., BOSE, S., GORA-TYBOR, et al. Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing-radiation. *Cancer Research*, v. 58, p. 421-425, 1998.
- DENAULT, J.B., SALVESEN, G.S. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem. Rev.*, v. 103, n. 12, p. 4489-4500, 2002.
- DEUTSCHER, M.P. *Methods in Enzymology. Guide to Protein Purification. Vol 182.* Academic Press, 1990.
- DEVERAUX, Q.L., REED, J.C. IAP family proteins- suppressors of apoptosis. *Genes & Development*, v. 13, p. 239-252, 1999.
- DRUKER, B.J., TAMURA, S., BUCHDUNGER, E., et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*, v. 2, p. 561-566, 1996.
- DU, C., FANG, N., LI, Y., et al. SMAC, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, v.102, p. 33-42, 2000.
- EARNSHAW, W.C., MARTINS, L.M., KAUFMANN, S.H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 68, p. 383-424, 1999.
- EKERT, P.G., SILKE, J., HAWKINS, C.J., et al. DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed Caspase 9. *The Journal of Cell Biology*, v. 152, n. 3, p. 483-490, 2001.
- FADEEL, B., OREENIUS, S., ZHIVOTOVSKY, B. Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 266, n. 6, p.699-717, 1999b.
- FADERL, S., TAPAZ, M., ESTROV, Z., et al. The biology of chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, v. 341, n. 3, p. 164-172, 1999.
- FADOK, V.A., VOELKER, D.R., CAMPBELL, P.A., et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.*, v. 148, p. 2207-2216, 1992.
- FERRI, K.F., KROEMER, G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol*, v. 3, p. E255-63, 2001.
- FU, J., JIN, Y., AREND, L.J. Smac3, a novel Smac/DIABLO splicing variant, attenuates the stability and apoptosis-inhibiting activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein. *J Biol Chem.*, v. 278, n. 52, p. 52660-72, 2003.
- GAIGER, A., HEEN, T., HORTH, E. et al. Increase of bcr-abl chimeric mRNA expression in tumour cells of patients with chronic myeloid leukemia precedes disease progression. *Blood*, v. 86, p. 2371-2378, 1995.
- GIODINI, A., KALLIO, M.J., WALL, N.R., et al. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Research*, v. 62, p. 2462-2467, 2002.

GLUECKSMANN, A. Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biological Reviews*, v. 26, p. 59-86, 1951. apud LOCKSHIN, R.A., ZAKERI, Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Molecular Cell Biology*, v. 2, p. 545-550, 2001.

GOLDMAN, J.M., GALE, R.P., HOROWITZ, M.M., et al. Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: increased risk of relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med*, p.806-814, 1988.

GRAHAM, S.M., JORGENSEN, H.G., ALLAN, E., PEARSON, C., ALCORN, M.J., RICHMOND, I., HOLYOAKE, T.L. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood*, v.99, p. 319-325, 2002.

GRATWOHL, A., HERMANS, J., GOLDMAN, J.M., et al. Risk assessment for patients with chronic myeloid leukemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Lancet*, v. 352, n. 9134, p. 1087-1092, 1998.

GRATWOHL, A., HERMANS, J., NIEDERWEISER, D., et al. Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: long-term results. *Bone Marrow Transplant*, v. 12, p. 509-516, 1993.

GUO, F., NIMMANAPALLI, R., PARANAWITHANA, S., WITTMAN, S., GRIFFIN, D., BALI, P., et al. Ectopic overexpression of second mitochondria-derived activator of caspases (Smac/DIABLO) or cotreatment with N-terminus of Smac/DIABLO peptide potentiates epothilone B derivative-(BMS 247550) and Apo-2L/TRAIL-induced apoptosis. *Blood*, v. 99, n. 9, p. 3419-26, 2002.

HEHLMANN, R., HEIMPEL, H., HASFORD, J., KOIB, H.J., PRALLE, H., HOSSFELD, D.K., et al. Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood*, v. 84, p. 4064-4077, 1994.

HERNANDEZ-BOLUDA, J.C., BELLOSILLO, B., VELA, M.C., COLOMER, D., ALVAREZ-LARRAN, A., CERVANTES, F. Survivin expression in the progression of chronic myeloid leukemia: a sequential study in 16 patients. *Leuk Lymphoma*, v. 46, n. 5, p. 717-22, 2005.

HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, P.S., et al. Simultaneous amplification and detection of specific ADN sequences. *Biotechnology (N Y)*, v. 10, n. 4, p. 413-7, 1992.

HOLTZ, M.S., FORMAN, S.J., BHATIA, R. Nonproliferating CML CD34+ progenitors are resistant to apoptosis induced by a wide range of proapoptotic stimuli. *Leukemia*, v. 19, n. 6, p. 1034-41, 2005.

HOLYOAKE, T., JIANG, X., EAVES, C., EAVES, A. Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood*, v. 94, n. 6, p. 2056-64, 1999.

HORVITZ, H.R., ELLIS, H.M., STEMBERG, P.W. Programmed cell death in nematode development. *Neurosci. Comment*, v. 1, p. 56-65, 1982. apud VAUX, D.L. Apoptosis timeline. *Cell Death and Differentiation*, v. 9, p. 349-354, 2002.



ILLMER, T., SCHAICH, M., PLATZBECKER, U., et al. P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with Imatinibe mesylate. *Leukemia*, v. 18, p. 401-408, 2004.

INOKUCHI, K. Chronic Myelogenous Leukemia: from molecular biology to clinical aspects and novel targeted therapies. *J. Nippon Med Sch*, v. 73, n. 4, p. 178-192, 2006.

ISLAM, A., KAGEYAMA, H., TAKADA, N., et al. High expression of survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene*, v. 19, p. 617-623, 2000.

KANO, Y., AKUTSU, M., TSUNODA, S., et al. In vitro cytotoxic effects of a tyrosine kinase inhibitor STI571 in combination with commonly used antileukemic agents. *Blood*, v. 97, n. 7, p. 1999-2007, 2001.

KANTARJIAN, H.M., DEISSSEROETH, A., KURZROCK, R. et al. *Blood*, v. 82, p. 691-703, 1993 e The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, v. 330, p. 820-825, 1994.

KANTARJIAN, H.M., GILES, F.J., O'BRIEN, S., et al. Therapeutic choices in younger patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer*, v. 89, p. 1647-1658, 2000.

KANTARJIAN, H.M., KEATING, M.J., ESTEY, E.H. et al. Treatment of advanced stages of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia with interferon-alpha and low-dose cytarabine. *J Clin Oncol*, v. 10, p. 772-778, 1992.

KANTARJIAN, H.M., SAWYERS, C., HOCHHAUS, et al, International STI571 CML Study Group. Hematology and cytogenetic response to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N England J Med*, v. 346, p. 645-652, 2002.

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

KAPPLER, M., KOHLER, T., KAMPF, C., DIESTELKOTTER, P., WURL, P., SCHMITZ, M., et al. Increased survivin transcript levels: an independent negative predictor of survival in soft tissue sarcoma patients. *Int J Cancer*, v. 95, n. 6, p. 360-3, 2001.

KAWASAKI, H., ALTIERI, D.C., LU, C.D., et al. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res*, v. 58, p. 5071-5074, 1998.

KERR, J.F., WILLIE, A.H., CURRIE, A.R., et al. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, v. 26, n. 4, p. 239-57, 1972. apud WONG, S., WITTE, O.N. The BCR-ABL story: Bench to bedside and back. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 22, n. 247-306, 2004.

KHORASHAD, J.S., ANAND, M., MARIN, D., SAWNDERS, S., AL-JABARY, T., IQBAL, A., et al. The presence of a BCR-ABL mutant allele in CML does not always explain clinical resistance to imatinib. *Leukemia*, v. 20, n. 4, p. 658-63, 2006.

KIM, R.B. Transporter and xenobiotic disposition. *Toxicology*, v. 181-182, p. 291-297, 2002.

KISCHKEL, F.C., HELLBARDT, S., BEHRMANN, I., et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the

- receptor. *EMBO J*, v. 14, p. 5579-88, 1995.
- KOEPSSELL, H. Organic cation transporter in intestine, kidney, liver and brain. *Ann Rev Physiol*, v. 60, p. 243-266, 1998.
- KURZROCK, R., KANTARJIAN, H.M., DRUKER, B.J., et al. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med*, v. 138, p. 819-830, 2003.
- LAEMMLI, U.K. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970. apud DEUTSCHER, M.P. *Methods in Enzymology. Guide to Protein Purification. Vol 182.* Academic Press, 1990.
- LEE, M.S., KANTARJIAN, H.M., TALPAZ, M., et al. Detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia following interferon therapy. *Blood*, v. 79, p. 1920-1923, 1992.
- LEIST, M., JAATTELA, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell.*, v. 2, n. 8, p. 589-98, 2001.
- LI, P., NIJHAWAN, D., BUDIARDJO, I., et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1 /caspases 9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, v. 91, p. 479-89, 1997.
- LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the  $2^{\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOCKSHIN, R.A., WILLIAMS, C.M. Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmths. *J. Insect Physiol.*, v. 10, p. 643-649, 1964. apud LOCKSHIN, R.A., ZAKERI, Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Molecular Cell Biology*, v. 2, p. 545-550, 2001.
- LOCKSHIN, R.A., ZAKERI, Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Molecular Cell Biology*, v. 2, p. 545-550, 2001.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LOZZIO, B.B., LOZZIO, C.B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, v. 45, n. 3, p. 321-34, 1975.
- LU, C.D., ALTIERI, D.C., TANIGAWA, N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res.*, v. 58, p. 1808-1812, 1998.
- LUGO, T.G., PENDERGAST, A.M., MULLER, A.J., et al. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*, v. 247, p. 1079-82, 1990.
- MAHOTKA, C., LIEBMANN, J., WENZEL, M., et al. Differential subcellular localization of functionally divergent surviving splice variants. *Cell Death Differ*, v. 9, p. 1334-1342, 2002.
- McCLURE, J.S., LITZ, C.E. Chronic myelogenous leukemia: Molecular diagnostic considerations. *Human Pathol*, v. 25, p.594-597, 1994
- McNEISH, I.A., LOPES, R., BELL, S.J., et al. Survivin interacts with Smac/DIABLO in

ovarian carcinoma cells but is redundant in Smac-mediated apoptosis. *Experimental Cell Research*, v. 302, p. 69-82, 2005.

MEIER, P., FINCH, A., EVAN, G. Apoptosis in development. *Nature*, v. 407, n. 6805, p. 796-801, 2000.

MIRZA, A., MCGUIRK, M., HOCKENBERRY, T.N., WU, Q., ASHAR, H., BLACK, S., et al. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*, v. 21, n. 17, p.2613-22, 2002.

MIURA, N., ZHU, H., ROTELLO, R., et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 $\beta$ -converting enzyme, a mammalian homologue of the *C. elegans* cell death gene ced-3. *Cell*; v. 75, p. 653-660, 1993.

MIZUTANI, Y., NAKANISHI, H., YAMAMOTO, K., et al. Downregulation of SMAC/DIABLO expression in renal cell carcinoma and its prognostic significance. *Journal of Clinical Oncology*, v. 23, n. 3, p. 448-54, 2005.

MONZO, M., ROSELL, R., FELIP, E., ASTUDILLO, J., SANCHEZ, J.J., MAESTRE, J., et al. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol*, v. 17, n. 7, p. 2100-4, 1999.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Met.*, v. 65, p. 55-63, 1983.

NACHMIAS, B., ASHHAB, Y., BEN-YEHUDA, D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol.*, v. 14, n. 4, p. 231-43, 2004.

NEUMANN, E. Uber myelogene leukemia. *Berliner Klinische Wochenschrift*, v. 15, p. 69-72, 1878 apud INOKUCHI, K. Chronic Myelogenous Leukemia: from molecular biology to clinical aspects and novel targeted therapies. *J. Nippon Med Sch*, v. 73, n. 4, p. 178-192, 2006.

NEWTON, K., STASSER, A. Cell death control in lymphocytes. *Adv Immunol*, v. 76, p. 179-226, 2000.

NOGVA, H.K., LILLEHAUG, D. Detection and quantification of Salmonella in pure cultures using 5'-nuclease polymerase chain reaction. *Int J Food Microbiol*, v. 51, n. 2-3, p. 191-6, 1999.

NOWELL, P.C., HUNGERFORD, D.A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, v.132, p. 1497, 1960. apud WONG, S., WITTE, O.N. The BCR-ABL story: Bench to bedside and back. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 22, p. 247-306, 2004.

O'CONNOR, D.J., LAM, E.W., GRIFFIN, S., et al. Physical and functional interactions between p53 and cell cycle co-operating transcription factors, EsF1 and DP1. *Eur. Mol. Biol. Org. J.*, v. 14, p. 6184-6192, 1995.

O'BRIEN, S.G., GUILHOT, F., LARSON, R.A. et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J*

*Med*, v. 348, p. 994-1004, 2003.

OKADA, H., MAK, T.W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat. Rev. Cancer*, v. 4, p. 592-603, 2004.

OLIVER, L., VALLETTE, M. The role of caspases in cell death and differentiation. *Drug Resistance Updates*, v. 8, n. 3, p. 163-70, 2005.

PARKIN, D.M., WHELAN, S.L., FERALLY, J., et al. Cancer incidence in five continents, Volume VII. IARC Scientific Publication number 143, Lyon, France, 1997 apud REDAELLI, A., BELL, C., CASAGRANDE, J., et al. Clinical and epidemiologic burden of chronic myelogenous leukemia. *Expert. Re. Anticancer Ther.*, v. 4, n. 1, p. 85-96, 2004.

PHILCHENKOV, A., ZAVELEVICH, M., KROCZAK, T., et al. Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities. *Exp Oncol*, v. 26, n. 2, p. 82-97, 2004.

REDAELLI, A., BELL, C., CASAGRANDE, J., et al. Clinical and epidemiologic burden of chronic myelogenous leukemia. *Expert. Re. Anticancer Ther.*, v. 4, n. 1, p. 85-96, 2004.

RICHARDSON, H., KUMAR, S. Death to flies: *Drosophila* as a model system to study programmed cell death. *J. Immunol. Methods*, v. 265, n. 1-2, p. 21-38, 2002.

RIES, L.A.G., EISNER, M.P., KOSARY, C.L., et al. *SEER Cancer Statistics Review, 1973-1999*. National Cancer Institute, MD, USA, 2002 apud REDAELLI, A., BELL, C., CASAGRANDE, J., et al. Clinical and epidemiologic burden of chronic myelogenous leukemia. *Expert. Re. Anticancer Ther.*, v. 4, n. 1, p. 85-96, 2004.

RODEL, F., HOFFMANN, J., GRABENBAUER, G.G., PAPADOPOULOS, T., WEISS, C., GUNTHER, K., et al. High survivin expression is associated with reduced apoptosis in rectal cancer and may predict disease-free survival after preoperative radiochemotherapy and surgical resection. *Strahlenther Onkol.*, v. 178, n. 8, p. 426-35, 2002.

ROWLEY, J.D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature*, v. 243, p. 290-93, 1973 apud KURZROCK, R., KANTARJIAN, H.M., DRUKER, B..J., et al. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med* v. 138, p. 819-830, 2003.

ROY, N., MAHADEVAN, M.S., McLEAN, M., et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell*, v. 80, p. 167-178, 1995.

RYAN, B.M., KONECNY, G., KAHLERT, S., et al. Survivin expression in breast cancer predicts clinical outcome and associated with HER-2, VEGF, urokinase plasminogen activator and PAI-1. *Ann. Oncol.*, v. 52, p. 345-351, 2006.

SAH, N.K., KHAN, Z., KHAN, G.J., et al. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Letters*, 1-8, 2006.

SALVESEN, G.S., DUCKETT, C.S. IAP proteins: blocking the road to death's door.

*Molecular Cell Biology*, v. 3, p. 401-410, 2002.

SARELA, A.I., MACADAM, R.C., FARMERY, S.M., MARKHAM, A.F., GUILLOU, P.J. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut*, v. 46, n. 5, p. 645-50, 2000.

SAWYERS, C.L., HOCHHAUS, A., FELDMAN, E., et al. Imatinibe induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood*, v. 99, p. 3430-3539, 2002.

SAWYERS, C.L. Chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med*, v. 340, n. 17, p. 1330-1340, 1999.

SCHIMMER, A.D. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res.*, v. 64, n. 20, p. 7183-90, 2004.

SEKIMURA, A., KONISHI, A., MIZUNO, K., et al. Expression of Smac/DIABLO is a novel prognostic marker in lung cancer. *Oncol Rep.*, v. 11, n. 4, p. 797-802, 2004.

SHARIAT, S.F., LOTAN, Y., SABOORIAN, H., KHODDAMI, S.M., ROEHRBORN, C.G., SLAWIN, K.M., et al. Survivin expression is associated with features of biologically aggressive prostate carcinoma. *Cancer*, v. 100, n. 4, p. 751-7, 2004.

SHIMMER, A.D., PEDERSON, I.M., KITADA, S., et al. Functional blocks caspase activation pathways are common in leukemia and predict patient response to induction chemotherapy. *Cancer Research*, v. 63, p. 1242-8, 2003.

SILVA, K.L., VASCONCELLOS, D.V., CASTRO, E.D., et al. Apoptotic effect of fludarabine is independent of expression of IAPs in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Apoptosis*, v. 11, n. 2, p. 277-85, 2006.

SILVA, K.L., VASCONCELOS, F.C., MARQUES-SANTOS, L.F. et al. CPT-11-induced cell death in leukemic cells is not affected by the MDR phenotype. *Leuk Res.*, v. 27, n. 3, p. 243-51, 2003.

SIMONSSON, B. On behalf of the ISG. Beneficial effects of cytogenetic and molecular response on long-term outcome in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with imatinib (IM): update from the IRIS Study. *ASH Annual Meeting Abstracts*, v. 106, p. 166a, 2005.

SOKAL, J.E., COX, E.B., BACCARANI, M. Prognostic discrimination in 'good risk' chronic granulocytic leukemia. *Blood*, v. 63, p. 789 – 799, 1984.

SONG, Z., YAO, X., WU, N., et al. Direct interaction between survivin and SMAC/DIABLO is essential for the Anti-apoptotic activity of survivin during Taxol-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 25, 23130-40, 2003.

SPAN, P.N., SWEPP, F.C., WIEGERINCK, E.T., et al. Survivin is an independent prognostic marker for risk stratification of breast cancer patients. *Clin. Chem.*, v. 50, p. 1983-1986, 2004.

SUN, C., NETTESHEIM, D., LIU, Z., et al. Solution Structure of human Survivin and its

binding interface with SMAC/DIABLO. *Biochemistry*, v. 44, p. 11-17, 2005.

TABRIZI, R., MAHON, F.X., CONY MAKHOUL, P., et al. Resistance to daunorubicin-induced apoptosis is not completely reversed in CML blast cells by STI571. *Leukemia*, v. 16, n. 6, p.1154-9, 2002.

TANAKA, K., IWAMOTO, S., GON, G., NOHARA, T., IWAMOTO, M., TANIGAWA, N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.*, v. 6, n. 1, 127-34, 2000.

TAPLAZ, M., SILVER, R.T., DRUKER, B.J. et al. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood*, v. 99, p. 1928-1937, 2002.

THOMAS, D.A., FADERL, S., CORTES, J., O'BRIEN, S., GILES, F.J., KORNBLAU, S.M., et al. Treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia with hyper-CVAD and imatinib mesylate. *Blood*, v. 103, n. 12, p. 4396-407, 2004.

TIKOO, A., O'REILLY, L., DAY, C.L., et al. Tissue distribution of DIABLO/SMAC revealed by monoclonal antibodies. *Cell Death and Differentiation* v. 9, n. 7, p.710-6, 2002.

UREN, A.G., WONG, L., PAKUSCH, M., et al. Survivin and the inner Centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr. Biol.*, v. 10, p. 1319-1328, 2000.

van ENGELAND, M., NIELAND, L.J.W., RAMAEKERS, F.C.S., et al. Annexin V-Affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, v. 31, n. 1, p. 1-9, 1998.

VAUX, D.L., CORY, S., ADAMS, J.M. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, v. 355, p. 440-442, 1988.

VAUX, D.L., SILKE, J. IAPs, RINGs e ubiquitylation. *Molecular Cell Biology*, v. 6, p. 285-297, 2005.

VAUX, D.L., WEISSMAN, I.L., KIM, S.K. Prevention of programmed cell death and *C. elegans* by human. *Science*, v. 258, p. 1955-1957, 1992.

VAUX, D.L. Apoptosis timeline. *Cell Death and Differentiation*, v. 9, p. 349-354, 2002.

VERHAGEN, A., EKERT, P.G., PAKUSCH, M. et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, v. 102, p 43-53, 2000.

VERHAGEN, A.M., COULSON, E.J., VAUX, D.L. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biology*, v. 2, n. 7, 2001.

VERMES, I., HAANEN, C., STEFFNS-NAKKEN, H., et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *J. Immunol. Methods*, v. 184, n. 1, p. 39-51, 1995.

VIRCHOW, R. Weisses Blut. *Froiep's Notizen*, v. 36, p. 151-156, 1845 apud WONG, S.,

WITTE, O.N. The BCR-ABL story: Bench to bedside and back. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 22, p. 247-306, 2004.

WESTBROOK, C.A., HOOBERMANN, A.L., SPINO, C., et al. Clinical significance of the BCR-ABL fusion gene in adult acute lymphoblastic leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study (8762). *Blood*, v. 80, p. 2983-90, 1992.

WHEATLEY, S.P., McNEISH, I.A.. Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis. *International Review of Cytology*, v. 247, p. 35-88, 2005.

WILLIAMS, J.R., LITTLE, J.B., SHIPLEY, W.U.. Association of mammalian cell death with a specific endonucleolytic degradation of ADN. *Nature*, v. 252, p. 754-755, 1974. apud VAUX, D.L.. Apoptosis timeline. *Cell Death and Differentiation*, v. 9, p. 349-354, 2002.

WONG, S., WITTE, O.N. The BCR-ABL story: Bench to bedside and back. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 22, p. 247-306, 2004.

WRZESIEN-KUS, A., SMOLEWSKI, P., SOBCZAK-PLUTA, A., WIERZBOWSKA, A., ROBAK, T. The inhibitor of apoptosis protein family and its antagonists in acute leukemias. *Apoptosis*, v. 9, n. 6, p. 705-15, 2004.

WU, G., CHAI, J., SUBER, T.L., et al. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature*, v. 408, n. 6815, p. 1008-12, 2000.

YANG, L., CAO, Z., YAN, H., et al. Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy. *Cancer Res.*, v. 63, p. 6815-6824, 2003.

YIE, S.M., LUO, B., YE, N.Y., XIE, K., YE, S.R. Detection of Survivin-expressing circulating cancer cells in the peripheral blood of breast cancer patients by a RT-PCR ELISA. *Clin Exp Metastasis*, v.23, n. 5-6, p. 279-89, 2006.

YOFFE, G., BLICK, M., KANTARJIAN, H. et al. Molecular analysis of interferon-induced suppression on Philadelphia chromosome in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*, v. 69, p. 961-963, 1987.

YOO, N.J., KIM, H.S., KIM, S.Y., et al. Immunohistochemical analysis of Smac/DIABLO expression in human carcinomas and sarcomas. *APMIS*, v. 11, p. 382-8, 2003.

YU, C., KRYSTAL, G., DENT, P., GRANT, S. Flavopiridol potentiates STI571-induced mitochondrial damage and apoptosis in BCR-ABL-positive human leukemia cells. *Clin Cancer Res.*, v. 8, n. 9, p. 2976-84, 2002.

YU, C., RAHMANI, M., ALMENARA, J., SUBLER, M., KRYSTAL, G., CONRAD, D., et al. Histone deacetylase inhibitors promote STI571-mediated apoptosis in STI571-sensitive and -resistant Bcr/Abl+ human myeloid leukemia cells. *Cancer Res.*, v. 63, n. 9, p. 2118-26, 2003.

ZAFFARONI, N., PENNATI, M., DAIDONE, M.G.. Survivin as a target for new anticancer interventions. *J. Cell. Mol. Med.*, v. 9, n. 2 p. 360-372, 2005.

ZHENG, L.D., et al. Effects of Smac gene over-expression on the radiotherapeutic sensitivities of cervical cancer cell line HeLa. *Chinese Medical Journal (Engl)*, v. 118, n. 3, p. 226-30, 2005.

ZUZARTE-LUIS, V., HURLE, J.M. Programmed cell death in developing limb. *Int. J. Dev. Biol.*, v. 46, n. 7, p. 871-6, 2002.



## Anexo I

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

É necessário que o Sr. (a) leia atentamente e entenda o estudo antes de assinar este documento. Por isso, se o Sr (a) não entender qualquer palavra ou informação, por favor, peça ao seu médico que explique detalhadamente.

Nome do estudo: Expressão da Survivina e Smac-Diablo na leucemia mielóide crônica.

Investigador principal: Dra. Raquel Ciuvalschi Maia, (Laboratório de Hematologia Celular e Molecular do Serviço de Hematologia do Hospital de Câncer-I-INCA)

Objetivo do estudo:

Apesar dos avanços no tratamento da leucemia mielóide crônica, alguns pacientes não respondem de forma satisfatória ao interferon ou ao Imatinibe.

Nesse estudo laboratorial, gostaríamos de verificar o nível de proteínas denominadas survivina e Smac-Diablo nas células de pacientes com leucemia mielóide crônica. O nível dessas proteínas pode estar relacionado com a resposta ou a resistência ao imatinibe.

O presente estudo também visa contribuir para esclarecer o efeito do imatinibe na expressão dessas proteínas.

Procedimento do estudo:

**Para o estudo dessas proteínas é necessário obter uma pequena quantidade de seu sangue, através de uma punção venosa no braço. Também poderá ser necessário realizar uma punção de medula óssea (mielograma) no esterno ou no osso da bacia após anestesia local. Esses procedimentos são exatamente os mesmos que normalmente são efetuados para se fazer o diagnóstico do tipo da leucemia. Uma pequena parte do material coletado para o diagnóstico da leucemia será aproveitado para o presente estudo não havendo necessidade de coleta de material especificamente para este estudo.**

Riscos:

**O único desconforto que o Sr. (a) poderá sentir será dor e uma equimose (mancha roxa) no local da punção venosa ou de medula óssea.**

Benefícios:

O único benefício da participação do Sr. (a) como doador da amostra de sangue ou de medula óssea, neste estudo, é possibilitar que maiores conhecimentos dos mecanismos envolvidos com a resistência ao tratamento possam auxiliar no futuro a escolha de um tratamento melhor.

É importante que o Sr. (a) saiba que:

- 1- O seu consentimento para participar do estudo é livre e voluntário e não haverá nenhuma forma de pagamento caso dê a sua autorização. Também não haverá custos da parte do Sr (a) para que seja realizado o estudo.
- 2- A participação no estudo é confidencial e a identidade de todos os pacientes será mantida em sigilo. O anonimato das amostras não será irreversível conforme item 2.3 da Resolução CNS no 347/05.
- 3- A participação no estudo é voluntária e o (a) paciente não sofrerá nenhuma penalidade ou mudança no planejamento do seu tratamento, caso não dê sua autorização.
- 4- Caso seja do interesse do (a) paciente, os resultados da presente pesquisa estarão disponibilizados para consulta.
- 5- Esse estudo foi aprovado por um Comitê de Ética em Pesquisa que o considerou ético e seguro, seguindo as exigências da legislação brasileira para realização de estudos clínicos (Portaria 196 de 10/10/96 e 251 de 07/08/97 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde).
- 6- O termo de consentimento livre e esclarecido é um documento em duas vias uma das quais ficará com o (a) paciente e a outra com o investigador principal do projeto.
- 7- Qualquer dúvida poderá ser esclarecida pelo médico responsável pelo estudo: Dra. Raquel C. Maia, no Laboratório de Hematologia Celular e Molecular do Serviço de Hematologia do Hospital do Câncer, telefone; 21 25066198 e com a Dra. Adriana Scheliga do Comitê de Ética em Pesquisa do INCA- Rua André Cavalcanti, 37 telefone: 21 32331410

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Projeto de estudo: Expressão da survivina e Smac/Diablo na leucemia mielóide crônica.**

Ao assinar esse documento, declaro que:

- Fui suficientemente informado pelo pesquisador, ou outro médico por ele designado, sobre o estudo, mas que posso, a qualquer momento, solicitar a ele mais informações;
- Entendo que não receberei nenhuma compensação financeira ou qualquer tipo de doação, pela participação no estudo;

- **Estou ciente que o anonimato das amostras será mantido, mas que, no entanto, os resultados do estudo poderão ser publicados. Tive tempo para ler as informações e decidir se quero ou não participar do estudo;**
- **Minha participação no estudo é totalmente voluntária;**
- **Concordo em participar deste estudo desenvolvido pelo Laboratório de Hematologia Celular e Molecular do Hospital de Câncer-INCA.**

**Nome do paciente.....**

**Assinatura.....Data.....**

**Nome do Pesquisador Principal.....**

**Assinatura.....Data.....**