

MÔNICA ALEXANDRA YON CASTRO

**Expressão de galectina-1 e -3
na Leucemia Mielóide Crônica e
sua contribuição para a
progressão da doença**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Imunologia).

São Paulo

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MÔNICA ALEXANDRA YON CASTRO

**Expressão de galectina-1 e -3
na Leucemia Mielóide Crônica e
sua contribuição para a
progressão da doença**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Imunologia).

Área de concentração: Imunologia

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

São Paulo

2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Castro, Monica Alexandra Yon.

Expressão de galectina-1 e -3 na Leucemia Mielóide Crônica e sua contribuição para a progressão da doença / Monica Alexandra Yon Castro. -- São Paulo, 2009.

Orientador: João Gustavo Pessini Amarante-Mendes.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Biologia dos Tumores.

Versão do título para o inglês: Galectin -1 and -3 expression in chronic Myeloid Leukemia and its contribution to disease progression .

Descritores: 1. Galectina-1 2. BCR-ABL 3. Leucemia mielóide crônica 4. Tirosina quinase 5. Tumorigênese 6. Galectina-3 I. Amarante-Mendes, João Gustavo Pessini II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB083/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Monica Alexandra Yon Castro.

Título da Tese: Expressão de galectina-1 e -3 na Leucemia Mielóide Crônica e sua contribuição para a progressão da doença.

Orientador(a): João Gustavo Pessini Amarante Mendes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Certificado da Comissão de Ética em Experimentação Animal



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **98** nas fls. **61** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de João Gustavo Pessini Amarante-Mendes, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Papel da galectina-1 na leucemia mielóide crônica**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Mônica Alexandra Yon Castro, Claudia Pantaleão**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **19.11.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 24 de novembro de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

Parecer da Comissão de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 25 de agosto de 2008.

PARECER 854/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos* do ICB, em sua 87ª reunião realizada em 25.08.08, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Expressão das galectinas 1 e 3 e suas consequências biológicas na Leucemia Mielóide Crônica*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**, condicionada ao registro das coleções de amostras envolvida neste projeto, conforme Resolução 347/05, cópia anexo.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **25 de agosto de 2009**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma. Sra.
MÔNICA ALEXANDRA YON CASTRO
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 38130900 - telefax: (55) (011) 3818-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

Decl. CEP SH. 047.09

D E C L A R A Ç Ã O

Em adendo ao parecer 854/CEP, de 25.08.08, informo que o título do Projeto foi alterado para "*Leucemia Mielóide Crônica e sua contribuição para a progressão da doença*" não apresentando restrições quanto às modificações do projeto, que as mesmas não afetam os aspectos éticos da pesquisa.

São Paulo, 06 de maio de 2009.

Prof. Dr. PAOLO M.A. ZANOTTO
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

*Aos meus pais e ao Sammy
pela dedicação, incentivo e
apoio constante*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Gustavo Amarante-Mendes pela oportunidade de fazer parte de um grupo de pesquisa de excelente qualidade nos últimos oito anos. Por me mostrar que, mesmo quando o objetivo parece inatingível, vale a pena acreditar que é possível. Por sua generosidade. Por todas as empolgantes discussões científicas e filosóficas. Principalmente, pelo carinho e amizade.

A Prof. Dra. Fabíola Attié de Castro, informalmente, minha co-orientadora. Por toda a ajuda nos experimentos, desenvolvimento e discussão desta tese. Pela amizade e grande carinho!

Aos médicos, Dr. Nelson Hamerschlag, Dra. Zanichelli e Dra. Collassanti, por colaborarem com a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Scott Lowe, por me receber em seu laboratório e colocar a disposição todos os recursos materiais e intelectuais necessários para fazer do período em que estive lá, sem dúvida, o mais cansativo! Mas também, o mais frutífero que eu poderia ter! Em pouco tempo, por sua simplicidade, conquistou minha admiração e respeito.

A Mila, na época esposa de Scott e gerente do laboratório. Não era somente o braço direito do Scott, era a grande mãe do laboratório. Sempre atenta ao bem estar dos alunos e funcionários do laboratório. No final, uma grande amiga...

Ao Prof. Dr. Marcelo Dias-Baruffi pela ajuda com a metodologia para detecção de galectina-1 no plasma dos pacientes e discussões científicas empolgantes sobre as galectinas.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas, por disponibilizar reagentes e por deixar as portas sempre abertas para discussões científicas, principalmente na elaboração dos projetos.

A Prof. Dra. Thelma Zhorn pela grande ajuda com os experimentos de microscopia eletrônica.

A minha banca de qualificação, Dr. Niels Olsen Saraiva, Dr. Alexandre Marzagão Barbutto e Dr. José M. Álvarez pelas críticas e sugestões construtivas que enriqueceram este trabalho.

Aos técnicos Áurea, Marilú e Danilo, cujo trabalho foi fundamental para o bom andamento e organização do laboratório.

As minhas amigas de laboratório de longa data, Ana, Clau e Jackie, por me ajudarem na elaboração dos experimentos e discussão dos dados. Pela amizade sincera que cultivaremos

fora do laboratório. Felizmente, com a Ana, já encontramos a Make-A-Wish Brasil para nos unir novamente!!! Com a Clau, o trabalho?!

Aos amigos do laboratório que permanecem, Julia, Maíra, Maria Emilia, Lu Medina, Lu Concep, Débora, Daniel, Ricardo e Welbert. Aos que já saíram: Janine, Gabi Bru, Gabi Vaccarezza e Axel. Pela amizade, companheirismo e carinho que tornaram o ambiente de trabalho tão divertido e especial!

Aos amigos do Lowe Lab, Valery, Ross, Christof, Magda, Prem, Uli, Cornelius, Claudio Wen, Lars, Katie, Amy, Bei, Johannes, Darren, Zhen, Mona, Yu-Chen. Especialmente aos amigos do Latin Corner, Agustín (El Salvador) , Sabrina (Argentina) e Camile (Brasil). Graças a eles, o laboratório é considerado o mais produtivo e o mais festeiro de todo o Instituto!

Aos meus pais, Mario e Marolga, e aos meus irmãos Andrés e Ximena, apesar de longe fisicamente estiveram sempre presente, apoiando, incentivando e vibrando com todas as minhas conquistas.

Ao Sammy, por compreender os momentos de ausência em prol da minha formação, pela grande ajuda na elaboração da tese. Pelos anos de cumplicidade, companheirismo e amor.

Ao meu “abuelito”, que aos 103 anos, nos deixa uma lição de amor a vida. Não é a toa que é tão querido por todos que o conhecem!

A família do Sammy, Sr. Sergio, Dona Christina, Serginho, Ju, Henrique, Paula, Chris, André e os queridos sobrinhos Enzo, Luis Henrique, Isabella e Marina pelo imenso carinho e apoio em todos os momentos.

As lorpas de coração, Andy, Bruna, Glin, Laura, Maia, Paula, e Rê Faria, unidas por uma grande amizade! Em especial ao trio Lu, Clau e Rê Moretti que me apoiou quando mais precisei. E, além disso, à Rê Moretti, com quem estabeleci uma central de redação de teses que funcionou inclusive na virada do ano!! Quem disse que Reveillon fazendo tese não pode ser divertido?!

Aos mais novos amigos e voluntários da Make-A-Wish Brasil, Rê, Rô, Fábio e Lêda por me mostrarem “o poder do desejo” na vida das crianças que precisam voltar a aprender a sonhar...

Aos amigos do Lycée Pasteur, pelos de 20 anos de amizade!! Ana, Anne-Sophie, Bertrand (Coca), Céline, Gaël, Isadora, Ivan, Jérôme, Paul, Philippe e Sophie. Espero que vocês continuem fazendo parte da minha vida, nos próximos 20 anos!!

Aos dedicados funcionários da secretaria, em especial ao Amarildo, pela ajuda com a parte burocrática da tese.

Aos funcionários da portaria e segurança do departamento de Imunologia. Especialmente ao Otacílio e Milton, independentemente do dia, da hora, sempre cordiais e bem humorados!

Aos pacientes, por acreditarem na importância deste trabalho.

A todos os amigos que não foram citados, mas que contribuíram direta ou indiretamente, para a elaboração desta tese.

“We learn more by looking for the answer to a question and
not finding it than we do from finding the answer itself”

Lloyd Alexander

Resumo

YON, M. A. C. **Expressão de galectina-1 e -3 na Leucemia Mielóide Crônica e sua contribuição para a progressão da doença.** 2009. 222 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

As galectinas são proteínas solúveis que se ligam a beta-galactosídeos. A expressão alterada de galectina-1 e galectina-3 foi relatada em diferentes tumores, sendo associada, em alguns casos, à aquisição de potencial metastático. Estas proteínas exibem uma variedade de efeitos intra e extracelulares que modulam alguns processos fisiológicos envolvidos na tumorigênese. Dentre eles, adesão, proliferação, migração celular e escape tumoral. No entanto, a expressão destas lectinas e sua contribuição na progressão da leucemia mielóide crônica (LMC) é desconhecida. No presente trabalho, verificamos que a expressão ectópica de BCR-ABL, resultou em aumento de galectina-1, mas não de galectina-3. Além disso, linhagens com atividade tirosina-quinase reduzida pelo mesilato de imatinibe ou expressão de mutante de BCR-ABL quinase deficiente exibiram diminuição nos níveis de galectina-1. Por outro lado, em pacientes com LMC, a maior expressão de galectina-1 foi correlacionada a altos níveis de BCR-ABL, progressão da doença e a um tempo de sobrevida menor. Adicionalmente, as células K562 com galectina-1 inibida por RNA de interferência exibiram crescimento mais lento do que as células K562 com galectina-1 intacta, em camundongos “nude”. Em conjunto, nossos dados indicam claramente que somente a galectina-1 é modulada pela atividade tirosina-quinase de BCR-ABL. Ademais, o pior prognóstico de pacientes com altos níveis de galectina-1 sugere um efeito cooperativo de galectina-1 na tumorigênese de BCR-ABL. Isto reforça o conceito de que a galectina-1 é um forte candidato para intervenção terapêutica na LMC.

Palavras-chave: Leucemia mielóide crônica. Galectina-1. Galectina-3. BCR-ABL. Tirosina-quinase. Pacientes. Tumorigênese.

Abstract

YON, M. A. C. **Expression of galectin-1 and -3 in Chronic Myeloid Leukemia and its contribution to disease progression.** 2009. 222 f. PhD thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Galectins are soluble beta-galactoside binding proteins. Altered expression has been reported in different tumors and, in some cases this expression was associated to the acquisition of metastatic potential. Galectins have different intra and extracellular effects that modulate some physiological processes involved in tumorigenesis, including cellular adhesion, proliferation, migration and immune escape. However, its expression and contribution to chronic myeloid leukemia (CML) progression is unknown. We verified herein, that BCR-ABL ectopic expression resulted in higher galectin-1 but not galectin-3 levels. Moreover, cell lines with diminished tyrosine-kinase activity by imatinib mesylate or kinase-deficient BCR-ABL expression showed a reduction in galectin-1 expression. On the other hand, in CML patients, elevated expression of galectin-1 was correlated with high BCR-ABL levels, disease progression and shorter survival time. Additionally, in nude mice, galectin-1-deficient K562 cells obtained by RNA interference were less efficient in tumor formation than control K562 cells. Altogether, our data clearly show that only galectin-1 is BCR-ABL tyrosine-kinase dependent. Also, worst prognosis in patients bearing high galectin-1 levels suggest a cooperative role for galectin-1 in BCR-ABL-positive leukemia and support the concept that galectin-1 is a strong candidate for CML therapeutic intervention.

Key words: Chronic Myeloid Leukemia. Galectin-1. Galectin-3. BCR-ABL. Tyrosine-kinase. Patients. Tumorigenesis.

Lista de Ilustrações

Figura 1- Esquema da translocação que dá origem ao cromossomo Philadelphia.....	29
Figura 2. Esquema do mecanismo de ação do mesilato de imatinibe.	35
Figura 3 - Esquema da estrutura da proteína BCR.....	40
Figura 4 - Esquema da estrutura das proteínas c-Src, c-ABL e BCR-ABL.”.....	42
Figura 5 - Esquema dos pontos de quebra nos genes <i>ABL</i> e <i>BCR</i> e RNAm derivado da fusão desses dois genes.	44
Figura 6-Tipos de estrutura das galectinas e formação de redes entre galectinas e carboidratos multivalentes.	57
Figura 7-Vetor vazio pMLP.	82
Figura 8- Páginas acessadas do RNAi Central.	89
Figura 9 – Via de RNA de interferência (RNAi).	93
Figura 10 - Esquema de inoculação das células tumorais K562.MLP e K562.shLGALS1.	95
Figura 11-Expressão relativa de <i>LGALS1</i> e <i>LGALS3</i> nas linhagens BCR-ABL ⁻ e BCR-ABL ⁺ derivadas de pacientes com leucemia.	100
Figura 12- Expressão protéica de galectina-1 e -3 nas linhagens BCR-ABL ⁻ e BCR-ABL ⁺	101
Figura 13-Galectina-1 em HL-60 e Jurkat com expressão ectópica de <i>BCR-ABL</i>	102
Figura 14. Galectina-1 em células com expressão condicional de <i>BCR-ABL</i>	103
Figura 15-Galectina-1 em células HL-60 e HL-60.BCR-ABL tratadas com mesilato de imatinibe...	104
Figura 16- Galectina-1 nas linhagens BCR-ABL ⁻ e BCR-ABL ⁺ tratadas com mesilato de imatinibe.	105
Figura 17-Galectina-1 em células com atividade tirosina-quinase deficiente.	106
Figura 18- <i>BCR-ABL</i> nos pacientes com LMC.	107
Figura 19- <i>BCR-ABL</i> nas diferentes fases da LMC e nos pacientes resistentes ou com remissão citogenética complete após tratamento com mesilato de imatinibe.	108
Figura 20- <i>LGALS3</i> nos pacientes com LMC.	109
Figura 21-Galectina-3 nas diferentes fases da LMC e em pacientes que responderam ou não ao tratamento com mesilato de imatinibe.....	110
Figura 22-Associação entre <i>LGALS3</i> e <i>BCR-ABL</i> nos pacientes com LMC.....	111

Figura 23- Ggalectina-1 nos pacientes com LMC.....	112
Figura 24-Galectina-1 nas diferentes fases da LMC e em pacientes que responderam ou não ao tratamento com mesilato de imatinibe.....	113
Figura 25-Associação entre <i>LGALS1</i> e <i>BCR-ABL</i> nos pacientes com LMC.....	114
Figura 26-Associação entre a expressão de galectina-1 e o índice de Sokal nos pacientes na fase crônica da LMC.....	114
Figura 27-Associação entre <i>LGALS1</i> e parâmetros clínico-laboratoriais.....	115
Figura 28- ELISA de amostras de pacientes com LMC. O.....	116
Figura 29 Galectina-1 e sobrevida dos pacientes na fase avançada da LMC.....	118
Figura 30 - Silenciamento da expressão gênica de galectina-1.....	120
Figura 31 - Efeito do silenciamento de <i>LGALS1</i> na tumorigênese <i>in vivo</i> de células K562.....	121
Figura 32 - Curva de proliferação das células K562 deficientes em galectina-1.	122

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Aspectos clínicos e hematológicos da LMC na fase crônica.	31
Tabela 2 - Comparação das três classificações da LMC na fase acelerada.	32
Tabela 3. Comparação entre os novos inibidores de tirosina-quinase de c-ABL.....	38
Tabela 4. Critérios de resposta ao tratamento com inibidores de tirosina-quinase na LMC definidos pelo IRIS.	39
Tabela 5- Critério para classificação da fase crônica da doença	76
Tabela 6- Número de pacientes cujas amostras foram coletadas em mais de uma fase.....	77
Tabela 7-Análise descritiva do sexo e idade dos pacientes portadores da LMC e indivíduos saudáveis utilizados como controle.	78
Tabela 8- Descrição das características clínico-laboratoriais ao diagnóstico dos pacientes com LMC.....	78
Tabela 9 - Cálculo dos percentis 25% e 75% nos diferentes grupos de pacientes.	117
Tabela 10 - Critério de definição das classes “Baixa”, “Média” e “Alta” de acordo com a expressão de galectina-1 nos pacientes da fase avançada e número de pacientes incluídos em cada classe.	118

Lista de Abreviaturas e Siglas

μ -BCR - “micro breakpoint cluster”
ABL - "Abelson Leukemia"
ANVISA - Agência de Vigilância Sanitária
Apaf-1 – “apoptotic protease activating factor 1”
Ara C - Citarabina
ATP – adenosina trifosfato
BCL-2 - “B-cell-lymphoma 2”
BCR - "Breakpoint Cluster Region"
cAMP – adenosina monofosfato cíclico
CDS – “CoDing Sequence”
CRD - domínio de reconhecimento a carboidratos
CSHL –Cold Spring Harbor Laboratory
CTL – “Cytotoxic T lymphocyte” (Linfócito T citotóxico)
Der9 - deleção na região do cromossomo 9
Diablo – “Direct IAP binding protein with low pI”
DMEM – “Dulbecco’s Modified Eagle’s Médium”
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DO - densidade óptica
E.U.A - Estados Unidos da América
EC- Evolução Clonal
EDTA – “Ácido etileno-diaminotetracético
EGFP – “enhanced green fluorescent protein”
FA - fase acelerada
FAK - quinase de adesão focal
FAV - fase Avançada
FB - fase blástica
FC – fase crônica
GEF - fator de troca de nucleotídeos de guanina
GTP – guanosina trifosfato
Hb – Hemoglobina
HIAE - Hospital Israelita Albert Einstein
HLIF - “human leucocyte interferon”
hOCT-1 - “human organic cation transporter-1”

IAP - proteínas inibidoras de apoptose
IBMTR- “International Bone Marrow Transplant Registry”
ICSBP - “interferon consensus sequence-binding protein”
IFN - interferon
IL – interleucina
IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
IRES – “internal ribosome entry site”
IRIS – “International Randomized study of Interferon and STI571”
IRS-1 - substrato 1 do receptor de insulina
JAK - janus quinase
LB - Luria-Bertani Broth
LLA - leucemia linfóide aguda
LMC - Leucemia Mielóide Crônica
LNC -leucemia neutrofílica crônica
LTR - “Long Terminal Repeats”
MAPK - quinase ativada por mitógenos
m-BCR - “minor breakpoint cluster”
M-BCR - “Major breakpoint cluster region”
MDACC - “M. D. Anderson Cancer Center”
MEC - matriz extracelular
MI - -mesilato de imatinibe
M-MuLV - vírus da leucemia murina de Moloney
MO – medula óssea
MSCV - “Murine Stem Cell Vírus”
NA- Não se aplica
NK –“Natural Killer”
OMS - Organização Mundial da Saúde
PBS – “phosphate buffer saline”
PCR – “polimerase chain reaction”
Ph - Philadelphia
PI - iodeto de propídeo
PI-3K - fosfatidilinositol 3-quinase
pTyr -fosfotirosina
RCC - resposta citogenética completa
RHC - resposta hematológica completa

R-MI - Resistentes ao Mesilato de Imatinibe
RNA – Ácido ribonucléico
RNAi -RNA de interferência
RISC - “RNA-induced silencing protein complex”
RT-qPCR – PCR quantitativo em tempo real
SAS - Secretaria de Atenção à Saúde
SC - subcutânea
SH domínio de homologia de SRC
shRNA - “short hairpin RNA”
shRNAmiR – shRNA microRNA
SOB – “Super Optimal Broth”
SOS - “son of sevenless”
SRC – sarc
STAT - fatores de transcrição ativados pela transdução de sinais
SUS – Sistema Único de Saúde
TA – temperatura ambiente
TAE – tampão tris-acetato-EDTA
TCR - receptor de linfócito T
TE – Tris-EDTA
TK - tirosina-quinase
TMO - transplante de medula óssea
TNF - “Tumor Necrosis Factor”
XPB - Xeroderma pigmentosa B

Sumário

1 Introdução.....	28
1.1 Leucemia mielóide crônica	28
1.1.1 Fases da leucemia mielóide crônica	29
<i>1.1.1.1 Fase crônica.....</i>	<i>30</i>
<i>1.1.1.2 Fase acelerada</i>	<i>31</i>
<i>1.1.1.3 Fase blástica.....</i>	<i>33</i>
1.1.2 Tratamentos da Leucemia Mielóide Crônica	34
<i>1.1.2.1 Interferon-alfa</i>	<i>34</i>
<i>1.1.2.2 Mesilato de Imatinibe</i>	<i>35</i>
<i>1.1.2.3 Novas drogas</i>	<i>38</i>
1.1.3 Resposta ao tratamento.....	39
1.2 BCR-ABL	39
1.2.1 BCR.....	40
1.2.2 c-ABL	41
1.2.3 BCR-ABL.....	43
1.2.4 Regulação da atividade quinase	44
1.2.5 Propriedades biológicas alteradas por BCR-ABL	45
<i>1.2.5.1 Adesão celular.....</i>	<i>46</i>
<i>1.2.5.2 Proliferação.....</i>	<i>47</i>
<i>1.2.5.2.1 Via de RAS/MAPK.....</i>	<i>47</i>
<i>1.2.5.2.2 Via de PI3-K</i>	<i>49</i>
<i>1.2.5.2.3 Via de JAK/STAT.....</i>	<i>50</i>
<i>1.2.5.2.4 Via de MYC.....</i>	<i>51</i>
<i>1.2.5.3 Apoptose</i>	<i>51</i>
1.3 Galectinas	56
1.3.1 Galectina-1 e câncer	58
<i>1.3.1.1 Transformação, proliferação e apoptose.....</i>	<i>60</i>
<i>1.3.1.2 Adesão.....</i>	<i>61</i>
<i>1.3.1.3 Invasão</i>	<i>62</i>
<i>1.3.1.4 Angiogênese</i>	<i>63</i>
<i>1.3.1.5 Escape do sistema imune.....</i>	<i>63</i>
1.3.2 Galectina-3 e câncer	66
<i>1.3.2.1 Transformação, proliferação e apoptose.....</i>	<i>67</i>
<i>1.3.2.2 Adesão, invasão, angiogênese e escape tumoral.....</i>	<i>69</i>
1.4 Considerações Finais	70
2 Objetivos.....	72

3 Casuística, Materiais e Métodos	75
3.1 Sujeitos de Pesquisa.....	75
3.1.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos	75
3.1.2 Critérios de Inclusão e Exclusão dos sujeitos de pesquisa no estudo	75
3.1.3 Critérios para Classificação das Fases da LMC	76
3.1.4 Critérios de definição de resposta ao tratamento	77
3.1.5 Características clínico-laboratoriais e demográficas dos pacientes com LMC	77
3.1.6 Índice de Sokal	79
3.1.7 Construção da curva de sobrevida global.....	79
3.2 Linhagens celulares	80
3.3 Vetor	81
3.4 Camundongos.....	82
3.5 Cultivo Celular.....	83
3.6 Coleta e isolamento de células mononucleares de sangue periférico	83
3.7 Extração de RNA.....	84
3.8 Quantificação de DNA e RNA	84
3.9 Síntese de cDNA.....	85
3.10 PCR em tempo real.....	85
3.11 “SDS PAGE” e “Western Blot”	86
3.12 Quantificação de proteínas	86
3.13 Tratamento com doxíciclina	87
3.14 Tratamento das linhagens celulares com STI571	87
3.15 Dosagem da concentração de galectina-1 por ELISA	87
3.16 Obtenção dos plasmídeos contendo shRNA	88
3.16.1 Desenho do shRNA	88
3.16.2 Anelamento dos oligonucleotídeos.....	90
3.16.3 Digestão enzimática	90
3.16.4 Ligação	91
3.16.5 Preparo de bactérias competentes	91
3.16.6 Transformação bacteriana	92
3.16.7 Purificação de DNA plasmidial.....	92
3.16.8 Eletroforese de DNA.....	93
3.17 Silenciamento da expressão gênica por RNA de interferência.....	93
3.17.1 Transfecção.....	94
3.17.2 Infecção retroviral	94
3.17.3 Seleção com antibiótico	95
3.17.4 Detecção de células EGFP+ por microscopia de fluorescência	95
3.18 Inoculação subcutânea (sc) dos camundongos.....	95

3.19 Captura de imagens digitais	96
3.20 Análise do crescimento de células tumorais in vivo.....	96
3.21 Ensaio de Proliferação Celular.....	96
3.22 Determinação da viabilidade celular por exclusão de azul de tripan	97
3.23 Determinação da apoptose por fragmentação de DNA.....	97
3.24 Análise estatística.....	97
4 Resultados	100
4.1 Expressão de galectina-1 e -3 em linhagens.....	100
4.1.1 Expressão de galectina-1 e -3 em linhagens BCR-ABL+ e BCR-ABL-	100
4.1.2 Galectina-1 em células com expressão condicional de BCR-ABL	101
4.1.3 Participação da atividade tirosina-quinase de BCR-ABL na expressão de galectina-1	103
4.2 Expressão em pacientes com LMC	106
4.2.1 Expressão de BCR-ABL nos pacientes com LMC	106
4.2.2 Expressão de BCR-ABL nos diferentes grupos de pacientes com LMC.....	107
4.2.3 Expressão de <i>LGALS3</i> nos pacientes com LMC	108
4.2.4 Expressão de <i>LGALS3</i> nos diferentes grupos de pacientes com LMC	109
4.2.5 Correlação entre <i>BCR-ABL</i> e <i>LGALS3</i> nos pacientes com LMC.....	111
4.2.6 Expressão de galectina-1 nos pacientes com LMC	111
4.2.7 Expressão de galectina-1 nos diferentes grupos de pacientes com LMC	112
4.2.8 Correlação entre <i>LGALS1</i> e <i>BCR-ABL</i>	113
4.2.9 Correlação entre <i>LGALS1</i> e o índice de Sokal	114
4.2.10 Correlação entre <i>LGALS1</i> e parâmetros clínico-laboratoriais	115
4.2.11 Quantificação de galectina-1 no plasma de pacientes com LMC.....	116
4.2.12 Curva de sobrevida dos pacientes na fase avançada da LMC	117
4.3 Efeitos do silenciamento de <i>LGALS1</i>	119
4.3.1 Obtenção de linhagens BCR-ABL+ deficientes em galectina-1	119
4.3.2 Efeito da inibição de galectina-1 na tumorigênese in vivo	120
4.3.3 Efeito in vitro da inibição de <i>LGALS1</i> na proliferação	122
5 Discussão	124
6 Conclusões	142
Referências Bibliográficas	144
Anexos	168
Anexo A	169
Anexo B	172
Anexo C	191
Anexo D	209
Anexo E	220
Anexo F	221

Prefácio

Prefácio

Apesar de não ser muito comum escrever um prefácio em teses de doutorado, optei por fazê-lo. Acredito ser importante fazer uma breve explicação da minha trajetória, no doutorado, para melhor compreensão do trabalho que foi desenvolvido no Brasil e também nos EUA.

Ao longo de todo o período de doutorado, desenvolvi três projetos diferentes com resultados importantes nas três vertentes. Por serem projetos com aspectos muito diferentes entre eles, seriam necessários três capítulos que corresponderiam a três teses independentes. A tese ficaria ainda maior. Sendo assim, decidi apresentar apenas os resultados mais importantes de dois trabalhos. Um deles foi apresentado no formato tradicional de tese com todas as seções. O outro, com duas publicações, foi apresentado na forma de artigo, como anexo.

Os primeiros dois anos foram dedicados a investigar se a galectina-1 e a galectina-3 poderiam ter alguma função na citotoxicidade mediada por células citotóxicas, uma vez que o Dr. Gustavo Amarante-Mendes havia descoberto a presença destas proteínas numa análise proteômica de grânulos de linfócitos T citotóxicos e células “Natural Killer” (NK). Chegamos a confirmar a localização de galectina-1 nos grânulos citotóxicos de uma linhagem NK humana, por microscopia eletrônica. A ajuda da Dra. Telma Zhorn foi fundamental para a realização dos experimentos. No entanto, não conseguimos obter maiores informações com relação a sua participação na indução de morte de células tumorais. Concluímos que o projeto era arriscado, pois a chance de obtermos um resultado difícil de ser publicado (de que galectina-1 não teria nenhum papel na citotoxicidade), era grande. Assim, decidimos por uma abordagem mais ampla. Uma varredura para buscar moléculas que pudessem ter algum efeito na citotoxicidade mediada por células NK parecia ser a melhor estratégia, no momento.

Optamos, então, por uma abordagem na qual a inibição de genes específicos levasse a um comprometimento da atividade citotóxica de células NK. Para alcançar este objetivo, utilizaríamos a técnica de “wide-screen” por RNA de interferência (RNAi). Como não dispúnhamos de conhecimento e material para a realização dessa técnica, contatamos o Dr. Scott Lowe, um investigador renomado, cujo laboratório é referência no estudo de genes supressores de tumor que controlam a apoptose. O grupo do Dr. Lowe utiliza diversas ferramentas genéticas e genômicas, inclusive a de “wide-screen” RNAi.

Realizei no laboratório do Dr. Lowe, inicialmente, um estágio de dois meses para aprender as técnicas necessárias para desenvolver o projeto no Brasil. Durante o período do estágio no “Cold Spring Harbor Laboratory” (CSHL) eu tive a oportunidade de aprender a metodologia para realizar o silenciamento gênico por “short hairpin” “shRNA” de interferência, que vai desde a construção do plasmídeo contendo o shRNA até a obtenção das células contendo essas construções. Além disso, nesse período, o grupo de pesquisa do Dr. Lowe estava prestes a submeter um artigo mostrando que, no modelo de hepatocarcinoma murino, a reativação de p53 promovia a regressão completa do tumor. Um dos dados mais interessantes desse artigo é que a depleção de células NK causava um atraso nessa regressão. Por ter experiência com a linhagem NK humana YT, decidimos fazer um ensaio *in vitro* para ver o mecanismo pelo qual a depleção de NK atrasava a regressão do tumor.

Obtivemos dados preliminares que indicavam que as células induzidas à senescência pela superexpressão de RAS tornavam-se mais sensíveis ao ataque citotóxico de células NK. Por ser um dado extremamente interessante, optamos por aprofundar esse estudo e publicar os resultados separadamente, mas a colaboração na discussão dos resultados culminou na citação do meu nome nos agradecimentos do artigo publicado em 2007, na revista “NATURE” (Anexo A).

Com o fim do estágio, retornei ao Brasil. Mas, sem a biblioteca de RNAi que iríamos usar para dar continuidade ao projeto inicial, decidimos investir em outra vertente, até obtermos o material necessário. Tendo em vista que nosso grupo de pesquisa também estuda a biologia molecular e celular do BCR-ABL, o oncogene responsável pelo desenvolvimento da leucemia mieloide crônica, e que a expressão das galectina-1 e -3 estão alteradas em diferentes tumores sólidos, decidimos checar a expressão e contribuição destas duas proteínas na LMC, sendo este, o principal tema abordado nesta tese e já submetido (Anexo B).

Além disso, durante o desenvolvimento desse segundo projeto, voltei aos EUA, para realizar o doutorado sanduíche no laboratório do Dr. Lowe. Neste momento, o Dr. Krizhanovsky, pós-doutorando, havia observado que, no modelo murino de cirrose hepática, havia indução de senescência das células estreladas hepáticas e que, a depleção de células NK, prejudicava a eliminação das células estreladas hepáticas senescentes. Ou seja, a participação das células NK na eliminação de células senescentes foi estabelecida em dois modelos. Primeiro, nas células hepáticas induzidas a senescência pela reativação do p53 e agora neste modelo de cirrose hepática. Desta forma, estabelecemos uma colaboração e toda a

parte de experimentação *in vivo* que envolvia o ataque de células NK a células senescentes foi realizado por mim, resultando na publicação do artigo “Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis” em 2008, na revista “CELL” (Anexo C). No que se refere à parte experimental que conduzi, demonstramos, pela primeira vez, que as células induzidas à senescência por danos no DNA, expressão de oncogenes ou replicação, ficam mais susceptíveis ao ataque citotóxico mediado por células NK. Esta maior susceptibilidade das células senescentes foi mostrada inclusive por “live cell imaging”. Além disso, participei na elaboração da revisão intitulada “Implications of Cellular Senescence in Tissue Damage Response, Tumor Suppression, and Stem Cell Biology”, publicada na revista “Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology” (Anexo D). O trabalho desenvolvido nos EUA foi bem avaliado pelo Dr. Lowe (Anexo E), abrindo as portas para futuras colaborações com esse excelente grupo de pesquisa.

Introdução

1 Introdução

1.1 Leucemia mielóide crônica

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa, caracterizada por uma expansão clonal de célula tronco hematopoética neoplásica pluripotente (FADERL *et al.*, 1999).

A LMC é responsável por 15-20% de todos os casos de leucemia, na população adulta ocidental (FADERL *et al.*, 1999). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no Brasil, a incidência anual da LMC é de 1-2 casos a cada 100000 habitantes, números semelhantes aos da Europa e EUA (BRASIL, 2007). Esta incidência é discretamente maior no sexo masculino (2,2 em 100000) do que no sexo feminino (1,4 em 100000) (BRINCKER, 1982; VARDIMAN *et al.*, 2002). Apesar de ocorrer com maior frequência em adultos, na faixa de 25-60 anos, pode ocorrer também em crianças, representando apenas 3% dos casos de LMC.

Embora a etiologia da leucemia mielóide seja desconhecida, alguns trabalhos sugerem que um dos possíveis agentes causadores da LMC pode ser a radiação ionizante (CORSO *et al.*, 1995). O primeiro indicativo desta associação foi a maior incidência observada em sobreviventes da bomba atômica de Hiroshima e Nagasaki (FOLLEY *et al.*, 1952), em trabalhadores de usinas nucleares assim como em indivíduos submetidos a procedimentos médicos que emitem baixas doses de radiação (NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.). COMMITTEE TO ASSESS HEALTH RISKS FROM EXPOSURE TO LOW LEVEL OF IONIZING RADIATION., 2006). Além disso, experimentos *in vitro* indicaram que uma alta dose de radiação ionizante foi capaz de induzir a formação do neogene *BCR-ABL* em linhagens celulares em maior frequência do que as células que não foram irradiadas, apesar da diferença observada não ter sido significativa (DEININGER *et al.*, 1998).

Em 1960, a LMC foi a primeira neoplasia a ser associada a uma anormalidade citogenética característica, graças à descoberta do cromossomo "Philadelphia" (Ph), um cromossomo presente nas células primordiais e suas descendentes (NOWELL e HUNGERFORD, 1960).

Treze anos mais tarde foi constatado que o cromossomo Ph encurtado era resultante de uma translocação recíproca t(9;22)(q34;q11) entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 (Figura 1) (ROWLEY, 1973). O trabalho de Rowley e cols. permitiu outra descoberta fundamental: a de que o neogene *BCR-ABL*, virtualmente presente em 100% dos casos de LMC, é resultante da fusão de parte do gene *BCR* ("Breakpoint Cluster Region") com o proto-oncogene *c-ABL* ("Abelson"), localizados respectivamente nos cromossomos 22 e 9 (Figura 1) (BARTRAM *et al.*, 1983; GROFFEN *et al.*, 1984).

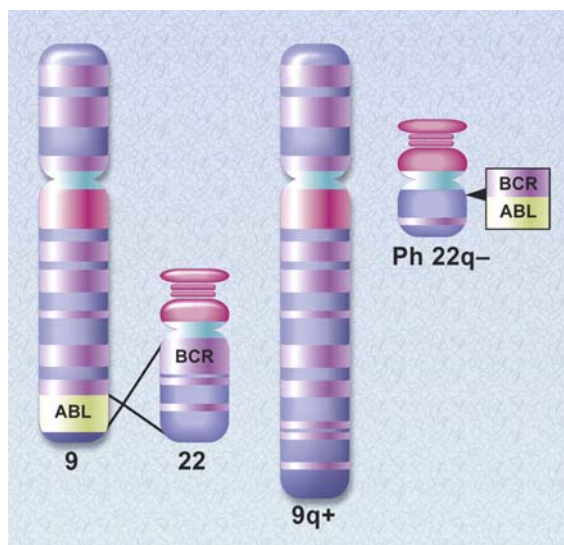


Figura 1 - Esquema da translocação que dá origem ao cromossomo Philadelphia. O gene *ABL* presente no cromossomo 9 e o *BCR* no cromossomo 22 sofrem uma translocação formando um neogene, o *BCR-ABL*.

FONTE: Figura retirada de DRUKER, B. J. *et. al.*, 2008.

1.1.1 Fases da leucemia mielóide crônica

Classicamente, a LMC é uma doença de evolução trifásica: fase crônica (FC), fase acelerada (FA) e fase blástica (FB). No entanto, em alguns casos, os pacientes podem desenvolver uma doença de curso bifásico que passa diretamente da FC para a FB, sem passar pela fase intermediária FA (SAWYERS, 1999; MELO *et al.*, 2003). A FC tem progressão lenta com expansão anormal das células granulocíticas que contribui para o aumento de leucócitos circulantes. A doença que se inicia com uma fase crônica, indolente, de duração variável, progride para a FA. Por último atinge a FB que dura geralmente de três a seis meses, resultando inexoravelmente na morte dos pacientes. A grande maioria dos pacientes com

LMC (80%) é diagnosticados na FC e apenas 5-10% na FA ou FB (FADERL *et al.*, 1999; CORTES e KANTARJIAN, 2003a).

1.1.1.1 Fase crônica

A LMC tem início na fase crônica. Os pacientes, nesta fase, não apresentam as características agressivas da doença, não apresentando sintomas. De fato, a incidência de casos assintomáticos aumentou de 15 para 40%, aproximadamente, nas últimas décadas, provavelmente devido à introdução de análises sanguíneas nos exames de rotina (KANTARJIAN *et al.*, 1993; SAWYERS, 1999).

Nesta fase, quando presentes, os sintomas estão normalmente relacionados à expansão das células leucêmicas. Dentre os sintomas mais comuns, podem ser destacados: fadiga, anorexia, perda de peso, aumento de sudorese, desconforto e saciedade precoce, sendo os dois últimos sintomas causados pelo aumento do tamanho do baço (CORTES *et al.*, 1996; SAVAGE *et al.*, 1997) (Tabela 1). A esplenomegalia e a púrpura são os achados mais comuns do exame clínico de pacientes com LMC. Já nos exames laboratoriais, a leucocitose, trombocitopenia e anemia estão entre as características mais observadas nesses pacientes (SAVAGE *et al.*, 1997) (Tabela 1).

Algumas das mudanças observadas no sangue dos pacientes na FC incluem um predomínio de granulócitos, neutrófilos e liberação de células imaturas da medula óssea (MO), tais como mieloblastos, pró-mielócitos e metamielócitos. O aparecimento, no sangue periférico, de precursores granulocíticos (bastonetes, mielócitos e metamielócitos), que normalmente se localizam na medula óssea é denominado de desvio à esquerda. Assim, uma das características de pacientes na FC é o desvio à esquerda no hemograma (BAIN, 2005). Apesar das alterações, pacientes na FC não são mais susceptíveis a infecções do que indivíduos saudáveis (KANTARJIAN *et al.*, 2006).

Tabela 1 - Aspectos clínicos e hematológicos da LMC na fase crônica.

Achados Clínicos
Fadiga, anorexia e perda de peso
Esplenomegalia
Hepatomegalia
Púrpura
Achados do Sangue Periférico
Leucocitose ($> 25.000/\text{mm}^3$)
Trombocitose (30 a 40% dos casos)
Basofilia
Diminuição da fosfatase alcalina dos leucócitos
Achados da Medula Óssea
Hipercelularidade
Aumento das células da série mielóide em relação às da série eritróide
Blastos e pró-mielócitos numericamente $<$ que 10% de todas as células

A fase crônica pode durar de três a cinco anos. Após esse período, a LMC evolui para a fase acelerada em 80% dos casos, enquanto os outros 20% progridem diretamente para a crise blástica (KANTARJIAN *et al.*, 1993).

1.1.1.2 Fase acelerada

Os critérios de classificação das fases acelerada e blástica variam na literatura. As classificações incluem dados objetivos, tais como porcentagem de blastos e basófilos, assim como dados subjetivos, por exemplo, esplenomegalia persistente e resistência ao tratamento com hidroxiuréia (Tabela 2). É importante estabelecer critérios adequados para a classificação dos pacientes. Isto pode ser exemplificado pelo impacto que a inclusão incorreta de pacientes de fase acelerada na blástica poderia ter na expectativa de vida dos doentes na FB.

Tabela 2 - Comparação das três classificações da LMC na fase acelerada.

	MDACC (1998)	IBMTR	OMS
Blastos (%)	≥ 15	≥ 10	10-19
Blastos + pró-mielócitos (%)	≥ 30	≥ 20	NA
Basófilos	≥ 20	≥ 20	≥ 20
Plaquetas	< 100000	↑ ou ↓ Persistente independente do tratamento	< 100000 ou > 1000000
Leucócitos	NA	Difícil controle	NA
Anemia	NA	Não responsiva ao tratamento	NA
Esplenomegalia	NA	Em aumento	NA
Citogenética	EC	EC	EC após diagnóstico
Outros	NA	Sarcoma, granulócitos, fibrose	Proliferação de megacariócitos, fibrose

MDACC: M. D. Anderson Cancer Center; IBMTR: International Bone Marrow Transplant Registry; OMS: Organização Mundial da Saúde; NA: Não se aplica; EC: Evolução Clonal.

Fonte: Adaptada do manual de oncologia médica (KANTARJIAN *et al.*, 2006).

Entre as classificações mais usadas estão as do hospital M. D. Anderson Cancer Center (MDACC), do International Blood and Marrow Transplantation Registry (IBMTR) e OMS (Tabela 2).

Em 1988, foi proposta a definição do hospital americano MDACC, frequentemente utilizada em estudos nos quais os pacientes foram tratados com interferon-alfa e/ou mesilato de imatinibe (MI), um inibidor específico de tirosina-quinase (TK) também denominado de STI571 (descrição na seção 1.1.2.2) (KANTARJIAN *et al.*, 1988). Por outro lado, quando o estudo envolve transplante de medula óssea, as fases avançadas da doença são definidas de acordo com os critérios adotados pelo centro IBMTR.

Em 2002, foi proposta pela OMS uma nova classificação a partir de estudos já publicados (VARDIMAN *et al.*, 2002). Mas, somente alguns anos mais tarde, foi feita uma comparação entre as classificações da MDACC e OMS. Os pacientes tratados com mesilato de imatinibe, que haviam sido classificados de acordo com os critérios da MDACC foram reclassificados com o critério definido pela OMS e a taxa de sobrevivência, entre outros parâmetros, foi avaliada no intuito de definir a utilidade clínica desta nova categorização (CORTES *et al.*, 2006). De fato, os autores mostraram que 10% dos pacientes estudados

mudaram de fase com a reclassificação elevando a sobrevivência global dos pacientes na FC. Além disso, os pacientes que apresentavam porcentagem de blastos entre 20 e 29%, considerados nesta nova classificação, como fase blástica, apresentaram sobrevivência melhor do que os que tinham a porcentagem de blastos acima de 30%. Com esses resultados os autores desse trabalho propuseram uma atualização da antiga classificação do MDACC considerando critérios mais uniformes e menos subjetivos que independam do tratamento utilizado (CORTES *et al.*, 2006).

A mediana de sobrevivência dos pacientes em FA é de um a dois anos, mesmo com o advento de tratamentos com inibidores de tirosina-quinase (VARDIMAN *et al.*, 2002; CORTES e KANTARJIAN, 2003a). Alguns pacientes morrem antes mesmo de alcançar a fase blástica.

1.1.1.3 Fase blástica

O curso natural da doença é o avanço da doença até a última fase, a FB. Entre os sintomas exibidos, podem ser destacados a anemia, aumento no risco de infecções e ou sangramento. Um dos critérios que define a FB é a porcentagem de blastos no sangue ou na medula óssea. Ainda permanece bastante controverso o ponto de corte a ser considerado e, assim, cada classificação estabelece uma porcentagem diferente. Segundo as classificações da MDACC, IBMTR e OMS o paciente é considerado em FB quando apresenta no sangue ou medula óssea uma porcentagem de blastos superior a 15%, 10% ou 20% respectivamente (Tabela 2). Mais recentemente, foi proposto que essa porcentagem deveria ser superior a 29% uma vez que pacientes com blastos entre 20-29% tem sobrevivência maior do que os indivíduos com a porcentagem blastos igual ou superior a 30 (CORTES *et al.*, 2006).

A fase blástica pode ser mielóide (40-70%) ou linfóide (20-30%). Apesar desta variável não ser considerada na maioria das classificações, alguns estudos apontam que a FB mielóide tem um prognóstico menos favorável (KANTARJIAN *et al.*, 1987; CERVANTES *et al.*, 1998). A sobrevivência dos pacientes em fase blástica, como citado anteriormente, é de 3-6 meses.

1.1.2 Tratamentos da Leucemia Mielóide Crônica

Em 1865, foi relatado o primeiro tratamento que trouxe benefícios para os pacientes com LMC. Esta terapia consistia em tratar os pacientes com arsênico, entretanto, este agente não tinha efeito curativo, apenas melhorava os sintomas da doença, reduzindo a quantidade de leucócitos no sangue (ANTMAN, 2001). Por mais de cem anos as terapias empregadas, incluindo radioterapia e tratamento com bussulfan, foram paliativas, melhoraram a qualidade de vida dos pacientes com LMC, sem curá-los.

Somente na década de 80, surgiu a possibilidade real de cura da LMC, com a introdução do transplante de medula óssea como terapia para esta doença (SPECK *et al.*, 1984). Esta permanece sendo, até hoje, a única forma curativa de tratamento, porém é um procedimento associado a uma alta morbidade e taxa de mortalidade (HEHLMANN *et al.*, 2005).

O desenvolvimento do mesilato de imatinibe (descrito na seção 1.1.2.2), um inibidor específico da atividade tirosina-quinase de BCR-ABL foi um marco no tratamento da LMC (DRUKER *et al.*, 1996). A comprovação clínica dos efeitos deste inibidor motivou a busca por novos compostos, por meio da tecnologia chamada de “drug design”. Hoje, novos inibidores estão sendo estudados em ensaios clínicos para verificar eficácia e segurança destas drogas em pacientes com LMC (MELO e CHUAH, 2008).

1.1.2.1 Interferon-alfa

Os intérferons têm sido amplamente utilizados no tratamento de vários tipos de neoplasias, como melanoma, linfoma folicular e sarcoma de Kaposi (JONASCH e HALUSKA, 2001). Por esse motivo, em 1979, Verma e cols. mostraram que uma preparação contendo o intérferon secretado por leucócitos humanos (“human leucocyte interferon” HLIF), quando acrescentada na cultura de granulócitos, causava uma redução no número de colônias e aumento na porcentagem de granulócitos imaturos de forma dose-dependente (VERMA *et al.*, 1979). A partir desse interessante resultado, o interferon-alfa foi introduzido, no início dos anos 80, como tratamento em pacientes (TALPAZ *et al.*, 1983). No entanto, esta terapia foi aceita somente na década seguinte, quando estudos mais amplos apontaram o

aumento na sobrevida global dos pacientes que receberam o IFN-alfa ao invés de bussulfan (OHNISHI *et al.*, 1995) ou hidroxiuréia (HEHLMANN *et al.*, 1994).

Diversas meta-análises, contemplando os dados obtidos por outros pesquisadores, reforçaram a observação de que o tratamento com interferon-alfa aumentava a porcentagem de pacientes com sobrevida superior a cinco anos em alguns trabalhos e dez anos em outros (CHRONIC MYELOID LEUKEMIA TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP., 1997; BONIFAZI *et al.*, 2001; KANTARJIAN *et al.*, 2003).

1.1.2.2 Mesilato de Imatinibe

A partir da descoberta da alteração molecular BCR-ABL como responsável pela patogênese da LMC, teve início a busca por inibidores desta molécula. Identificado em 1996, o mesilato de imatinibe (MI), originalmente denominado CPG57148B, e também denominado STI571, foi desenvolvido para inibir especificamente a atividade a quinase de c-ABL. O MI, comercialmente denominado Gleevec®/Glivec® (Novartis, Basel, Suíça), tem como alvo a estrutura terciária inativa da quinase c-ABL, mais especificamente, a trinca de aminoácidos Aspartato(D)-Fenilalanina(F)-Glicina(G) (DFG). Ao se ligar a esta trinca, o MI previne a mudança conformacional da proteína e impede, desta forma, a ligação do ATP ao sítio catalítico (Figura 2) (SCHINDLER *et al.*, 2000; NAGAR *et al.*, 2003). Esta pequena molécula é capaz de se ligar também a algumas outras quinases como c-KIT (BUCHDUNGER *et al.*, 2000), mas de forma menos eficaz (ZERMATI *et al.*, 2003).

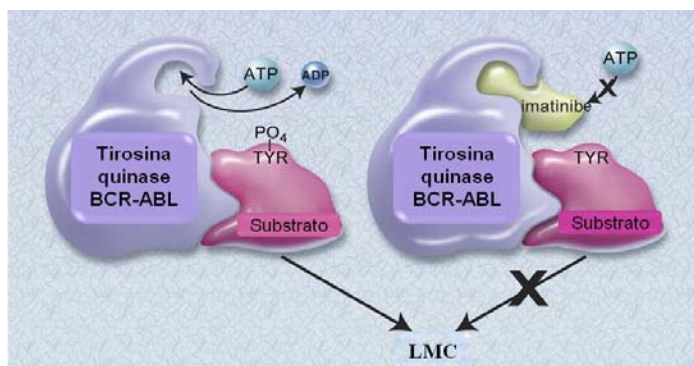


Figura 2 - Esquema do mecanismo de ação do mesilato de imatinibe. O Imatinibe se liga ao sítio da tirosina-quinase de BCR-ABL, bloqueando a ligação do ATP e conseqüentemente inibe a atividade quinase de BCR-ABL.

FONTE: Figura adaptada de Druker, B. J. *et. al.*, 2008.

Ao se ligar no sítio de ATP de c-ABL, o MI inibe a atividade enzimática desta tirosina-quinase. Os resultados dos experimentos, realizados *in vitro*, indicaram uma redução na proliferação e formação de colônias de células BCR-ABL-positivas do sangue de pacientes com LMC, mas não tiveram efeito sobre as células normais (DRUKER *et al.*, 1996). Mais tarde ficou provado que o MI induzia somente a morte das células BCR-ABL-positivas (DEININGER *et al.*, 1997).

Dois anos após a descoberta deste inibidor altamente específico, tiveram início os ensaios clínicos de fase I, que avaliaram a segurança e concentração de uso desta droga. Em 1998, doses crescentes de MI (25-1000 mg) foram administradas em 83 pacientes com LMC em fase crônica sem resposta ao tratamento com IFN-alfa. De fato, os efeitos adversos foram mínimos e a dose máxima utilizada foi bem tolerada pelos pacientes (DRUKER *et al.*, 2001).

No ano seguinte, diversos ensaios clínicos de fase II foram iniciados, com pacientes das fases crônica (KANTARJIAN *et al.*, 2002b), acelerada (TALPAZ *et al.*, 2002) e blástica da LMC (SAWYERS *et al.*, 2002) que já haviam apresentado resistência ao tratamento com IFN-alfa que estavam. Em conjunto, estes trabalhos mostraram os efeitos benéficos nos pacientes submetidos à terapia com Glivec®.

Logo em seguida, em 2003, a eficácia do mesilato de imatinibe, na concentração de 400mg, ficou comprovada por meio do estudo internacional prospectivo randomizado que comparou a resposta ao tratamento desse inibidor ou de IFN-alfa mais citarabina (Ara C) em 1106 pacientes em fase crônica (O'BRIEN *et al.*, 2003). Os autores desse trabalho observaram que quando tratados com Glivec®, uma porcentagem aproximadamente três vezes maior de pacientes permaneciam livres de progressão de doença, quando tratados com Além disso, esse novo tratamento apresentou menor toxicidade, maior aderência e melhor qualidade de vida (HAHN *et al.*, 2003; O'BRIEN *et al.*, 2003).

Devido aos excelentes resultados obtidos nos ensaios clínicos, o Glivec® foi rapidamente aprovado pelo FDA e se tornou tratamento de primeira linha para pacientes em fase avançada da LMC, nos EUA e Europa. No Brasil, o MI foi aprovado pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) e introduzido no tratamento do pacientes da Rede Pública em 2001 para pacientes em fase acelerada ou blástica. Apesar dos indicativos da superioridade do tratamento com o STI571 em relação aos outros, o MI só era coberto pelo Sistema Único de Saúde como medicamento de segunda linha, nos pacientes resistentes ao IFN-alfa ou

intolerantes a essa droga. Finalmente, em junho de 2008, o mesilato de imatinibe passou a ser considerado tratamento de primeira linha e a ter cobertura financeira do SUS, sob a portaria da Secretaria de Atenção à Saúde (SAS) n° 347.

Como na maioria dos tratamentos medicamentosos, alguns pacientes nunca apresentam resposta à terapia inicial com MI, este fenômeno é conhecido por resistência primária. Por outro lado, uma porcentagem pequena dos pacientes perde a resposta que havia sido adquirida e, portanto, passa a ter uma resistência secundária ao imatinibe (MELO e CHUAH, 2007). Este último tipo de resistência é raro na fase crônica, mas à medida que ocorre a progressão da doença, sua frequência aumenta (HOCHHAUS *et al.*, 2002).

Diversos mecanismos podem ser responsáveis pela resistência ao tratamento com MI, alguns deles podem inclusive atuar de forma concomitante. Por ser um medicamento oral, algumas das causas de resistência primária estão relacionadas com a absorção, metabolização, influxo e efluxo do mesilato de imatinibe. Um estudo recente sobre este último mecanismo levou a identificação de uma proteína denominada hOCT-1 (“human organic cation transporter-1”) que regula a entrada do MI para o interior das células (THOMAS *et al.*, 2004). White e cols. observaram que pacientes com resposta sub-ótima para o Glivec® possuíam uma atividade de OCT-1 menor do que pacientes que responderam ao tratamento, mas que o aumento na dose de imatinibe era suficiente para superar esse problema (WHITE *et al.*, 2007).

A maioria dos estudos, no entanto concentrou-se nos mecanismos envolvidos na resistência secundária. Nesse sentido, vale a pena destacar o trabalho de Hochhaus e cols., no qual os autores, ao estudar 66 pacientes resistentes ao MI, perceberam que 43 deles recidivaram após uma resposta transitória primária, sendo que 33/43 pacientes exibiram uma alteração molecular ou citogenética associada a essa resistência. Nesse sentido, o evento mais frequente associado à resistência secundária foi a presença de mutações pontuais no domínio de tirosina-quinase de c-ABL, ocorrendo em 23/66 pacientes. Além disso, foram observadas amplificações genômicas de *BCR-ABL* e alterações cromossômicas em 2/32 e 19/36 pacientes, respectivamente (HOCHHAUS *et al.*, 2002).

As mutações foram observadas em duas regiões do domínio c-ABL: no ponto de contato entre esse domínio e o Glivec® (T315I e F359V) prejudicando a ligação entre eles (CORBIN *et al.*, 2002), e na região da alça P (G250E, Q252H, Y253F/H, E255K/V, M244V)

que parecem alterar a estrutura conformacional de BCR-ABL da forma iniciativa para a ativa, impedindo também a ligação deste inibidor de tirosina-quinase (SHAH *et al.*, 2002).

1.1.2.3 Novas drogas

Devido a essa resistência, duas estratégias foram abordadas para o desenvolvimento de novas drogas. A primeira consistiu em modificar a molécula de MI para melhorar a afinidade deste inibidor ao domínio de c-ABL. Nesse sentido, pesquisadores da Novartis criaram o Nilotinibe, pelo menos 10 vezes mais potente do que o imatinibe, incluindo a maioria das mutações testadas (exceto a T315I) e mantendo a especificidade pela quinase c-ABL (REDAELLI *et al.*, 2008) (Tabela 3). O Dasatinibe e o Bosutinibe, por outro lado, podem se ligar tanto na forma ativa quanto inativa de c-ABL, sendo cerca de 300 e 200 vezes mais potente do que o imatinibe, respectivamente (REDAELLI *et al.*, 2008). No entanto, nenhum dos inibidores descritos anteriormente atua sobre a mutação T315I (Tabela 3).

Recentemente foi desenvolvido um novo inibidor, o MK-0457, capaz de se ligar ao BCR-ABL com essa mutação (CARTER *et al.*, 2005). Um trabalho inicial com apenas três pacientes mostrou resultados promissores, no tratamento de pacientes que apresentavam essa mutação e que receberam o bosutinibe após desenvolverem resistência contra o imatinibe e dasatinibe ou nilotinibe (GILES *et al.*, 2002) (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação entre os novos inibidores de tirosina-quinase de c-ABL

	Ligação	Potência	Mutações sensíveis	Alvo(s) molecular(es)	Fase da pesquisa
Nilotinibe (AMN 107)	Forma Inativa	30-50 x imatinibe	Maioria Exceção: T315I	ABL, PDGFR, KIT, EPHB4	Fase I/II
Dasatinibe (BMS-354825)	Forma inativa Forma ativa	325 x imatinibe	Todos Exceção: T315I	ABL, PDGFR, KIT, FGR, FYN, HCK, LCK, LYN, SRC, YES, EPHB4	Aprovado
Bosutinibe (SKI 606)	Forma inativa Forma ativa	200 x imatinibe	Todos Exceção: T315I	ABL, FGR, LYN, SRC	Fase I/II Início Fase III
MK-0457 (VX-680)	Forma ativa	Similar ao imatinibe	Todos Inclusive: T315I	Aurora quinases, FLT3, JAK2, ABL	Fase II

1.1.3 Resposta ao tratamento

A avaliação da resposta à terapia segue critérios estabelecidos e definidos pelo estudo internacional randomizado do interferon versus STI571, chamado de estudo IRIS (O'BRIEN *et al.*, 2003). O primeiro parâmetro analisado é a resposta hematológica, seguido pela análise citogenética e por último a molecular (Tabela 4). Considera-se que pacientes que alcançam uma resposta hematológica completa (RHC) têm normalização da contagem normal de leucócitos ($< 10 \times 10^9/L$), de plaquetas ($< 450 \times 10^9/L$) e do tamanho do baço (Tabela 4). Os pacientes em RHC são subdivididos de acordo com a resposta citogenética em: mínima, menor, parcial, completa e maior e também pela resposta molecular que pode ser maior ou completa (Tabela 4).

Tabela 4. Critérios de resposta ao tratamento com inibidores de tirosina-quinase na LMC definidos pelo IRIS.

Remissão hematológica	
Completa	Normalização da contagem normal e diferencial de leucócitos, desaparecimento dos sintomas incluindo a esplenomegalia
Remissão citogenética	
Maior	Completa+Parcial (0-34% metáfases Ph ⁺)
Completa	0% metáfases Ph ⁺
Parcial	1-34% metáfases Ph ⁺
Menor	35-95% metáfases Ph ⁺
Mínima	> 95% metáfases Ph ⁺
Remissão molecular	
Completa	Níveis indetectáveis de transcritos de <i>BCR-ABL</i> por PCR em tempo real e “nested-PCR”
Maior	Razão entre <i>BCR-ABL/ABL</i> $< 0,05\%$ ou redução ≥ 3 log de <i>BCR-ABL</i> a partir da mediana calculada

FONTE: Adaptado de (KANTARJIAN *et al.*, 2006).

1.2 BCR-ABL

A capacidade de uma única molécula, o BCR-ABL, induzir leucemogênese despertou o interesse de muitos pesquisadores. Para uma melhor compreensão da função deste oncogene, vale a pena destacar as funções fisiológicas dos dois genes translocados, *BCR* e *ABL* para depois analisar o oncogene e a proteína de fusão resultante, BCR-ABL.

1.2.1 BCR

O gene BCR “Breakpoint Cluster Region” é composto por 25 éxons, incluindo o primeiro (e1’) e segundo (e2’) éxons alternativos (CHISSOE *et al.*, 1995).

A proteína de 160 kDa (p160^{BCR}) codificada por este gene tem características estruturais que sugerem uma possível função na transdução de sinais. Este gene é constituído por domínios de serina/treonina quinase (MARU e WITTE, 1991), de adenosina monofosfato cíclico, de oligomerização (MCWHIRTER *et al.*, 1993b), de fator de troca de guanina de Rho GTPase (Rho-GEF) (BOGUSKI e MCCORMICK, 1993), de proteínas ativadoras de RAC GTPase (Rac-GAP) (DIEKMANN *et al.*, 1991) e também de sítios dependentes de cálcio de ligação de lipídeos (BOGUSKI e MCCORMICK, 1993), BAP-1, um membro da família 14-3-3 de proteínas (REUTHER *et al.*, 1994), e a proteína de reparo de DNA, xeroderma pigmentosa B (XPB) (TAKEDA *et al.*, 1999) (Figura 3).

As regiões mais importantes de BCR são a tirosina 177 e o domínio “coiled-coil” presente no início da região N-terminal (Figura 3). A tirosina 177 por ser o sítio de ligação da proteína adaptadora GRB-2 que permite a ligação do RAS ao BCR (PENDERGAST *et al.*, 1993) e o domínio “coiled-coil” por promover a dimerização de BCR-ABL, essencial para a ativação da atividade TK (SMITH *et al.*, 2003).

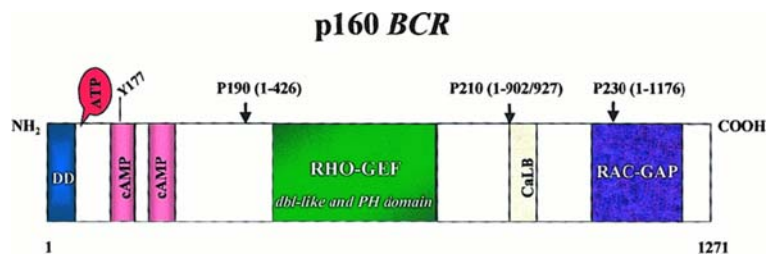


Figura 3 - Esquema da estrutura da proteína BCR. Estão identificados, neste esquema, o domínio de dimerização (DD), dois domínios de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), de fator de troca de guanina de Rho GTPase (Rho-GEF), proteínas ativadoras de RAC GTPase (RAC-GAP), sítios dependente de cálcio de ligação de lipídeos (c-ABL). As setas indicam a posição dos locais de quebra das diferentes proteínas de fusão BCR-ABL.

FONTE: Retirada de DEININGER, M. W. *et al.*, 2000.

A função de BCR em células hematopoéticas não está bem definida uma vez que camundongos “BCR-null” possuem um sistema hematopoético aparentemente normal. Estes camundongos não apresentam alterações fenotípicas e se reproduzem normalmente. Somente

quando os animais recebem doses de endotoxinas foi observada uma alteração no “burst” respiratório de neutrófilos, tornando esses camundongos mais susceptíveis ao choque séptico (VONCKEN *et al.*, 1995).

Em 1996, foi sugerido outro papel de BCR após demonstrarem que o uso de formas mutadas *BCR*, de peptídeos de BCR fosforilados em Ser-354, mas não em Tyr-360 eram capazes de inibir a atividade quinase tanto de c-ABL como de BCR-ABL. Este trabalho provê indícios de que seqüências presentes no primeiro éxon de *BCR* são importantes para modular a atividade quinase de c-ABL e BCR-ABL (LIU *et al.*, 1996).

Alguns anos mais tarde, foi observada a ligação de XPB a uma porção do domínio Rho-GEF (TAKEDA *et al.*, 1999) sugerindo uma possível função de BCR na regulação do reparo de DNA por excisão, comprovada posteriormente em linhagens que expressavam a p210^{BCR-ABL} (CANITROT *et al.*, 2003).

O ano passado, Perazzona e cols. investigaram o efeito de BCR na expressão de BCR-ABL. Para tanto, os investigadores expressaram BCR/GFP em células Ton.B210 contendo uma construção induzível de *BCR-ABL*. Os camundongos “nude”, deficientes em linfócitos T e B, inoculados com as células Ton.B210 BCR/GFP que tinham a expressão de BCR-ABL induzida, apresentaram um atraso no aparecimento de tumores e ainda tinham a metade do tamanho dos tumores observados nos camundongos inoculados com as células Ton.B210 BCR/GFP que não expressavam BCR-ABL. No entanto, este mesmo resultado não foi observado com a expressão de um mutante de BCR que torna a atividade TK deficiente. Sendo assim, estes dados sugerem que a inibição de BCR-ABL por BCR requer uma atividade tirosina-quinase (PERAZZONA *et al.*, 2008).

1.2.2 c-ABL

O proto-oncogene humano *c-ABL* é homólogo ao oncogene viral *v-ABL*, originalmente identificado no vírus da leucemia murina de Abelson (A-MuLV). Este retrovírus foi isolado de um camundongo que havia sido inoculado com o vírus da leucemia murina de Moloney (M-MuLV) e sofreu recombinação com o *c-ABL* murino (ABELSON e RABSTEIN, 1970). Logo em seguida, foi demonstrado o potencial de transformação deste novo retrovírus, A-

MuLV, que contém o v-*ABL*, em culturas primárias murinas de fibroblastos NIH3T3 e células linfóides (RASCHKE *et al.*, 1975; ROSENBERG *et al.*, 1975; SCHER e SIEGLER, 1975).

O *c-ABL* humano está constituído de 12 éxons e diversos íntrons (PASTERNAK *et al.*, 1998). Existem duas isoformas resultantes do “splicing” alternativo do primeiro éxon, sendo a isoforma 1b miristoilada (AMARANTE-MENDES e GREEN, 1997a).

A proteína *c-ABL* é ubiquitariamente expressa em células de mamíferos. Esta tirosina-quinase não atua como receptor. Está preferencialmente localizada no núcleo, mas pode também ser encontrada no citoplasma associada a filamentos de actina (VAN ETEN, 1999).

A estrutura da proteína *c-ABL* humana tem uma região amino-terminal muito similar ao da família de sarc (SRC) quinases, seguido por um domínio de homologia de SRC 3 (SH3), domínio de homologia de SRC 2 (SH2) além do domínio catalítico de quinase, o SH1 (Figura 4). A outra região das proteínas da família ABL, por exemplo, do *c-ABL* de 145 kDa (p145^{ABL}) é constituída de grande domínio carboxi-terminal de 60 kDa, ausente nas SRC quinases que compreende domínios ricos em prolina, consistindo de três seqüências PxxP (P é prolina e x é qualquer aminoácido) com afinidade pelo domínio SH3 de proteínas adaptadoras; domínios de ligação ao DNA; de ligação ao p53, de ligação a proteína Rb, de ligação a actina glomerular e actina filamentosa assim como regiões sinalizadoras de localização e exportação nuclear responsáveis pelo direcionamento de *c-ABL* para o núcleo ou citoplasma (Figura 4) (NAGAR *et al.*, 2003).

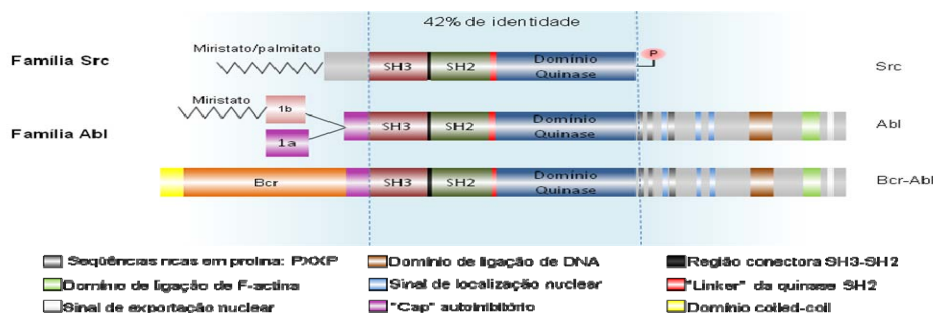


Figura 4 - Esquema da estrutura das proteínas c-Src, c-ABL e BCR-ABL. Domínios estruturais de membros da família SRC e ABL (c-ABL e BCR-ABL). Os sítios de fosforilação não estão representados. A região principal dos três membros é composta pelos domínios de homologia de SRC 3 (SH3), homologia de SRC 2 (SH2) e de homologia de SRC 1 (SH1), também denominado domínio tirosina-quinase. A isoforma 1b de c-ABL é miristoilada, enquanto a isoforma 1a não o é. A escala dos domínios não está representada. ABL: tirosina-quinase Abelson, BCR: "breakpoint cluster region".

FONTE: Figura adaptada de Hantschel e Superti-Furga, 2004.

Todos esses domínios de c-ABL permitem uma grande variedade de interações proteína-proteína e proteína-DNA que culminam com sua participação em diversos processos celulares. Entre os efeitos nucleares promovidos por c-ABL, podem ser destacadas a indução de parada no ciclo celular (SAWYERS, 1999) ou apoptose (WANG, 2000; YOSHIDA, 2008) em resposta ao estresse induzido por dano no DNA. Em contrapartida, no citoplasma, o c-ABL parece estar mais envolvido com a dinâmica da actina e diferenciação (WOODRING *et al.*, 2003). A sinalização mediada por integrinas (LEWIS *et al.*, 1996) ou por fatores de crescimento (FURSTOSS *et al.*, 2002) promove a proliferação de fibroblastos.

1.2.3 BCR-ABL

Em células tronco pluripotentes hematopoéticas nas quais ocorreu a translocação dos cromossomos 9 e 22, o gene resultante da fusão de *BCR* e *ABL* é o *BCR-ABL*. Os fatores que causam esta translocação não foram elucidados até o momento.

Nesta fusão, o éxon 1a de *ABL* é substituído por pedaços variados de *BCR*. De acordo com o ponto de quebra de *BCR*, a fusão dos genes pode dar origem a três proteínas BCR-ABL distintas: p190^{BCR-ABL}, p210^{BCR-ABL} e p230^{BCR-ABL}, associadas respectivamente à leucemia linfóide aguda (LLA), leucemia mielóide crônica (LMC) e leucemia neutrofílica crônica (LNC), diferentes formas de leucemias Philadelphia-positivas (MELO, 1996a). A maioria dos pacientes com leucemia mielóide crônica apresenta o ponto de quebra na região dos éxons originalmente chamados b1-b5 (atualmente éxons 12-16) do *BCR*, denominada “Major breakpoint cluster region” (M-BCR) (GROFFEN *et al.*, 1991), que justaposto ao c-ABL codifica a isoforma p210^{BCR-ABL} (CHEN *et al.*, 1988). O ponto de quebra ocorre geralmente ou entre os íntrons b2 e b3 ou b3 e b4, e juntamente com o éxon a2 de *ABL* formam respectivamente as isoformas b2a2, b3a2 (Figura 5).

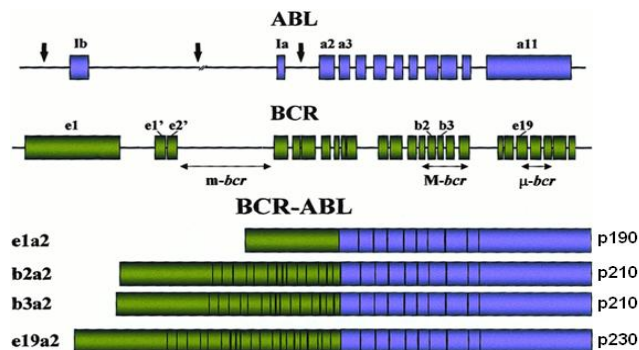


Figura 5 - Esquema dos pontos de quebra nos genes *ABL* e *BCR* e RNAm derivado da fusão desses dois genes. Diferentes RNAm (e1a2, b2a2, b3a2 e e19a2) são formados de acordo com a localização do ponto de quebra nos genes *ABL* e *BCR*, além de especificar o tipo de proteína formada (p190^{BCR-ABL}, p210^{BCR-ABL}, e p230^{BCR-ABL}).

FONTE: Retirada de Deininger, M. W. *et al.*, 2000.

Os outros dois pontos de quebra são o “minor breakpoint cluster” (m-BCR) e o “micro breakpoint cluster” (μ-BCR) que estão associados na maioria das vezes à leucemia linfocítica aguda (LLA), cuja forma observada é a p190^{BCR-ABL} (KURZROCK *et al.*, 1987) e à leucemia neutrofílica crônica (LCN), semelhante a LMC, os sintomas mais brandos e cuja isoforma presente é a p230^{BCR-ABL} (PANE *et al.*, 1996) (Figura 5).

Com a translocação, além do surgimento do neogene BCR-ABL, é transcrito o gene *ABL-BCR*, em aproximadamente 2/3 dos pacientes com LMC, no entanto, sua função permanece desconhecida (MELO *et al.*, 1993).

1.2.4 Regulação da atividade quinase

A atividade tirosina-quinase de c-ABL é muito bem controlada. Mesmo quando esta proteína é superexpressa em células hematopoéticas ou fibroblastos, ela não é capaz de transformar estas células (VAN ETTEN *et al.*, 1989). Este controle é efetuado por diferentes mecanismos de auto-inibição de c-ABL, com envolvimento de alguns domínios da própria molécula.

A estrutura conformacional de c-ABL é estabilizada devido a complexas interações intramoleculares que compreendem além do sítio catalítico de quinase, os domínios SH2 e SH3 (BRASHER *et al.*, 2001), o grupo miroistil, a região conectora SH2-SH3, o domínio “linker” de quinase SH2 e possivelmente a região do “Cap” (HANTSCHER e SUPERTI-FURGA, 2004). Quando a proteína ABL está em sua conformação inativa, os domínios SH2 e

SH3 permanecem ligados à região distal do sítio ativo (NAGAR *et al.*, 2003). Na realidade, ligações de fosfopeptídeos no domínio SH2 (NAGAR *et al.*, 2003), na alça de ativação (DOREY *et al.*, 2001) e no domínio “linker” de quinase SH2 (BRASHER e VAN ETTEN, 2000) assim como ligações dos inibidores celulares Abi-1 (SHI *et al.*, 1995) e Pag/MSP23 (WEN e VAN ETTEN, 1997) no c-ABL, parecem contribuir para esta modulação.

É interessante notar que a grande maioria das 112 substituições de aminoácidos induzidas por mutagênese aleatória que conferiam aos clones uma resistência ao Glivec, identificadas por Azam e cols., estão localizadas na porção ABL de BCR-ABL. De fato, muitos dos resíduos mutados em BCR-ABL equivaliam às mutações implicadas na desregulação da atividade quinase de c-ABL sugerindo que os mecanismos de regulação destas duas proteínas deviam ser semelhantes (PLUK *et al.*, 2002; AZAM *et al.*, 2003) (BRASHER *et al.*, 2001; HANTSCHHEL e SUPERTI-FURGA, 2004).

Um controle adequado da atividade tirosina-quinase de c-ABL é fundamental, pois se sabe que uma falha na regulação desta pode resultar no aparecimento de diferentes tipos de leucemias. Vale à pena destacar o exemplo de BCR-ABL. Neste caso, o processo de fusão do gene BCR ao ABL causa alterações, na estrutura conformacional desta, que acarretam na exposição do sítio de ligação de actina (MCWHIRTER e WANG, 1993a), permitem a dimerização de forma constitutiva (MCWHIRTER *et al.*, 1993b), e por fim, parecem interferir também na regulação da atividade de c-ABL pelo domínio SH3 (PENDERGAST *et al.*, 1991). Sendo assim, a perda de regulação de tirosina-quinase de BCR-ABL foi associada ao potencial tumorigênico desta oncoproteína (HANTSCHHEL e SUPERTI-FURGA, 2004).

1.2.5 Propriedades biológicas alteradas por BCR-ABL

A presença dos variados domínios citados no tópico anterior e a alta atividade TK decorrente da fusão de BCR e ABL conferem a esta oncoproteína a capacidade de ligação e/ou fosforilação de diversas proteínas, com possibilidade de ativação de múltiplas vias de sinalização.

É importante destacar, neste momento, que ao contrário de c-ABL, a localização de BCR-ABL é principalmente citoplasmática e, portanto, muitas vias de sinalização ativadas por BCR-ABL diferem de c-ABL. A ativação destas vias, por BCR-ABL, é responsável pelas

quatro principais alterações fisiológicas que causam a transformação maligna de células normais (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000). São estas, a adesão celular, mitose, independência de fatores de crescimento e apoptose (DEININGER *et al.*, 2000a).

1.2.5.1 Adesão celular

As células hematopoéticas progenitoras normais se ligam ao estroma da medula óssea via receptores $\beta 1$ integrina para fibronectina (HURLEY *et al.*, 1995). Atualmente, acredita-se que o processo de adesão é essencial não somente para a ancoragem das células progenitoras, mas também para a regulação da hematopoese, incluindo proliferação e apoptose destas.

A proliferação acentuada e a liberação prematura de células progenitoras e precursoras hematopoéticas estão entre as características clínicas da LMC (KANTARJIAN *et al.*, 1985). Um dos mecanismos sugeridos para explicar esses dois fenômenos é a de que a adesão das células progenitoras Ph^+ à matriz extracelular ou células estromais seja defeituosa. Nessa situação, as células progenitoras deixariam de receber os estímulos que inibem a proliferação (HURLEY *et al.*, 1995) destas células e, além disso, sem uma boa aderência ao estroma medular, estas mesmas células seriam liberadas de forma prematura para a corrente sanguínea (PELLETIER *et al.*, 2004).

Esta hipótese foi corroborada por ensaios realizados, *in vitro*, que indicaram que a adesão das células progenitoras, obtidas de medula óssea de pacientes com LMC, estava diminuída em relação às células progenitoras de indivíduos normais (GORDON *et al.*, 1987).

Esta perda da aderência foi atribuída, por alguns autores, a possíveis defeitos nos receptores de integrina das células progenitoras ou na sinalização mediada por eles. Os resultados apresentados por Verfaillie e cols., em 1992, reforçam esta idéia. Nesse estudo, as células progenitoras de medula óssea, retiradas de pacientes com LMC, não se aderem bem às células estromais normais ou à fibronectina, mas são capazes de aderir a outras proteínas da matriz extracelular (MEC) tais como colágeno do tipo IV, laminina e componentes da membrana basal (VERFAILLIE, 1992).

Contrastando com essa idéia, outros pesquisadores atribuem a falha na adesão a alterações ocorridas nas células estromais Ph^+ de pacientes com LMC. Isto porque, células

progenitoras normais, quando incubadas na presença de células estromais BCR-ABL⁺, têm menor proliferação do que na presença de células normais (BHATIA *et al.*, 1995).

Em 2004, foi descrito outro modelo, no qual camundongos deficientes na molécula de adesão P-selectina tiveram uma liberação prematura das células progenitoras mielóides BCR-ABL⁺, acelerando a doença (PELLETIER *et al.*, 2004).

Existe ainda, um conjunto de resultados, que descreve um aumento na adesão tanto de linhagens BCR-ABL positivas como de células progenitoras CD34⁺ que não pôde ser explicado por uma alteração na função dos receptores de integrina (BAZZONI *et al.*, 1996).

A sinalização envolvida na falha de aderência entre as células progenitoras e o estroma da medula óssea não foram esclarecidas. No entanto, presume-se que a fosforilação de proteínas que participam na organização do citoesqueleto ou membrana celular, possa ter algum papel. A maior fosforilação da quinase de adesão focal (FAK), que promove a adesão celular via sinalização por integrinas, foi observada em células BCR-ABL⁺ (GOTOH *et al.*, 1995; SALGIA *et al.*, 1995). Outras moléculas que também são fosforiladas por BCR-ABL, incluindo a CRKL, paxilina, vinculina e tanilina (SATTler e SALGIA, 1997).

1.2.5.2 Proliferação

Várias vias de sinalização mitóticas são induzidas por BCR-ABL. Entre elas, podem ser destacadas as vias de RAS e proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K), de janus quinase (JAK) e fatores de transcrição ativados pela transdução de sinais (STAT), JAK-STAT, e via de MYC.

1.2.5.2.1 Via de RAS/MAPK

A proteína RAS fica localizada na superfície interna da membrana plasmática e faz a transdução dos sinais extracelulares. Esta via inicia-se, por exemplo, a partir da ligação de fatores de crescimento no respectivo receptor causando a dimerização deste receptor.

A proteína BCR-ABL é capaz de ativar RAS por meio das moléculas adaptadoras, tais como a proteína 2 ligada a receptor de fator de crescimento, denominada GRB-2, CRKL e

proteína com domínio SH2, chamada de proteína SHC (MATSUGUCHI *et al.*, 1995). A GRB-2 interage com o domínio de SH2 de BCR-ABL, disponível quando o resíduo 177 de tirosina está autofosforilado (PENDERGAST *et al.*, 1993). Quando isto ocorre, o GRB-2 se liga tanto à proteína “son of sevenless” (SOS) que atua como fator de troca de nucleotídeos de guanina (GEF) formando um complexo BCR-ABL-GRB-2-SOS-RAS que ativa RAS (MATSUGUCHI *et al.*, 1995), quanto à proteína adaptadora GAB2 que ativa a via de PI3-K (SATTLER e SALGIA, 1997).

As outras duas moléculas adaptadoras, CRKL e SHC também podem ativar RAS (ERNST *et al.*, 1994; GOTOH *et al.*, 1995). A importância de CRKL, na ativação de RAS, tem sido discutida uma vez que a ligação direta desta proteína a BCR-ABL não foi necessária para obter a transformação de células mielóides (HEANEY *et al.*, 1997).

O principal alvo do RAS ativado (RAS-GTP) é a MAPK. O primeiro componente da via MAPK ao qual RAS se liga é a serina treonina quinase RAF-1, que por sua vez cataliza a fosforilação de quinases reguladas por quinases ativadas por sinais mitóticos e sinais extracelulares 1 e 2 (MEK 1 e MEK 2) e ERK. Além de ativar ERK, esta via de RAS-MAPK ativada por BCR-ABL, também ativa quinases c-JUN N-terminal (JNK), e quinases ativadas por estresse (SAPK), culminando na fosforilação e ativação de fatores de transcrição de genes (CAHILL *et al.*, 1996).

A via de RAS tem um papel fundamental na transmissão de sinais mitóticos recebidos por receptores de tirosina-quinase (WOOD *et al.*, 1992), além de ser um componente importante na sinalização por fatores de crescimento (REBOLLO e MARTINEZ, 1999) (VARTICOVSKI *et al.*, 1991), afetando os processos de proliferação, sobrevivência e diferenciação (ULKU e DER, 2003).

Diferentes trabalhos mostraram que linhagens Ph⁺ e células primárias de pacientes com LMC, ao serem tratadas com anti-senso para RAS ou construções dominante-negativas de RAS, exibiam uma inibição da proliferação (SAWYERS *et al.*, 1995). Dados obtidos recentemente, utilizando o mutante dominante negativo de RAS, N17 H-RAS, capaz de inibir as três principais isoformas de RAS, indicaram que esta molécula é um alvo crítico para a patogênese de CML causada pelo BCR-ABL. Isto porque o N17-RAS atenuou o desenvolvimento da LMC em camundongos (BAUM e REN, 2008).

1.2.5.2.2 Via de PI3-K

A enzima PI3-K fosforila os fosfatídídeos da posição 3' do anel do inositol. A sinalização via PI3-K desempenha um papel importante nos processos de sobrevivência, proliferação, diferenciação, metabolismo entre outros (KHARAS e FRUMAN, 2005).

Esta ativação, por BCR-ABL, pode ocorrer, supostamente, por três vias diferentes (KHARAS e FRUMAN, 2005). A melhor caracterizada e estudada é a via que inclui o complexo GRB2-GAB2 (SATTTLER e SALGIA, 1997). BCR-ABL associa-se a esse complexo, fosforilando GAB2, permitindo desta forma a ligação de PI3-K. A ativação desta enzima produz moléculas de fosfatidilinositol-3, 4, 5 trifosfato (PIP3) que se acumulam em células BCR-ABL⁺ (VARTICOVSKI *et al.*, 1991). Este produto de PI3-K recruta e ativa proteínas efetoras, por exemplo, AKT (KHARAS e FRUMAN, 2005). O aumento de PIP3 pode ser obtido não apenas pela ativação de sua síntese como também pela diminuição de sua degradação. De fato, a expressão da fosfatase SHIP1 é inibida por BCR-ABL (SATTTLER *et al.*, 2001). Além disso, camundongos deficientes em SHIP1 desenvolvem uma doença semelhante à LMC (HELGASON *et al.*, 1998).

Estudos mais recentes, sugerem uma via de ativação alternativa, ainda controversa, por meio de membros da família SRC, do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) ou RAS. Isto porque, o uso de Dasatinibe, o inibidor de SRC e ABL, foi capaz de anular a resistência de células BCR-ABL⁺ resistentes ao tratamento com imatinibe (SHAH *et al.*, 2004). Além disso, pesquisas realizadas em camundongos mostraram que animais deficientes em LYN/HCK/FGR, três membros da família SRC, são resistentes à transformação maligna linfóide induzida por BCR-ABL, mas não à mielóide (HU *et al.*, 2004).

O IRS-1 é um importante mediador de ativação de PI3-K após estímulo dos receptores de insulina, fator de crescimento e citocinas. Este último tipo de receptor é fosforilado, de forma dependente de BCR-ABL, via IRS-1, em células que expressam esse oncogene, participando da ativação de PI3-K (TRAINA *et al.*, 2003).

A importância de PI3K ficou clara com os dados que mostram que sua inibição bloqueia a proliferação em células BCR-ABL dependentes (SKORSKI *et al.*, 1995). Além disso, camundongos deficientes nos genes *PIK3R1* e *PIK3R*, que codificam isoformas de

PI3K da classe 1A, impediram a transformação, bloqueando a leucemogênese induzida por BCR-ABL (KHARAS *et al.*, 2008).

Ainda nessa via de ativação de PI3-K, outra molécula relevante é a proteína AKT. Sua importância ficou clara em um modelo murino, utilizando um mutante dominante negativo de AKT, no qual foi observado que sem esta molécula, não há transformação de células da medula óssea (SKORSKI *et al.*, 1997).

1.2.5.2.3 Via de JAK/STAT

A interação de citocinas com receptores de superfície de membrana iniciam cascatas de sinalização que promovem a proliferação e divisão celular, mas inibem as vias de apoptose (BLALOCK *et al.*, 1999). O fator estimulador de crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e a IL-3 são duas citocinas importantes na regulação da proliferação e diferenciação de células mielóides (BAINES *et al.*, 1994). A via de sinalização JAK/STAT, iniciada por essa interação, é constituída por membros da família de Janus (JAK), tirosina-quinases e STAT que fazem a transmissão do sinal do receptor chegar até o núcleo, ativando a transcrição de genes (TAO *et al.*, 2008).

Algumas evidências apontam uma possível ativação da via de JAK/STAT por BCR-ABL. Por exemplo, em 1990, de Groot e cols. conseguiram mostrar que STAT5 desempenha um papel importante na transformação celular induzida por BCR-ABL, uma vez que o uso de dominante negativo STAT5 prejudicou o desenvolvimento destas células em “soft” ágar, uma característica adquirida na transformação (DE GROOT *et al.*, 1999). Além disso, linhagens hematopoéticas transformadas por BCR-ABL apresentam ativação constitutiva de STAT1, STAT3, mas principalmente STAT5. Estes dados foram reforçados pelo trabalho mais amplo de Chai e cols. que mostraram além da ativação constitutiva de STAT5, a ativação de JAK em um maior número de linhagens BCR-ABL positivas e células obtidas de sangue de pacientes com LMC (CHAI *et al.*, 1997).

Recentemente, foi demonstrado que a transformação mediada por BCR-ABL em fibroblastos murinos primários NIH 3T3 requer ativação da via JAK2/STAT5 via receptor de IL-3 (TAO *et al.*, 2008). No entanto, parece contraditório que STAT5 não seja necessário na indução de leucemia por BCR-ABL, em camundongos (SEXL *et al.*, 2000).

1.2.5.2.4 Via de MYC

Em 1997, Sawyers e cols. mostraram que este fator de transcrição é imprescindível para a transformação causada por BCR-ABL (SAWYERS *et al.*, 1992). Apesar de alguns alvos deste proto-oncogene terem sido relacionados aos processos de apoptose e ciclo celular, muitos permanecem desconhecidos (MENSSEN e HERMEKING, 2002).

Por estar expresso em diversos tipos de tumores, MYC é considerado um proto-oncogene. Foi observado, em 1998, que os domínios SH2 (AFAR *et al.*, 1994) e c-terminal (OKUDA *et al.*, 1998), presentes no BCR-ABL, são importantes para a ativação de MYC. Além disso, JAK2 parece contribuir para o aumento de MYC pela indução de RNAm deste proto-oncogene e por dar maior estabilidade a proteína de transcrição de MYC, protegendo-a da degradação proteossomal (XIE *et al.*, 2002).

1.2.5.3 Apoptose

A habilidade de expansão de um determinado tumor não depende apenas do índice de proliferação, mas também da taxa de morte das células tumorais, principalmente por apoptose (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Na LMC, não é diferente, e acredita-se que a inibição da apoptose mediada pelo BCR-ABL pode contribuir para o desenvolvimento da hiperplasia observada nos pacientes que estão na fase crônica desta doença (LANEUVILLE *et al.*, 1994).

A apoptose é um processo organizado e controlado molecularmente, sendo, por esse motivo, também chamado de morte celular programada. Este fenômeno é caracterizado pela condensação da cromatina, degradação do DNA genômico em fragmentos oligonucleosomais, perda de volume com aumento da granulosidade celular, manutenção da estrutura das organelas e formação de pregas citoplasmáticas que dão origem aos corpos apoptóticos (WYLLIE *et al.*, 1980).

Didaticamente, este tipo de morte celular pode ser dividido em quatro fases (AMARANTE-MENDES e GREEN, 1999). Na primeira, ocorre a transdução de danos físicos ou químicos, em sinais de estresse que, em geral, convergem para o conjunto de mitocôndrias. Estas exercem um papel fundamental, atuando como sensores, monitorando o

ambiente intra e extracelular. É nas mitocôndrias que esses sinais de estresse são avaliados e, dependendo, principalmente da intensidade do estímulo e da razão entre membros pró e anti-apoptóticos da família BCL-2, estes sinais resultarão na liberação de fatores apoptogênicos da mitocôndria para o citosol. Na etapa seguinte, as moléculas liberadas pela mitocôndria, como por exemplo, citocromo c, AIF e SMAC/DIABLO, iniciam uma cascata bioquímica que envolve a ativação de certos membros de uma família de cisteíno-proteases, denominadas caspases, as quais são as responsáveis diretas pelas características morfológicas e bioquímicas da morte celular programada ou apoptose. Por último, essas células em apoptose são reconhecidas e eliminadas por fagócitos ou células adjacentes (GREEN e AMARANTE-MENDES, 1998; AMARANTE-MENDES e GREEN, 1999).

Entre os sinais de estresse que ativam a maquinaria apoptótica, podem ser destacados a falta de fatores de crescimento, danos no DNA e ligantes de receptores de morte (ELLIS *et al.*, 1991). Os sinais de estresse podem ativar a apoptose por duas vias. A extrínseca, induzida por ligantes de receptores de morte da família dos fatores de necrose tumoral (“Tumor Necrosis Factor”, TNF), e a via intrínseca iniciada, por exemplo, por danos no DNA, cujo sinal é dirigido diretamente à mitocôndria (IGNEY e KRAMMER, 2002a).

A observação de que BCR-ABL estaria protegendo as células da apoptose induzida pela ausência de sinais mediados por fatores de crescimento, foi feita inicialmente em culturas primárias murinas e humanas. Em 1988, foi observado que as células de medula óssea infectadas por retrovírus e, com a construção que continha a forma p210 de BCR-ABL adquiriam uma independência a fatores de crescimento, apesar de não haver aumento na quantidade de IL-3 produzida (DALEY e BALTIMORE, 1988). Por outro lado, na linhagem hematopoética M07E, a expressão dessa isoforma, conferiu resistência a ausência de fatores de crescimento, atribuída a um mecanismo autócrino, resultando em maior secreção de fatores de crescimento, tais como IL-3 e GM-CSF (SIRARD *et al.*, 1994). No mesmo ano, foi verificado que a capacidade de induzir o aumento de sobrevivência nas células mantidas em cultura na ausência de fatores de crescimento é, pelo menos na linhagem Ba/F3, dependente de atividade tirosina-quinase (KABAROWSKI *et al.*, 1994).

Alguns anos mais tarde, foi sugerida a existência de uma hierarquia dose-dependente nos efeitos biológicos causados por BCR-ABL. Enquanto uma baixa expressão deste oncogene seria suficiente para proteger as células da privação de fatores de crescimento,

apenas níveis mais elevados seriam capazes de evitar a morte celular induzida por outros estímulos apoptóticos, como, por exemplo, o tratamento com estaurosporina, um inibidor de quinases (CAMBIER *et al.*, 1998). Apesar de pouco conhecidas, sabe-se que algumas das vias de sinalização induzidas pela atividade tirosina-quinase de BCR-ABL são semelhantes às vias desencadeadas por fatores de crescimento (SATTLER e SALGIA, 1997).

A expressão de BCR-ABL não causa apenas uma diminuição na susceptibilidade contra a ausência de fatores de crescimento, mas também contra outros estímulos apoptóticos, tais como a indução de danos no DNA, inibidores de proteínas, alterações no citoesqueleto, entre outros (BRUMATTI *et al.*, 2003).

O estudo sobre a resistência à apoptose adquirida pelas células que expressam BCR-ABL ganhou importância com a verificação de que a expansão clonal na LMC se deve principalmente à inibição da morte celular e não a uma desregulação da proliferação (BEDI *et al.*, 1994). Nesse mesmo ano, McGahon e cols., obtiveram dados que corroboraram essa idéia. Eles observaram que as células da linhagem K562 derivada de um paciente com leucemia mielóide crônica perderam a resistência a apoptose ao serem tratadas com oligonucleotídeos anti-senso específicos para *BCR-ABL* que impediram a transcrição do oncogene (MCGAHON *et al.*, 1994). No entanto, dados contrários foram obtidos por Gordon e cols. e Amos e cols.. Estes dois grupos não observaram nenhuma diferença na apoptose dos clones obtidos de pacientes com CML e indivíduos saudáveis (GORDON *et al.*, 1999) (AMOS *et al.*, 1995). Nos anos seguintes, mais trabalhos mostraram o aumento da proteção contra a apoptose, mediada por BCR-ABL, em modelos utilizando linhagens derivadas de pacientes como em células transformadas, nas quais a expressão de *BCR-ABL* foi induzida (CORTEZ *et al.*, 1995; NISHII *et al.*, 1996; AMARANTE-MENDES *et al.*, 1998a). Atualmente, a contribuição de BCR-ABL na resistência a apoptose é mais aceita.

Cortez e cols., 1995, investigaram a participação dos motivos estruturais essenciais para o desempenho das funções deste oncogene, utilizando para tanto, construções de mutantes de BCR-ABL. A expressão de moléculas contendo apenas a substituição de um aminoácido na posição do sítio de GRB2 (Y177F), no domínio de SH2 (R552L), ou no sítio de autofosforilação do domínio de tirosina-quinase (Y793F) não causou alteração na transformação de células hematopoéticas (CORTEZ *et al.*, 1995). No entanto, a presença simultânea destas três mutações teve grande impacto, diminuindo tanto a capacidade de

transformação maligna destas células quanto a resistência à apoptose mediada por BCR-ABL, sugerindo que esta molécula atua em várias vias ao mesmo tempo e esta ativação concomitante é necessária para a sua habilidade de transformação e de conferir resistência à apoptose (CORTEZ *et al.*, 1995).

Na busca pela compreensão dos mecanismos de BCR-ABL envolvidos no processo de transformação e resistência à apoptose de células hematopoéticas, alguns trabalhos focaram a investigação nos membros apoptóticos e anti-apoptóticos da família BCL-2 que atuam na mitocôndria, principal ponto de regulação da morte celular. De fato, Sanchez-Garcia e Grutz, 1995, mostraram que a expressão de BCR-ABL na linhagem hematopoética murina Ba/F3 induzia a expressão da molécula anti-apoptótica BCL-2, tornando esta linhagem independente de fator de crescimento e capaz de formar tumores quando inoculada em camundongos. A importância de BCL-2 foi comprovada pela reversão dessas alterações fisiológicas ao incubar as células com anti-senso de BCL-2 (SANCHEZ-GARCIA e GRUTZ, 1995). Em contraste, nosso grupo de pesquisa constatou, ao introduzir o *BCR-ABL* na linhagem humana pró-mielocítica HL-60, o aumento de BCL-xL, outro membro anti-apoptótico da família BCL-2, mas não de BCL-2, cuja expressão, estava inclusive diminuída em relação à linhagem infectada com o vetor vazio (AMARANTE-MENDES *et al.*, 1998b). Dois anos depois, foi descrito que a atividade tirosina-quinase de BCR-ABL era responsável pela ativação de STAT5 que interage com o promotor de BCL-xL elevando os níveis deste gene (HORITA *et al.*, 2000). Assim, o principal mecanismo de inibição da apoptose por BCR-ABL parece atuar ao nível mitocondrial. Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa contribuiu para confirmação desta idéia ao mostrar que esta proteína bloqueava a liberação de citocromo c, sob diversos estímulos apoptóticos, impedindo, conseqüentemente, a ativação das caspases executoras (AMARANTE-MENDES *et al.*, 1997b; AMARANTE-MENDES *et al.*, 1998a; AMARANTE-MENDES *et al.*, 1998c).

Vale ressaltar dentre outras, duas evidências que apontam para a existência de mecanismos adicionais responsáveis pela proteção contra estímulos apoptóticos. Uma delas está baseada no estudo comparativo entre as linhagens HL-60 transfectadas com os genes *BCL-2*, *BCL-xL* e *BCR-ABL*, mostrando que a linhagem que expressa BCR-ABL tem uma resistência maior a diversos estímulos apoptóticos, quando comparada às células que superexpressam BCL-2 ou BCL-xL (BRUMATTI *et al.*, 2003). A outra reside no fato de que o tratamento com anti-senso para *BCL-xL*, nas células que tiveram esse gene aumentado ao

superexpressar *BCR-ABL*, não foi capaz de abolir a resistência conferida por esse oncogene (AMARANTE-MENDES *et al.*, 1998b).

Na última década, foram descritas diversas moléculas moduladas ou alteradas por BCR-ABL que parecem contribuir com a aquisição de resistência à apoptose. Entre elas, BAD, uma proteína anti-apoptótica, que ao ser fosforilada pelas quinases AKT e RAF, se torna inativa (DEL PESO *et al.*, 1997). Foi relatada, em 2000, a fosforilação de BAD em células hematopoéticas que expressavam BCR-ABL (NESHAT *et al.*, 2000). Por meio do inibidor específico de PI3K e da infecção das células com retrovírus contendo construções dominante-negativas de AKT, RAF e RAS e ERK, e inibindo, portanto, a expressão dos respectivos genes, os autores mostraram que essa fosforilação ocorre de forma dependente de PI3K, AKT, RAF e RAS, mas não de ERK (NESHAT *et al.*, 2000). Além disso, a expressão de BCR-ABL protegeu as células de expressões mais altas de BAD (NESHAT *et al.*, 2000).

Outra molécula que parece participar do mecanismo de sobrevivência mediado por BCR-ABL é o fator de transcrição da família de reguladores de interferon, a “interferon consensus sequence-binding protein” (ICSBP). Sua importância nas células mielóides foi inicialmente determinada em camundongos deficientes em ICBSP, uma vez que a taxa de apoptose espontânea e a sensibilidade a danos no DNA nas células desses camundongos foi menor do que em células de camundongos selvagens (GABRIELE *et al.*, 1999). A redução da expressão deste fator de transcrição e seu efeito supressor de tumor foram verificados, um ano mais tarde, em um modelo experimental murino induzido por BCR-ABL e cuja doença se assemelha à LMC (HAO e REN, 2000).

Mais recentemente, foram descritos outros potenciais alvos de BCR-ABL. A survivina, membro da família das proteínas inibidoras de apoptose (IAP), é mais uma das moléculas com expressão aumentada por BCR-ABL. O silenciamento de sua expressão gênica torna as células BCR-ABL positivas mais susceptíveis ao tratamento com mesilato de imatinibe e estímulos apoptóticos da via mitocondrial, mas não da via extrínseca (WANG *et al.*, 2005). Outro trabalho mostrou que a expressão da glicoproteína osteopontina (OPN) também se eleva ao induzir a expressão de BCR-ABL em células da linhagem 32D de forma dependente de tirosina-quinase, por meio da ativação da via de RAS/RAF-1/PI3K/MAPK (HICKEY *et al.*, 2005). A proteína MCL-1, membro da família BCL-2, é mais um dos alvos de BCR-ABL cuja expressão também é induzida pela ativação da via de RAS/RAF-

1/PI3K/MAPK, mesma via que ativa OPN (AICHBERGER *et al.*, 2005). Além de mostrar o aumento da expressão em células CML primárias, os autores verificaram que o tratamento das células com oligonucleotídeos anti-senso específicos para MCL-1, diminui a expressão desse gene causando a inibição do crescimento e viabilidade das células de LMC (AICHBERGER *et al.*, 2005).

É interessante destacar que a própria molécula de BCR-ABL pode promover a apoptose das células, ao ser translocada para o núcleo (VIGNERI e WANG, 2001). Nesse sentido terapias que visem a translocação podem ser uma estratégia opcional de tratamento para indução de apoptose nas células BCR-ABL positivas.

Evidências apontam para uma dependência completa da capacidade transformante deste oncogene com a sua atividade tirosina-quinase (CORTEZ *et al.*, 1995). Entretanto, foi proposto recentemente que parte do efeito anti-apoptótico parece ser independente da atividade quinase de BCR-ABL, ou pelo menos, ocorre na ausência desta atividade e da conseqüente manutenção de substratos fosforilados em tirosina (BUENO-DA-SILVA *et al.*, 2003).

Apesar do número de estudos realizados, ainda permanece grande a busca por alvos terapêuticos que possam ser utilizados em conjunto com os quimioterápicos já utilizados no momento, com o intuito de melhorar a eliminação das células tumorais.

Nesse sentido, as galectinas podem ser um alvo interessante por duas razões. Primeiro, a expressão de várias galectinas foi associada a uma maior agressividade em diferentes tipos de tumores sólidos. Em segundo lugar, pela interessante semelhança entre as propriedades biológicas das galectinas e as descritas para BCR-ABL.

1.3 Galectinas

As galectinas são proteínas solúveis pertencentes a uma família de lectinas animais. As galectinas apresentam um domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD) com regiões de consenso conservadas e cujo sítio de ligação tem especificidade por β -galactosídeos. Os ancestrais das galectinas encontram-se presente desde fungos, esponjas e nemátodos, até mamíferos. Já foram identificados, nestes últimos organismos 15 tipos de galectinas, as quais

apresentam distintas estruturas primárias (COOPER e BARONDES, 1999; YANG *et al.*, 2008). Isto é, apesar de todos os membros possuírem o domínio CRD, estes possuem diferenças em sua organização.

As galectinas estão divididas em três grupos de acordo com sua estrutura e número de CRDs. Estas podem existir como monômeros ou homodímeros não covalentes de CRD (galectina-1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 15), como quimeras compostas por um CRD ligado a um domínio diferente de lectina (galectina-3), e finalmente como repetições em série (*in tandem*) de dois CRDs diferentes numa única cadeia polipeptídica (galectina-4, 6, 8, 9 e 12) (HIRABAYASHI *et al.*, 2002) (Figura 6).

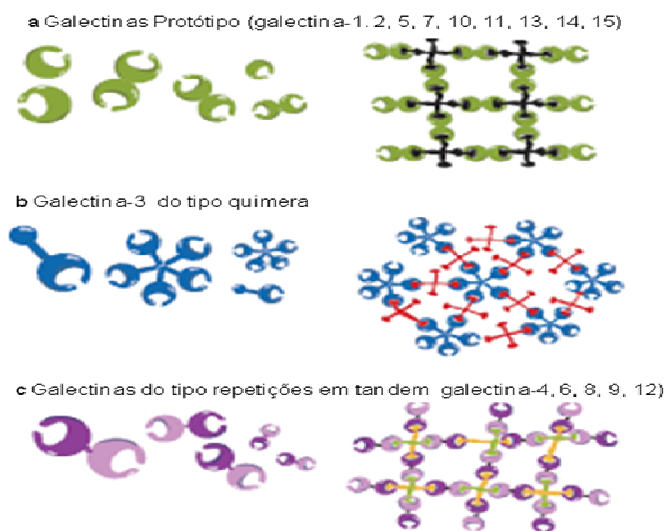


Figura 6 - Tipos de estrutura das galectinas e formação de redes entre galectinas e carboidratos multivalentes. a) Monômeros e dímeros de galectinas do tipo protótipo que possuem apenas um domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD) do lado esquerdo, e exemplo de rede estabelecida entre galectinas (verde) e carboidratos (preto) do lado direito. b) Monômeros e pentâmeros da galectina-3, com estrutura do tipo quimera do lado esquerdo, e exemplo de rede formada entre galectina-3 (azul) e carboidratos multivalentes (vermelho). c) Monômeros de galectinas com repetições em tandem de CRDs diferentes e, portanto, com dois CRDs do lado esquerdo e um exemplo de rede formada entre esse tipo de galectina (roxo) e carboidratos (amarelo) multivalentes do lado direito.

FONTE: Adaptada de Yang R., *et al.*, 2008.

As galectinas variam em diversos aspectos, sendo a valência dos domínios de reconhecimento a carboidratos, um deles. A maioria destas proteínas é bivalente ou multivalente. Exemplificando, as galectinas em estrutura em *tandem*, por possuírem dois CRD já são todas, no mínimo bivalentes. Entre aquelas do tipo protótipo, que possuem um CRD, algumas são bivalentes e a galectina-3 foi observada na forma pentamérica quando ligada a carboidratos multivalentes (AHMAD *et al.*, 2004). Esta característica das galectinas lhes

permite formar redes mixtas entre estas proteínas e carboidratos multivalentes (SACCHETTINI *et al.*, 2001) (Figura 6).

A conservação destas proteínas ao longo da evolução e sua ampla distribuição nos tecidos são dois indícios de sua importância. Este fato tem sido comprovado por numerosos estudos que descreveram a sua participação em processos fisiológicos, participando da modulação da proliferação, apoptose, adesão, migração em vários tipos celulares, incluindo células do sistema imune e células tumorais (HSU e LIU, 2004).

As galectinas são sintetizadas nos ribossomos do citoplasma e desempenham funções intracelulares que diferem quando presentes no citosol ou no núcleo (LIU *et al.*, 2002; HSU e LIU, 2004; NORLING *et al.*, 2009). Apesar das galectinas não possuírem uma sequência sinalizadora clássica que permite sua secreção, estas proteínas podem ser secretadas, passando a exercer outras funções, sejam extracelulares, autócrinas ou parácrinas e que dependem, por sua vez, das proteínas de superfície presentes na célula (HSU e LIU, 2004; ELOLA *et al.*, 2007). Por um lado a capacidade de se ligar e promover o agrupamento (“cluster”) de receptores de superfície da célula, ativando esses receptores e desencadeando a sinalização intracelular assim como a de interagir com moléculas da matriz extracelular ocorre de forma dependente da ligação de carboidratos ao CRD presente nas galectinas (OCHIENG *et al.*, 2004; HE e BAUM, 2006a; ELOLA *et al.*, 2007; RABINOVICH *et al.*, 2007a). Por outro lado, é interessante notar que a atuação intracelular destes tipos de lectina não parece depender da sua habilidade de se ligar a carboidratos (LIU *et al.*, 2002; NAKAHARA e RAZ, 2006).

Destaco, nesta oportunidade, as galectinas-1 (*LGALS1*) e -3 (*LGALS3*), por serem o foco deste estudo. No entanto, a grande maioria dos resultados obtidos neste trabalho está relacionada à galectina-1 e, portanto esta molécula foi descrita com muito mais detalhe.

1.3.1 Galectina-1 e câncer

Em 1994, foi descrita a estrutura de dímeros de galectina-1 cristalizada que consiste em um sanduíche- β de 22 fitas antiparalelas (BARONDES *et al.*, 1994; LIAO *et al.*, 1994). Assim como outras galectinas, este tipo de lectina é secretado, entretanto, o mecanismo permanece desconhecido. Um trabalho recente trouxe novas informações a esse respeito.

Clones da linhagem CHO (“chinese hamster ovary”) que expressavam proteínas recombinantes de galectina-1, apresentando diferentes mutações pontuais na região de reconhecimento a carboidratos, tiveram a secreção desta lectina prejudicada (SEELENMEYER *et al.*, 2005). Além disso, os autores obtiveram linhagens que expressam a forma selvagem de galectina-1, a partir do clone 13 (BRILES *et al.*, 1977), um mutante de CHO, cujo transportador de UDP-galactose do aparelho de Golgi é deficiente, e, portanto sem β -galactosídeos no açúcar dos receptores glicoprotéicos ou glicolipídicos de galectina-1. Neste caso, a secreção também ficou deficiente. Em conjunto, esses dados sugerem que a sequência alvo responsável pela secreção é o CRD e sugerem que os receptores de galectina-1 poderiam atuar de forma intracelular, participando no recrutamento das galectinas citoplasmáticas para uma via de exportação alternativa; ou extracelular, exercendo uma força que promove o transporte direcional através da membrana plasmática (SEELENMEYER *et al.*, 2005). Este mesmo grupo demonstrou, no ano passado, ao utilizar um inibidor de formação de vesículas na membrana plasmática, que a exportação de galectina-1 não ocorria por meio da liberação dessas vesículas para o meio extracelular (SEELENMEYER *et al.*, 2008).

Vale a pena ressaltar que devido à sua característica de ligar-se a glicoconjugados presentes na superfície celular, a função da galectina-1 varia de acordo com o repertório exposto de moléculas glicosiladas. Esta exposição, por sua vez, pode sofrer alterações segundo o estado de ativação e/ou diferenciação da célula (RABINOVICH *et al.*, 2002). Sendo assim, essa proteína possui propriedades paradoxais que podem variar de acordo com o tipo celular, localização e/ou concentração (SCOTT e WEINBERG, 2004).

A galectina-1 possui uma vasta distribuição, encontrando-se expressa em tecidos imunoprivilegiados (RABINOVICH, 1999a; DETTIN *et al.*, 2003; ISHIDA *et al.*, 2003) e diferentes tipos celulares, dentre eles, células epiteliais do timo, células endoteliais, células do estroma do timo e da medula óssea, macrófagos e linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ (PERILLO *et al.*, 1995; BLASER *et al.*, 1998; GAUTHIER *et al.*, 2002; HE e BAUM, 2004; BAUM e REN, 2008). Além disso, um aumento na expressão desta galectina foi observado em determinados tipos de tumores, como por exemplo, no câncer de cólon, mama, bexiga, carcinomas de ovário e de próstata (DANGUY *et al.*, 2002).

O acúmulo de alterações na adesão, proliferação, apoptose e migração em células normais resulta na transformação neoplásica e conseqüentemente no desenvolvimento do tumor (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000). É importante ressaltar neste momento que os efeitos de algumas galectinas, dentre elas a galectina-1 e galectina-3 (descritas, respectivamente, nas seções 1.3.1 e 1.3.2), abrangem todos esses processos fisiológicos (LIU e RABINOVICH, 2005).

1.3.1.1 Transformação, proliferação e apoptose

Os mecanismos pelos quais a galectina-1 leva a transformação maligna não foram esclarecidos até o momento, mas foi relatado que esta molécula, quando presente no citoplasma, é capaz de interagir com forma oncogênica de RAS, o H-RAS dependente do CRD, já que a adição de lactose, um inibidor competitivo inespecífico de galectinas, inibe esse efeito (PAZ *et al.*, 2001). Os autores desse estudo mostraram que a ligação de H-RAS-GTP à galectina-1 é essencial para a ancoragem de H-RAS na membrana celular e às atividades que dependem desta ancoragem uma vez que a superexpressão de galectina-1 aumenta o número de moléculas associadas à membrana celular assim como a transformação das células (PAZ *et al.*, 2001). Além disso, o incremento na duração do sinal da via de RAS por meio da via RAF-1 e ERK sugerem que a ativação dessa via seria a responsável pela transformação destas células (PAZ *et al.*, 2001) (ELAD-SFADIA *et al.*, 2002).

Como explicado anteriormente, dados da literatura mostram que a galectina-1 pode inibir ou promover a proliferação de acordo com a sua localização na célula, tipo celular e até mesmo concentração (SCOTT e WEINBERG, 2004). Em células de glioma de rato transfectadas a galectina-1 induz a proliferação já que o uso de cDNA anti-senso para esta lectina promoveu uma parada no ciclo celular (YAMAOKA *et al.*, 2000). Em contraposição, a exposição de células de neuroblastoma a galectina-1 exógena inibiu sua multiplicação (KOPITZ *et al.*, 2001). Nas células tumorais de Leydig, ambos os efeitos foram observados. Em altas concentrações a galectina-1 exógena bloqueia a proliferação, enquanto baixas doses estimulam a mitose (BIRON *et al.*, 2006).

A maioria dos trabalhos sobre galectina-1 e apoptose está concentrada nos linfócitos T, mas alguns trabalhos relataram uma modulação da morte celular em células tumorais pela

galectina-1. Na linhagem de câncer de próstata LNCaP, por exemplo, a transfecção destas células com o vetor contendo o gene *LGALS1*, resultou em bloqueio da proliferação e aumento da taxa de apoptose (ELLERHORST *et al.*, 1999). Alguns anos mais tarde, Horiguchi e cols., observaram que a expressão de galectina-1 nas células de carcinoma de cólon, Colo201 induziu a apoptose dessas células, enquanto a adição exógena desta lectina não teve efeito. (HORIGUCHI *et al.*, 2003).

Um dos aspectos que determina a agressividade do tumor é a formação de metástases, um processo que envolve várias etapas. Acredita-se que a sequência de eventos fisiológicos que devem ocorrer para que ocorram as metástases envolve inicialmente o desprendimento das células do tumor primário, migração, invasão de outro tecido, sobrevivência nesse tecido, proliferação, angiogênese e escape do sistema imunológico (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000; GEHO *et al.*, 2005; PRENDERGAST e JAFFEE, 2007). É importante destacar, mais uma vez, que a galectina-1 tem participação em todos esses processos, os quais foram descritos nas seções 1.3.1.1 e 1.3.2.1.

1.3.1.2 Adesão

Alterações na adesão entre as células e entre células e matriz extracelular devem ocorrer para que as células adquiram potencial metastático, possibilitando que as células se desprendam do tecido de origem e se prendam a células endoteliais de outro tecido mais distante. De fato, foi constatada em diferentes situações uma correlação entre perda de adesão entre as células e aumento na capacidade invasiva e metastática de tumores (HOOD e CHERESH, 2002).

As galectinas são capazes de ligar-se a glicoproteínas presentes na superfície de membrana ou matriz extracelular. A galectina-1, por exemplo, se liga a laminina (ZHOU e CUMMINGS, 1993) e a proteína ligante humana MAC-2 (TINARI *et al.*, 2001), proteínas da matriz extracelular e $\alpha 7\beta 1$ integrina (GU *et al.*, 1994) e $\alpha M\beta 2$ -integrina (AVNI *et al.*, 1998) presentes na superfície de mioblastos e macrófagos, respectivamente. A existência dessas interações indicava que as galectinas poderiam ter algum efeito sobre a adesão intercelular e entre célula e matriz extracelular. Isto foi comprovado por estudos *in vitro*, ao mostrarem que galectina-1 aumenta a adesão de glicoproteínas da matriz extracelular e células de tumor de

próstata (ELLERHORST *et al.*, 1999) ovário (SKRINCOSKY *et al.*, 1993) e melanoma (VAN DEN BRULE *et al.*, 1995). Entretanto, os fatores que determinam o efeito de galectina-1 ainda não foram esclarecidos.

Em conjunto, a modulação da aderência mediada pela galectina-1, observada em estudos *in vitro*, assim como sua capacidade de interagir com integrinas, moléculas importantes em tumores metastático, sugerem que esta lectina poderia contribuir para a aquisição do potencial metastático.

1.3.1.3 Invasão

As células tumorais devem ser capazes de migrar para poderem invadir outros tecidos. Nesse sentido, foi constatado que a expressão de galectina-1 estava correlacionada com o grau de astrocitoma, um tipo de tumor cerebral. E, dentro dos astrocitomas com maior grau, foi detectada uma quantidade maior de galectina-1 nos pacientes que apresentavam menor sobrevida. Além disso, ao transplantar glioblastoma humanos em camundongos, houve maior presença de galectina-1 nas regiões mais invasivas desses tumores (RORIVE *et al.*, 2001). Os autores desse estudo mostraram também que os astrócitos U373, quando incubados em placas com galectina-1 aderida, apresentavam maior mobilidade do que as células mantidas em placas sem tratamento (RORIVE *et al.*, 2001). E, no ano seguinte, o mesmo grupo de pesquisa mostrou dois dados importantes. Primeiro, a inibição da expressão de galectina-1 endógena dos astrócitos U373 posteriormente enxertados em camundongos “nude”, promoveu maior sobrevida quando comparado com os camundongos que receberam os astrócitos com expressão constitutiva de galectina-1. Segundo, os efeitos de galectina-1 na mobilidade desses astrócitos estava relacionada com alterações na organização do citoesqueleto de actina e aumento da expressão de RhoA GTPases (CAMBY *et al.*, 2002). Resultados semelhantes foram obtidos por Jung e cols. no ano passado, em linhagens celulares de glioblastoma multiforme humano. A expressão de galectina-1 estava positivamente correlacionada com a capacidade de migração e invasão nessas linhagens (JUNG *et al.*, 2008). Esses estudos sugerem que a galectina-1 poderia estar envolvida com a capacidade migratória, mas são necessários mais estudos nesse campo para confirmar essa hipótese e também descobrir os mecanismos pelos quais isso ocorre.

1.3.1.4 Angiogênese

A angiogênese, o processo de formação de novos vasos, é uma etapa crítica no crescimento de tumores sólidos. Os primeiros estudos sobre o impacto de galectina-1 na angiogênese são recentes. Inicialmente, Thijssen e cols. (2006) demonstraram a interação entre galectina-1 e anginex, um peptídeo angiostático específico, desenvolvido anteriormente por seu grupo de pesquisa. Essa interação levou os autores a investigarem a importância de galectina-1 na angiogênese. Com esse intuito, eles verificaram que o silenciamento da expressão gênica de *LGALS1* inibiu tanto a proliferação como a migração de células endoteliais de cordão umbilical humano cultivadas, *in vitro* (THIJSEN *et al.*, 2006). Observaram também que o silenciamento de *LGALS1*, no estágio embrionário de peixe-zebra, resultou no crescimento de vasos disfuncionais. Por último, mostraram que camundongos deficientes nessa proteína tiveram o crescimento de tumores prejudicado sugerindo que a galectina-1 desempenha um papel importante na angiogênese (THIJSEN *et al.*, 2006).

1.3.1.5 Escape do sistema imune

As células tumorais, apesar de serem próprias do organismo, expressam antígenos tumorais que podem ser reconhecidos pelas células do sistema imune, com participação de linfócitos T e B entre outras (SOGN, 1998; GRAZIANO e FINN, 2005). No entanto, embora expressem esses antígenos que podem ser reconhecidos, as células tumorais muitas vezes não ativam a resposta imune e são, de certa forma, “toleradas” pelo organismo (IGNEY e KRAMMER, 2002b; RABINOVICH *et al.*, 2007b). São muitos os mecanismos responsáveis pelo escape da resposta imunológica de células tumorais, incluindo a eliminação de linfócitos T específicos, indução de sinais coestimuladores negativos e secreção de fatores imunossupressores (IGNEY e KRAMMER, 2002b; DRAKE *et al.*, 2006).

A galectina-1 atua de variadas formas sobre as células do sistema imune. Os principais estudos, no entanto, concentram-se nos efeitos causados nos linfócitos T. De fato, no que se refere às células do sistema imune, a galectina-1, adicionada de forma exógena, parece inibir a proliferação de linfócitos T ativados (RABINOVICH *et al.*, 1997; BLASER *et al.*, 1998) e

reduzir a expansão clonal de linfócitos T CD8⁺ (NOVELLI *et al.*, 1999). Em outras situações, entretanto, a galectina-1 induz a apoptose em linfócitos T ativados, células T leucêmicas e timócitos imaturos duplo negativos (PERILLO *et al.*, 1995; PERILLO *et al.*, 1997).

É interessante notar que as glicoproteínas identificadas como receptores de galectina-1, envolvidas tanto na indução de proliferação como de apoptose são as mesmas. Entre eles podem ser destacados o CD45, CD2, CD3, CD43 e CD7 (PACE *et al.*, 1999; PACE *et al.*, 2000; NGUYEN *et al.*, 2001; STILLMAN *et al.*, 2006). Esta aparente contradição foi explicada, em parte, por dados que mostraram que o estado de glicosilação de CD45 e a ausência da enzima 2β-1,6 N-acetilglucosaminiltransferase tornavam as células resistentes à galectina-1 exógena (NGUYEN *et al.*, 2001). Ou seja, a glicosilação dos receptores determinaria o efeito de galectina-1 nas células. De fato, foi comprovado, em outro modelo, que o padrão de glicosilação em linfócitos T auxiliares CD4⁺ do tipo Th1 e Th2 confere a estes dois tipos celulares, diferente susceptibilidade a apoptose (TOSCANO *et al.*, 2007). Enquanto os linfócitos Th1 são sensíveis, os linfócitos Th2 são resistentes à apoptose mediada por galectina-1 (TOSCANO *et al.*, 2007).

A galectina-1 também exerce um papel modulador na morte mediada pela ativação do receptor de morte FAS sensibilizando e aumentando a apoptose, respectivamente, em linfócitos T humanos “naïve” e ativados (MATARRESE *et al.*, 2005). Neste trabalho, foram relatados alguns eventos que contribuíram para a indução de apoptose, tais como ativação das caspases -8, -9 e -3, hiperpolarização da membrana mitocondrial, liberação de citocromo c além do surgimento de brotamentos e fissões nas mitocôndrias (MATARRESE *et al.*, 2005).

Recentemente, Brandt e cols., 2008, verificaram que a indução de apoptose mediada por galectina-1 podia ser inibida com o uso de inibidor específico de caspase-8 ou de anticorpo monoclonal neutralizante de FAS, sugerindo que esta lectina atuaria na via de receptores de morte de indução de apoptose. Este estudo identificou pela primeira vez o FAS como alvo de galectina-1 (BRANDT *et al.*, 2008). Fato que foi demonstrado por diferentes técnicas que compreenderam desde a marcação com imunofluorescência, indicando co-localização destas duas proteínas, como ensaio de ligação da galectina-1 ao receptor imobilizado, “immunoblotting” e até análise por espectrofotometria de massa por cromatografia-tandem líquida (BRANDT *et al.*, 2008).

Os eventos desencadeados pela adição de galectina-1 que induzem o processo apoptótico não estão bem estabelecidos e alguns são inclusive contraditórios. Em 2000, Rabinovich e cols. relataram a indução da atividade de ligação de DNA do fator de transcrição AP-1 e a diminuição da expressão de BCL-2 induzida pela concanavalina A, após o estímulo com galectina-1 (RABINOVICH *et al.*, 2000). Em linfócitos B de memória, esta proteína parece inibir a fosforilação de AKT, aumentando a expressão de BIM, um membro pró-apoptótico da família BCL-2, induzindo a apoptose destas células (TABRIZI *et al.*, 2009).

Recentemente, foi proposto por Rubinstein e cols. que a habilidade de promover apoptose em linfócitos T ativados corresponde a um dos mecanismos responsáveis pela evasão tumoral da resposta imune, ao verificarem que o bloqueio da expressão de galectina-1 em tumores promovia a eliminação deste tumor e o aumento de linfócitos T específicos a esse tumor (RUBINSTEIN *et al.*, 2004).

Outro mecanismo que parece colaborar para a evasão do sistema imune pelas células tumorais que expressam galectina-1, nesse estudo, se refere ao desvio do balanço Th1/Th2 para um perfil Th2 da resposta imune (RUBINSTEIN *et al.*, 2004). De fato, esse desvio foi demonstrado também em outros modelos animais de auto-imunidade e inflamação, nos quais o tratamento de camundongos com galectina-1 provoca um desvio da resposta imune para o tipo Th2 (RABINOVICH *et al.*, 1999b; SANTUCCI *et al.*, 2000; BAUM *et al.*, 2003; RUBINSTEIN *et al.*, 2004; TOSCANO *et al.*, 2007). Pelo menos dois princípios contribuem para esse desvio, sendo um deles, a indução de apoptose preferencial dos linfócitos Th1, restando os linfócitos Th2, e o outro, a indução de aumento na produção de citocinas do perfil Th2 de forma dependente do receptor de linfócito T (TCR) (MOTRAN *et al.*, 2008).

A galectina-1, em alguns casos, tem ainda ação antiinflamatória. Em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ativados e não ativados, a adição exógena desta lectina aumenta os níveis de RNAm da citocina IL-10 e diminui IL-2 (VAN DER LEIJ *et al.*, 2007). Em timócitos e hibridomas de linfócito T, esta lectina causa a inibição da proliferação e produção de citocinas dependentes de IL-2 (VESPA *et al.*, 1999), antagonizando os sinais antígeno específicos e agrupamento dependente de “rafts” lipídicos do complexo TCR/coestimulador no sítio de contato do TCR (CHUNG *et al.*, 2000). Além disso, a galectina-1 em baixas concentrações, variando entre 0,01 e 0,1 μ M, reduz a produção das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , e TNF- α por linfócitos T ativados (RABINOVICH *et al.*, 1999c). Contudo, não se sabe até o

momento se a galectina-1 expressa em tumores tem a mesma capacidade de regular a produção de citocinas, criando um ambiente antiinflamatório, quando expressa em tumores.

1.3.2 Galectina-3 e câncer

Esta lectina tem a particularidade de conter uma região composta de repetições em *tandem* de pequenos fragmentos de aminoácidos conectada ao domínio de reconhecimento a carboidrato (CRD) (HIRABAYASHI *et al.*, 2002). Por raios-X, sua estrutura cristalizada tridimensional complexada a lactose foi definida por um arranjo de folhas-beta de cinco fitas e seis fitas, formando um "sanduíche" similar ao de galectina-1 (SEETHARAMAN *et al.*, 1998). É importante destacar que a galectina-3 pode ser fosforilada nos resíduos de serina 6 (Ser6) e serina 12 (Ser12) (HUFLEJT *et al.*, 1993) e que algumas de suas funções são dependentes dessa fosforilação (YOSHII *et al.*, 2002; TAKENAKA *et al.*, 2004).

A seqüência sinalizadora necessária para a secreção de proteínas pelo mecanismo clássico está ausente também na galectina-3, assim como nas outras galectinas. Apesar de esse mecanismo permanecer um mistério, sabe-se apenas que o fator limitante para secreção de galectina-3 é o transporte para a membrana plasmática, pois uma vez na membrana, esta lectina é rapidamente liberada (MEHUL e HUGHES, 1997).

Com relação à distribuição de galectina-3 nos tecidos, esta é menos ampla do que de galectina-1. Sua expressão foi detectada em macrófagos (SATO e HUGHES, 1994), células epiteliais (FLOTTE *et al.*, 1983), linfócitos T ativados (JOO *et al.*, 2001), células NK (KOOPMAN *et al.*, 2003) e células tumorais (DANGUY *et al.*, 2002).

Os efeitos extracelulares e intracelulares de galectina-3 são diversos (LIU *et al.*, 2002; OCHIENG *et al.*, 2004). No meio extracelular, esta lectina pode oligomerizar-se na presença de carboidratos multivalentes, permitindo o "cross-linking" das glicoproteínas presentes na superfície da membrana celular, iniciando desta forma, vias de sinalização que afetam diferentes processos fisiológicos celulares (OCHIENG *et al.*, 2004).

A expressão e correlação de galectina-3 foram descritas em diversos tipos de tumores (DANGUY *et al.*, 2002). Em alguns casos, as células tumorais exibem um aumento em relação às células normais, como por exemplo, no câncer de fígado (HSU *et al.*, 1999),

tireóide (XU *et al.*, 1995) e do sistema nervoso central (BRESALIER *et al.*, 1997). Nesse último tipo de câncer mencionado, o aumento de galectina-3 foi inclusive associado a um maior potencial metastático (BRESALIER *et al.*, 1997). Por outro lado, no câncer de mama, a expressão reduzida nas células tumorais, em relação às normais foi associada ao maior grau histológico (IDIKIO, 1998) e formação de metástases (CASTRONOVO *et al.*, 1996).

1.3.2.1 Transformação, proliferação e apoptose

A importância de galectina-3 na transformação maligna foi evidenciada pelos estudos que mostraram o efeito da inibição da expressão desta lectina, em células tumorais. Tanto as células provenientes de carcinoma de mama como as de carcinoma papilar de tireóide deixaram de exibir as propriedades tumorigênicas, ao terem a expressão de galectina-3 bloqueada por anti-senso específico para esse gene (HONJO *et al.*, 2001; YOSHII *et al.*, 2001). Além disso, a realização do processo inverso, ou seja, a superexpressão do cDNA de galectina-3 nas células foliculares normais de tireóide resultou na indução de transformação maligna dessas células (TAKENAKA *et al.*, 2003).

Pouco se conhece sobre o mecanismo de transformação mediado por galectina-3. Uma possibilidade foi levantada pela sua interação com proteínas da família RAS, mas principalmente o proto-oncogene K-RAS, por meio da ativação de RAF1 e PI3-K e contribuindo, portanto para a ativação das vias de sinalização e fatores de transcrição gênica (ELAD-SFADIA *et al.*, 2004). Recentemente, o mesmo grupo de pesquisa mostrou que a molécula K-RAS.GTP recruta galectina-3 presente no citosol, para a membrana plasmática da célula, local onde se torna uma parte integrante de nanoclusters, estruturas importantes para uma transdução correta do sinal (SHALOM-FEUERSTEIN *et al.*, 2008). Os autores mostraram que a região hidrofóbica de galectina-3 é essencial para essa interação e que o nível de galectina-3 no citosol determina a intensidade do sinal resultante da via RAS.GTP, com consequências na proliferação e transformação das células (SHALOM-FEUERSTEIN *et al.*, 2008).

Por outro lado, a interação de galectina-3 com β -catenina, componente da via de sinalização mediada por WNT, e fatores de transcrição, assim como a expressão de ciclina D

e c-MYC, sugerem que outros mecanismos de transformação podem ter a participação dessas vias ou componentes (YANG *et al.*, 2008).

No que tange a regulação da apoptose por galectina-3, o número de estudos é maior. Esta proteína atua de forma antagônica dependendo da sua localização intracelular (núcleo ou citosol) (CALIFICE *et al.*, 2004) ou extracelular. A indução de apoptose pela adição de galectina-3 extracelular foi descrito apenas nas linhagens Jurkat, MOLT-4 e CEM derivadas de leucemias de linfócitos T (STILLMAN *et al.*, 2006). Por outro lado, diversos estudos indicaram que a galectina-3 endógena tem atividade anti-apoptótica (YANG *et al.*, 2008). As primeiras evidências surgiram de estudos que constatarem o ganho na resistência de células tumorais transfectadas com cDNA, evidente em diferentes tipos de tumores tratados com diversos agentes que induzem apoptose (LIU *et al.*, 2002).

É interessante notar que após o estímulo apoptótico, ocorre a translocação de galectina-3 do citosol ou núcleo para as mitocôndrias (YU *et al.*, 2002), bloqueando a queda do potencial de membrana, prevenindo desta forma a morte da célula, sugerindo que esta proteína poderia ter ela própria uma atividade anti-apoptótica ou poderia interagir com moléculas da mitocôndria que possuem essa atividade (MATARRESE *et al.*, 2000).

Nesse sentido, foi estudada a estrutura de galectina-3 e descoberta uma similaridade do domínio Asp-Trp-Gly-Arg (NWGR), responsável pela regulação da apoptose, entre a galectina-3 e a proteína anti-apoptótica BCL-2 (“B-cell-lymphoma 2”), indicando que a galectina-3 poderia ter o mesmo mecanismo de regulação da apoptose de BCL-2 (YANG *et al.*, 1996). De fato, a substituição de glicina por alanina na sequência (NGWR), na galectina-3, aboliu a sua atividade anti-apoptótica (AKAHANI *et al.*, 1997). Entretanto, não foi comprovado ainda se o mecanismo pelo qual as duas proteínas conferem resistência à morte é o mesmo.

A regulação da apoptose pode também ser mediada por outras proteínas que interagem com galectina-3, tais como BCL-2 (XU *et al.*, 1995) e sinexina, uma proteína necessária para a prevenção da apoptose mediada pela lectina (YU *et al.*, 2002).

1.3.2.2 Adesão, invasão, angiogênese e escape tumoral

A importância de galectina-3 no desenvolvimento e agressividade dos tumores foi sugerida a partir da identificação de uma associação entre a expressão deste tipo de lectina e o potencial metastático dos tumores, previamente descrita na seção 1.3.2. Não somente a expressão de galectina-3 nas células tumorais (DANGUY *et al.*, 2002), mas também no estroma têm sido associados a um potencial metastático maior e pior prognóstico (MOISA *et al.*, 2007). Estudos em animais reforçam o papel de galectina-3 na formação de metástases, já que o tratamento de camundongos com anticorpo anti-galectina-3 (INUFUSA *et al.*, 2001), assim como o bloqueio da capacidade de homodimerização desta proteína foram capazes de inibir o aparecimento de metástases (JOHN *et al.*, 2003).

O papel da galectina-3 na formação de metástases pode estar relacionado com sua capacidade de modular processos de migração, invasão e angiogênese (LIU e RABINOVICH, 2005; YANG *et al.*, 2008).

No que se refere à adesão, a alta expressão de galectina-3 em células de carcinoma com grande potencial metastático foi associada a uma adesão maior destas células quando comparadas às células normais (KHALDOYANIDI *et al.*, 2003). Se por um lado, os efeitos da exposição de células tumorais a galectina-3 exógena sobre a motilidade e capacidade invasiva variaram de acordo com o tipo de tumor estudado (LE MARER e HUGHES, 1996; MOISA *et al.*, 2007), por outro lado, a superexpressão endógena desta lectina em diferentes linhagens tumorais conferiu maior motilidade e capacidade invasiva a todas elas (MATARRESE *et al.*, 2000; O'DRISCOLL *et al.*, 2002).

Além disso, *in vitro*, a galectina-3 tem atividade angiogênica relacionada possivelmente a sua capacidade de induzir a migração de células endoteliais, morfologia e estimula a formação de novos tubos capilares no Matrigel contendo células endoteliais de cordão umbilical humano, tanto *in vitro* como *in vivo* (NANGIA-MAKKER *et al.*, 2000).

Por último, a galectina-3 poderia contribuir para o desenvolvimento de tumores, induzindo a morte de linfócitos T ativados (FUKUMORI *et al.*, 2003) ou por meio de outras formas de atuação nas células do sistema imune identificadas em outros modelos (NANGIA-MAKKER *et al.*, 2008).

1.4 Considerações Finais

Este conjunto de informações mostra a importância das galectinas 1 e 3 no desenvolvimento e potencial metastático de tumores. Um grande número de trabalhos tem descrito a associação entre galectinas e câncer. Nas neoplasias, a multifuncionalidade apresentada pelas galectinas 1 e 3 parece contribuir para os processos de transformação e progressão tumoral, como resistência à apoptose, neoangiogênese, metástases e evasão da vigilância (NAKAHARA *et al.*, 2005; RABINOVICH, 2005). Nesse sentido, principalmente as galectinas 1 e 3 vêm sendo consideradas como valiosos biomarcadores e fatores de prognóstico em diferentes linhagens tumorais e neoplasias humanas (RAZ *et al.*, 1987; CHIARIOTTI *et al.*, 1992; DANGUY *et al.*, 2002). Entretanto, não existe na literatura nenhum trabalho sobre a expressão e função das galectinas 1 e 3 em tumores não sólidos.

Objetivos

2 Objetivos

O objetivo principal deste estudo é o de investigar a expressão e contribuição das galectinas 1 e 3 na progressão da LMC. Esta meta foi abordada por meio dos seguintes objetivos específicos:

- 1- Verificar se a expressão das galectinas 1 e 3 é modulada por BCR-ABL em:
 - Linhagens leucêmicas BCR-ABL-negativas derivadas de pacientes com diferentes tipos de leucemia (HL-60, Jurkat e CEM) e BCR-ABL-positivas derivadas de pacientes com LMC (K562, KCL22 e LAMA-84);
 - Linhagens leucêmicas derivadas de pacientes BCR-ABL-negativos (HL-60 e Jurkat) e estas mesmas linhagens transfectadas com *BCR-ABL* (HL-60.BCR-ABL e Jurkat.BCR-ABL);
 - Amostras de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LMC nas fases crônica, acelerada, blástica, pacientes resistentes ao tratamento com mesilato de imatinibe e com resposta citogenética completa após o tratamento com essa droga;
- 2- Determinar se existe associação entre a expressão de *LGALS1* e/ou *LGALS3* e progressão da LMC.

Objetivos específicos adicionais foram propostos somente para a(s) galectina(s) que apresentar(am) uma expressão modulada por BCR-ABL:

- 3- Verificar se a expressão é dependente da atividade tirosina-quinase de BCR-ABL em dois modelos distintos:
 - Linhagem estabelecida no laboratório que expressa uma forma mutada de *BCR-ABL* que tem atividade tirosina-quinase deficiente (Jurkat.BCR-ABL/KD);

- Tratamento das linhagens HL-60, HL-60.BCR-ABL, Jurkat, Jurkat.BCR-ABL, K562, KCL22 e LAMA-84 com o inibidor específico de atividade tirosina-quinase, mesilato de imatinibe;
- 4- Checar se a alteração na expressão intracelular de galectina(s) teria um impacto nos níveis extracelulares, no soro de pacientes com LMC nas fases crônica, acelerada e blástica, assim como nos pacientes que apresentaram resposta citogenética completa e aqueles com resistência secundária ao tratamento com mesilato de imatinibe para;
 - 5- Avaliar se existe relação entre expressão da(s) galectina(s) modulada(s) por BCR-ABL e sobrevida global de pacientes com LMC na fase avançada da doença;
 - 6- Verificar o efeito do silenciamento da(s) galectina(s) modulada(s) por BCR-ABL na linhagem BCR-ABL+ K562, no crescimento tumoral *in vivo* e na proliferação *in vitro* pelo silenciamento da expressão gênica específica pela técnica de RNA de interferência (RNAi);

Materiais e Métodos

3 Casuística, Materiais e Métodos

3.1 Sujeitos de Pesquisa

3.1.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

Este projeto de Doutorado intitulado “Expressão das galectinas 1 e 3 e suas consequências biológicas na Leucemia Mielóide Crônica” foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, tendo sido aprovado em 25/08/08, sob o número 854 do Comitê de Ética em Pesquisa.

As amostras utilizadas de pacientes com LMC pertencem ao banco de amostras biológicas referentes aos projetos de pesquisa intitulados “Análise de expressão Gênica Global de linhagens BCR-ABL: “Investigação de possíveis alvos terapêuticos e marcadores de prognóstico em leucemias Ph positivas”; “Controle da expressão de OSM, TRAIL, FAIM e NIPA pelo oncogene BCR-ABL”; “Regulação da expressão gênica diferencial de HSH2D, WAS, TRIF, SH2D2A E ASH2L em células BCR-ABL positivas e consequências biológicas dessa regulação na LMC” e “Regulação da expressão de SH3BGRL2, D53, PRAME, DAP12 e calcineurina A-beta por BCR-ABL e consequências biológicas dessa regulação na LMC” . Todos os projetos supracitados e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido foram aprovados pelos Comitês de Ética da Sociedade Beneficente Israelita e Brasileira Hospital Albert Einstein, do Hospital Brigadeiro, do Hospital Santa Marcelina e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.1.2 Critérios de Inclusão e Exclusão dos sujeitos de pesquisa no estudo

As amostras dos pacientes com Leucemia Mielóide Crônica nas diferentes fases da doença foram coletadas no Centro Oncológico do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), no Hospital Brigadeiro e no Hospital Santa Marcelina, todos localizados na cidade de São Paulo, Brasil. A seleção dos indivíduos controle, por outro lado, ocorreu no Instituto de

Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pareando as idades dos indivíduos saudáveis e pacientes com LMC.

A inclusão dos pacientes com LMC, no presente estudo, obedeceu aos seguintes critérios: resultado positivo para cromossomo Philadelphia por citogenética e/ou presença do neogene *BCR-ABL* detectado por biologia molecular em exames de diagnóstico feitos pelos laboratórios dos hospitais aos quais os pacientes foram admitidos.

Os pacientes e os indivíduos saudáveis que possuíam quaisquer outras doenças de base no momento da colheita que não fosse a LMC, no caso dos pacientes, foram excluídos deste estudo.

3.1.3 Critérios para Classificação das Fases da LMC

Os pacientes com LMC foram classificados na fase crônica, acelerada ou blástica de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), descritos na seção 1.1.1 deste trabalho e resumidos na tabela 5 (VARDIMAN *et al.*, 2002).

Tabela 5- Critério para classificação da fase crônica da doença

Fase blástica

Blastos (%) ≥ 20 no sangue ou medula óssea
Proliferação extramedular
Grandes focos de blastos na biópsia de medula óssea
Agrupamentos de blastos na medula óssea

Fase acelerada

Blastos (%) entre 10 e 19 no sangue ou medula óssea
Basófilos (%) ≥ 20 no sangue
Trombocitopenia persistente não relacionada ao tratamento
Trombocitose não responsiva ao tratamento
Aumento do tamanho do baço e de contagem de leucócitos não responsiva a terapia
Evidência citogenética de evolução clonal

Fase crônica

Aqueles que não apresentam nenhum dos critérios acima mencionados

FONTE: Adaptada de Baccarani M. *et al.*, 2006

3.1.4 Critérios de definição de resposta ao tratamento

Neste estudo, foram analisadas amostras de pacientes que após o tratamento com mesilato de imatinibe atingiram resposta citogenética completa (RCC), ou seja, apresentavam 0% de células Ph⁺ na medula óssea representando o grupo de pacientes RCC e outras amostras cujos pacientes desenvolveram resistência secundária ao tratamento, denominados R-MI (Resistentes ao Mesilato de Imatinibe).

3.1.5 Características clínico-laboratoriais e demográficas dos pacientes com LMC

A fim de verificar se a expressão de galectina-1 era modulada por BCR-ABL nas amostras de pacientes, foram avaliadas 75 amostras provenientes de 70 sujeitos de pesquisa cujas características clínicas no momento do diagnóstico estão representadas na tabela S1 do anexo F. As 75 amostras incluem 26 pacientes na fase crônica (FC), 12 na fase acelerada (FA), oito (8) na fase blástica, seis (6) pacientes que apresentaram resistência ao tratamento com mesilato de imatinibe (R-MI), onze (11) que obtiveram resposta citogenética completa (RCC) após tratamento com MI e 12 indivíduos saudáveis como controle (Cont).

O motivo pelo qual o número de amostras é superior ao número de pacientes é devido à coleta de amostras de cinco (5) pacientes em duas fases diferentes da doença (Tabela 6).

Tabela 6- Número de pacientes cujas amostras foram coletadas em mais de uma fase.

Número de pacientes	Amostra A	Amostra B
2	FC	RCC
2	FB	R-MI
1	FA	FB

FC: Fase Crônica, RCC: Resposta Citogenética Completa, FB: Fase Blástica, R-MI: Resistente ao Mesilato de Imatinibe, FA: Fase Acelerada.

Uma análise descritiva do sexo e idade dos pacientes com LMC e dos indivíduos saudáveis foi elaborada (Tabela 7).

Tabela 7-Análise descritiva do sexo e idade dos pacientes portadores da LMC e indivíduos saudáveis utilizados como controle.

Sexo	Nº de indivíduos		f(%)		Média de idade (anos)		DP (Anos)		Mediana da idade (anos)		Menor idade (anos)		Maior idade (anos)	
	LMC	Cont	LMC	Cont	LMC	Cont	LMC	Cont	LMC	Cont	LMC	Cont	LMC	Cont
Masc	32	8	55,2	86,7	45,3	40	14,9	3,3	46	40	16	36	67	44
Fem	26	4	44,8	33,3	46,5	41,7	19,2	1024	46	44	19	26	77	56
Total	58	12	100	100	45,8	41,7	16,8	8,0	46	42	16	26	77	56

LMC: Leucemia Mielóide Crônica. Cont: Controle, f: frequência, DP: Desvio Padrão. Masc: Masculino. Fem: Feminino.

A mediana da idade dos pacientes estudados foi de 46 anos, variando de 16 a 77 anos e a dos indivíduos saudáveis foi de 42 anos, variando de 26 a 56 anos. Aproximadamente metade dos pacientes é do sexo masculino (Tabela 7).

Além disso, dados clínico-laboratoriais detectados no hemograma realizado no diagnóstico e que constavam no prontuário dos pacientes foram analisados (Tabela 8).

Tabela 8- Descrição das características clínico-laboratoriais ao diagnóstico dos pacientes com LMC.

	Média	Desvio padrão	Mínim o	Máxim o
Leucócitos (nº/µL)	191345	143740	24400	770000
Hemoglobina (g/dL)	10,7	2,2	7	16
Tamanho do baço (cm)	8,5	6,4	0	20
Plaquetas (nº/µL)	497362	445780	10700	2800000

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o quadro de anemia é considerado quando a concentração de Hb é menor do que 12 g/dL, leucocitose quando o número de leucócitos/µL é maior do que 10000 e plaquetopenia quando o número de plaquetas é menor do que 150000/µL. Sendo assim, a análise desses parâmetros indicou que todos os pacientes com LMC apresentaram uma leucocitose variando de 24000-770000 leucócitos/µL, 69% dos pacientes apresentaram anemia, 90% tinham esplenomegalia, mas apenas 8,6 % destes apresentaram plaquetopenia (Tabela 8).

3.1.6 Índice de Sokal

A fórmula do índice de Sokal foi utilizada para calcular o prognóstico, risco de evolução da doença para fases avançadas. O cálculo desse índice considera os seguintes parâmetros: idade do paciente (anos), tamanho do baço (distância máxima da margem costal, em cm), concentração de plaquetas ($\times 10^9/L$) e blastos no sangue periférico (%).

$$\text{Risco Relativo} = \text{EXP}(0,0016(\text{idade}-43,4) + 0,0345(\text{tamanho do baço}-7,51) + 0,188[(\text{plaquetas}/700)^2 - 0,563] + 0,0887(\text{blastos}-2,1))$$

3.1.7 Construção da curva de sobrevida global

No intuito de verificar se a expressão de *LGALS1* teria algum impacto na sobrevida global dos pacientes nas fases avançadas da LMC, o primeiro passo consistiu em definir uma população mais homogênea que seria estudada. Desta forma, os pacientes da fase acelerada e fase blástica foram unificados em um novo grupo que constituiu a Fase Avançada (FAV) da LMC. Somando os pacientes da fase acelerada e blástica, este estudo continha 20 amostras de pacientes. No entanto, foi descartado o dado da amostra do paciente que fora analisado duas vezes no estudo, com amostras das fases acelerada e blástica (descartando o da fase acelerada). Sendo assim, a análise foi baseada nos dados de 19 pacientes.

O tempo de sobrevida global dos pacientes foi calculado a partir da data da aceleração da doença até o óbito do sujeito de pesquisa ou até a última data de análise dos dados no caso dos pacientes vivos.

Com o auxílio do programa GraphPad Prism (versão 5,0), foram determinados os percentis 25 e 75 da expressão de *LGALS1* desses pacientes. Aqueles que possuíam valores abaixo do percentil 25%, entre 25-75% e acima do percentil 75% foram considerados respectivamente, indivíduos com expressão “Baixa”, “Média” e “Alta” de *LGALS1*. Após a definição desses três grupos, a curva de sobrevida global foi obtida pelo método de Kaplan-Meier, utilizando o programa GraphPad Prism (versão 5,0) e os grupos comparados pelo teste de log-rank.

3.2 Linhagens celulares

Neste trabalho foram utilizadas linhagens celulares derivadas de pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA) e leucemia linfocítica aguda (LLA) e leucemia mieloide crônica (LMC), entre outras listadas abaixo.

Além disso, algumas linhagens BCR-ABL negativas foram infectadas com plasmídeo contendo esse gene e passando, portanto, a expressar o *BCR-ABL* selvagem ou mutado de acordo com a construção de *BCR-ABL* utilizada. Nesta relação estão inclusas também as linhagens deficientes em galectina-1 obtidas por meio da infecção com retrovírus contendo plasmídeos que expressam diferentes construções de “short hairpin RNA” (shRNA) para *LGALS1*.

Relação das linhagens celulares empregadas no desenvolvimento do presente estudo:

- Phoenix™ Amphi: linhagem empacotadora de segunda geração, derivada de células HEK-293T provenientes de células embrionárias humanas de rim transformadas com o adenovírus Ela que contém o antígeno T termosensível e foi co-selecionada com neomicina. Linhagem gentilmente cedida pelo Dr. Gary Nolan (Stanford University, Palo Alto, CA, USA);
- CEM: linhagem derivada de linfócitos T de paciente com leucemia linfoblástica aguda (LLA), BCR-ABL negativa (ATCC n° CCL-119);
- HL-60: linhagem derivada de paciente com leucemia pró-mielocítica aguda (LMA), BCR-ABL negativa (ATCC n° CCL-240);
- HL-60.vetor e HL-60.BCR-ABL (HL-60.BA): linhagem obtida a partir da HL-60 transduzida com retrovírus contendo os plasmídeos pSRαMSVtkneo e pSRαMSVtkneo.BCR-ABL;
- Jurkat: linhagem derivada de linfócitos T de paciente com leucemia linfoblástica aguda (LLA), BCR-ABL negativa (ATCC n° TIB-152);
- Jurkat.vetor, Jurkat.BCR-ABL (Jurkat.BA), Jurkat.BA/KD: linhagem obtida em nosso laboratório, a partir de células Jurkat transduzidas com retrovírus contendo

respectivamente os plasmídeos pSR α MSV.tkneo, pSR α MSVp185^{BCR-ABL}tkneo e pSR α MSVp185^{BCR-ABL/K671R}tkneo;

- K562: linhagem derivada de paciente com eritroleucemia (LMC), BCR-ABL positiva (ATCC n° CCL-243);
- K562.MLP (vetor), K562.shLGALS1-208, K562.shLGALS1-115, K562.shLGALS1-467 e K562.shLGALS1-391: linhagens obtidas neste trabalho, a partir de células K562 transduzidas com retrovírus contendo respectivamente, os plasmídeos pMSCV-MLP, pMSCV-MLPshLGALS1-208, pMSCV-MLPshLGALS1-115, pMSCV-MLPshLGALS1-467, pMSCV-MLPshLGALS1-391 (plasmídeos descritos na seção 3.16.1);
- KCL22: linhagem derivada de paciente com LMC, na crise blástica, BCR-ABL positiva, gentilmente cedida pelo Dr. Owen Witte (University of California, Los Angeles, USA);
- LAMA-84: linhagem derivada de paciente com LMC, BCR-ABL positiva, gentilmente cedido pelo Dr. James Griffin (Dana-Farber Cancer Institute, MA, USA);
- Ton.B210.1: linhagem hematopoética murina com expressão condicional de BCR-ABL, dependente de tetraciclina (KLUCHER *et al.*, 1998), gentilmente cedida pelo Dr.

3.3 Vetor

A fim de promover a expressão ou o silenciamento de proteínas nas linhagens celulares utilizadas neste trabalho, foram utilizadas as seguintes construções retrovirais:

pMSCV-LTRmiR30-PIG (pMLP): Plasmídeo retroviral bicistrônico contendo IRES (internal ribosome entry site) derivado do vírus murino de célula tronco (MSCV, “Murine Stem Cell Vírus”) que permite a expressão, a partir do mesmo transcrito, de GFP e da construção de shRNAmir específica. Este vetor foi desenvolvido no laboratório do Dr. Lowe e promove a inibição eficiente do gene de interesse com apenas uma cópia simples no genoma. Este vetor, capaz de inibir de forma eficiente o gene de interesse com apenas uma

cópia simples no genoma, foi desenvolvido pelo laboratório do Dr. Lowe. Além disso, este plasmídeo contém os genes de resistência a ampicilina e puromicina (Figuras 7A e B).

Este vetor foi utilizado como “backbone” para as construções de shRNAmiR específicas para *LGALS1* descritas na seção 3.16.1.

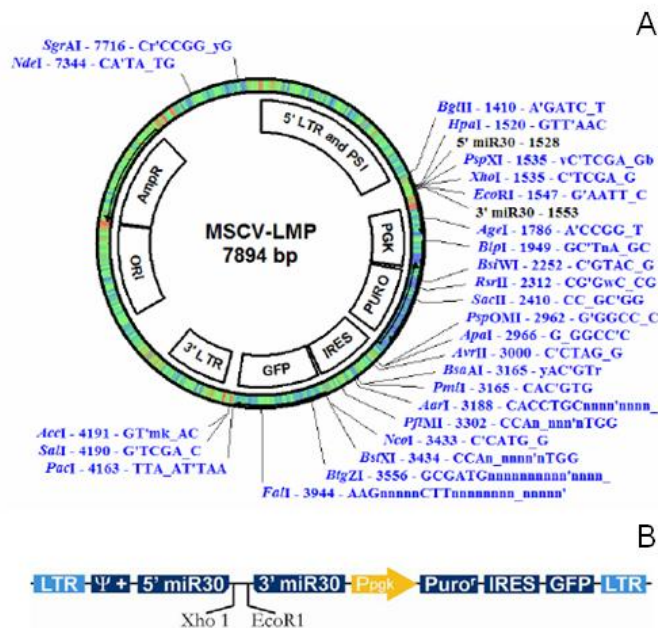


Figura 7 - Vetor vazio pMLP. A) Mapa de restrição do vetor vazio pMLP. B) Representação esquemática do vetor pMLP, mostrando o promotor retroviral LTR (“Long Terminal Repeats”, a sequência Ψ de empacotamento, promotor da enzima fosfoglicerato quinase (PGK), PURO: gene de resistência a puromicina.

3.4 Camundongos

Neste trabalho, foram utilizados camundongos BALB/c nude machos, singênicos, com idade entre 4-8 semanas provenientes do Biotério de Criação do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). Os animais foram mantidos de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O protocolo de pesquisa foi aprovado sob nº 98, nas folhas 61 do livro 02, pela Comissão de Ética em Experimentação Animal em 19/11/2008.

3.5 Cultivo Celular

As células que proliferam em suspensão (todas, exceto a Phoenix™ Ampho) foram mantidas em meio RPMI-1640 completo (Life Technologies, INC., USA). Por outro lado, as células aderentes foram cultivadas em meio DMEM completo (Dulbecco's Modified Eagle's Medium", Life Technologies, INC., USA). Nos dois casos, o meio foi suplementado com 2,0 g/L de bicarbonato de sódio, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamina, 100 U/ mL penicilina, 100 µg/mL sulfato de estreptomicina (Life Technologies, Inc., USA) e 10% de soro fetal bovino (Life Technologies, Inc., USA). As células foram mantidas em incubadoras umidificadas na temperatura de 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂ (Forma Scientific). O repique foi efetuado a cada 2 ou 3 dias para que as células fossem mantidas em densidade de 1×10^5 - 1×10^6 /mL.

3.6 Coleta e isolamento de células mononucleares de sangue periférico

Vinte mililitros do sangue periférico de todos os sujeitos de pesquisa foi coletado em tubos contendo o anticoagulante EDTA.

As amostras de sangue dos sujeitos de pesquisa foram centrifugados a 500 x g por 15 min a 4 °C e posteriormente, o plasma foi transferido para outro tubo. O plasma foi armazenado a -80 °C, para posterior análise.

As células mononucleares do sangue foram separadas pelo protocolo padrão de densidade por gradiente de Ficoll-Hypaque 1,077 (BOYUM, 1976). A viabilidade celular foi avaliada por exclusão de Azul de Tripan. De acordo com o número de células obtidas, uma parte das células foi estocada em Trizol e tampão de amostra de "Western Blot" de acordo com os protocolos descritos nas seções 3.6 e 3.10 para realização dos ensaios de quantificação gênica e protéica respectivamente.

3.7 Extração de RNA

A extração do RNA total das linhagens celulares e células de pacientes foi realizada pelo método do Trizol, de acordo com protocolo do fabricante (Invitrogen Life Technologies). Resumidamente, 5×10^6 células foram lisadas com 0,5 mL de Trizol e incubadas por 5 min a temperatura ambiente (TA), em seguida, foi adicionado 0,1 mL de clorofórmio e os microtubos foram agitados vigorosamente por 15 s, e incubados por 2-5 min. Após a separação da fase aquosa por centrifugação a $12000 \times g$ a 4°C por 15 min, o RNA contido na fase aquosa foi precipitado com 0,25 mL de isopropanol, por 10 min a TA, e centrifugação a $12000 \times g$ a 4°C , por 10 min. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi retirado e o RNA lavado com 0,5 mL de etanol 75%, centrifugado a $7500 \times g$ a 4°C , por 5 min. Por último, após remoção do sobrenadante, o RNA obtido foi ressuspensão em 20-30 μL de água livre de RNases para ser utilizado na quantificação e síntese de cDNA.

3.8 Quantificação de DNA e RNA

A concentração de DNA ou RNA da amostra foi verificada pela absorção de luz Ultra Violeta analisada pelo espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm. As bases nitrogenadas dos nucleotídeos têm absorção máxima em 260 nm e as proteínas têm absorção máxima em 280 nm, devido aos resíduos de triptofano. Desta forma, numa amostra que contém tanto DNA quanto RNA, a absorbância a 280 nm fornece uma estimativa da contaminação da amostra com proteína. A relação da absorbância 260nm/280 nm indica a pureza da amostra e deve ficar entre 1,65 e 1,85 para atestar boa qualidade.

O cálculo foi realizado a partir da seguinte fórmula:

Concentração de DNA ($\mu\text{g/ml}$) = (DO 260) x (fator de diluição) x (50 $\mu\text{g DNA/ml}$)/(1 unidade de DO 260)

Concentração de RNA ($\mu\text{g/ml}$) = (DO 260) x (fator de diluição) x (40 $\mu\text{g RNA/ml}$)/(1 unidade de DO280)

3.9 Síntese de cDNA

Três microgramas (3 µg) de RNA total foram utilizadas para obtenção do cDNA, utilizando-se kit de transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen) de acordo com protocolo do fabricante. Para verificação da qualidade do cDNA sintetizado, foi feita a reação de RT-PCR para β -ACTINA.

3.10 PCR em tempo real

Para avaliar a expressão dos genes *LGALS1* e *LGALS3* nas amostras de cDNA das linhagens celulares, oligonucleotídeos (“primers”) específicos foram desenhados para amplificar estes genes nas amostras por meio da técnica de PCR em tempo real. Os “primers” utilizados foram:

<i>LGALS1</i> (forward)	GAG TGC GAG GCG AAG TGG CT
<i>LGALS1</i> (reverse)	CCC CGC CGT CCT TGC TGT T
<i>LGALS3</i> (forward)	CTG GCG CAT GGG GGA ACC A
<i>LGALS3</i> (reverse)	CCG GGG GCA CTT GGC TGT C
<i>GAPDH</i> (forward)	GGA GAA GGC TGG GGC TCA T
<i>GAPDH</i> (reverse)	GTC CTT CCA CGA TAC CAA AGT T
β -ACTINA (forward)	GTG GGC ATG GGT CAG AAG
β -ACTINA (reverse)	GGC CAT CTC TTG CTC GAA

Como controle endógeno foi amplificado o gene *GAPDH* de expressão constitutiva (“housekeeping genes”). A amplificação em tempo real foi realizada utilizando-se o Kit comercial Quantitect SyBRGreen (Qiagen) e aparelho ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). Os resultados foram relatados por expressão relativa entre o gene de interesse e o *GAPDH*.

3.11 “SDS PAGE” e “Western Blot”

Amostras contendo 1×10^6 células foram centrifugadas a $210 \times g$ por 5 minutos a 4°C e ressuspensas em 80 μL de tampão de amostra (Tris Cl 50mM, pH 6,8; SDS 2%; Glicerol 10%; β -mercaptoetanol 2,5%) para serem aquecidas a 100°C por 5 minutos e resfriadas rapidamente, sendo mantidas no gelo até o momento da aplicação ou estocadas a -20°C para posterior utilização. Foram preparados géis com diferentes concentrações (15-10%) de acordo com o peso molecular da proteína analisada e foram aplicados 10-20 μg de amostra em cada poço do gel. As proteínas foram separadas utilizando uma voltagem contínua de 100 V. Ao término da corrida das amostras, as proteínas foram transferidas do gel para a membrana de PVDF de 0,45 μm (Pierce) em amperagem contínua de 0,45 mA de por 1 hora e 30 minutos. Em seguida a membrana foi colocada em uma solução de bloqueio TBS-Tween (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl pH=7,5, 0,05% Tween-20, 5% de leite desnatado, 0,01% azida sódica) por duas horas. Após esse período, as membranas foram marcadas com os anticorpos primários específicos (diluídos em leite desnatado 5%) por uma hora, lavadas com TBS-Tween para em seguida serem marcadas com o anticorpo secundário acoplado à peroxidase. Novamente a lavagem das membranas foi realizada e após esse período, o excesso de TBS-Tween foi retirado e as membranas incubadas em solução de ECL (Amersham Pharmacia Biotech) para que o sinal de quimioluminescência fosse detectado pela exposição rápida de filmes auto-radiográficos X-OMAT-LS (Kodak, co).

3.12 Quantificação de proteínas

A concentração protéica das amostras de lisado celular foi determinada usando o reagente “BIO-RAD Protein Assay” de acordo com o protocolo do fabricante. O princípio do método baseia-se no método de Bradford no qual a adição de um corante ácido às amostras leva a uma mudança da coloração de acordo com a concentração de proteína presente. Esta coloração é analisada no comprimento de onda de 595 nm.

Diluições seriadas das amostras foram comparadas à curva-padrão realizada a partir de diluições da albumina bovina em diferentes concentrações conhecidas e ressuspensas em tampão de amostra.

3.13 Tratamento com doxiciclina

Para a indução da expressão de *BCR-ABL* nas células Ton.B210.1 com expressão condicional desse gene, as células foram tratadas por 12 e 24 horas com doxiciclina na concentração de 2µg/mL.

3.14 Tratamento das linhagens celulares com STI571

As linhagens celulares HL-60, HL-60.BCR-ABL, Jurkat, Jurkat BCR-ABL, K562, KCL22 e LAMA-84 foram tratadas com mesilato de imatinibe na concentração de 0,1-10 µM por 12 e 24 horas para verificar se a expressão de galectina-1 era modificada com esse tratamento.

3.15 Dosagem da concentração de galectina-1 por ELISA

A concentração plasmática de galectina-1 foi mensurada pelo método de ELISA (“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”) de captura realizado em placas de poliestireno de 96 poços (Corning, Corning, NY). O ELISA de captura foi configurado no formato de sanduíche como descrito por BURGER *et al.*, 2004.

Em linhas gerais, o fundo da placa foi revestido com anticorpos policlonais de galinha anti-galectina-1, purificados por afinidade, que foram utilizados para capturar a galectina-1 presente no plasma dos pacientes. Já os anticorpos policlonais de coelho contra galectina-1 foram utilizados, purificados por afinidade, para detectar esta lectina. Estes anticorpos foram produzidos no laboratório do Dr. Richard D. Cummings e gentilmente cedidos pelo Dr. Marcelo Dias-Baruffi. O plasma obtido dos pacientes foi centrifugado previamente ao uso e adicionado as placas, sendo incubadas por 16 horas, a 4°C, com 100 µL de anticorpos de galinha anti- galectina-1 a 10 µg/mL. Ao final deste período, e após cada procedimento, as placas foram lavadas três vezes com PBS 0,1% Tween-20. Em seguida, as placas foram bloqueadas com gelatina 3% em PBS por duas horas a temperatura ambiente (TA). Depois

desta lavagem com PBS, as amostras de plasma foram incubadas por uma hora a TA. A seguir, o anticorpo de Coelho, anti-galectina-1 humana foi adicionado na concentração de 10 µg/mL e as placas incubadas por mais uma hora a TA. Anticorpos de cabra anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina (10 µg/mL) foram adicionados aos poços e as placas incubadas por 1 hora a TA. Por último, a reação colorimétrica foi detectada com a adição de substrato para a fosfatase (1 mg/mL *p*-nitrofenilfosfato em MgCl₂ 0,001 M e Na₂CO₃ 0,05 M, pH 9.8) e incubada por 30 minutos a TA. A leitura das placas foi realizada no leitor de placas a 405 nm (Emax micro plate reader; Molecular Devices). Amostras de um “pool” de plasmas provenientes de indivíduos saudáveis com ou sem galectina-1 recombinante (2µg) foi utilizada como controle negativo e positivo.

3.16 Obtenção dos plasmídeos contendo shRNA

3.16.1 Desenho do shRNA

O primeiro passo para obter um plasmídeo contendo shRNA foi o desenho das seqüências de siRNA específicos de acordo com o protocolo 2 descrito pelo fabricante. DE forma resumida, quatro seqüências de RNA de interferência foram desenhadas utilizando a ferramenta disponível na página:

<http://www.biopredsi.org/start.html>.

BIOPREDsi é um algoritmo baseado em inteligência artificial que prediz de forma computadorizada, seqüências de siRNA de 21 nucleotídeos (21-nt) que apresentam capacidade de silenciamento ótimo para um determinado gene. Os critérios de especificidade foram definidos por meio de análise sistemática de 200 siRNAs mutados testados para a sua eficiência de silenciamento (HUESKEN *et al.*, 2005). Assim, ao obter as seqüências específicas da base BIOPREDsi, as bases “U”s foram substituídas por “T”s e foi feito o complemento reverso. A seguir, foi utilizada outra ferramenta disponível na internet para obter, os shRNA contendo as seqüências de siRNA obtidas. Esta ferramenta foi desenvolvida no laboratório do Dr. Gregory Hannon, em CSHL, e está hospedada na página:

<http://katahdin.cshl.org:9331/homepage/siRNA/RNAi.cgi?type=shRRNA>

Ao clicar nessa página, foi selecionada a opção shRNA psm2 Design e opção humana, e depois de clicar no botão NEXT, foi selecionada a opção 21mer (Figura 8A) e por último são inseridas uma a uma, as quatro seqüências de 21-nt obtidas pelo programa BIOPREDsi e o número de acesso do gene de acordo com o CDS (Figura 8B). Os oligonucleotídeos obtidos foram processados a fim de conseguir um que fosse o complemento reverso e foi colocada a seqüência de bases correspondentes aos sítios de restrição para as enzimas EcoRI e XhoI. Cada oligonucleotídeo gerado no final tem 110 pb que foram checadas quanto ao tamanho e presença de extremidades adesivas.

A
B





Figura 8 - Páginas acessadas do RNAi Central. Esta ferramenta elaborada pelo grupo do Dr. Hannon de CSHL para desenho de shRNA. A) Página obtida ao selecionar as opções de shRNA_psm2, para gene humano, e obtenção de quarto oligonucleotídeos. B) Página obtida ao selecionar a forma disponível da seqüência de RNAi.

De acordo com este protocolo, foram obtidos quatro pares de oligonucleotídeos contendo os shRNA para *LGALS1*, citados a seguir:

shlgals1-208

Oligo1:

TCGA GAAGGTATAT TGCTGTTGACAGTGAGCG CCACCATCGTGTGCAACAGCAATAGTG
AAGCCACAGATGTATTGCTGTGACACGATGGTGTGCCTACTGCCTCGG

Oligo2:

AATT CCGAGGCAGTAGGCAACACCATCGTGTGCAACAGCAATACATCTGTGGCTTCACT
ATTGCTGTTGCACACGATGGTGGCGCTCACTGTCAACAGCAATATACCTTC

shlgals1-115

TCGA GAAGGTATAT TGCTGTTGACAGTGAGCG CCGCCAGCAACCTGAATCTCAATAGTG
AAGCCACAGATGTATTGAGATTGAGGTTGCTGGCGATGCCTACTGCCTCGG

AATT CCGAGGCAGTAGGCATCGCCAGCAACCTGAATCTCAATACATCTGTGGCTTCACTA
TTGAGATTGAGGTTGCTGGCGGCGCTCACTGTCAACAGCAATATACCTTC

shlgals1-467

TCGA GAAGGTATAT TGCTGTTGACAGTGAGCG CGACGGTGACTTCAAGATCAATAGTG
AAGCCACAGATGTATTGATCTTGAAAGTCACCGTCATGCCTACTGCCTCGG

AATT CCGAGGCAGTAGGCATGACGGTGACTTCAAGATCAATACATCTGTGGCTTCACTA
TTTGATCTTGAAGTCACCGTCGCGCTCACTGTCAACAGCAATATACCTTC

shlgals1-391

TCGA GAAGGTATAT TGCTGTTGACAGTGAGCG ACGTCAAGCTGCCAGATGGATAGTG
AAGCCACAGATGTATTATCCATCTGGCAGCTTGACGGTGCCTACTGCCTCGG

AATT CCGAGGCAGTAGGCACCGTCAAGCTGCCAGATGGATATACATCTGTGGCTTCACT
ATATCCATCTGGCAGCTTGACGTGCTCACTGTCAACAGCAATATACCTTC



3.16.2 Anelamento dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos, comprados da empresa Sigma foram ressuspensos em H₂O duplamente destilada (H₂O_{dd}), em concentração idêntica. Os pares de oligonucleotídeos 1 e 2 de cada shRNA foram anelados por reação de PCR para formar o shRNAmiR. O tampão de anelamento concentrado 5 X continha acetato de potássio a 500 mM, HEPES-KOH a 150 mM (pH 7.4) e acetato de magnésio a 10 mM. Uma alíquota dos pares de oligonucleotídeos foi ressuspensa no tampão de anelamento e incubada por 5 min no termociclador a 95°C, 10 min a 80 °C e por último 5-7 horas 80 °C a 4 °C (-0.5°C a cada 2,5 min).

3.16.3 Digestão enzimática

As digestões enzimáticas para clonagem ou para verificação dos plasmídeos utilizados foram feitas de acordo com protocolo do fabricante (New England, Biolabs). Em geral, as digestões foram feitas por 1 hora a 37 °C no volume final de 50 µL contendo 10 µg de DNA,

1 unidade de enzima e tampão de digestão (específico para cada enzima) diluído 1X. Eventualmente as digestões foram feitas por 12 horas a 37 °C.

3.16.4 Ligação

Os oligonucleotídeos anelados foram diluídos 1:10 em H₂O ou EB (Qiagen). Os oligonucleotídeos não diluídos foram estocados a -20°C. A ligação foi realizada com 2 µL do vetor digerido com XhoI/EcoRI (50-200 ng) (New England Biolabs Ltda), 2 µL do oligonucleotídeoanelado, 14 µL de H₂O e incubados a 45-55 °C por 5 min. Em seguida, foi adicionada a esta reação, 2 µL de tampão de ligação 10x, 1 µL de ATP 10 mM e 1 µL T4 DNA Ligase (New England Biolabs Ltda).

3.16.5 Preparo de bactérias competentes

Foram utilizadas bactérias *Escherichia Coli* das cepas DH10.B (Eppendorf; Hamburg, Germany) e One Shot®TOP10 (Invitrogen,CA, USA) para fazer as propagações dos plasmídeos. De acordo com protocolos pré-estabelecidos (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989) foram feitos pré-inóculos a partir de uma única colônia obtida de placas de cultura, em 3 mL de meio líquido SOB (2% peptona, 0,5% extrato de levedura, 8,56 mM NaCl, 250 mM KCl, pH=7,0). Estes pré-inóculos foram mantidos sob agitação constante (300 rpm) a 37 °C por 16-18 horas. Após este período, 1/20 dessa suspensão foi transferida para 50 mL de meio líquido SOB, incubados sob agitação constante (300 rpm) por 4 a 4 horas. Antes da densidade óptica (D.O.) atingir o valor de 0,6, as células foram transferidas para o gelo onde foram incubadas por 15 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 1000 x g por 12 min a 4 °C. O precipitado foi ressuspensão em 10 mL de solução RFI pH=8,0 (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM C₂H₃KO₂, 10 mM CaCl e 15% de glicerol), permanecendo em repouso, no gelo, por 15 min. Em seguida, foram novamente centrifugadas e o precipitado foi ressuspensão em 2 mL de RFII pH=6,8 (100 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂ e 15% de glicerol). Finalmente, as bactérias foram congeladas no N₂ líquido e estocadas em alíquotas a -80 °C.

3.16.6 Transformação bacteriana

As bactérias One Shot®TOP10 ou DH10B foram transformadas pelo método rápido do choque térmico. Antes de realizar a transformação, o microtubo contendo o plasmídeo foi centrifugado brevemente e mantido no gelo. As bactérias competentes (50 µL) foram descongeladas em gelo e a elas foi adicionado 1-5 µL do plasmídeo, misturadas cuidadosamente e incubadas por 30 minutos no gelo. Em seguida as bactérias foram incubadas em banho-maria a 42 °C por exatos 45 segundos e colocadas imediatamente no gelo por mais 5 minutos. Por último, 50 µL da suspensão foram plaqueados em placas de Petri preparadas com meio sólido LB ágar (meio LB com 1,5 g/L de ágar e 100 µg/mL de antibiótico de seleção) e pré-aquecidas a 37 °C. As placas foram mantidas na estufa a 37°C por 14-16 horas.

3.16.7 Purificação de DNA plasmidial

Para a purificação do DNA plasmidial foram utilizadas colunas QIAGEN aplicando o protocolo de lise alcalina fornecido pelo fabricante. Em resumo, as bactérias foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Logo em seguida, foi adicionada uma solução P1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA e 100 µg/mL de RNase A) para desestabilizar a membrana das bactérias, depois de homogeneizar, foi adicionada a solução P2 (200 mM NaOH, 1% SDS), por 5 min a 4 °C, para lisar as células bacterianas. Após esse período, foi adicionada uma solução P3, para neutralizar a reação (3 mM de acetato de potássio, pH=5,5) e a mistura foi incubada por 10-20 min, no gelo. Para a separação do DNA plasmidial, o lisado bacteriano foi centrifugado a 20000 x g, por 30 min a 4 °C e o precipitado descartado. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para colunas de resina de sílica para retenção do DNA que foi posteriormente, eluído e recuperado pela precipitação com isopropanol 15%. O precipitado foi lavado com etanol 70% e centrifugado a 15000 x g por 10 min. Por último, o sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo o DNA plasmidial foi ressuspensionado em 50 µL de solução de TE (10 mM Tris-Cl e 0,1 mM EDTA).

3.16.8 Eletroforese de DNA

Para a verificação da digestão dos plasmídeos e visualização dos produtos de RT-PCR foram realizados géis de agarose seguindo protocolo padrão (SAMBROOK *et al.*, 1989). Foram preparados géis contendo 2% agarose que foram dissolvidos em tampão tris-acetato-EDTA (TAE) 0,5X para verificar a digestão dos plasmídeos e 1X (40 mM Tris-base, 0,1% ácido acético glacial e 1 mM EDTA) para produtos de RT-PCR. As corridas foram realizadas em cubas de eletroforese com voltagem constante (60-100 V).

3.17 Silenciamento da expressão gênica por RNA de interferência

Esta técnica consiste em transduzir, nas células, plasmídeos que expressam shRNA adaptados de microRNA (shRNAmiR), para os genes de interesse, neste caso, galectina-1. Estes microRNAs são transcritos na forma de precursores de microRNAs que contém um “stem loop” e são processados no núcleo pela enzima Drosha (RNase III) (Figura 9).

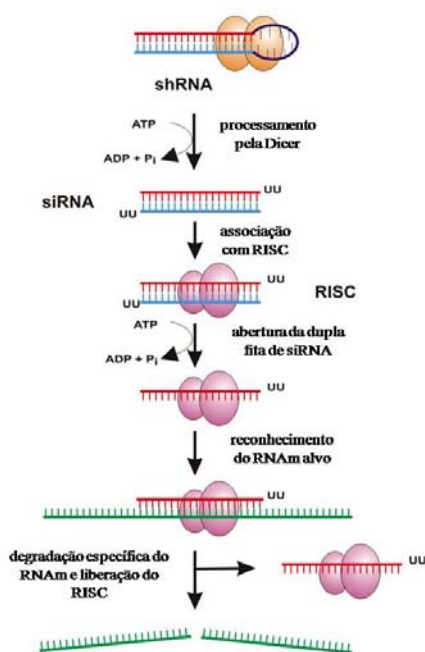


Figura 9 - Via de RNA de interferência (RNAi). O “small hairpin RNA” (shRNA) é processado pela enzima Dicer, formando pequenas fitas de RNA (siRNA), que se associam ao complexo de proteínas indutoras de silenciamento de RNA (“RNA-induced silencing protein complex” RISC), guiando este complexo ao sítio de sequência alvo específica para a clivagem do RNA alvo.

FONTE: Adaptada e traduzida de Rutz e Shefford, 2004.

Esta enzima retira o “loop” para formar o pré-miRNA. A seguir, estes pré-miRNA são exportados para o citosol aonde são clivados pela enzima Dicer que gera o microRNA maduro na forma de RNA de dupla fita. Finalmente, este RNA de dupla fita é aberto pela helicase e incorporado ao complexo RISC associado ao RNAm homólogo cuja clivagem tem como consequência a inibição da expressão do gene de interesse (Figura 9).

Para a obtenção de linhagens com expressão do shRNAmiR e EGFP, é necessário passar pelas etapas de transfecção, infecção, seleção e detecção do EGFP descritas a seguir.

3.17.1 Transfecção

As transfecções celulares foram realizadas de acordo com o protocolo de transfecção por fosfato de cálcio (SAMBROOK e RUSSELL, 2006). Em linhas gerais, 4×10^6 as células empacotadoras, Phoenix™ Amphi foram plaqueadas 14-16 horas para apresentarem uma confluência de 60-80%. Trinta minutos antes da transfecção, foi realizada a troca de meio das placas (9 mL). Durante esse período, foi preparado o precipitado. Para tanto, foram separados dois tubos para cada plasmídeo a ser transfectado. Em um dos tubos, foram misturados 10-20 µg de DNA do vetor retroviral, 0,25 mM CaCl_2 completando para 500 µL com H_2O . No outro, foram adicionados 500 µL de tampão HEBS 2X (50 mM BES, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na_2HPO_4 (pH 6,95)). Para a formação dos cristais, bolhas foram feitas com o auxílio de um pipetador automático no tubo contendo o tampão HEBS e a mistura contendo o plasmídeo de interesse foi adicionada gota a gota ao tampão HEBS. Após um período de 30 min, o precipitado foi adicionado aos poucos às placas de cultura celular.

3.17.2 Infecção retroviral

As infecções foram realizadas 48 horas após a transfecção. O sobrenadante viral de células Phoenix™ Amphi transfectadas com os plasmídeos contendo as construções de shRNAmiR foi filtrado e transferido para células K562. As células K562 foram incubadas por 12 horas com o sobrenadante viral e após 48 horas foram selecionadas.

3.17.3 Seleção com antibiótico

O início da seleção foi feita 48 horas depois da primeira infecção. Nesse momento, apenas as células mantidas do repique foram centrifugadas a 240 x g, 5min a 4 °C para retirada completa do meio. Em seguida as células foram ressuspensas em meio de cultura contendo o antibiótico de seleção, puromicina, na concentração de 2 µg/mL por 48 horas. Ao final do tratamento, a porcentagem de células EGFP positivas foi observada por citometria de fluxo de microscopia de fluorescência.

3.17.4 Detecção de células EGFP+ por microscopia de fluorescência

A aquisição de imagens de imunofluorescência e de campo claro foi observada no microscópio invertido Axiovert 400 da Zeiss, equipado para epifluorescência do laboratório do Dr. Carlos Menck. Foi utilizado um aumento de 10X.

3.18 Inoculação subcutânea (sc) dos camundongos

As células K562.MLP e K562.shLGALS1 mantidas em cultura, foram centrifugadas a 240 x g, por 5 min, a 4 °C e ressuspensas em PBS 1X gelado. Este procedimento foi repetido duas vezes e na última vez, as células foram ressuspensas na concentração de 1×10^7 células/100 µL de PBS 1X. Foram inoculadas dez milhões de células K562.MLP e K562.shLGALS1-115, subcutaneamente, respectivamente no dorso esquerdo e direito de camundongos BALB/c nude anestesiados (Figura 10).

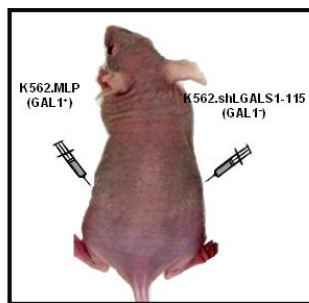


Figura 10 - Esquema de inoculação das células tumorais K562.MLP e K562.shLGALS1. Dez milhões de células foram inoculadas no dorso esquerdo e direito respectivamente de camundongos BALB/c nude, respectivamente.

3.19 Captura de imagens digitais

Imagens digitais foram capturadas dos camundongos, antes de serem inoculados, nos dias em que os tumores foram mensurados e ao final do experimento, foram capturadas com o auxílio de uma câmera digital de marca CANON, modelo Power Shot SD1000.

3.20 Análise do crescimento de células tumorais in vivo

Após a inoculação das células tumorais, o tamanho dos tumores foi mensurado por meio de uma fita métrica três vezes por semana. O volume tumoral foi calculado de acordo com a fórmula seguinte, descrita anteriormente (SABHERWAL *et al.*, 2006):

$$\text{Volume do tumor} = 0,52 \times (\text{largura}) \times (\text{largura}) \times (\text{comprimento})$$

Os dados resultantes desse cálculo foram plotados em um gráfico do volume do tumor em função do tempo transcorrido após a inoculação das células. No momento em que um dos tumores dos camundongos atingiu aproximadamente 1 cm³, os camundongos foram sacrificados com CO₂ e os tumores extirpados.

3.21 Ensaio de Proliferação Celular

A proliferação das células K562 controle e infectadas com retrovírus contendo os plasmídeos pMSCV-MLP, pMSCV-MLPshLGALS1-208, pMSCV-MLPshLGALS1-115, pMSCV-MLPshLGALS1-467, pMSCV-MLPshLGALS1-391 foi realizada por contagem das células em câmara de Neubauer. Assim, as células K562 investigadas foram plaqueadas na concentração de 10×10^4 células em placas de seis (6) poços e incubadas por um período total de 72 horas, com contagem das células viáveis a cada 24 horas.

3.22 Determinação da viabilidade celular por exclusão de azul de tripan

A determinação da viabilidade celular foi feita pela contagem de células (mínimo de 100) em câmara de Neubauer após a diluição de 1:2 da suspensão de células em azul de Tripan a 0,4% em tampão fosfato (PBS) (0,137 M NaCl; 2,7 mM KCl, 8,0 mM Na₂HPO₄, pH 7,4). As células vivas são impermeáveis e por isso permanecem incolores, já as células mortas perdem a integridade da membrana e por isso adquirem a coloração azul.

3.23 Determinação da apoptose por fragmentação de DNA

Amostras contendo $1-4 \times 10^5$ células foram centrifugadas a 210g por 5 minutos a 4 °C e ressuspensas em uma solução hipotônica, contendo 0,1% de citrato de sódio, 0,1% de triton X-100 e 50µg/mL de iodeto de propídeo (PI). As amostras foram incubadas por 15 minutos a 4 °C para promover a fragilização da membrana celular pelo Triton X-100 e lise celular pelo choque hipotônico da solução. Após a lise, o material nuclear fica acessível ao iodeto de propídeo (PI), que se intercala no DNA genômico e produz uma fluorescência capaz de ser analisada no citômetro de fluxo (FACScalibur-Becton Dickinson). A análise é realizada em 5000 eventos, o resultado é dado pelo histograma do software CellQuest (Becton Dickinson). O histograma indica a ploidia nuclear em função da fluorescência. As células apresentam um pico maior correspondente à fase G0-G1 (2n) do ciclo celular e um menor, G2-M (4n), intercalados pela fase S. A população que se encontra à esquerda do pico G0-G1, por possuírem uma quantidade de DNA inferior a 2n (hipodiplóide), corresponde às células em apoptose.

3.24 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata e repetidos pelo menos três vezes.

O teste de Kruskal–Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn foi utilizado para comparar os dados de expressão gênica dos indivíduos controle e pacientes com

LMC nas diferentes fases, pacientes que obtiveram remissão citogenética completa e com resistência ao tratamento com mesilato de imatinibe. A associação entre *BCR-ABL* e *LGALS1* ou *LGALS3* foi avaliada por meio do teste não paramétrico de coeficiente de correlação de Spearman. A curva de sobrevida global dos pacientes na fase avançada da doença foi obtida pelo método de Kaplan-Meier e os grupos foram comparados pelo teste de log-rank como descrito na seção 3.1.7. A comparação entre os grupos na análise de crescimento tumoral, *in vivo*, foi realizada pelo teste 2-way ANOVA com repetições.

Em todas as análises, a diferença entre os grupos experimentais foi considerada significativa quando $p < 0.05$. As análises estatísticas foram executadas com o programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

Resultados

4 Resultados

4.1 Expressão de galectina-1 e -3 em linhagens

4.1.1 Expressão de galectina-1 e -3 em linhagens BCR-ABL⁺ e BCR-ABL⁻

O primeiro passo deste estudo consistiu em verificar a expressão gênica das galectinas 1 e 3 em linhagens celulares negativas ou positivas para o oncogene *BCR-ABL*.

A análise da expressão gênica de *LGALS1* por RT-qPCR mostrou que as três linhagens BCR-ABL-positivas estudadas (K562, KCL22 e LAMA-84) exibiram níveis de *LGALS1* mais altos do que as células BCR-ABL-negativas (Jurkat, CEM e HL-60) analisadas neste trabalho (Figura 11A). Por outro lado, apesar de todas as linhagens BCR-ABL⁺ expressarem grandes quantidades de galectina-3, a expressão deste gene não é maior do que todas as linhagens BCR-ABL⁻. A linhagem CEM exibiu níveis equivalentes aos da linhagem BCR-ABL⁺ K562 e inclusive maiores do que nas linhagens BCR-ABL⁺ KCL-22 e LAMA-84. (Figura 11B).

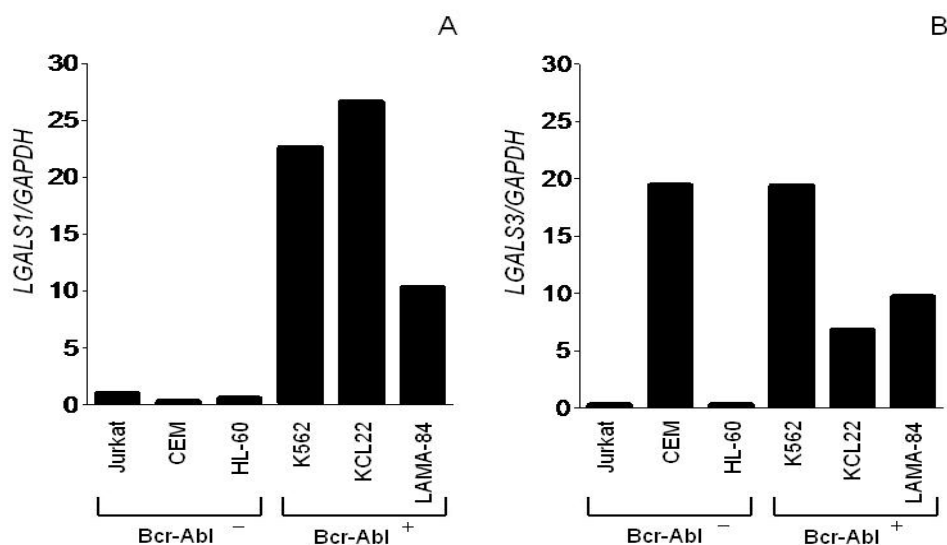


Figura 11 - Expressão relativa de *LGALS1* e *LGALS3* nas linhagens BCR-ABL⁻ e BCR-ABL⁺ derivadas de pacientes com leucemia. RT-qPCR de *LGALS1* (A) e *LGALS3* (B) nas linhagens Jurkat, CCRM-CEM e HL-60 (BCR-ABL⁻) e K562, KCL22 e LAMA-84 (BCR-ABL⁺), utilizando como controle endógeno, a expressão de *GAPDH*.

A seguir, foram avaliados os níveis protéicos de galectina-1 e -3 para verificar se estes refletiam os resultados obtidos na detecção de expressão gênica. De fato, os resultados obtidos corroboram os dados referentes à expressão gênica, pois mostram que as linhagens K562, KCL22 e LAMA-84 que expressam BCR-ABL apresentaram maiores níveis protéicos de galectina-1 do que as linhagens HL-60, CEM e Jurkat (Figura 12). Em contraposição, apesar de ter sido observada a expressão gênica de *LGALS3* nas linhagens BCR-ABL⁺, não foi detectada a presença desta proteína em nenhuma das linhagens utilizadas (Figuras 11B e 12).

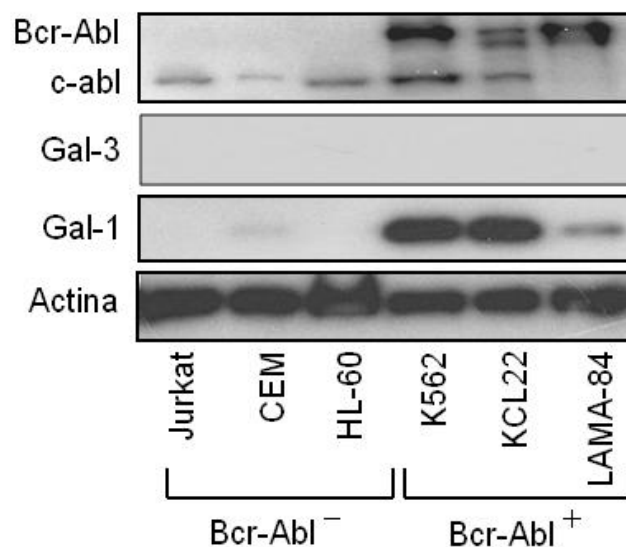


Figura 12 - Expressão protéica de galectina-1 e -3 nas linhagens BCR-ABL⁻ e BCR-ABL⁺. Os lisados totais das linhagens Jurkat, CEM, HL-60 (BCR-ABL⁻) e K562, KCL22 e LAMA-84 (BCR-ABL⁺) foram analisadas por “Western Blot” com anticorpos para galectina-1 (Gal-1) e galectina-3 (Gal-3).

4.1.2 Galectina-1 em células com expressão condicional de BCR-ABL

Em conjunto, os resultados anteriores sugerem que apenas a galectina-1 seria modulada pela expressão do BCR-ABL. Assim sendo, os experimentos subsequentes focaram a galectina-1. Para testar esta hipótese de modulação, a expressão de Gal-1 foi comparada nas linhagens de leucemia pró-mielocítica (HL-60) e linfóide (Jurkat) transfectadas com retrovírus recombinante contendo a forma p185 do oncogene *BCR-ABL* (HL-60.BA e Jurkat.BA) ou apenas o vetor vazio (HL-60 e Jurkat). Como esperado, a expressão de BCR-ABL nestas duas linhagens levou ao aparecimento de várias proteínas fosforiladas em tirosina

(Figura 13). Além disto, as células HL-60 e Jurkat passaram a expressar Gal-1 quando transfectadas com o vetor contendo *BCR-ABL* (Figura 13A). Finalmente, os resultados de RT-qPCR mostram que esse aumento ocorre também em nível de RNAm (Figura 13B).

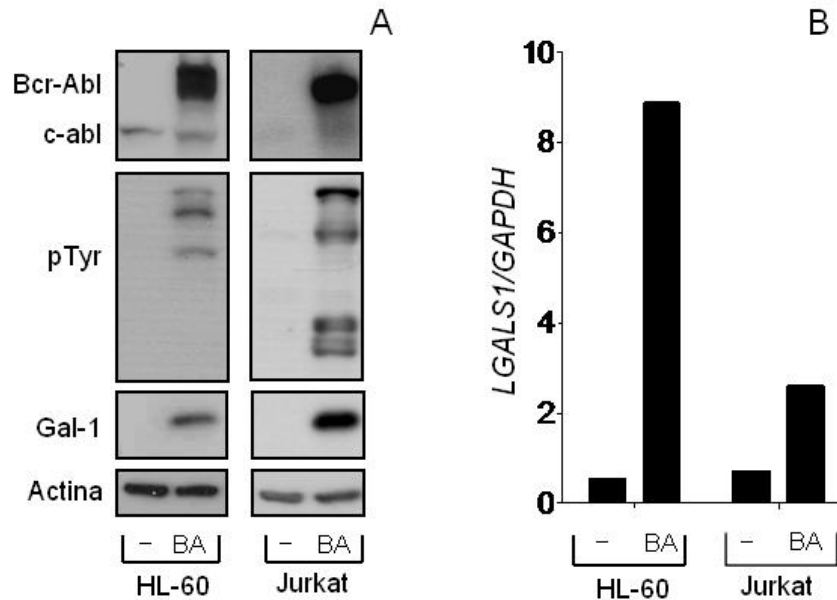


Figura 13 - Galectina-1 em HL-60 e Jurkat com expressão ectópica de *BCR-ABL*. A) Os lisados totais das células HL-60.vetor (-), HL-60.BCR-ABL (BA), Jurkat.vetor (-) e Jurkat.BCR-ABL (BA) foram analisadas por “Western Blot” com anticorpos dirigidos a galectina-1 (Gal-1), proteínas fosforiladas em tirosina (pTyr) e c-ABL/BCR-ABL. B) RT-qPCR de *LGALS1* nas linhagens HL-60.vetor (-), HL-60.BCR-ABL (BA), Jurkat.vetor (-) e Jurkat.BCR-ABL (BA), utilizando como controle endógeno, a expressão de *GAPDH*.

Além disso, foram utilizadas as células Ton.B.210 nas quais a expressão da isoforma p210 de *BCR-ABL* pode ser induzida pela adição de doxíciclina à cultura. Neste modelo, a análise de RT-qPCR revelou que a expressão de *LGALS1* apresenta um aumento significativo após 24 horas de tratamento com doxíciclina, corroborando a idéia de que a expressão de galectina-1 é regulada por *BCR-ABL* (Figura 14A). No entanto, ao analisar os níveis protéicos, esse aumento não foi observado (Figura 14B). Porém, é importante destacar que esta linhagem murina já expressava uma quantidade considerável de galectina-1 antes mesmo de expressar o *BCR-ABL* e, talvez por isso, não tenha sido possível observar um aumento na expressão protéica deste β -galactosídeo (Figura 14B).

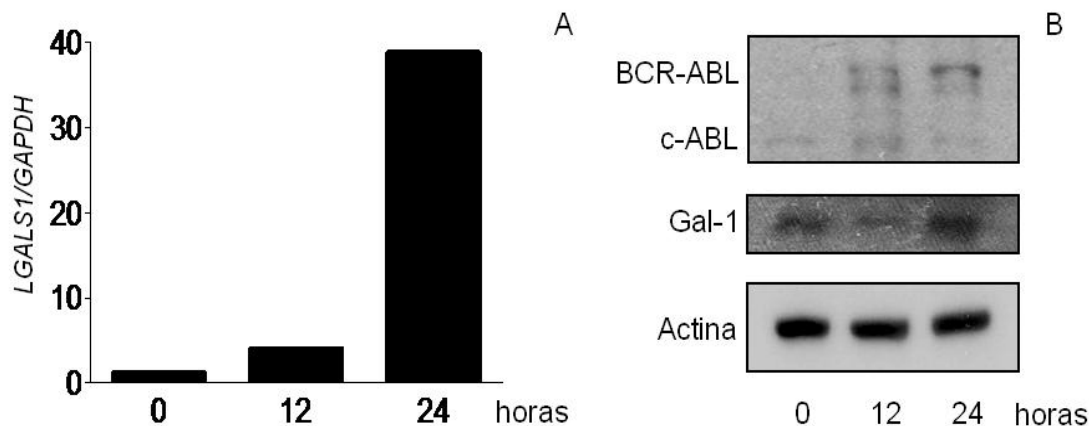


Figura 14 - Galectina-1 em células com expressão condicional de *BCR-ABL*. A) RT-qPCR de *LGALS1* nas células Ton.B.210.1 incubadas por 0, 12 e 24 horas na presença de doxíciclina, utilizando como controle endógeno, a expressão de *GAPDH*. B) Os lisados totais das células Ton.B.210.1 incubadas por 0, 12 e 24 horas na presença de doxíciclina foram analisadas por “Western Blot” com anticorpos para galectina-1 (Gal-1) e actina como controle.

4.1.3 Participação da atividade tirosina-quinase de *BCR-ABL* na expressão de galectina-1

Alguns estudos relataram que diversos genes são regulados de forma dependente da atividade tirosina-quinase do *BCR-ABL* (CLEVELAND *et al.*, 1989) (DEININGER *et al.*, 2000b). Desta forma, foi verificado se a galectina-1 poderia ser regulada por essa atividade, utilizando duas abordagens distintas.

Primeiro, as linhagens transfectadas com *BCR-ABL* ou vetor vazio e as linhagens de leucemia derivadas de paciente com LMC foram tratadas com o inibidor específico de tirosina-quinase, mesilato de imatinibe (MI). Uma curva dose-resposta foi elaborada para a determinação da concentração de MI que inibia a atividade quinase em células HL-60.*BCR-ABL*, utilizando a HL-60 vetor como controle (Figura 15). Para tanto, as células HL-60 e HL-60.*BCR-ABL* foram mantidas na ausência ou presença de concentrações de MI variando de 0,2 a 10 μ M e mesmo na maior concentração utilizada, não foram observadas células mortas em 24 horas, período anterior ao início da morte induzida pelo MI (Figura 15A). As células HL-60.*BCR-ABL* apresentaram diminuição da expressão protéica de galectina-1 quando tratadas com concentrações de mesilato de imatinibe superiores a 5 μ M (Figura 15B).

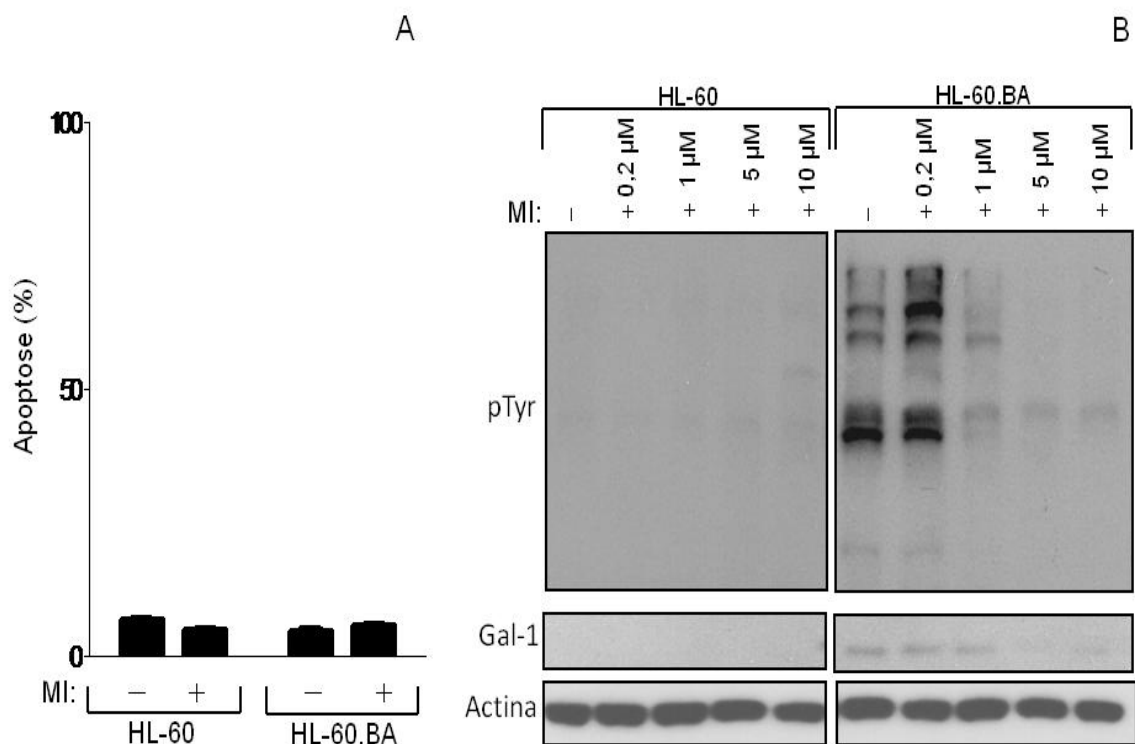


Figura 15 - Galectina-1 em células HL-60 e HL-60.BCR-ABL tratadas com mesilato de imatinibe. A) As células HL-60 e HL-60.BCR-ABL foram incubadas na presença ou ausência de STI571 (10 μ M) por 24 horas e em seguida lisadas em tampão HFS contendo iodeto de propídeo para terem o conteúdo de DNA analisado por citometria de fluxo. A porcentagem de apoptose é representada pelos núcleos hipodiplóides, considerados apoptóticos. B) As células HL-60 e HL-60.BCR-ABL foram incubadas na ausência ou presença de 200 nM, 1 μ M, 5 μ M, ou 10 μ M de mesilato de imatinibe (MI) por 24 horas e após esse período, o lisado total de proteínas foi analisado por “Western Blot” com anticorpos para proteínas fosforiladas em tirosina (pTyr), galectina-1 (Gal-1) e actina como controle.

Definida a concentração ideal de MI em 10 μ M, o passo seguinte foi realizar um experimento com todas as linhagens incubadas simultaneamente por 24 horas na presença ou ausência do MI. Nesse experimento, a diminuição na quantidade de proteínas fosforiladas comprova a eficiência do tratamento com MI (Figura 16). Neste contexto, foi observada a redução de galectina-1 em todas as linhagens BCR-ABL⁺, exceto na linhagem KCL22 (Figura 16).

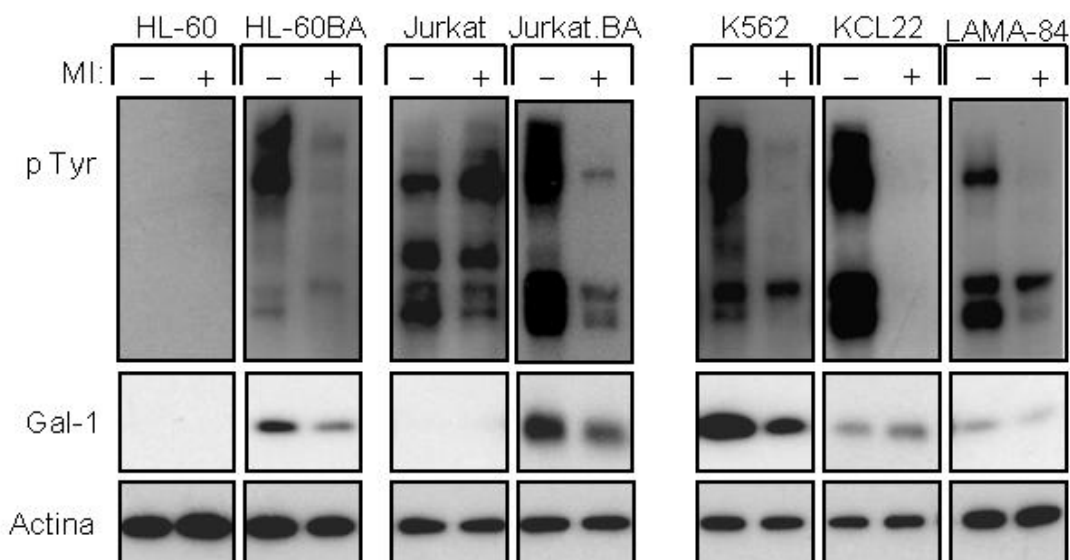


Figura 16- Galectina-1 nas linhagens BCR-ABL⁻ e BCR-ABL⁺ tratadas com mesilato de imatinibe. As linhagens HL-60 e Jurkat transfectadas com o vetor vazio ou com *BCR-ABL* (HL-60.BA e Jurkat.BA assim como as linhagens derivadas de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica foram incubadas na ausência (-) ou presença (+) de mesilato de imatinibe (IM) a 10 µM, por 24 horas. O lisado total de proteínas foi analisado por “Western Blot” com anticorpos para proteínas fosforiladas em tirosina (pTyr), galectina-1 (Gal-1) e actina como controle.

Estes dados sugerem que a expressão de galectina-1 é dependente de atividade tirosina-quinase de BCR-ABL.

Para consolidar este resultado, foi utilizada uma abordagem alternativa que consistiu no uso de células Jurkat, derivadas de leucemia BCR-ABL⁻ transfectadas com uma construção de *BCR-ABL* quinase deficiente. Esta linhagem foi obtida no laboratório, pela Dra. Ana Elisa B. Bueno-da-Silva. Nesse modelo, foi analisada a expressão de galectina-1 nas células Jurkat infectadas com uma construção mutada de *BCR-ABL*, deficiente na atividade tirosina-quinase. Esta linhagem denominada Jurkat.BCR-ABL/KD comparada com as células infectadas com o vetor vazio tanto em nível de expressão protéica como gênica (Figura 17). As células Jurkat.BCR-ABL/KD não apresentaram aumento na quantidade de proteínas fosforiladas em tirosina, uma vez que a atividade quinase é deficiente (Figura 17A). Nestas condições, a forma quinase-deficiente do *BCR-ABL* não resultou no aumento de expressão protéica e gênica de galectina-1 (Figura 17A e B).

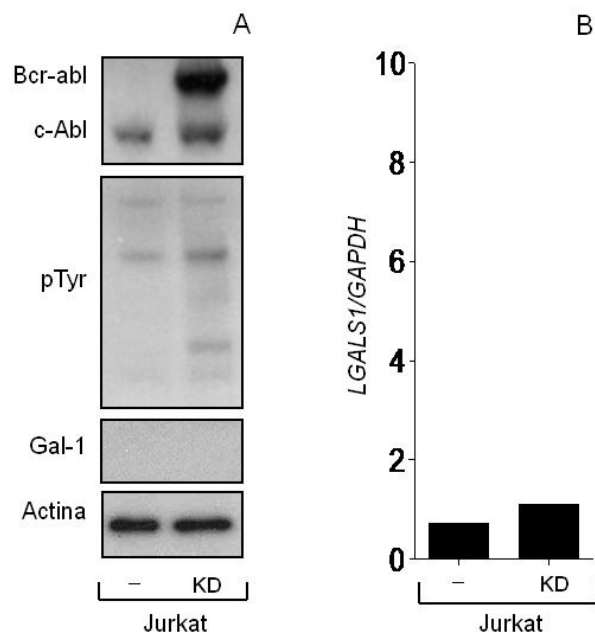


Figura 17 - Galectina-1 em células com atividade tirosina-quinase deficiente. A) Os lisados totais das células Jurkat transfectadas com o vetor vazio (-) ou com a construção de *BCR-ABL* quinase deficiente (KD) foram analisados por “Western Blot” com anticorpos para proteínas fosforiladas (pTyr), galectina-1 (Gal-1) e actina como controle. B) RT-qPCR de *LGALS1* nas linhagens Jurkat vetor (-) e Jurkat.BCR-ABL/KD (KD), utilizando como controle endógeno, a expressão de *GAPDH*.

Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos no tratamento das linhagens BCR-ABL positivas com mesilato de imatinibe e em conjunto demonstram que a expressão desta lectina com especificidade para β -galactosídeos é dependente da atividade tirosina-quinase do BCR-ABL.

4.2 Expressão em pacientes com LMC

4.2.1 Expressão de BCR-ABL nos pacientes com LMC

A LMC é caracterizada pela expressão de BCR-ABL e, portanto, a expressão desse oncogene foi confirmada nas amostras de todos pacientes incluídos neste trabalho. No entanto, a figura 18 representa apenas os dados dos pacientes com LMC nas fases crônica,

acelerada e blástica (Figura 18). A presença de *BCR-ABL* foi confirmada em todos os pacientes com LMC, mas em nenhum dos indivíduos saudáveis. Por esse motivo, os pacientes com LMC, ao serem analisados, como um único grupo, exibiram uma expressão de *BCR-ABL* maior do que os indivíduos saudáveis (Figura 18).

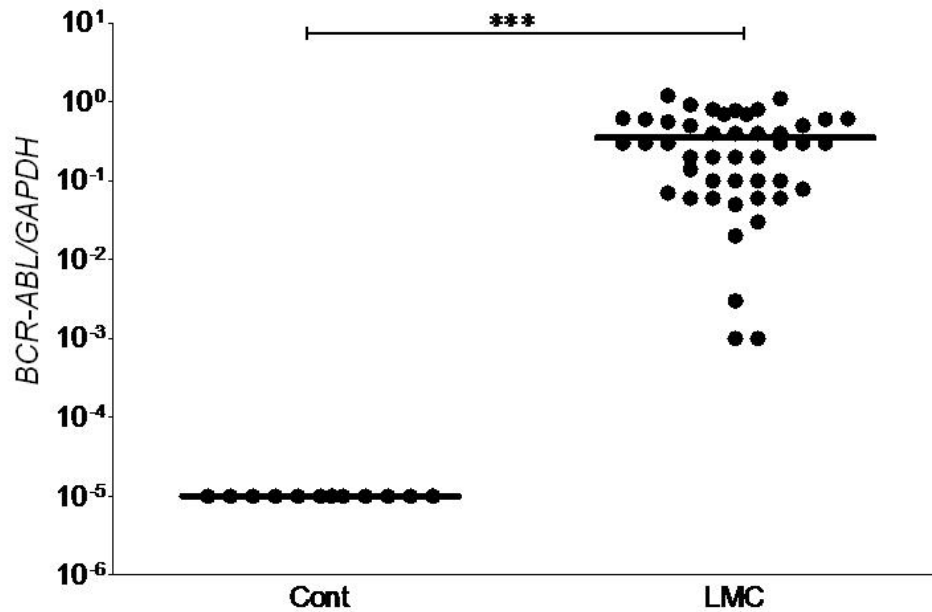


Figura 18 - *BCR-ABL* nos pacientes com LMC. RT-qPCR de *BCR-ABL* de cada amostra de PBMC de indivíduos saudáveis (Cont) e pacientes com LMC das fases crônica, acelerada e blástica foram analisadas, utilizando como controle endógeno, a expressão de *GAPDH*. O traço horizontal representa a mediana de cada grupo. $p < 0,0001$: (***)

4.2.2 Expressão de *BCR-ABL* nos diferentes grupos de pacientes com LMC

A seguir foi analisada a expressão de *BCR-ABL* nos pacientes com LMC separados nas fases crônica (FC), acelerada (FA) e blástica (FB) assim como nos pacientes que alcançaram remissão citogenética completa (RCC) e pacientes resistentes ao tratamento com mesilato de imatinibe (R-MI).

A expressão nas três fases da LMC foi maior do que nos indivíduos saudáveis, mas não houve diferença entre essas fases. Com relação ao tratamento, os pacientes resistentes mantiveram altos níveis de *BCR-ABL*, similares aos das fases crônica, acelerada e blástica,

enquanto os pacientes que apresentaram remissão citogenética exibiram níveis menores do que as fases blástica e pacientes resistentes ao tratamento (Figura 19).

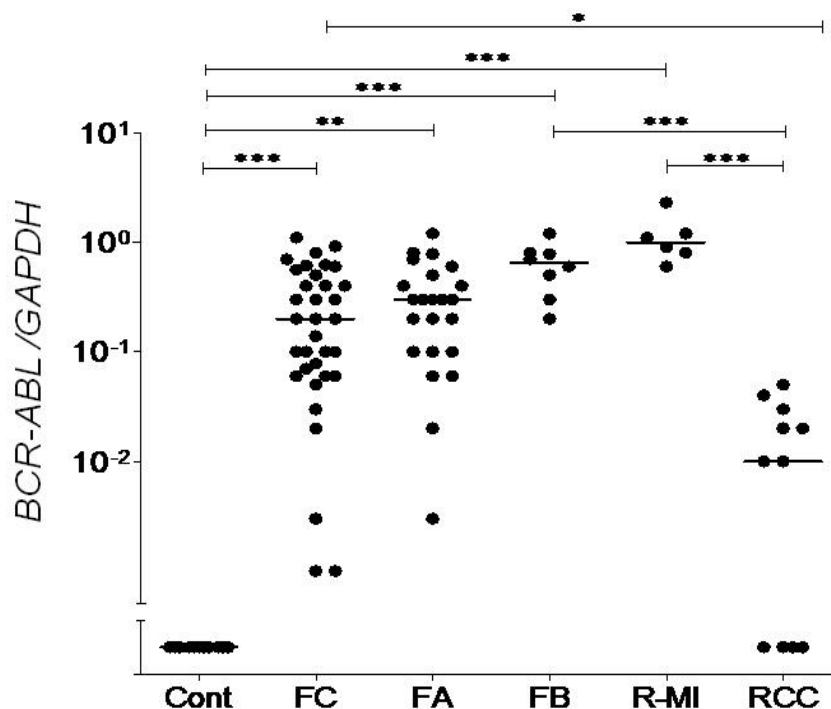


Figura 19 - *BCR-ABL* nas diferentes fases da LMC e nos pacientes resistentes ou com remissão citogenética completa após tratamento com mesilato de imatinibe. RT-qPCR de *BCR-ABL* de cada amostra de PBMC de indivíduos saudáveis (Cont) e pacientes com LMC das fases crônica (FC), acelerada (FA), blástica (FB), pacientes com remissão citogenética completa (RCC) e resistentes ao tratamento com mesilato de imatinibe (R-MI) foram analisadas, utilizando como controle endógeno, a expressão de *GAPDH*. O traço horizontal representa a mediana de cada grupo. $p < 0,0001$: (***), $p < 0,01$: (**), $p < 0,05$: (*).

É interessante notar que parece haver dois subgrupos de pacientes no grupo RCC, um subgrupo com expressão semelhante ao controle e outro com uma expressão um pouco maior, mas de qualquer forma inferior ao da fase crônica (Figura 19).

4.2.3 Expressão de *LGALS3* nos pacientes com LMC

Apesar de não ter sido observada uma relação entre a expressão de *BCR-ABL* e *LGALS3* nas linhagens, este fato não descartava a possibilidade de existir uma associação entre esses genes em pacientes com LMC. Assim, foi realizada a análise das amostras dos

pacientes com LMC nas fases crônica, acelerada e blástica, quando analisados como um único grupo e comparada com os indivíduos saudáveis (Figura 20).

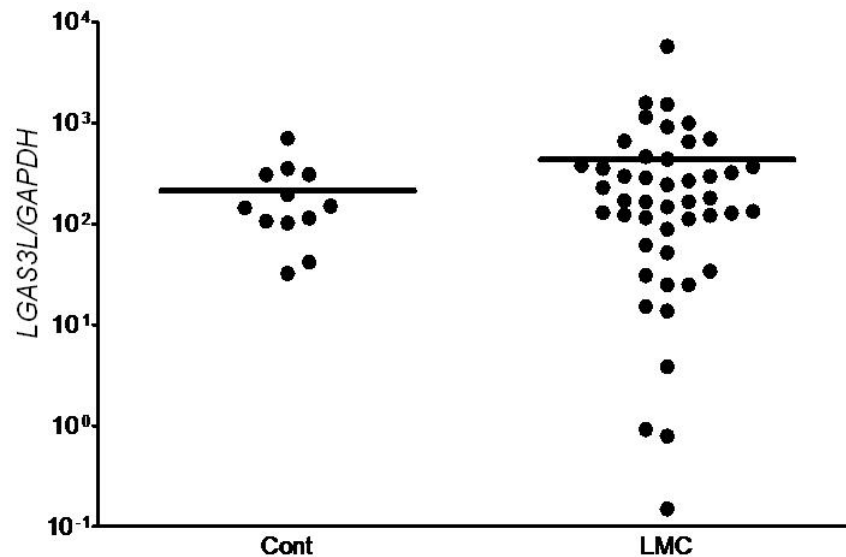


Figura 20 - *LGALS3* nos pacientes com LMC. RT-qPCR de *LGALS3* de cada amostra de PBMC de indivíduos saudáveis (Cont) e pacientes com LMC das fases crônica, acelerada e blástica foram analisadas, utilizando como controle endógeno, a expressão de *GAPDH*. O traço horizontal representa a mediana de cada grupo.

Não houve diferença significativa entre os dois grupos (Figura 20). Os dados relativos aos pacientes com LMC são bastante dispersos e uma análise dos pacientes separados nas diferentes fases foi realizada para obter mais informações sobre a expressão de galectina-3 nos pacientes com LMC.

4.2.4 Expressão de *LGALS3* nos diferentes grupos de pacientes com LMC

Quando os pacientes foram separados de acordo com as três fases da doença e com relação ao resultado após o tratamento com mesilato de imatinibe, em dois grupos, aqueles com remissão citogenética completa e resistentes ao MI, foi possível notar que a expressão de *LGALS3* nos pacientes com LMC permaneceu igual aos indivíduos saudáveis em todas as

fases da doença e também em relação à resposta ao tratamento com mesilato de imatinibe (Figura 21).

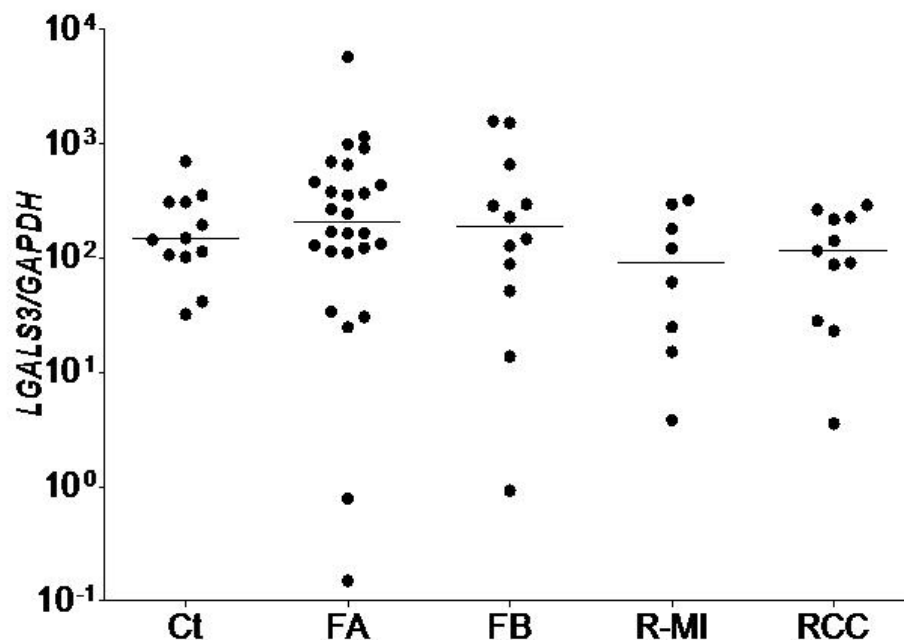


Figura 21 - Galectina-3 nas diferentes fases da LMC e em pacientes que responderam ou não ao tratamento com mesilato de imatinibe. RT-qPCR de *LGALS3* de cada amostra de PBMC de indivíduos saudáveis (Ct) e pacientes com LMC das fases crônica (FC), acelerada (FA), blástica (FB), pacientes com remissão citogenética completa (RCC) e resistentes ao tratamento com mesilato de imatinibe (R-MI) foram analisadas, utilizando como controle endógeno, a expressão de *GAPDH*. O traço horizontal representa a mediana de cada grupo. $p < 0,0001$: (***), $p < 0,01$: (**), $p < 0,05$: (*).

Além disso, não foi observada diferença entre os pacientes que apresentaram resistência secundária ao tratamento com MI e aqueles com RCC (Figura 21).

Estes resultados indicaram que apesar de haver um aumento da expressão de galectina-3 nos pacientes com LMC, não parece haver relação direta com a expressão de *BCR-ABL*, uma vez que a diminuição das células *BCR-ABL*-positivas pelo tratamento com MI, não reverteu a expressão de *LGALS3* nos pacientes que alcançaram uma remissão citogenética completa.

Contudo, uma análise da correlação entre a expressão desses dois genes é necessária para essa afirmação.

4.2.5 Correlação entre *BCR-ABL* e *LGALS3* nos pacientes com LMC

A associação entre a expressão de *BCR-ABL* e *LGALS3* foi analisada pelo teste de correlação de Spearman, considerando apenas os 26 pacientes na fase crônica a fim de eliminar a influência de fatores associados à aceleração da doença. O resultado desse teste mostrou que não há correlação entre a expressão desses dois genes (Figura 22).

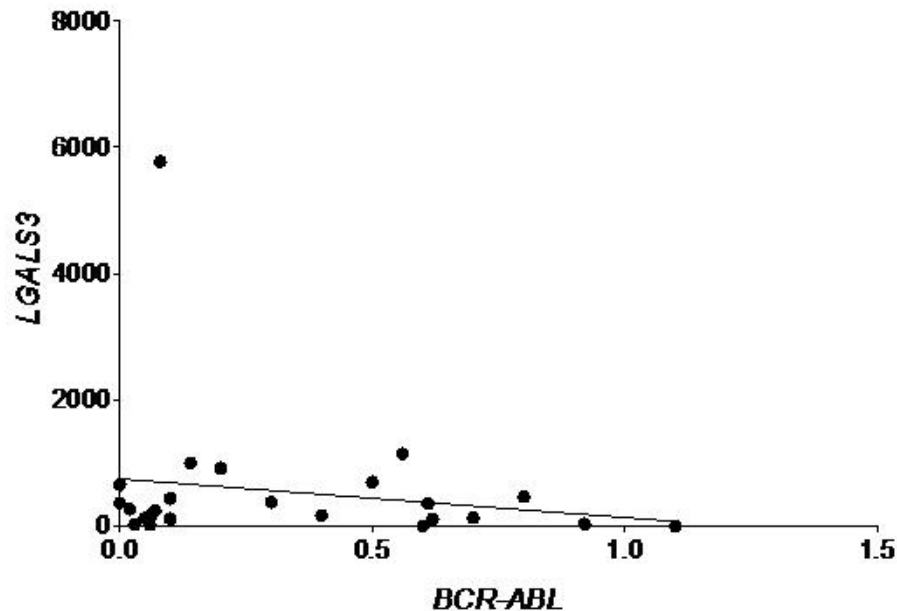


Figura 22 - Associação entre *LGALS3* e *BCR-ABL* nos pacientes com LMC. Análise da correlação de Spearman nos pacientes com LMC. Nesta análise, foram incluídos apenas os pacientes com LMC na fase crônica. $R=-0,113$, $p>0,05$.

4.2.6 Expressão de galectina-1 nos pacientes com LMC

Seguindo a mesma linha de raciocínio, foi elaborada uma análise comparativa da expressão de *LGALS1* nos indivíduos saudáveis (Cont) e pacientes com LMC. Não foi observada nenhuma diferença entre as medianas desses dois grupos (Figura 23). No entanto, é possível notar uma discreta tendência à maior expressão desta lectina nos pacientes portadores de LMC (Figura 23).

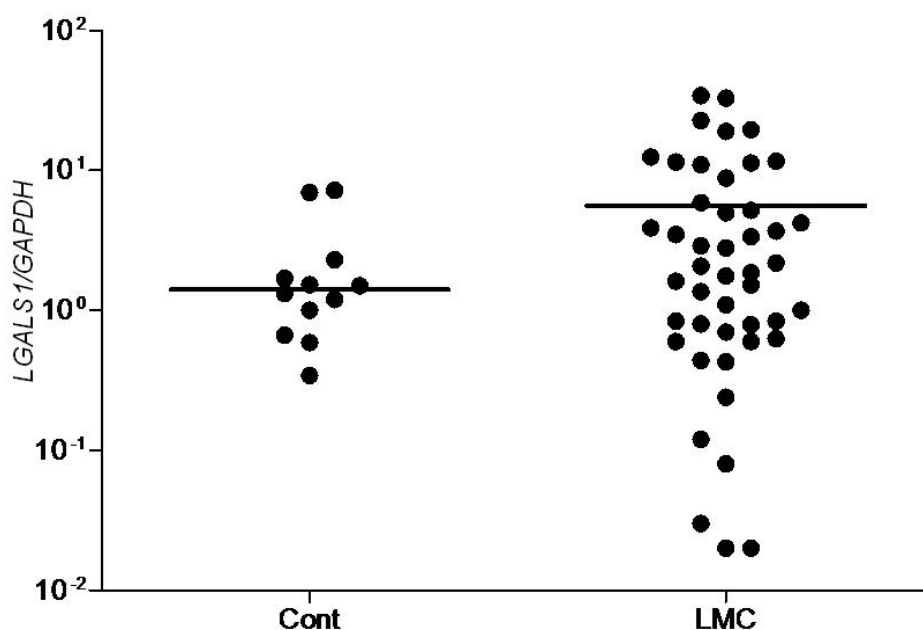


Figura 23 - Galectina-1 nos pacientes com LMC. RT-qPCR de *LGALS1* nas amostras de PBMC de indivíduos saudáveis (Cont) e pacientes com LMC nas fases crônica, acelerada e blástica, utilizando como controle endógeno, a expressão de *GAPDH*. O traço horizontal representa a mediana de cada grupo.

4.2.7 Expressão de galectina-1 nos diferentes grupos de pacientes com LMC

Com o intuito de saber se a expressão de galectina-1 variava conforme a fase da doença, os pacientes foram separados de acordo com as três fases da doença, e também de acordo com a resposta ao tratamento com MI, em resistentes (R-MI) ou em remissão citogenética completa (RCC). Ao separar as fases, fica claro que a expressão de *LGALS1* não é igual em todas as fases, sendo significativamente maior na fase blástica do que na crônica (Figura 24). Além disso, os pacientes que obtiveram RCC exibiram níveis mais baixos do que os pacientes na fase blástica, chegando inclusive a apresentar uma expressão similar aos indivíduos saudáveis (Figura 24).

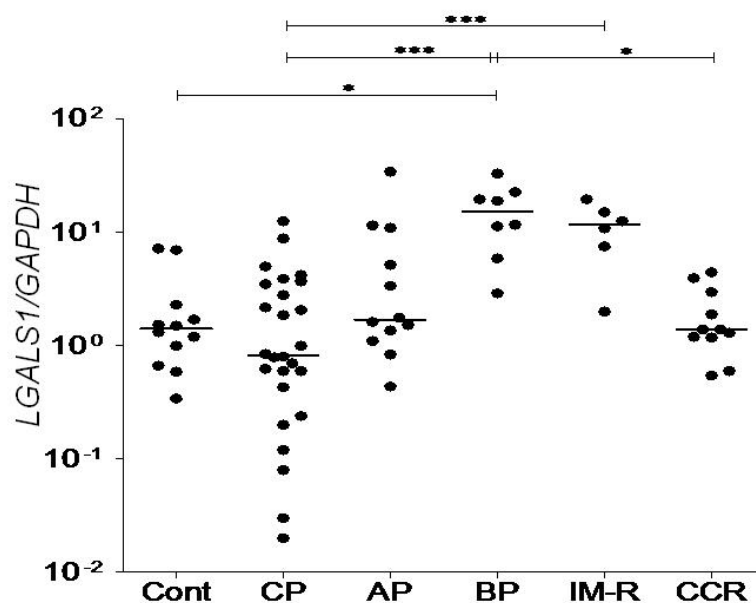


Figura 24 - Galectina-1 nas diferentes fases da LMC e em pacientes que responderam ou não ao tratamento com mesilato de imatinibe. RT-qPCR de *LGALS1* foram realizados nas amostras de PBMC de indivíduos saudáveis (Cont) e pacientes nas fases crônica (FC), acelerada (FA), blástica (FB) e amostras de pacientes que apresentaram resistência ao tratamento com mesilato de imatinibe (R-MI) ou que entraram em remissão citogenética completa (RCC) após esse tratamento. Estas amostras foram analisadas, utilizando como controle endógeno, a expressão de *GAPDH*. O traço horizontal representa a mediana de cada grupo (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.

4.2.8 Correlação entre *LGALS1* e *BCR-ABL*

O aumento na expressão de galectina-1 com a progressão da LMC sugere, portanto, que pode haver uma associação entre os níveis de *LGALS1* e *BCR-ABL*. Ao fazer a análise estatística de correlação da expressão de *LGALS1* e *BCR-ABL* nos pacientes com LMC e na fase crônica, foi constatado que uma correlação positiva realmente existe. De fato, o resultado do coeficiente de Spearman revelou uma forte correlação entre esses genes nos pacientes com LMC na fase crônica, mostrando que aproximadamente, 78,3% da variação de galectina-1 está relacionada com a expressão de *BCR-ABL* (Figura 25).

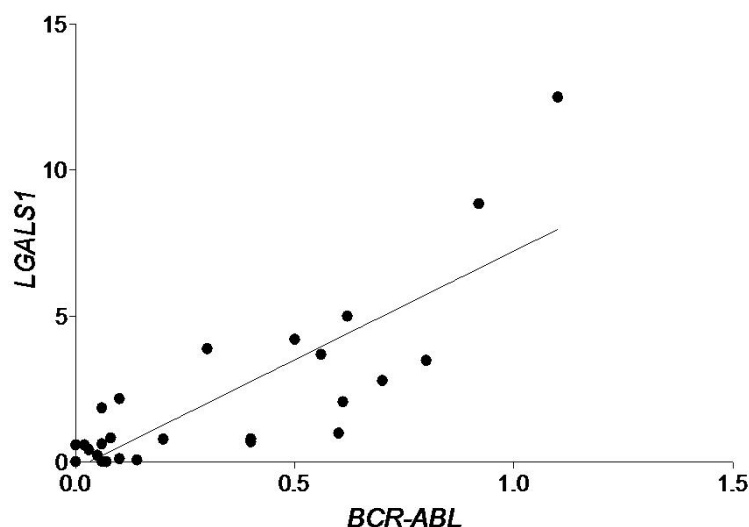


Figura 25 - Associação entre *LGALS1* e *BCR-ABL* nos pacientes com LMC. Análise da correlação de Spearman nos pacientes com LMC. Nesta análise, foram incluídos apenas os pacientes com LMC na fase crônica. $R=0,783$, $p<0,0001$.

4.2.9 Correlação entre *LGALS1* e o índice de Sokal

Após a confirmação da correlação entre a expressão de *LGALS1* e *BCR-ABL*, foi investigada a correlação entre essa lectina e o índice de Sokal calculado para os pacientes com LMC, na fase crônica. No entanto, não houve correlação entre a expressão de *LGALS1* e índice de Sokal (Figura 26).

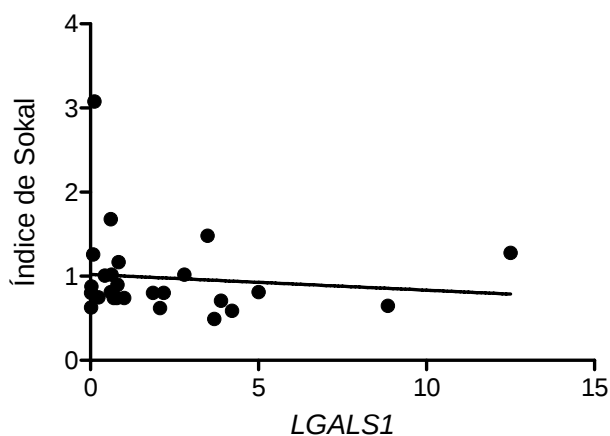


Figura 26 - Associação entre a expressão de galectina-1 e o índice de Sokal nos pacientes na fase crônica da LMC. Análise da correlação de Spearman entre a expressão de galectina-1 (*LGALS1*) e o índice de Sokal, nos pacientes da fase crônica da LMC. $R=-0,2283$, $p=0,2619$.

4.2.10 Correlação entre *LGALS1* e parâmetros clínico-laboratoriais

Ao analisar separadamente a correlação entre *LGALS1* e os parâmetros clínico-laboratoriais associados ao índice de Sokal assim como a taxa de hemoglobina, não foi observada nenhuma correlação entre *LGALS1* e qualquer um dos parâmetros clínico-laboratoriais envolvidos na análise multivariada do índice Sokal, tais como idade, tamanho do baço, número de plaquetas, número de leucócitos e porcentagem de blastos no sangue periférico e tampouco com a taxa de hemoglobina no sangue (Figura 27A-F).

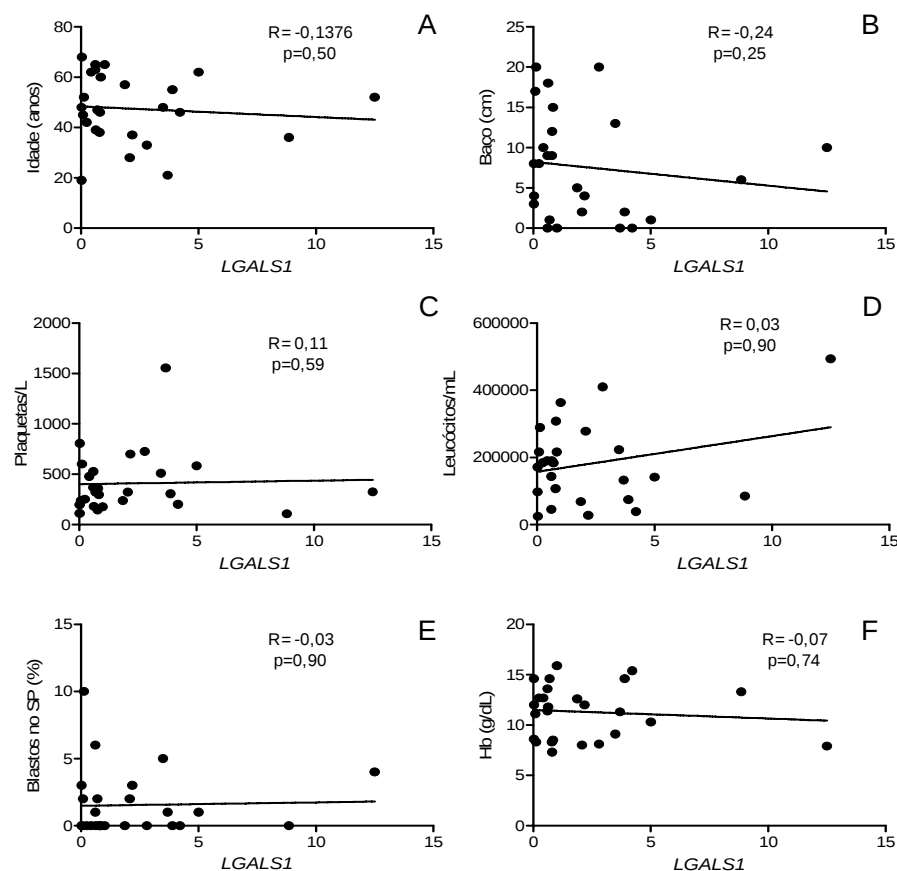


Figura 27 - Associação entre *LGALS1* e parâmetros clínico-laboratoriais. Análise da correlação de Spearman entre *LGALS1* e idade (A), tamanho do baço (B), plaquetas (C), leucócitos (D), blastos no sangue periférico (SP) (E) e concentração de hemoglobina (Hb) (F). Nesta análise, foram incluídos apenas os pacientes com LMC na fase crônica.

4.2.11 Quantificação de galectina-1 no plasma de pacientes com LMC

Com o intuito de verificar se o aumento na quantidade de galectina-1 nas células leucêmicas poderia refletir em alteração da concentração plasmática desta proteína, os níveis de galectina-1 no plasma foi avaliado em pacientes com LMC na fase crônica, blástica, pacientes resistentes ao tratamento com mesilato de imatinibe e em remissão citogenética completa (Figura 28). Pacientes na fase blástica apresentaram uma concentração de galectina-1 no plasma pelo menos três vezes maior do que na fase crônica (Figura 28). A falta de amostras dos pacientes da fase acelerada nos impediu de analisar os níveis de galectina-1 nessa fase.

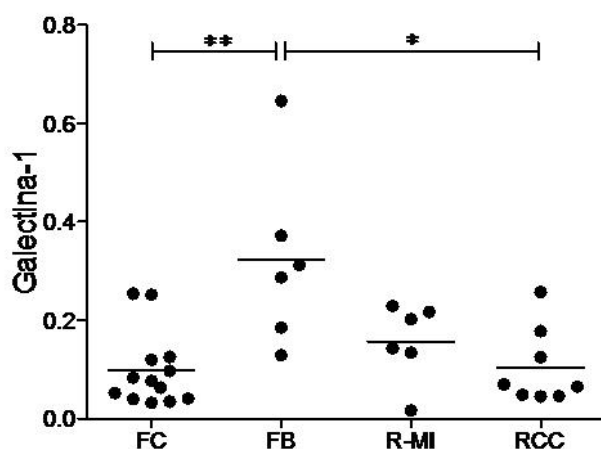


Figura 28 - ELISA de amostras de pacientes com LMC. O plasma de alguns pacientes das fases crônica (FC) e fase acelerada (FAV) assim como os pacientes que apresentaram resistência ao tratamento com mesilato de imatinibe (R-MI) e pacientes que entraram em remissão citogenética completa (RCC) foi analisado por ELISA para determinar a concentração plasmática de galectina-1.

Além disso, os pacientes que exibiram resposta citogenética completa apresentaram níveis desta lectina significativamente menores do que aqueles da fase blástica (Figura 28). É interessante notar, que ao contrário do observado nas células mononucleares de sangue periférico dos pacientes resistentes ao tratamento com MI que mantém uma alta expressão de galectina-1 (Figura 28), a concentração desta proteína no plasma tende a diminuir nesses pacientes quando comparada com pacientes da fase blástica (Figura 28).

4.2.12 Curva de sobrevida dos pacientes na fase avançada da LMC

Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho mostram uma maior expressão da galectina-1 nas fases mais avançadas da LMC assim como uma forte correlação entre a expressão de *BCR-ABL* e esta lectina. Desta forma, o próximo passo foi determinar se dentro do grupo de pacientes nas fases acelerada e blástica agrupados em uma única fase denominada fase avançada (FAV), aqueles que apresentaram maior expressão de galectina-1 exibiam uma doença mais agressiva e, portanto, vinham à óbito num período menor de tempo.

Os valores de percentil 25% e percentil 75 % dos grupos de indivíduos controle, pacientes na fase crônica, fase avançada, resistentes ao MI e com resposta citogenética completa foram calculados (Tabela 9).

Tabela 9 - Cálculo dos percentis 25% e 75% nos diferentes grupos de pacientes.

	Cont	FC	FAV	R-MI	RCC
Nº indivíduos	12	26	19	6	11
Percentil 25%	0,7	0,4	1,6	6,1	1,2
Percentil 75%	2,2	12,5	19	16,2	3,0

Cont: Indivíduos saudáveis, FC: fase crônica, FAV: fase avançada, R-MI: pacientes resistentes ao tratamento com mesilato de imatinibe, RCC: pacientes com resposta citogenética completa.

Apesar da mediana do controle e dos pacientes com LMC não ser estatisticamente diferente (Figura 23), vale a pena ressaltar que a faixa de normalidade (valores entre percentil 25% e 75%) dos indivíduos saudáveis é bem diferente da observada nos pacientes na fase avançada (Tabela 9). Enquanto a faixa de normalidade de *LGALS1* para o controle varia de 0,7 até 2,2, nos pacientes na fase avançada da doença essa faixa corresponde aos valores de 1,6 e 19 (Tabela 9). Os valores dos percentis da expressão de galectina-1, na fase avançada, foram utilizados como critério de separação dos grupos de pacientes em “Alta”, “Média” e “Baixa” expressão como descrito na seção 3.1.7.

Sendo assim, o intervalo definido para cada classe e o número de pacientes incluídos em cada uma delas está representado na tabela 10.

Tabela 10 - Critério de definição das classes “Baixa”, “Média” e “Alta” de acordo com a expressão de galectina-1 nos pacientes da fase avançada e número de pacientes incluídos em cada classe.

	Expressão de galectina-1	Nº de pacientes
“Baixa”	0-1,6	4
“Média”	1,6-19	10
“Alta”	19-50	5

Definidos os pacientes incluídos em cada classe, foi elaborada a curva de sobrevida global dos pacientes da fase avançada (Figura 29).

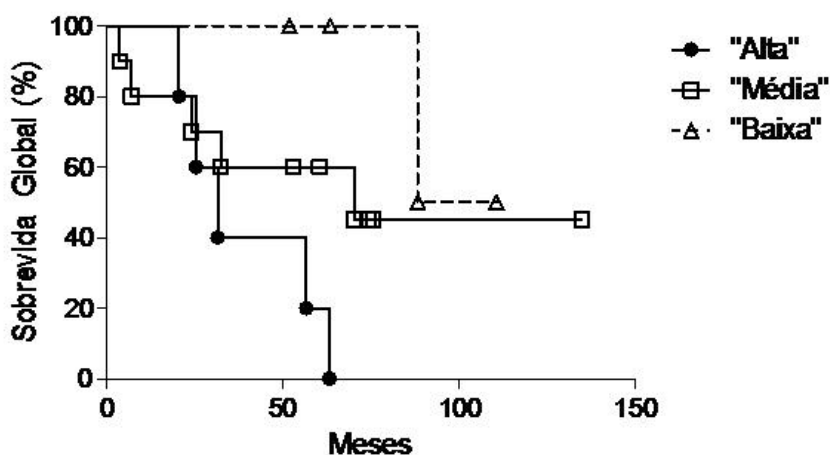


Figura 29 - Galectina-1 e sobrevida dos pacientes na fase avançada da LMC. A análise da sobrevida dos pacientes foi realizada considerando o número de meses transcorridos desde a data da aceleração da doença até o óbito ou até a data da última análise dos dados. Os três grupos foram separados de acordo com a expressão de *LGALS1* nas amostras de PBMC, como descrito na seção 3.1.7. Foi utilizado o método de Kaplan-Meier para construção da curva de sobrevida global e o teste estatístico de Gehan-Breslow-Wilcoxon foi aplicado para comparar a diferença entre os diferentes grupos, com $p < 0,05$ apenas para diferença entre “Alta” e “Baixa” expressão de *LGALS1*.

Vale a pena ressaltar que de fato, os pacientes que expressaram altos níveis de galectina-1 tiveram uma sobrevida pior do que os pacientes que expressaram baixos níveis (Figura 29).

4.3 Efeitos do silenciamento de *LGALS1*

Para estudar os potenciais efeitos desta proteína, no contexto da presença de BCR-ABL, a abordagem escolhida foi o silenciamento da expressão gênica de *LGALS1* em uma linhagem BCR-ABL⁺, K562. Nesse sentido, foi realizado um estágio de dois meses, no laboratório do Dr. Scott Lowe do Cold Spring Harbor Laboratory, aonde foram realizados os experimentos baseados nessa metodologia.

4.3.1 Obtenção de linhagens BCR-ABL⁺ deficientes em galectina-1

A linhagem K562 foi escolhida devido a alta expressão de galectina-1. Estas células foram infectadas, seguindo o protocolo descrito (seções 3.16, 3.17 e 3.18), com os plasmídeos pMSCV-MLP contendo quatro seqüências diferentes de “short hairpin” para identificar as construções que levariam ao melhor silenciamento de galectina-1. Esses vetores expressam simultaneamente o “short hairpin” específico e GFP, portanto a presença de GFP é um indicativo de que o shRNA também está sendo expresso. Assim sendo, a proteína GFP foi detectada nas linhagens K562 transfectadas com o vetor vazio, ou com as quatro construções diferentes de shRNALGALS1 (Figura 30A). Além disso, a análise por Western Blot confirmou o silenciamento de *LGALS1* para todas as construções de shRNA (Figura 30B).

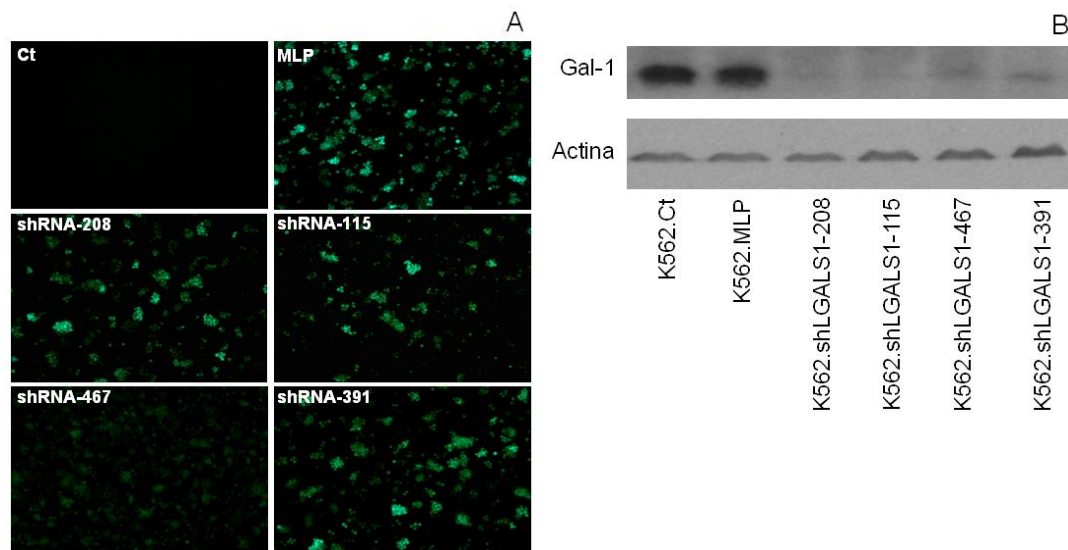


Figura 30 - Silenciamento da expressão gênica de galectina-1. A) Imagens de fluorescência, por microscopia, da expressão de GFP nas células K562 infectadas com pMSCV-LMP sem shRNA (MLP), pMSCV-shRNA-LGALS1-208 (shRNA-208), pMSCV-shRNA-LGALS1-115 (shRNA-115), pMSCV-shRNA-LGALS1-467 (shRNA-467) e pMSCV-shRNA-LGALS1-391 (shRNA-391) (Aumento de 10X). B) Os lisados totais das linhagens transfectadas com MLP, shRNA-208, shRNA-115, shRNA-467 e shRNA-391 foram analisadas por “Western Blot”, com anticorpos para galectina-1 (Gal-1) e actina como controle.

4.3.2 Efeito da inibição de galectina-1 na tumorigênese *in vivo*

Uma vez obtidas as linhagens BCR-ABL⁺ deficientes em galectina-1, o próximo passo consistiu em verificar sua contribuição para o desenvolvimento de tumores *in vivo*. Nesse sentido, o modelo experimental escolhido foi a inoculação subcutânea das células tumorais no dorso de camundongos BALB/c nude.

Após a inoculação subcutânea de 1×10^7 células K562.MLP e 1×10^7 células K562.shLGALS1-115 respectivamente no dorso esquerdo e direito de grupos de 4-5 camundongos BALB/c nude, o crescimento dos tumores foi mensurado três vezes por semana (Figura 31A). Ao final desse período, os camundongos foram sacrificados e imagens macroscópicas dos camundongos experimentais e dos tumores retirados foram capturadas (Figura 31B e C).

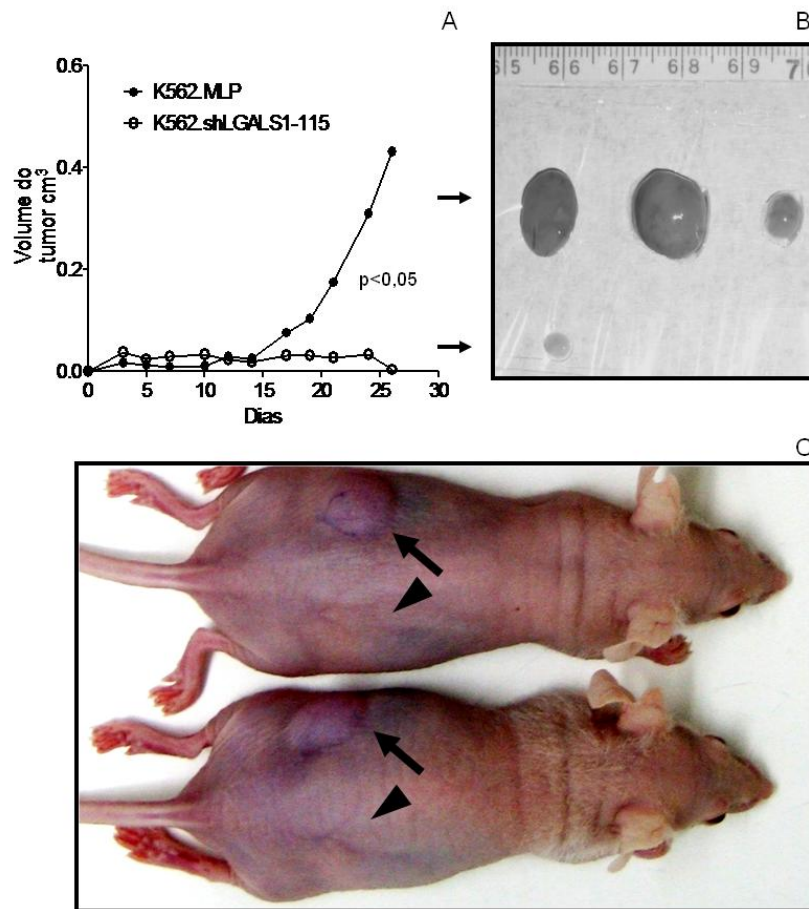


Figura 31 - Efeito do silenciamento de *LGALS1* na tumorigênese *in vivo* de células K562. A) Análise do volume dos tumores derivados de células K562.MLP e K562.shLGALS1 inoculadas subcutaneamente, respectivamente, no dorso esquerdo e direito de camundongos BALB/c nude. Quatro experimentos independentes foram realizados e este gráfico representa a média do volume dos tumores provenientes de cada linhagem celular, de um grupo de 4 animais. B) Imagem macroscópica dos tumores retirados 26 dias após a inoculação das células. Acima tumores derivados de células K562.MLP e abaixo de K562.shLGALS1-115. C) Imagem macroscópica dos camundongos que apresentaram o desenvolvimento de tumores 26 dias após a inoculação. As setas indicam tumores derivados de células K562.MLP e as pontas de setas, os tumores derivados de K562.shLGALS1-115, que estão ausentes.

Nos primeiros 15 dias, tanto o tumor derivado de K562.MLP quanto o de K562.shLGALS1 apresentaram um crescimento semelhante, ou seja, crescimento discreto nos cinco primeiros dias, seguido por uma pequena regressão, após uma semana, e tamanho constante por mais uma semana. No entanto, após 15 dias, os tumores derivados de células K562.MLP que expressam a galectina-1 exibiram um crescimento extremamente rápido, enquanto os tumores derivados da linhagem deficiente em galectina-1 apresentaram uma regressão completa dos tumores na maioria dos animais injetados, restando apenas um tumor

pequeno de um único camundongo. A figura 31 mostra dois camundongos representativos da maioria.

Estes resultados, *in vivo*, indicam que a inibição da galectina-1 nas células K562 prejudicou o desenvolvimento de tumores nos camundongos BALB/c nude.

4.3.3 Efeito *in vitro* da inibição de *LGALS1* na proliferação

Assim sendo, a taxa de proliferação destas células que expressam BCR-ABL, mas que são deficientes em galectina-1 foi comparada a das células que permaneceram expressando galectina-1. A contagem do número de células na câmara de Neubauer após 0, 24, 48 e 72 horas foi realizada e não houve diferenças na taxa de proliferação das células K562 deficiente em galectina-1 quando comparadas com as células K562 controle e transfectada com o vetor vazio (Figura 32).

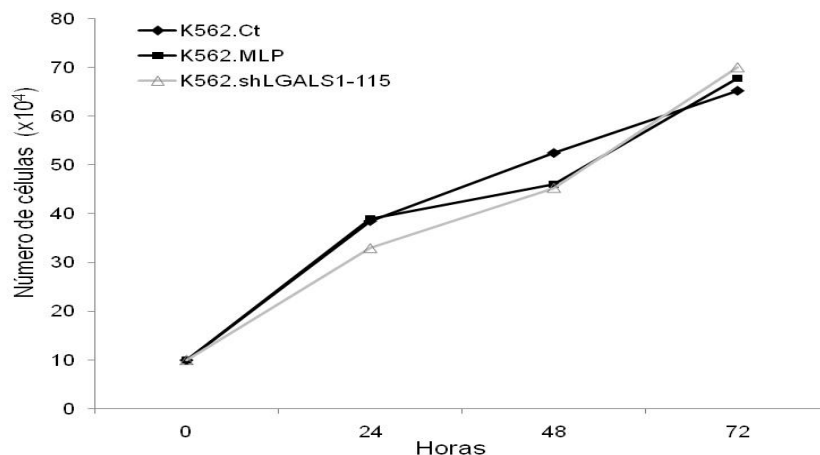


Figura 32 - Curva de proliferação das células K562 deficientes em galectina-1. O número de células foi contado nas linhagens K562 controle (K562-Ct), K562 infectada com vetor vazio (K562-MLP), K562 infectada com as quatro construções de shRNA específicos para galectina-1 (K562-shLGALS1-208, K562-shLGALS1-115, K562-shLGALS1-467, K562-shLGALS1-391), após 0, 24, 48 e 72 horas de incubação.

Discussão

5 Discussão

O evento citogenético responsável pela patogênese da LMC é a translocação dos cromossomos 9 e 22 que aproxima os genes *BCR* e *ABL*, dando origem ao neogene *BCR-ABL*. A partir desta descoberta, o BCR-ABL tornou-se, portanto, o alvo terapêutico ideal para o tratamento da LMC.

As terapias atuais mais utilizadas no tratamento desta doença (mesilato de imatinibe, IFN-alfa e transplante de medula óssea) são, no entanto, mais eficazes na fase crônica do que na acelerada ou blástica. Isto parece estar relacionado em parte, ao fato de que a expressão do gene *BCR-ABL* é suficiente para dar início à fase crônica da LMC, mas a progressão da doença para fases mais avançadas (acelerada e blástica) necessita de alterações genéticas adicionais para transformação celular (MELO, 1996b). Dentre os mecanismos descritos podem ser destacados: a amplificação genômica de *BCR-ABL*, superexpressão dos transcritos de *BCR-ABL*, alterações citogenéticas adicionais, como duplicação do cromossomo Ph, mutações pontuais no domínio da tirosina-quinase de BCR-ABL (HOCHHAUS *et al.*, 2002; JOHANSSON *et al.*, 2002). Relatos de expressão alterada de proto-oncogenes (RAS e MYC) e genes supressores de tumor (p53, p16 e RB) contribuem para esta suposição (MELO, 1996b).

Assim, conhecer melhor os genes regulados por BCR-ABL é fundamental por pelo menos dois motivos. O primeiro: alguns destes genes podem ser alvos secundários no tratamento da LMC. Dentre as moléculas reguladas por BCR-ABL, previamente descritas, podem ser citadas: MYC (CLEVELAND *et al.*, 1989), BCL-xL (AMARANTE-MENDES *et al.*, 1998b), PRAME (“melanoma-related antigen”)(WATARI *et al.*, 2000)(CARVALHO *et al.*, submetido), KIR (COHEN *et al.*, 1994), além de outras identificadas recentemente: Heme oxigenase-1 (MAYERHOFER *et al.*, 2004), MCL-1 (AICHBERGER *et al.*, 2005) e c-MYB (LIDONNICI *et al.*, 2008). O segundo: a expressão desses genes pode ser utilizada como marcador de prognóstico, auxiliando na escolha do melhor tratamento para o paciente.

Nesse contexto, cabe aqui ressaltar que as galectinas 1 e 3 seriam potenciais alvos terapêuticos, pois a expressão alterada e associação destas duas lectinas, com a aquisição de potencial metastático têm sido relatada em diferentes linhagens tumorais e amostras de

tumores sólidos de pacientes (DANGUY *et al.*, 2002; LIU e RABINOVICH, 2005). Além disso, dados da literatura também descreveram a galectina-1 ou a -3 como biomarcadores de progressão tumoral em numerosos tumores sólidos, como o câncer de tireóide (XU *et al.*, 1995) e de bexiga (CINDOLO *et al.*, 1999).

No entanto, enquanto os relatos da expressão destas galectinas em células leucêmicas são escassos, eles são inexistentes quanto à sua contribuição em tumores não sólidos. A ausência e/ou escassez desses dados na literatura incentivaram-nos a investigar a expressão de galectina-1 e galectina-3 na LMC.

Antes de iniciar a discussão dos dados obtidos, é importante enfatizar que uma análise cuidadosa dos dados existentes na literatura é fundamental, pois em alguns casos não é possível distinguir se a expressão alterada corresponde às células tumorais ou às células que as rodeiam, quando os resultados são baseados em análises de “imunoblotting” ou amplificação gênica, em amostras retiradas de pacientes, que podem conter tanto células normais como células tumorais. É necessário utilizar técnicas que permitam diferenciar células normais de tumorais com maior precisão, por exemplo, por imunohistoquímica. Desta forma, alguns trabalhos mostram claramente que a expressão de galectina-1 é maior nas células tumorais quando comparadas às células normais. A exemplo destes estudos, podem ser citados os trabalhos que relataram alteração em carcinoma da mama (GABIUS *et al.*, 1986), câncer de bexiga (CINDOLO *et al.*, 1999) e tireóide (CHIARIOTTI *et al.*, 1995; XU *et al.*, 1995).

Em alguns casos, o aumento na expressão de galectina-1 nas células tumorais está associado com a maior agressividade e aumento do potencial metastático da neoplasia, como no câncer de bexiga (DANGUY *et al.*, 2002). Amostras de carcinomas de bexiga em estágios com graduação histológica mais alta exibiram maior aumento na expressão de RNAm de *LGALS1* em relação àqueles com menor graduação, sendo por sua vez maior do que a expressão observada em amostras de urotélio normais (CINDOLO *et al.*, 1999).

Em outros casos, é a expressão aumentada nas células estromais, que circundam o tumor, que está relacionada à tumorigênese. Neste sentido, o trabalho de Sanjuan e cols., 1997, em amostras de pacientes com câncer colorectal, demonstrou que a expressão de galectina-1 foi detectada principalmente nas células estromais e sua expressão em amostras da

mucosa normal foi menor do que em adenoma que foi por sua vez menor do que nas amostras de carcinoma (SANJUAN *et al.*, 1997).

Assim sendo, uma das vantagens do estudo da expressão das galectinas 1 e 3 em linhagens leucêmicas estabelecidas é exatamente a possibilidade de eliminar, ou pelo menos reduzir, a ação de outros fatores que interfeririam no resultado do experimento.

Apesar de altos níveis de galectina-3 terem sido descritos em diversos tumores, dados da literatura indicam que esta lectina está ausente tanto nas células BCR-ABL- (Jurkat, CEM, HL-60) (FUKUMORI *et al.*, 2003), como nas BCR-ABL+ (K562, KCL-22, LAMA-84). Nossos resultados foram concordantes aos relatados por esses autores. Apenas um trabalho detectou a galectina-3 em células HL-60, contrastando com o nosso dado (NANGIA-MAKKER *et al.*, 1993).

A galectina-1 está expressa em quase todos os tecidos, inclusive em células do sistema imune (YANG *et al.*, 2008) e na linhagem leucêmica pró-mielocítica HL-60 (COURAUD *et al.*, 1989; LOTAN *et al.*, 1989; DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003). No presente estudo, verificamos níveis detectáveis de RNAm, mas não protéicos de galectina-1 em HL-6. A presença de galectina-1 foi identificada também nas linhagens LAMA-84, KCL-22 e K562, derivadas de pacientes com LMC, em um estudo proteômico (FONTANA *et al.*, 2007). No entanto, os autores não se preocuparam em relacionar a expressão desta lectina e expressão de BCR-ABL.

O gene da galectina-1 está localizado na região q13 do cromossomo 22. É justamente essa região do cromossomo 22 que sofre translocação com o cromossomo 9 na LMC. Portanto, seria possível que durante esse processo, houvesse perda no controle da regulação de galectina-1. Sendo verdadeira esta suposição, a expressão ectópica de BCR-ABL, sem a translocação dos cromossomos, não deveria aumentar os níveis de galectina-1. Nossos resultados mostraram exatamente o oposto, em dois modelos experimentais: na expressão ectópica de *BCR-ABL* (em células HL-60 e Jurkat humanas) e na condicional (em células Ton.B210 murinas). Ou seja, nas duas situações, a expressão de *BCR-ABL* promoveu incremento da expressão gênica e protéica de galectina-1 nas linhagens hematopoéticas estudadas indicando que a regulação desta lectina está diretamente relacionada com a expressão de BCR-ABL.

A regulação de vários genes depende da atividade tirosina-quinase de BCR-ABL (DEININGER *et al.*, 2000b). É importante destacar que independentemente do local de quebra do cromossomo e da sequência do neogene formado, as três proteínas resultantes da fusão BCR-ABL exibem atividade tirosina-quinase desregulada quando comparada com a proteína ABL (CLARK *et al.*, 1988; QUACKENBUSH *et al.*, 2000). A desregulação da atividade TK tem como consequência a elevada fosforilação dos resíduos de tirosina de muitas proteínas, incluindo a própria molécula de BCR-ABL (LANEUVILLE, 1995; HANTSCHHEL e SUPERTI-FURGA, 2004).

Essas informações nos sugeriram que a atividade tirosina-quinase poderia regular a expressão de galectina-1. De fato, nossos dados apontaram, por meio de duas estratégias diferentes, que a galectina-1 é mais uma proteína cuja expressão é modulada pela atividade TK de BCR-ABL. Isto porque, o tratamento das linhagens com BCR-ABL constitutivo (K562, KCL-22 e LAMA-84) ou ectópico (HL-60.BA e Jurkat.BA) com o inibidor de TK, mesilato de imatinibe, reduziu os níveis de galectina-1 em todas as linhagens, excetuando-se a KCL-22. Além disso, a linhagem Jurkat infectada com a construção mutada de BCR-ABL, deficiente em atividade TK não teve o mesmo aumento na expressão de galectina-1 que as células Jurkat expressando a forma selvagem de BCR-ABL exibiram. O presente trabalho mostrou, portanto, pela primeira vez, a regulação de galectina-1 como dependente da atividade tirosina-quinase de BCR-ABL.

Não existem muitos estudos dedicados à investigação de vias intracelulares de regulação de galectina-1. Há somente um trabalho que mostra o envolvimento de quinases na regulação da expressão desta lectina, mas o modelo experimental empregado avalia a expressão de galectina-1 induzida pela ativação de linfócitos T (FUERTES *et al.*, 2004). Nesse estudo, os inibidores de quinases U0126, SB202190 e rapamicina, que bloqueiam as vias de MAPK, MEK1/ERK e p38 MAPK reduzem os níveis de galectina-1 nos linfócitos T ativados (FUERTES *et al.*, 2004). Apesar desse estudo não esclarecer se os resultados podem ser ampliados para situações em que a expressão de galectina-1 é constitutiva, como no nosso estudo, é interessante notar que as vias inibidas que causam redução de galectina-1 são as mesmas vias ativadas por BCR-ABL.

Faz-se necessário entender a regulação da transcrição gênica de *LGALS1* para discutir possíveis mecanismos atuantes, no contexto de BCR-ABL, que estariam envolvidos na

modulação da expressão dessa lectina, tanto na diferenciação como na transformação celular. A sequência genômica completa de *LGALS1* humana foi publicada em 1991, sendo o gene constituído de quatro éxons cuja região mais “upstream” contém sequências de ligação para glicocorticóides, proteínas de choque térmico, metais, entre outras (GITT e BARONDES, 1991). Em 1995, identificou-se uma região de 100 pares de base, próxima ao sítio de início da transcrição (-50/+50), responsável pela maior parte da atividade de transcrição de galectina-1 (SALVATORE *et al.*, 1995). São necessários dois elementos presentes nessa região para atingir a atividade de transcrição eficiente (SALVATORE *et al.*, 1995). Em 2001, foi descrita uma região promotora de *LGALS1* murino possui um sítio Sp1 e um elemento de consenso iniciador (Inr) que se sobrepõe parcialmente ao TATA box determinando o início da transcrição em dois pontos diferentes (DE GREGORIO *et al.*, 2001). Além disso, uma região responsiva ao ácido retinóico foi detectada acima do sítio de transcrição de *LGALS1* (LU *et al.*, 2000).

Em geral, há aumento dos níveis de galectina-1, com a desdiferenciação e transformação da célula, mas é possível reverter esse aumento, com indutores de diferenciação, como por exemplo, o ácido retinóico (BARONDES *et al.*, 1994). Dados concordantes foram obtidos na linhagem K562, derivada de LMC, amplamente utilizada em estudos de diferenciação envolvendo LMC e/ou BCR-ABL, por sua característica de célula indiferenciada (LUTOMSKI *et al.*, 1997; TSIFTSOGLU *et al.*, 2003). O esperado seria, portanto, observar grandes níveis de galectina-1 na linhagem K562. De fato, nossos dados indicam claramente a alta expressão gênica e protéica desta lectina na linhagem K562, corroborando com o dado publicado por Fontana e cols.. Somente um estudo descreveu a baixa expressão de galectina-1 nessa linhagem e o próprio autor classifica o dado, como pouco comum, por entender que células indiferenciadas costumam ter uma expressão considerável de galectina-1 (LUTOMSKI *et al.*, 1997). Esse mesmo estudo mostra que o tratamento com eritropoetina ou aficodilina, indutores de diferenciação, resultou no fenótipo eritrocítico das células K562, com diminuição nos níveis citosólicos de galectina-1 (LUTOMSKI *et al.*, 1997). Verificar-se que nesse modelo, houve redução da expressão de galectina-1 sem alteração dos níveis de BCR-ABL, sugerindo que a regulação não é dependente de BCR-ABL. Entretanto, isto não exclui a possibilidade de que mecanismos dependentes e independentes de BCR-ABL possam atuar nesse processo.

Nessa mesma época, surgiram indícios da existência de outro fator regulador de transcrição de *LGALS1*. Primeiro, a fusão de células de osteosarcoma humano (que expressam galectina-1) com células de fígado de rato diferenciadas (que não expressam) gera células de rato híbridas que tem os alelos de galectina-1 reativados. Ou seja, fatores presentes nas células de osteosarcoma humano estariam ativando os alelos da galectina-1 das células de rato (CHIARIOTTI *et al.*, 1994). Segundo, a expressão de *LGALS1*, em transfecções transientes de construções contendo a região mínima do promotor de galectina-1 é similar em células que expressam ou não *LGALS1* e, portanto, os fatores reguladores estão presentes nestas duas condições (SALVATORE *et al.*, 1995). Além disso, o tratamento das células de fígado de rato com 5-azacitidina, um agente demetilante promovia a ativação da transcrição de *LGALS1* (CHIARIOTTI *et al.*, 1994).

A possível presença de um fator regulador instigou Benvenuto e cols. a checarem a participação da metilação na regulação de galectina-1, uma vez que a metilação é um dos principais mecanismos epigenéticos de inibição da transcrição gênica. De fato, os autores descobriram uma correlação entre a hipometilação de uma região de *LGALS1* e a expressão do gene (BENVENUTO *et al.*, 1996). Benvenuto e cols., analisaram a região promotora por meio da técnica de seqüenciamento genômico do DNA tratado com bissulfito. Nestas condições, descobriram que a transição do estado metilado para demetilado, com demetilação completa de 11 dinucleotídeos CpG que atravessam o sítio de início da transcrição, era suficiente para promover uma ativação da transcrição de *LGALS1* (BENVENUTO *et al.*, 1996). Esta observação sugeria fortemente que a metilação do promotor de *LGALS1* poderia ser um dos mecanismos epigenéticos de regulação desse gene.

Recentemente, para averiguar o estado de metilação global de pacientes nas fases crônica, acelerada e blástica, Roman-Gomez e cols., avaliaram os elementos de DNA repetitivos mais importantes, o retrotransposon L1 e as seqüências Alu, alfa-satélite e satélite-2. Estes autores verificaram que as amostras significativamente mais hipometiladas foram de pacientes na FB, seguidos pelos pacientes da FC e por último os indivíduos normais (ROMAN-GOMEZ *et al.*, 2008). Se levarmos em consideração que os nossos dados mostram uma expressão maior de *LGALS1* na fase blástica da LMC e que coincidentemente os pacientes nesta fase apresentam maior hipometilação, podemos sugerir que uma das hipóteses de regulação de galectina-1, neste modelo, seria de que a hipometilação do promotor de *LGALS1* ocasionaria o aumento na expressão desse gene. Contudo, uma análise mais

aprofundada do estado de metilação da região promotora do gene de *LGALS1* deve ser realizada em amostras de pacientes a fim de verificar se essa hipótese é verdadeira.

A ativação de fatores de transcrição gênica por meio de sua fosforilação (GARCIA e JOVE, 1998) ou modulação dos níveis de RBPs (“RNA Binding Protein”) constitui mais um mecanismo que pode estar atuando na regulação da transcrição gênica de galectina-1, no contexto de BCR-ABL. As RBPs são proteínas que se ligam a RNAm controlando o seu processamento, exportação do núcleo para o citoplasma e tradução (DREYFUSS *et al.*, 1993). O aumento nos níveis de três RBPs foi constatado em células que expressam BCR-ABL. São estas, FUS (PERROTTI *et al.*, 1998), hnRNP A1 (IERVOLINO *et al.*, 2002), hnRNP E2 (PERROTTI *et al.*, 2002a). A diminuição dos níveis destas RBPs no contexto de BCR-ABL ocasionou a alteração da expressão de diferentes genes (PERROTTI e CALABRETTA, 2002b). Por exemplo, a inibição de FUS por DNA anti-senso eleva a expressão do receptor de G-CSF (PERROTTI *et al.*, 1998), a diminuição da atividade carreadora de hnRNP A1 pela competição com o mutante desta proteína aumenta os níveis de BCL-x_L citoplasmáticos (IERVOLINO *et al.*, 2002) e por último a supressão *in vivo* e *in vitro* da fosforilação de hnRNP E2 aumenta a expressão de C/EBP α (CHANG *et al.*, 2007). Contudo, não foi identificado, até o momento, nenhum fator trans-ativador de *LGALS1* e, portanto, não é possível avaliar a importância destes fatores na regulação de galectina-1, no contexto de BCR-ABL.

Tendo em vista os resultados obtidos em linhagens, dois motivos nos levaram a verificar a expressão de galectina-1 e galectina-3 em amostras de pacientes nas diferentes fases da LMC e associação com a progressão da doença. Primeiro, nem sempre as observações feitas em linhagens correspondem ao detectado em amostras de pacientes. O segundo motivo é a importância de identificar novos biomarcadores que permitam estabelecer a melhor opção de tratamento. Isto é particularmente importante em pacientes na fase avançada, pois nesse caso, as opções de tratamento existentes não são muito eficazes.

Apesar de nossos dados demonstrarem que a galectina-3 não é modulada por BCR-ABL, a presença de níveis detectáveis de *LGALS3* nas linhagens derivadas de LMC não excluía a possibilidade dessa lectina estar diferencialmente expressa em pacientes. A expressão de *LGALS3* foi consideravelmente maior em pacientes com LMC do que em indivíduos normais. Entretanto, não houve diferença na expressão de *LGALS3* de acordo com

a fase da LMC, nem em relação à resposta ao tratamento com mesilato de imatinibe. A ausência de correlação entre expressão de *LGALS3* e *BCR-ABL* em pacientes sugere que a galectina-3 não é modulada em linhagens celulares derivadas de pacientes com LMC e em amostras de pacientes com esta doença.

Por outro lado, os dados de expressão de *LGALS1* provenientes de amostras de pacientes com LMC corroboraram com os resultados obtidos em linhagens. Os níveis intracelulares e plasmáticos desta lectina aumentaram principalmente na fase blástica da LMC. Considerando que os dados obtidos em linhagens sugeriram modulação mediada por *BCR-ABL* é salutar especular que, em pacientes, a causa do aumento de galectina-1 na fase blástica seria o mesmo das linhagens. Assim, nossa hipótese é de que quanto maior a expressão de *BCR-ABL*, mais elevada a de *LGALS1*. A correlação positiva entre a expressão desses dois genes, no nosso trabalho, é um forte indício de que esta seja a explicação adequada. No entanto, não podemos excluir outra possibilidade. A elevação dos níveis de *LGALS1* pode estar relacionada simplesmente à maior quantidade de células imaturas na fase blástica da LMC. Nós avaliamos a expressão de galectina-1 em amostras de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) que contem diferentes populações de células e com isso, as células imaturas, por expressarem mais galectina-1 elevariam a expressão média das células analisadas. Para excluir essa possibilidade, seria necessário observar a expressão de galectina-1 nas subpopulações celulares existentes nas amostras de PBMC dos pacientes com LMC.

O aumento nos níveis de galectina-1 na fase blástica sugere uma associação entre expressão de *LGALS1* e progressão da LMC. Mas, para que um fator seja, de fato, utilizado como biomarcador tumoral e/ou fator de prognóstico, não basta mostrar apenas o aumento de sua expressão com a progressão da doença. É necessário relacioná-lo a outros fatores de prognóstico ou tempo de sobrevida do paciente.

Devido à grande heterogeneidade no tempo que os pacientes demoram para progredir da FC para uma fase mais avançada (FA ou FB) e assim desenvolver o quadro de agudização, muitos investigadores concentraram seus esforços no desenvolvimento de modelos matemáticos que poderiam assim auxiliar na escolha da melhor conduta terapêutica e na avaliação do risco de morte do paciente.

Os parâmetros que historicamente foram associados a um pior prognóstico são maior idade, esplenomegalia, hepatomegalia, elevada contagem de leucócitos, alta porcentagem de blastos no sangue ou medula óssea, porcentagem de basófilos, presença de fibrose, presença de evolução clonal entre outros. Alguns modelos matemáticos utilizando esses parâmetros foram propostos, mas o utilizado com maior frequência é o índice de Sokal (SOKAL *et al.*, 1984).

Este índice foi obtido a partir da análise dos achados clínicos e laboratoriais, apresentados ao diagnóstico, de 813 indivíduos Philadelphia-positivos provenientes de seis séries de casos europeus e americanos. Nesse estudo, o tamanho do baço e a contagem dos leucócitos foram os fatores identificados mais importantes, mas a idade e a porcentagem de blastos no sangue também foram associados ao prognóstico da LMC. Esta função matemática possibilitou a separação dos pacientes em três grupos, denominados de baixo, médio e alto risco, com uma diferença significativa na sobrevivência entre eles (SOKAL *et al.*, 1984).

Mesmo na era do tratamento com mesilato de imatinibe (descrito na seção 1.1.2.2), este índice parece ser um bom preditivo, de acordo com o estudo IRIS (International Randomized study of Interferon vs. STI571) (O'BRIEN *et al.*, 2003). No entanto, a importância das características clínicas tem-se alterado com o surgimento de novas terapias. Por exemplo, após o início do tratamento com MI em pacientes, a idade parece apresentar menor relevância em relação a outros dados clínicos ou laboratoriais (CORTES *et al.*, 2003b).

Enquanto alguns fatores perdem importância, há uma busca constante por melhores fatores preditivos. Nesse sentido, alguns dos fatores que têm recebido atenção na última década, são as translocações que ocorrem na LMC. Estas são acompanhadas de deleções sub-microscópicas adjacentes aos pontos de quebra do cromossomo 9 em 10-15% dos casos (KOLOMIETZ *et al.*, 2001).

Apesar dos resultados iniciais sugerirem que, por serem um raro evento, as deleções refletiam uma instabilidade genômica associada à progressão da doença, algumas evidências apontavam para o fato de que as deleções e translocações ocorriam de forma concomitante. Por exemplo, a manutenção da frequência de deleções nas diferentes fases da doença, a taxa três vezes maior de deleções em translocações variantes e a falta de visualização de células com translocações, mas sem deleções (HUNTLY *et al.*, 2001; KOLOMIETZ *et al.*, 2001).

Alguns estudos recentes investigaram a importância da deleção na região do cromossomo 9 (der9) como fator de prognóstico. Dentre eles, um estudo retrospectivo, ao comparar um grupo de pacientes com deleções e outro grupo sem deleções detectáveis, identificou uma associação entre a presença de diferentes tipos de deleções, incluindo a der9 com uma pior resposta ao tratamento, uma menor duração da fase crônica, diminuição no tempo de sobrevida global, e taxa de recidiva maior após transplante de medula óssea (TMO) (KOLOMIETZ *et al.*, 2001). Na mesma linha, Huntly e cols., a partir de dados preliminares, levantaram a hipótese de que a deleção der9 seria um fator de definição do prognóstico, pois sua presença foi associada a uma menor sobrevida livre de progressão da LMC (HUNTLY *et al.*, 2001). Por outro lado, Quintas-Cardama e cols. mostraram que os pacientes que possuíam essa deleção e que foram tratados com mesilato de imatinibe não exibiram diferença na sobrevida global em relação aos indivíduos que não tinham a deleção der9 (QUINTAS-CARDAMA *et al.*, 2005). Recentemente, foi verificado um pior prognóstico dos pacientes portadores da deleção der9, principalmente aqueles cuja deleção se localizava na região 5'ABL (VAZ DE CAMPOS *et al.*, 2007).

Existem, na literatura, alguns casos descritos em que o aumento da expressão de galectina-1 nas células tumorais está associado a maior agressividade e aumento do potencial metastático (DANGUY *et al.*, 2002). Por exemplo, amostras de carcinomas de bexiga em estágios com graduação histológica mais alta exibiram aumento na expressão de RNAm de *LGALS1* em relação à aqueles com menor graduação, sendo por sua vez maior do que a expressão observada em amostras de urotélio normais (CINDOLO *et al.*, 1999).

Apesar de observada a correlação entre os níveis de *LGALS1* e *BCR-ABL*, a análise da expressão de galectina-1 não revelou correlação com o índice de Sokal ou qualquer outros parâmetros individuais associados a esse índice (idade, baço, plaquetas, leucócitos, blastos no sangue periférico e hemoglobina). De posse desses dados, não podemos afirmar que a galectina-1 não teria valor prognóstico no momento do diagnóstico da doença, pois ela poderia ser um fator independente do índice de SOKAL. No entanto, nossos resultados indicam que a galectina-1 seria um potencial candidato a marcador prognóstico na fase avançada da LMC uma vez que os pacientes com elevados níveis de *LGALS1* tiveram uma sobrevida menor do que os pacientes com níveis intermediários ou baixos. Esse resultado permite-nos especular a possibilidade da galectina-1 ser utilizada como valor preditivo de pior

prognóstico do paciente na fase avançada da LMC, com indicação para terapias alternativas ou mais agressivas nesses casos.

Adicionalmente, no modelo *in vivo*, foi verificado que células com galectina-1, quando injetadas em camundongos “nude” foram capazes de gerar tumores maiores do que aquelas que não expressavam a lectina. Esse dado confirma a relevância de galectina-1 na tumorigênese, mesmo no contexto de BCR-ABL, portanto, a contribuição de galectina-1 no desenvolvimento da LMC é outro importante aspecto importante a ser discutido.

Cabe aqui destacar que o modelo experimental murino escolhido neste trabalho, não representa modelo de leucemia, pois a inoculação das células tumorais é realizada de forma subcutânea, no dorso de camundongos BALB/C “nude”. Assim, este modelo permite apenas mostrar a contribuição da expressão de galectina-1 na tumorigênese e não leucemogênese, no contexto de BCR-ABL.

Considerando as funções exercidas pela galectina-1 no desenvolvimento de outros tumores, discutimos diversas possibilidades que pudessem explicar a contribuição de galectina-1, no presente, trabalho. Entre estas, a galectina-1 poderia atuar na transformação maligna, proliferação, adesão, diferenciação, angiogênese e escape tumoral.

A primeira hipótese levantada é a participação desta lectina na transformação mediada por BCR-ABL. Beck e cols. mostraram a expressão de *HRAS* em 15 amostras de pacientes Ph^+ , mas aumento de *HRAS* somente em três amostras de pacientes na fase acelerada (BECK *et al.*, 1998). Isto indica que a potencialização da via de sinalização de RAS não pode ser atribuída à maior expressão de H-RAS, mas sim a elevação da sinalização decorrente da atividade TK de BCR-ABL. Esta atividade resulta em aumento do GTP transferido para RAS por meio da ligação direta de BCR-ABL a GRB2 (PUIL *et al.*, 1994). Em outras linhagens tumorais humanas, a galectina-1 se liga a H-RAS fazendo com que esta molécula permaneça mais tempo ancorada na superfície de membrana, aumentando a ativação da via de sinalização mediada por H-RAS (PAZ *et al.*, 2001; ELAD-SFADIA *et al.*, 2002). Assim, a galectina-1, poderia estar participando desse processo por meio da maior ativação da via de RAS nas células que expressam BCR-ABL, contribuindo para a transformação maligna mediada por BCR-ABL.

A proliferação das células tumorais é outro processo fisiológico vital alterado por galectina-1 (LIU e RABINOVICH, 2005). Os efeitos da expressão de galectina-1 variam de acordo com a sua localização (intra ou extracelular), concentração e contexto celular. Enquanto a expressão intracelular promove a proliferação em células de glioma de rato (YAMAOKA *et al.*, 2000), a extracelular tem o efeito contrário em células de neuroblastoma (KOPITZ *et al.*, 2001). Entretanto, no presente estudo, a inibição de galectina-1 não alterou a proliferação das células K562. Isto indica que o maior crescimento dos tumores derivados de K562.MLP (Galectina-1+) comparados aos que não expressam esta lectina (K562.shLGALS1-115) não é causado por uma diferença na taxa de proliferação dessa duas linhagens.

O efeito de galectina-1, na proliferação celular, foi descrito em células da medula óssea. Dado interessante a ser considerado tendo em vista que a LMC é resultante de uma alteração na célula pluripotente da medula óssea o que interferirá em toda progênie. Em nosso estudo, não fizemos a análise de células da MO, mas seria uma investigação promissora no futuro. Isto porque estudos mostraram que esta lectina exibe uma ação bifásica de indução de apoptose ou proliferação de acordo com o estágio de diferenciação. Se por um lado, doses baixas de galectina-1 recombinante (10 ng/mL) adicionada a culturas de células-tronco ou progenitoras hematopoéticas têm efeito positivo na formação de colônias das linhagens granulócítica-macrofágicas e eritrocíticas de forma dependente de lactose (VAS *et al.*, 2005). Por outro lado, doses altas (10 µg/mL) têm efeito contrário, reduzem a proliferação das células progenitoras hematopoéticas, em parte devido a indução de apoptose pela galectina-1. A redução, neste caso, não foi inibida pela adição de lactose (VAS *et al.*, 2005).

Ainda na medula óssea, a galectina-1 interfere na adesão celular. A galectina-1 aumenta a adesão das células tumorais de câncer próstata e de ovário à matriz extracelular pela ligação com fibronectina (ELLERHORST *et al.*, 1999; VAN DEN BRULE *et al.*, 2003). Efeitos similares foram atribuídos à BCR-ABL. Células que expressam esse oncogene exibem maior adesão a componentes da matriz extracelular (MEC) (GORDON *et al.*, 1987; VERFAILLIE, 1992). Em 2002, um trabalho mostrou em células 32D que esse aumento na adesão não diminuía com o tratamento dessas células com STI571 (WERTHEIM *et al.*, 2002), porém o oposto foi observado por Jin e cols. (JIN *et al.*, 2006). Estes autores verificaram uma adesão maior à fibronectina, ao tratar a linhagem Ton.B210, com IL-3 ou com expressão induzível de *BCR-ABL*, parcialmente dependente da atividade TK, com

ativação da via B-REF/MEK/ERK e AKT (JIN *et al.*, 2006). A similaridade do efeito da expressão de galectina-1 e BCR-ABL e a dependência da modulação da adesão e expressão de galectina-1 com a atividade TK de BCR-ABL sugerem que esta lectina poderia estar envolvida nesse processo, no contexto de BCR-ABL.

O envolvimento da galectina-1 na migração de células progenitoras é mais um fator que deve ser considerado. Recentemente, Kiss e cols., mostraram que o tratamento de camundongos com ciclofosfamida e fator estimulador de crescimento de granulócitos simula uma resposta imunológica uma vez que esse tratamento causa diferenciação e migração das células da medula óssea para o sangue e também indução de diferenciação (KISS *et al.*, 2007). No entanto, a administração concomitante de galectina-1 foi capaz de prevenir grande parte da mobilização de granulócitos e leucócitos, gerando um acúmulo de células hematopoéticas progenitoras na medula óssea (KISS *et al.*, 2007). Os autores atribuem esse efeito à inibição da migração transendotelial causada pela galectina-1 (KISS *et al.*, 2007). Talvez essa inibição possa contribuir para a hiper celularidade da medula óssea dos pacientes com LMC na fase blástica. Apesar de existir uma grande mobilização de células imaturas para o sangue, a galectina-1 estaria inibindo a migração de uma parte das células progenitoras que expressam altos níveis de galectina-1.

Em 2006, um novo papel de galectina-1 foi descrito por Thijssen e cols. que demonstraram que o silenciamento da expressão gênica de *LGALS1* inibiu não só a proliferação como também a migração de células endoteliais de cordão umbilical humano cultivadas, *in vitro* (THIJSEN *et al.*, 2006). Observaram ainda que o silenciamento de *LGALS1*, no estágio embrionário de peixes-zebra, resultou no crescimento de vasos disfuncionais. Por último, mostraram que camundongos deficientes nessa proteína tiveram o crescimento de tumores prejudicado sugerindo que a galectina-1 desempenha um papel importante na angiogênese (THIJSEN *et al.*, 2006).

O impacto da ação da galectina-1 na angiogênese é fácil de ser entendido em tumores sólidos uma vez que a falta de irrigação sanguínea limita o crescimento do tumor (HANAHAAN e WEINBERG, 2000). Recentemente, Hsieh e cols. demonstraram que a galectina-1 é capaz de ligar-se a neuropilina 1, um co-receptor para o fator angiogênico, denominado fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e promover a ativação das vias de sinalização que determinam a ação biológica do VEGF. É importante citar que o VEGF

parece estar envolvido no desenvolvimento e progressão de neoplasias hematológicas, incluindo a LMC (LIST, 2001). Esta suposição se baseou em alguns dados da literatura. Primeiro, a regulação da sobrevivência de células progenitoras pelo VEGF já foi estabelecida por Gerber e cols., em 2002 (GERBER *et al.*, 2002). Segundo, a densidade microvascular da medula óssea de pacientes com LMC é praticamente o dobro da observada em indivíduos saudáveis (AGUAYO *et al.*, 2000). E por último, os níveis plasmáticos de VEGF é significativamente maior do que nos indivíduos saudáveis (LUNDBERG *et al.*, 2000).

Em conjunto, o aumento de VEGF na LMC e da sinalização via VEGF, mediado pela galectina-1 sugere efeito cooperativo de BCR-ABL e galectina-1 na angiogênese. De fato, nossos resultados parecem estar de acordo com essa informação. Notamos que os tumores que não expressavam galectina-1, tiveram um crescimento mais lento do que os tumores que a expressavam. Além disso, percebemos que os tumores que expressavam galectina-1 tinham uma aceleração no crescimento após atingirem uma coloração avermelhada o que reforça a suposição de que a principal contribuição de galectina-1 estaria ligada a capacidade de induzir angiogênese. Esta observação, entretanto, precisa ser analisada com mais cuidado para afirmarmos que a galectina-1 aumentou a angiogênese do tumor, no nosso modelo experimental. De qualquer forma, se a indução da angiogênese fosse confirmada, a teoria de que esta seria a contribuição de galectina-1 no nosso modelo, se aplicaria apenas ao modelo de inoculação no subcutâneo, que simula um tumor sólido. Situação bem diferente da encontrada na LMC, onde as células leucêmicas ficam circulando pelo sangue. Contudo, não podemos esquecer que as células progenitoras que expressam BCR-ABL permanecem também na medula óssea.

Além dos efeitos intracelulares, se considerarmos que a concentração plasmática desta lectina está aumentada em pacientes com LMC na fase blástica, abrem-se outras possibilidades para as ações extracelulares de galectina-1, com destaque para as ações nas células do sistema imune que contribuem para o escape tumoral.

A grande maioria dos estudos sobre galectina-1 e apoptose existentes está concentrada nos efeitos de galectina-1 sobre os linfócitos T e linhagens leucêmicas. Foi observado que, em linhagens leucêmicas, a indução de apoptose pela galectina-1 exógena depende da concentração de galectina-1 intracelular (SALVATORE *et al.*, 2000). Linhagens com expressão alta foram mais resistentes a indução de morte por galectina-1 extracelular

(SALVATORE *et al.*, 2000). Este pode ser o caso, neste trabalho, uma vez que as linhagens BCR-ABL apresentaram altos níveis desta galectina. (SALVATORE *et al.*, 2000).

Por outro lado, sabe-se que a galectina-1 induz a apoptose de linfócitos T ativados e timócitos (PERILLO *et al.*, 1995; BLASER *et al.*, 1998; HE e BAUM, 2004). Neste caso, a morte massiva de linfócitos poderia colaborar com o aparecimento de infecções que é uma das complicações de leucemias agudas (BODEY *et al.*, 1978). Além disso, a indução de apoptose dos linfócitos T ativados poderia contribuir para o escape tumoral das células transformadas (RUBINSTEIN *et al.*, 2004).

Pacientes com LMC apresentam um perfil de resposta imune direcionado para o tipo Th2 (KIANI *et al.*, 2003). Esse mesmo direcionamento foi observado com a administração exógena de galectina-1 em diferentes modelos experimentais de autoimunidade (RABINOVICH, 1999a; SANTUCCI *et al.*, 2000; BAUM *et al.*, 2003; TOSCANO *et al.*, 2006). Em 2006, Toscano e cols., observaram que a administração sistêmica de galectina-1 recombinante em um modelo murino experimental de uveíte autoimune (EAU), tanto na fase inicial ou tardia da doença, foi capaz de melhorar os sinais clínicos desta patologia ocular. Estes autores mostraram que a galectina-1, nesse modelo, resultava em desvio da resposta Th1 para o perfil Th2 de citocinas produzidas, com diminuição da secreção de IFN- γ , e aumento de IL-10, sem alteração de IL-12, nas células obtidas de linfonodos drenantes (TOSCANO *et al.*, 2006). Toscano e cols. verificaram que não há aumento no número de linfócitos T CD4⁺ CD25⁺ reguladores e sugerem, portanto que o efeito de galectina-1 estaria associado a regulação da expansão ou atividade supressora da população de linfócitos T CD4⁺ CD25⁺ reguladores (TOSCANO *et al.*, 2006). De fato, o bloqueio da ligação de galectina-1 aos receptores desses linfócitos T reguladores causou uma inibição da atividade reguladora nos linfócitos T CD4⁺ CD25⁺ reguladores humanos e murinos (GARIN *et al.*, 2007). Por último, os linfócitos T CD4⁺ CD25⁺ reguladores obtidos de camundongos mutantes homozigotos nulos para galectina-1 apresentaram uma atividade reguladora reduzida, sugerindo um importante papel na regulação da resposta supressora de linfócitos T (GARIN *et al.*, 2007).

Estes efeitos de galectina-1 sobre os linfócitos T não foram avaliados neste trabalho, uma vez que o modelo experimental utilizado para os experimentos *in vivo*, foi o camundongo BALB/c nude, deficiente em linfócitos T e B. Isto não exclui a possibilidade de atuação de

galectina-1 nos linfócitos T na LMC. Muito pelo contrário, mostra que pelo menos, em parte, a contribuição da galectina-1 na progressão tumoral da LMC não depende do escape tumoral mediado pela resposta imune dos linfócitos T.

A galectina-1 exógena também promove a externalização da fosfatidilserina (DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003) de células leucêmicas (HL-60) e neutrófilos ativados que são então reconhecidos e fagocitados por macrófagos murinos ativados. Este efeito de galectina-1 poderia resultar na eliminação de neutrófilos ativados, prejudicando a resposta imune dos pacientes com LMC na fase blástica.

Os diversos efeitos de galectina-1 sobre as células do sistema imunológico, podem estar participando do comprometimento da resposta imune dos pacientes com LMC na fase blástica. Uma resposta imune deficiente tem duas consequências importantes nesses: maior susceptibilidade a infecções e resposta imune anti-tumoral prejudicada. A LMC é uma neoplasia que responde bem a imunoterapia e vacinação contra antígenos associados a tumores (PINILLA-IBARZ *et al.*, 2000). Está cada vez mais evidente que os linfócitos T controlam o desenvolvimento da LMC. A principal evidência é a obtenção de remissão, em pacientes que recidivaram após transplante de MO alogênico, após a infusão de uma população de linfócitos T, onde os linfócitos T CD8⁺ foram eliminados (GIRALT *et al.*, 1995). Atualmente, diversas estratégias de imunoterapias estão em desenvolvimento. Algumas focam vacinas contra antígenos associados a tumores, tais como Pr3 e WT-1, vacinas autólogas: células dendríticas autólogas e proteínas de choque térmico, por exemplo (GALE *et al.*, 2005).

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na transformação mediada por BCR-ABL é de fundamental importância para o melhor entendimento da etiopatogenia, progressão e/ou resposta terapêutica das leucemias BCR-ABL-positivas. É fato que o desenvolvimento do mesilato de imatinibe, revolucionou o tratamento da LMC. No entanto, o freqüente aparecimento de resistência adquirida ao tratamento em pacientes com LMC nas fases mais avançadas, assim como uma resistência primária em 7% dos indivíduos na fase crônica tratados com este inibidor de tirosina-quinase (KANTARJIAN *et al.*, 2002a) justifica a busca por alvos “downstream” a ativação de BCR-ABL. A inibição dos alvos identificados pode ampliar as estratégias de terapias combinadas. De fato, o uso de drogas que bloqueiam as vias de RAS (HOOVER *et al.*, 2002) e PI3K (KLEJMAN *et al.*, 2002) exibiu um efeito

sinérgico, *in vitro*, ao serem combinadas com o mesilato de imatinibe. Nossos dados sugerem que a galectina-1 é um forte candidato a alvo terapêutico secundário no tratamento da LMC. E, portanto, compostos sintéticos derivados da lactose que inibam seletivamente a galectina-1 (TEJLER *et al.*, 2006) poderiam ser utilizados, associados aos inibidores específicos de BCR-ABL com o intuito de potencializar a terapia contra a doença.

Conclusões

6 Conclusões

Identificamos um novo mecanismo de regulação da expressão de galectina-1, mediado pela atividade tirosina-quinase de BCR-ABL. Esta forma de regulação não é válida para galectina-3.

A galectina-1 é um potencial biomarcador de progressão tumoral e, portanto, a alta expressão desta lectina poderia ser usada, na fase avançada da LMC, como fator preditivo de pior prognóstico nesses pacientes.

A galectina-1 é um potencial candidato a alvo terapêutico na LMC, devido ao efeito cooperativo de galectina-1 e BCR-ABL na tumorigênese, observado no modelo *in vivo*.

Referências
Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- ABELSON, H. T.; RABSTEIN, L. S. Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res.*, v.30, n.8, p.2213-22, Aug, 1970.
- ADAM, J. K. et al. Immune responses in cancer. *Pharmacol. Ther.*, v.99, n.1, p.113-32, 2003.
- AFAR, D. E. et al. Differential complementation of Bcr-Abl point mutants with c-Myc. *Science.*, v.264, n.5157, p.424-6, 1994.
- AGUAYO, A. et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood.*, v.96, n.6, p.2240-5, 2000.
- AHMAD, N. et al. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J. Biol. Chem.*, v.279, n.12, p.10841-7, 2004.
- AICHBERGER, K. J. et al. Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of imatinib and mcl-1 antisense oligonucleotides. *Blood.*, v.105, n.8, p.3303-11, 2005.
- AKAHANI, S. et al. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res.*, v.57, n.23, p.5272-6, 1997.
- AMARANTE-MENDES, G. P. et al. Anti-apoptotic oncogenes prevent caspase-dependent and independent commitment for cell death. *Cell Death Differ.*, v.5, n.4, p.298-306, 1998c.
- AMARANTE-MENDES, G. P.; GREEN, D. R. Abl tyrosine kinase and the control of apoptosis. In: J. Martin, S. (Ed.). *Apoptosis and Cancer*. Basel: Karger Landes Systems, Abl tyrosine kinase and the control of apoptosis, p.98-115, 1997a.
- AMARANTE-MENDES, G. P.; GREEN, D. R. The regulation of apoptotic cell death. *Braz. J. Med Biol. Res.*, v.32, n.9, p.1053-61, Sep, 1999.
- AMARANTE-MENDES, G. P. et al. Bcr - Abl-mediated resistance to apoptosis is independent of PI 3-kinase activity. *Cell Death Differ.*, v.4, n.7, p.548-54, 1997b.
- AMARANTE-MENDES, G. P. et al. Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL. *Oncogene.*, v.16, n.11, p.1383-90, 1998b.
- AMARANTE-MENDES, G. P. et al. Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3. *Blood.*, v.91, n.5, p.1700-5, 1998a.
- AMOS, T. A. et al. Apoptosis in chronic myeloid leukaemia: normal responses by progenitor cells to growth factor deprivation, X-irradiation and glucocorticoids. *Br. J. Haematol.*, v.91, n.2, p.387-93, Oct, 1995.
- ANTMAN, K. H. Introduction: the history of arsenic trioxide in cancer therapy. *Oncologist.*, v.6 Suppl 2, p.1-2, 2001.
- ARANCIA, G. et al. Cellular mechanisms of lymphocyte-mediated lysis of tumor cells. *Ann. Ist Super Sanita.*, v.26, n.3-4, p.369-84, 1990.

- AVNI, O. et al. Complement receptor 3 of macrophages is associated with galectin-1-like protein. *J. Immunol.*, v.160, n.12, p.6151-8, 1998.
- AZAM, M. et al. Mechanisms of autoinhibition and STI-571/imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. *Cell.*, v.112, n.6, p.831-43, 2003.
- BAIN, B. J. Diagnosis from the blood smear. *N. Engl. J. Med.*, v.353, n.5, p.498-507, 2005.
- BAINES, P. et al. Haemopoietic colony-forming cells from peripheral blood stem cell harvests: cytokine requirements and lineage potential. *Br. J. Haematol.*, v.88, n.3, p.472-80, 1994.
- BARONDES, S. H. et al. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.*, v.269, n.33, p.20807-10, 1994.
- BARTRAM, C. R. et al. Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature.*, v.306, n.5940, p.277-80, Nov 17-23, 1983.
- BAUM, K. J.; REN, R. Effect of Ras Inhibition in Hematopoiesis and BCR/ABL Leukemogenesis. *J. Hematol. Oncol.*, v.1, p.5, 2008.
- BAUM, L. G. et al. Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. *Clin. Immunol.*, v.109, n.3, p.295-307, Dec, 2003.
- BAZZONI, G. et al. Bcr/Abl expression stimulates integrin function in hematopoietic cell lines. *J. Clin. Invest.*, v.98, n.2, p.521-8, 1996.
- BECK, Z. et al. Changes in oncogene expression implicated in evolution of chronic granulocytic leukemia from its chronic phase to acceleration. *Leuk. Lymphoma.*, v.30, n.3-4, p.293-306, 1998.
- BEDI, A. et al. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood.*, v.83, n.8, p.2038-44, 1994.
- BENNETT, D. C. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene.*, v.22, n.20, p.3063-9, 2003.
- BENVENUTO, G. et al. Cell-specific transcriptional regulation and reactivation of galectin-1 gene expression are controlled by DNA methylation of the promoter region. *Mol. Cell Biol.*, v.16, n.6, p.2736-43, Jun, 1996.
- BHATIA, R. et al. Treatment of marrow stroma with interferon-alpha restores normal beta 1 integrin-dependent adhesion of chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors. Role of MIP-1 alpha. *J. Clin. Invest.*, v.96, n.2, p.931-9, 1995.
- BIRON, V. A. et al. Galectin-1: biphasic growth regulation of Leydig tumor cells. *Glycobiology.*, v.16, n.9, p.810-21, 2006.
- BLALOCK, W. L. et al. Signal transduction, cell cycle regulatory, and anti-apoptotic pathways regulated by IL-3 in hematopoietic cells: possible sites for intervention with anti-neoplastic drugs. *Leukemia.*, v.13, n.8, p.1109-66, 1999.
- BLASER, C. et al. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur. J. Immunol.*, v.28, n.8, p.2311-9, 1998.
- BODEY, G. P. et al. Fever and infection in leukemic patients: a study of 494 consecutive patients. *Cancer.*, v.41, n.4, p.1610-22, 1978.

- BODNAR, A. G. et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, v.279, n.5349, p.349-52, Jan 16, 1998.
- BOGUSKI, M. S.; MCCORMICK, F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*, v.366, n.6456, p.643-54, Dec 16, 1993.
- BONIFAZI, F. et al. Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders. *Blood*, v.98, n.10, p.3074-81, Nov 15, 2001.
- BOYUM, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand. J. Immunol.*, v.5, p.9-15, Jun, 1976.
- BRANDT, B. et al. Galectin-1 induced activation of the apoptotic death-receptor pathway in human Jurkat T lymphocytes. *Histochem. Cell Biol.*, v.129, n.5, p.599-609, May, 2008.
- BRASHER, B. B. et al. Mutational analysis of the regulatory function of the c-Abl Src homology 3 domain. *Oncogene*, v.20, n.53, p.7744-52, Nov 22, 2001.
- BRASHER, B. B.; VAN ETEN, R. A. c-Abl has high intrinsic tyrosine kinase activity that is stimulated by mutation of the Src homology 3 domain and by autophosphorylation at two distinct regulatory tyrosines. *J. Biol. Chem.*, v.275, n.45, p.35631-7, Nov 10, 2000.
- BRASIL. Organização mundial da Saúde. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2007.
- BRESALIER, R. S. et al. Expression of the endogenous galactose-binding protein galectin-3 correlates with the malignant potential of tumors in the central nervous system. *Cancer*, v.80, n.4, p.776-87, Aug 15, 1997.
- BRILES, E. B. et al. Isolation of wheat germ agglutinin-resistant clones of Chinese hamster ovary cells deficient in membrane sialic acid and galactose. *J. Biol. Chem.*, v.252, n.3, p.1107-16, Feb 10, 1977.
- BRINCKER, H. Population-based age- and sex-specific incidence rates in the 4 main types of leukaemia. *Scand. J. Haematol.*, v.29, n.3, p.241-9, Sep, 1982.
- BRUMATTI, G. et al. Comparison of the anti-apoptotic effects of Bcr-Abl, Bcl-2 and Bcl-x(L) following diverse apoptogenic stimuli. *FEBS Lett.*, v.541, n.1-3, p.57-63, Apr 24, 2003.
- BUCHDUNGER, E. et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.295, n.1, p.139-45, Oct, 2000.
- BUENO-DA-SILVA, A. E. et al. Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis is independent of constant tyrosine-kinase activity. *Cell Death Differ.*, v.10, n.5, p.592-8, May, 2003.
- BURGER, O. et al. Placental protein 13 (PP-13): effects on cultured trophoblasts, and its detection in human body fluids in normal and pathological pregnancies. *Placenta*, v.25, n.7, p.608-22, Aug, 2004.
- CAHILL, M. A. et al. Signalling pathways: jack of all cascades. *Curr. Biol.*, v.6, n.1, p.16-9, Jan 1, 1996.
- CALDWELL, S. A. et al. The Fas/Fas ligand pathway is important for optimal tumor regression in a mouse model of CTL adoptive immunotherapy of experimental CMS4 lung metastases. *J Immunol.*, v.171, n.5, p.2402-12, Sep 1, 2003.

CALIFICE, S. et al. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. *Oncogene*, v.23, n.45, p.7527-36, Sep 30, 2004.

CAMBIER, N. et al. BCR-ABL activates pathways mediating cytokine independence and protection against apoptosis in murine hematopoietic cells in a dose-dependent manner. *Oncogene*, v.16, n.3, p.335-48, Jan 22, 1998.

CAMBY, I. et al. Galectin-1 modulates human glioblastoma cell migration into the brain through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, v.61, n.7, p.585-96, Jul, 2002.

CAMPISI, J. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo*, v.14, n.1, p.183-8, Jan-Feb, 2000.

CAMPISI, J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.*, v.11, n.11, p.S27-31, Nov, 2001.

CANITROT, Y. et al. p210 BCR/ABL kinase regulates nucleotide excision repair (NER) and resistance to UV radiation. *Blood*, v.102, n.7, p.2632-7, Oct 1, 2003.

CARTER, T. A. et al. Inhibition of drug-resistant mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v.102, n.31, p.11011-6, Aug 2, 2005.

CASTRONOVO, V. et al. Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *J. Pathol.*, v.179, n.1, p.43-8, May, 1996.

CERVANTES, F. et al. 'Lymphoid' blast crisis of chronic myeloid leukaemia is associated with distinct clinicohaematological features. *Br. J. Haematol.*, v.100, n.1, p.123-8, Jan, 1998.

CHAI, S. K. et al. Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J. Immunol.*, v.159, n.10, p.4720-8, Nov 15, 1997.

CHAKRABORTY, M. et al. Irradiation of tumor cells up-regulates Fas and enhances CTL lytic activity and CTL adoptive immunotherapy. *J. Immunol.*, v.170, n.12, p.6338-47, Jun 15, 2003.

CHANG, J. S. et al. High levels of the BCR/ABL oncoprotein are required for the MAPK-hnRNP-E2 dependent suppression of C/EBPalpha-driven myeloid differentiation. *Blood*, v.110, n.3, p.994-1003, Aug 1, 2007.

CHEN, Q. et al. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v.92, n.10, p.4337-41, May 9, 1995.

CHEN, S. J. et al. Philadelphia-positive acute leukemia: lineage promiscuity and inconsistently rearranged breakpoint cluster region. *Leukemia*, v.2, n.5, p.261-73, May, 1988.

CHIARIOTTI, L. et al. Activation of the galectin-1 (L-14-I) gene from nonexpressing differentiated cells by fusion with undifferentiated and tumorigenic cells. *Cell Growth Differ.*, v.5, n.7, p.769-75, Jul, 1994.

CHIARIOTTI, L. et al. Expression of galectin-1 in normal human thyroid gland and in differentiated and poorly differentiated thyroid tumors. *Int. J. Cancer*, v.64, n.3, p.171-5, Jun 22, 1995.

CHIARIOTTI, L. et al. Increased expression of the negative growth factor, galactoside-binding protein, gene in transformed thyroid cells and in human thyroid carcinomas. *Oncogene*, v.7, n.12, p.2507-11, Dec, 1992.

CHISSOE, S. L. et al. Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics*, v.27, n.1, p.67-82, May 1, 1995.

CHRONIC MYELOID LEUKEMIA TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP. Interferon alfa versus chemotherapy for chronic myeloid leukemia: a meta-analysis of seven randomized trials: Chronic Myeloid Leukemia Trialists' Collaborative Group. v.89, 1616-20 p., 1997

CHUNG, C. D. et al. Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J. Immunol.*, v.165, n.7, p.3722-9, Oct 1, 2000.

CINDOLO, L. et al. Galectin-1 and galectin-3 expression in human bladder transitional-cell carcinomas. *Int. J. Cancer*, v.84, n.1, p.39-43, Feb 19, 1999.

CLARK, S. S. et al. Expression of a distinctive BCR-ABL oncogene in Ph1-positive acute lymphocytic leukemia (ALL). *Science*, v.239, n.4841 Pt 1, p.775-7, Feb 12, 1988.

CLEVELAND, J. L. et al. Tyrosine kinase oncogenes abrogate interleukin-3 dependence of murine myeloid cells through signaling pathways involving c-myc: conditional regulation of c-myc transcription by temperature-sensitive v-abl. *Mol. Cell Biol.*, v.9, n.12, p.5685-95, Dec, 1989.

COHEN, L. et al. Transcriptional activation of a ras-like gene (kir) by oncogenic tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v.91, n.26, p.12448-52, Dec 20, 1994.

COOPER, D. N.; BARONDES, S. H. God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology*, v.9, n.10, p.979-84, Oct, 1999.

CORBIN, A. S. et al. Analysis of the structural basis of specificity of inhibition of the Abl kinase by STI571. *J. Biol. Chem.*, v.277, n.35, p.32214-9, Aug 30, 2002.

CORSO, A. et al. Chronic myelogenous leukemia and exposure to ionizing radiation--a retrospective study of 443 patients. *Ann. Hematol.*, v.70, n.2, p.79-82, Feb, 1995.

CORTES, J.; KANTARJIAN, H. Advanced-phase chronic myeloid leukemia. *Semin. Hematol.*, v.40, n.1, p.79-86, Jan, 2003a.

CORTES, J. et al. Effects of age on prognosis with imatinib mesylate therapy for patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Cancer*, v.98, n.6, p.1105-13, Sep 15, 2003b.

CORTES, J. E. et al. Chronic myelogenous leukemia: a review. *Am. J. Med.*, v.100, n.5, p.555-70, May, 1996.

CORTES, J. E. et al. Staging of chronic myeloid leukemia in the imatinib era: an evaluation of the World Health Organization proposal. *Cancer*, v.106, n.6, p.1306-15, Mar 15, 2006.

CORTEZ, D. et al. Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, v.15, n.10, p.5531-41, Oct, 1995.

COURAUD, P. O. et al. Molecular cloning, characterization, and expression of a human 14-kDa lectin. *J. Biol. Chem.*, v.264, n.2, p.1310-6, Jan 15, 1989.

- DALEY, G. Q.; BALTIMORE, D. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v.85, n.23, p.9312-6, Dec, 1988.
- DANGUY, A. et al. Galectins and cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1572, n.2-3, p.285-93, 2002.
- DANNENBERG, J. H. et al. Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions. *Genes Dev*, v.14, n.23, p.3051-64, Dec 1, 2000.
- DAVIS, J. E. et al. Granzyme A and B-deficient killer lymphocytes are defective in eliciting DNA fragmentation but retain potent in vivo anti-tumor capacity. *Eur. J. Immunol*, v.31, n.1, p.39-47, Jan, 2001.
- DE GREGORIO, E. et al. The overlap of Inr and TATA elements sets the use of alternative transcriptional start sites in the mouse galectin-1 gene promoter. *Gene*, v.268, n.1-2, p.215-23, May 2, 2001.
- DE GROOT, R. P. et al. STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. *Blood*, v.94, n.3, p.1108-12, Aug 1, 1999.
- DEININGER, M. W. et al. Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing radiation. *Cancer Res*, v.58, n.3, p.421-5, Feb 1, 1998.
- DEININGER, M. W. et al. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood*, v.90, n.9, p.3691-8, Nov 1, 1997.
- DEININGER, M. W. et al. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, v.96, n.10, p.3343-56, Nov 15, 2000a.
- DEININGER, M. W. et al. BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. *Cancer Res*, v.60, n.7, p.2049-55, Apr 1, 2000b.
- DEL PESO, L. et al. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*, v.278, n.5338, p.687-9, Oct 24, 1997.
- DETTIN, L. et al. Regulated expression and ultrastructural localization of galectin-1, a proapoptotic beta-galactoside-binding lectin, during spermatogenesis in rat testis. *Biol. Reprod*, v.68, n.1, p.51-9, Jan, 2003.
- DIAS-BARUFFI, M. et al. Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic recognition of leukocytes without inducing apoptosis. *J. Biol. Chem*, v.278, n.42, p.41282-93, Oct 17, 2003.
- DIEKMANN, D. et al. Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature*, v.351, n.6325, p.400-2, May 30, 1991.
- DIMRI, G. P. et al. Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. *Mol. Cell Biol*, v.20, n.1, p.273-85, Jan, 2000.
- DOREY, K. et al. Phosphorylation and structure-based functional studies reveal a positive and a negative role for the activation loop of the c-Abl tyrosine kinase. *Oncogene*, v.20, n.56, p.8075-84, Dec 6, 2001.
- DRAKE, C. G. et al. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv. Immunol*, v.90, p.51-81, 2006.

DREYFUSS, G. et al. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.*, v.62, p.289-321, 1993.

DRUKER, B. J. et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, v.344, n.14, p.1031-7, Apr 5, 2001.

DRUKER, B. J. et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.*, v.2, n.5, p.561-6, May, 1996.

ELAD-SFADIA, G. et al. Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. *J. Biol. Chem.*, v.279, n.33, p.34922-30, Aug 13, 2004.

ELAD-SFADIA, G. et al. Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, v.277, n.40, p.37169-75, Oct 4, 2002.

ELLERHORST, J. et al. Galectin-1 and galectin-3 expression in human prostate tissue and prostate cancer. *Urol Res.*, v.27, n.5, p.362-7, Oct, 1999.

ELLIS, R. E. et al. Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.*, v.7, p.663-98, 1991.

ELOLA, M. T. et al. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell. Mol. Life Sci.*, v.64, n.13, p.1679-700, Jul, 2007.

ERNST, T. J. et al. p210Bcr/Abl and p160v-Abl induce an increase in the tyrosine phosphorylation of p93c-Fes. *J. Biol. Chem.*, v.269, n.8, p.5764-9, Feb 25, 1994.

FADERL, S. et al. The biology of chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, v.341, n.3, p.164-72, Jul 15, 1999.

FLOTTE, T. J. et al. Dendritic cell and macrophage staining by monoclonal antibodies in tissue sections and epidermal sheets. *Am. J. Pathol.*, v.111, n.1, p.112-24, Apr, 1983.

FOLLEY, J. H. et al. Incidence of leukemia in survivors of the atomic bomb in Hiroshima and Nagasaki, Japan. *Am. J. Med.*, v.13, n.3, p.311-21, Sep, 1952.

FONTANA, S. et al. Comparative proteome profiling and functional analysis of chronic myelogenous leukemia cell lines. *J. Proteome Res.*, v.6, n.11, p.4330-42, Nov, 2007.

FUERTES, M. B. et al. Regulated expression of galectin-1 during T-cell activation involves Lck and Fyn kinases and signaling through MEK1/ERK, p38 MAP kinase and p70S6 kinase. *Mol. Cell Biochem.*, v.267, n.1-2, p.177-85, Dec, 2004.

FUKUMORI, T. et al. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res.*, v.63, n.23, p.8302-11, Dec 1, 2003.

FURSTOSS, O. et al. c-Abl is an effector of Src for growth factor-induced c-myc expression and DNA synthesis. *Embo J.*, v.21, n.4, p.514-24, Feb 15, 2002.

GABIUS, H. J. et al. Localization of endogenous lectins in normal human breast, benign breast lesions and mammary carcinomas. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.*, v.52, n.2, p.107-15, 1986.

GABRIELE, L. et al. Regulation of apoptosis in myeloid cells by interferon consensus sequence-binding protein. *J. Exp. Med.*, v.190, n.3, p.411-21, Aug 2, 1999.

- GALE, R. P. et al. Immune therapy of chronic myelogenous leukemia. *Leuk. Res.*, v.29, n.5, p.583-6, May, 2005.
- GARCIA, R.; JOVE, R. Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. *J. Biomed. Sci.*, v.5, n.2, p.79-85, 1998.
- GARIN, M. I. et al. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood*, v.109, n.5, p.2058-65, Mar 1, 2007.
- GAUTHIER, L. et al. Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*, v.99, n.20, p.13014-9, Oct 1, 2002.
- GEHO, D. H. et al. Physiological mechanisms of tumor-cell invasion and migration. *Physiology (Bethesda)*, v.20, p.194-200, Jun, 2005.
- GERBER, H. P. et al. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature*, v.417, n.6892, p.954-8, Jun 27, 2002.
- GILES, F. J. et al. Phase I and pharmacokinetic study of DX-8951f (exatecan mesylate), a hexacyclic camptothecin, on a daily-times-five schedule in patients with advanced leukemia. *Clin. Cancer Res.*, v.8, n.7, p.2134-41, Jul, 2002.
- GIRALT, S. et al. CD8-depleted donor lymphocyte infusion as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, v.86, n.11, p.4337-43, Dec 1, 1995.
- GITT, M. A.; BARONDES, S. H. Genomic sequence and organization of two members of a human lectin gene family. *Biochemistry*, v.30, n.1, p.82-9, Jan 8, 1991.
- GORDON, M. Y. et al. Cell biology of CML cells. *Leukemia*, v.13 Suppl 1, p.S65-71, Apr, 1999.
- GORDON, M. Y. et al. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*, v.328, n.6128, p.342-4, Jul 23-29, 1987.
- GOTOH, A. et al. Tyrosine phosphorylation and activation of focal adhesion kinase (p125FAK) by BCR-ABL oncoprotein. *Exp. Hematol.*, v.23, n.11, p.1153-9, Oct, 1995.
- GRAZIANO, D. F.; FINN, O. J. Tumor antigens and tumor antigen discovery. *Cancer Treat. Res.*, v.123, p.89-111, 2005.
- GREEN, D. R.; AMARANTE-MENDES, G. P. The point of no return: mitochondria, caspases, and the commitment to cell death. *Results Probl. Cell Differ.*, v.24, p.45-61, 1998.
- GRIFFITHS, G. M.; ARGON, Y. Structure and biogenesis of lytic granules. *Curr. Top. Microbiol Immunol.*, v.198, p.39-58, 1995.
- GROFFEN, J. et al. Philadelphia Chromosome Translocation. In: A. B. Deisseroth e R. B. Arlinghaus (Ed.). *Chronic myelogenous leukemia : molecular approaches to research and therapy*. New York: Dekker, Philadelphia Chromosome Translocation, p.181-209 1991.
- GROFFEN, J. et al. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*, v.36, n.1, p.93-9, Jan, 1984.

GU, M. et al. Selective modulation of the interaction of alpha 7 beta 1 integrin with fibronectin and laminin by L-14 lectin during skeletal muscle differentiation. *J. Cell. Sci.*, v.107 (Pt 1), p.175-81, Jan, 1994.

HAHN, E. A. et al. Quality of life in patients with newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia on imatinib versus interferon alfa plus low-dose cytarabine: results from the IRIS Study. *J. Clin. Oncol.*, v.21, n.11, p.2138-46, Jun 1, 2003.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v.100, n.1, p.57-70, Jan 7, 2000.

HANTSCH, O.; SUPERTI-FURGA, G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, v.5, n.1, p.33-44, Jan, 2004.

HAO, S. X.; REN, R. Expression of interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) is downregulated in Bcr-Abl-induced murine chronic myelogenous leukemia-like disease, and forced coexpression of ICSBP inhibits Bcr-Abl-induced myeloproliferative disorder. *Mol. Cell. Biol.*, v.20, n.4, p.1149-61, Feb, 2000.

HARRIS, S. L.; LEVINE, A. J. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, v.24, n.17, p.2899-908, Apr 18, 2005.

HARVEY, D. M.; LEVINE, A. J. p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes Dev.*, v.5, n.12B, p.2375-85, Dec, 1991.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell. Res.*, v.25, p.585-621, Dec, 1961.

HE, J.; BAUM, L. G. Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. *J. Biol. Chem.*, v.279, n.6, p.4705-12, Feb 6, 2004.

HE, J.; BAUM, L. G. Galectin interactions with extracellular matrix and effects on cellular function. *Methods Enzymol.*, v.417, p.247-56, 2006a.

HEANEY, C. et al. Direct binding of CRKL to BCR-ABL is not required for BCR-ABL transformation. *Blood*, v.89, n.1, p.297-306, Jan 1, 1997.

HEHLMANN, R. et al. Chronic myeloid leukemia: a model for oncology. *Ann. Hematol.*, v.84, n.8, p.487-97, Aug, 2005.

HEHLMANN, R. et al. Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood*, v.84, n.12, p.4064-77, Dec 15, 1994.

HELGASON, C. D. et al. Targeted disruption of SHIP leads to hemopoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span. *Genes Dev.*, v.12, n.11, p.1610-20, Jun 1, 1998.

HENKART, P. A. Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules. *Immunity*, v.1, n.5, p.343-6, Aug, 1994a.

HENKART, P. A.; SITKOVSKY, M. V. Cytotoxic lymphocytes. Two ways to kill target cells. *Curr. Biol.*, v.4, n.10, p.923-5, Oct 1, 1994b.

HICKEY, F. B. et al. Bcr-Abl regulates osteopontin transcription via Ras, PI-3K, aPKC, Raf-1, and MEK. *J. Leukoc Biol.*, v.78, n.1, p.289-300, Jul, 2005.

- HIRABAYASHI, J. et al. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.1572, n.2-3, p.232-54, Sep 19, 2002.
- HOCHHAUS, A. et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia.*, v.16, n.11, p.2190-6, Nov, 2002.
- HONJO, Y. et al. Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.*, v.7, n.3, p.661-8, Mar, 2001.
- HOOD, J. D.; CHERESH, D. A. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Cancer.*, v.2, n.2, p.91-100, Feb, 2002.
- HOOVER, R. R. et al. Overcoming STI571 resistance with the farnesyl transferase inhibitor SCH66336. *Blood.*, v.100, n.3, p.1068-71, Aug 1, 2002.
- HORIGUCHI, N. et al. Galectin-1 induces cell adhesion to the extracellular matrix and apoptosis of non-adherent human colon cancer Colo201 cells. *J. Biochem.*, v.134, n.6, p.869-74, Dec, 2003.
- HORITA, M. et al. Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J. Exp. Med.*, v.191, n.6, p.977-84, Mar 20, 2000.
- HSU, D. K. et al. Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer.*, v.81, n.4, p.519-26, May 17, 1999.
- HSU, D. K.; LIU, F. T. Regulation of cellular homeostasis by galectins. *Glycoconj. J.*, v.19, n.7-9, p.507-15, 2004.
- HU, Y. et al. Requirement of Src kinases Lyn, Hck and Fgr for BCR-ABL1-induced B-lymphoblastic leukemia but not chronic myeloid leukemia. *Nat. Genet.*, v.36, n.5, p.453-61, May, 2004.
- HUESKEN, D. et al. Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network. *Nat. Biotechnol.*, v.23, n.8, p.995-1001, Aug, 2005.
- HUFLEJT, M. E. et al. L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 in vivo and by casein kinase I. *J. Biol. Chem.*, v.268, n.35, p.26712-8, Dec 15, 1993.
- HUNTLY, B. J. et al. Deletions of the derivative chromosome 9 occur at the time of the Philadelphia translocation and provide a powerful and independent prognostic indicator in chronic myeloid leukemia. *Blood.*, v.98, n.6, p.1732-8, Sep 15, 2001.
- HURLEY, R. W. et al. Direct adhesion to bone marrow stroma via fibronectin receptors inhibits hematopoietic progenitor proliferation. *J. Clin. Invest.*, v.96, n.1, p.511-9, Jul, 1995.
- IDIKIO, H. Galectin-3 expression in human breast carcinoma: correlation with cancer histologic grade. *Int. J. Oncol.*, v.12, n.6, p.1287-90, Jun, 1998.
- IERVOLINO, A. et al. hnRNP A1 nucleocytoplasmic shuttling activity is required for normal myelopoiesis and BCR/ABL leukemogenesis. *Mol. Cell. Biol.*, v.22, n.7, p.2255-66, Apr, 2002.
- IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer.*, v.2, n.4, p.277-88, Apr, 2002a.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J. Leukoc. Biol.*, v.71, n.6, p.907-20, Jun, 2002b.

INUFUSA, H. et al. Role of galectin-3 in adenocarcinoma liver metastasis. *Int. J. Oncol.*, v.19, n.5, p.913-9, Nov, 2001.

ISHIDA, K. et al. Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms. *Ocul. Immunol. Inflamm.*, v.11, n.2, p.91-105, Jun, 2003.

JIN, A. et al. BCR/ABL and IL-3 activate Rap1 to stimulate the B-Raf/MEK/Erk and Akt signaling pathways and to regulate proliferation, apoptosis, and adhesion. *Oncogene*, v.25, n.31, p.4332-40, Jul 20, 2006.

JOHANSSON, B. et al. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol.*, v.107, n.2, p.76-94, 2002.

JOHN, C. M. et al. Truncated galectin-3 inhibits tumor growth and metastasis in orthotopic nude mouse model of human breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, v.9, n.6, p.2374-83, Jun, 2003.

JONASCH, E.; HALUSKA, F. G. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist*, v.6, n.1, p.34-55, 2001.

JOO, H. G. et al. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.*, v.69, n.4, p.555-64, Apr, 2001.

JUNG, T. Y. et al. Role of galectin-1 in migration and invasion of human glioblastoma multiforme cell lines. *J. Neurosurg.*, v.109, n.2, p.273-84, Aug, 2008.

KABAROWSKI, J. H. et al. A temperature sensitive p210 BCR-ABL mutant defines the primary consequences of BCR-ABL tyrosine kinase expression in growth factor dependent cells. *Embo J.*, v.13, n.24, p.5887-95, Dec 15, 1994.

KAFROUNI, M. I. et al. The role of TNF-TNFR2 interactions in generation of CTL responses and clearance of hepatic adenovirus infection. *J. Leukoc. Biol.*, v.74, n.4, p.564-71, Oct, 2003.

KAGI, D. et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science*, v.265, n.5171, p.528-30, Jul 22, 1994.

KAMIJO, T. et al. Loss of the ARF tumor suppressor reverses premature replicative arrest but not radiation hypersensitivity arising from disabled atm function. *Cancer Res.*, v.59, n.10, p.2464-9, May 15, 1999.

KANTARJIAN, H. et al. The MD Anderson manual of medical oncology. New York: McGraw-Hill Medical Pub. Division, xviii, 2006. 1149 p.p.

KANTARJIAN, H. et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.*, v.346, n.9, p.645-52, Feb 28, 2002a.

KANTARJIAN, H. M. et al. Chronic myelogenous leukemia: a concise update. *Blood*, v.82, n.3, p.691-703, Aug 1, 1993.

KANTARJIAN, H. M. et al. Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer*, v.61, n.7, p.1441-6, Apr 1, 1988.

KANTARJIAN, H. M. et al. Chronic myelogenous leukemia in blast crisis. Analysis of 242 patients. *Am. J. Med.*, v.83, n.3, p.445-54, Sep, 1987.

KANTARJIAN, H. M. et al. Complete cytogenetic and molecular responses to interferon-alpha-based therapy for chronic myelogenous leukemia are associated with excellent long-term prognosis. *Cancer*, v.97, n.4, p.1033-41, Feb 15, 2003.

KANTARJIAN, H. M. et al. Chronic myelogenous leukemia: a multivariate analysis of the associations of patient characteristics and therapy with survival. *Blood*, v.66, n.6, p.1326-35, Dec, 1985.

KANTARJIAN, H. M. 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, n.7, p.2177-87, Jul, 2002b.

KHALDOYANIDI, S. K. et al. MDA-MB-435 human breast carcinoma cell homo- and heterotypic adhesion under flow conditions is mediated in part by Thomsen-Friedenreich antigen-galectin-3 interactions. *J. Biol. Chem.*, v.278, n.6, p.4127-34, Feb 7, 2003.

KHARAS, M. G.; FRUMAN, D. A. ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors. *Cancer Res.*, v.65, n.6, p.2047-53, Mar 15, 2005.

KHARAS, M. G. et al. Ablation of PI3K blocks BCR-ABL leukemogenesis in mice, and a dual PI3K/mTOR inhibitor prevents expansion of human BCR-ABL+ leukemia cells. *J. Clin. Invest.*, v.118, n.9, p.3038-50, Sep, 2008.

KIANI, A. et al. Normal intrinsic Th1/Th2 balance in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia not treated with interferon-alpha or imatinib. *Haematologica*, v.88, n.7, p.754-61, Jul, 2003.

KISS, J. et al. A novel anti-inflammatory function of human galectin-1: inhibition of hematopoietic progenitor cell mobilization. *Exp. Hematol.*, v.35, n.2, p.305-13, Feb, 2007.

KLEJMAN, A. et al. Phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors enhance the anti-leukemia effect of STI571. *Oncogene*, v.21, n.38, p.5868-76, Aug 29, 2002.

KLUCHER, K. M. et al. Secondary mutation maintains the transformed state in BaF3 cells with inducible BCR/ABL expression. *Blood*, v.91, n.10, p.3927-34, May 15, 1998.

KOLOMIETZ, E. et al. Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis. *Blood*, v.97, n.11, p.3581-8, Jun 1, 2001.

KOOPMAN, L. A. et al. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J. Exp. Med.*, v.198, n.8, p.1201-12, Oct 20, 2003.

KOPITZ, J. et al. Negative regulation of neuroblastoma cell growth by carbohydrate-dependent surface binding of galectin-1 and functional divergence from galectin-3. *J. Biol. Chem.*, v.276, n.38, p.35917-23, Sep 21, 2001.

KURZROCK, R. et al. Expression of c-abl in Philadelphia-positive acute myelogenous leukemia. *Blood*, v.70, n.5, p.1584-8, Nov, 1987.

LAGGER, G. et al. The tumor suppressor p53 and histone deacetylase 1 are antagonistic regulators of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21/WAF1/CIP1 gene. *Mol. Cell. Biol.*, v.23, n.8, p.2669-79, Apr, 2003.

LANEUVILLE, P. Abl tyrosine protein kinase. *Semin. Immunol.*, v.7, n.4, p.255-66, Aug, 1995.

- LANEUVILLE, P. et al. bcr/abl expression in 32D cl3(G) cells inhibits apoptosis induced by protein tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res.*, v.54, n.5, p.1360-6, Mar 1, 1994.
- LE MARER, N.; HUGHES, R. C. Effects of the carbohydrate-binding protein galectin-3 on the invasiveness of human breast carcinoma cells. *J. Cell. Physiol.*, v.168, n.1, p.51-8, Jul, 1996.
- LEE, S. H. et al. In vivo rejection of tumor cells dependent on CD8 cells that kill independently of perforin and FasL. *Cancer Gene Ther.*, v.11, n.3, p.237-48, Mar, 2004.
- LEWIS, J. M. et al. Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, v.93, n.26, p.15174-9, Dec 24, 1996.
- LIAO, D. I. et al. Structure of S-lectin, a developmentally regulated vertebrate beta-galactoside-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, v.91, n.4, p.1428-32, Feb 15, 1994.
- LIDONNICI, M. R. et al. Requirement of c-Myb for p210(BCR/ABL)-dependent transformation of hematopoietic progenitors and leukemogenesis. *Blood.*, v.111, n.9, p.4771-9, May 1, 2008.
- LIST, A. F. Vascular endothelial growth factor signaling pathway as an emerging target in hematologic malignancies. *Oncologist.*, v.6 Suppl 5, p.24-31, 2001.
- LIU, F. T. et al. Intracellular functions of galectins. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.1572, n.2-3, p.263-73, Sep 19, 2002.
- LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat. Rev. Cancer.*, v.5, n.1, p.29-41, Jan, 2005.
- LIU, J. et al. Sequences within the first exon of BCR inhibit the activated tyrosine kinases of c-Abl and the Bcr-Abl oncoprotein. *Cancer Res.*, v.56, n.22, p.5120-4, Nov 15, 1996.
- LOTAN, R. et al. Modulation of galactoside-binding lectins in tumor cells by differentiation-inducing agents. *Cancer Lett.*, v.48, n.2, p.115-22, Nov 30, 1989.
- LOWE, S. W. et al. Intrinsic tumour suppression. *Nature.*, v.432, n.7015, p.307-15, Nov 18, 2004.
- LOWE, S. W.; SHERR, C. J. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v.13, n.1, p.77-83, Feb, 2003.
- LU, Y. et al. Differential regulation of constitutive and retinoic acid-induced galectin-1 gene transcription in murine embryonal carcinoma and myoblastic cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.1491, n.1-3, p.13-9, Apr 25, 2000.
- LUNDBERG, L. G. et al. Bone marrow in polycythemia vera, chronic myelocytic leukemia, and myelofibrosis has an increased vascularity. *Am. J. Pathol.*, v.157, n.1, p.15-9, Jul, 2000.
- LUTOMSKI, D. et al. Externalization and binding of galectin-1 on cell surface of K562 cells upon erythroid differentiation. *Glycobiology.*, v.7, n.8, p.1193-9, Dec, 1997.
- MARU, Y.; WITTE, O. N. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell.*, v.67, n.3, p.459-68, Nov 1, 1991.
- MATARRESE, P. et al. Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. *Int. J. Cancer.*, v.85, n.4, p.545-54, Feb 15, 2000.

MATARRESE, P. et al. Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding, and fission. *J. Biol. Chem.*, v.280, n.8, p.6969-85, Feb 25, 2005.

MATSUGUCHI, T. et al. Tyrosine phosphorylation of p95Vav in myeloid cells is regulated by GM-CSF, IL-3 and steel factor and is constitutively increased by p210BCR/ABL. *Embo J.*, v.14, n.2, p.257-65, Jan 16, 1995.

MAYERHOFER, M. et al. Identification of heme oxygenase-1 as a novel BCR/ABL-dependent survival factor in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res.*, v.64, n.9, p.3148-54, May 1, 2004.

MCCONNELL, B. B. et al. Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts. *Curr. Biol.*, v.8, n.6, p.351-4, Mar 12, 1998.

MCGAHON, A. et al. BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood*, v.83, n.5, p.1179-87, Mar 1, 1994.

MCWHIRTER, J. R. et al. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol. Cell. Biol.*, v.13, n.12, p.7587-95, Dec, 1993b.

MCWHIRTER, J. R.; WANG, J. Y. An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Embo J.*, v.12, n.4, p.1533-46, Apr, 1993a.

MEHUL, B.; HUGHES, R. C. Plasma membrane targetting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *J. Cell Sci.*, v.110 (Pt 10), p.1169-78, May, 1997.

MELO, J. V. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*, v.88, n.7, p.2375-84, Oct 1, 1996a.

MELO, J. V. The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*, v.10, n.5, p.751-6, May, 1996b.

MELO, J. V.; CHUAH, C. Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. *Cancer Lett.*, v.249, n.2, p.121-32, May 8, 2007.

MELO, J. V.; CHUAH, C. Novel Agents in CML Therapy: Tyrosine Kinase Inhibitors and Beyond. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, v.2008, p.427-35, 2008.

MELO, J. V. et al. The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. *Blood*, v.81, n.1, p.158-65, Jan 1, 1993.

MELO, J. V. et al. Chronic myeloid leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, p.132-52, 2003.

MENSSSEN, A.; HERMEKING, H. Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, v.99, n.9, p.6274-9, Apr 30, 2002.

MOISA, A. et al. Growth/adhesion-regulatory tissue lectin galectin-3: stromal presence but not cytoplasmic/nuclear expression in tumor cells as a negative prognostic factor in breast cancer. *Anticancer Res.*, v.27, n.4B, p.2131-9, Jul-Aug, 2007.

- MOTRAN, C. C. et al. Galectin-1 functions as a Th2 cytokine that selectively induces Th1 apoptosis and promotes Th2 function. *Eur. J. Immunol.*, v.38, n.11, p.3015-27, Nov, 2008.
- NAGAR, B. et al. Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell*, v.112, n.6, p.859-71, Mar 21, 2003.
- NAKAHARA, S. et al. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis*, v.10, n.2, p.267-75, Mar, 2005.
- NAKAHARA, S.; RAZ, A. On the role of galectins in signal transduction. *Methods Enzymol.*, v.417, p.273-89, 2006.
- NANGIA-MAKKER, P. et al. Regulation of tumor progression by extracellular galectin-3. *Cancer Microenviron.*, v.1, n.1, p.43-51, Dec, 2008.
- NANGIA-MAKKER, P. et al. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, v.156, n.3, p.899-909, Mar, 2000.
- NANGIA-MAKKER, P. et al. Regulation of the expression of galactoside-binding lectin during human monocytic differentiation. *Cancer Res.*, v.53, n.20, p.5033-7, Oct 15, 1993.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.). COMMITTEE TO ASSESS HEALTH RISKS FROM EXPOSURE TO LOW LEVEL OF IONIZING RADIATION. Health risks from exposure to low levels of ionizing radiation : BEIR VII Phase 2. Washington, D.C.: National Academies Press, Date., xvi, 406 p. p.2006
- NESHAT, M. S. et al. The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and Raf. *Mol. Cell. Biol.*, v.20, n.4, p.1179-86, Feb, 2000.
- NGUYEN, J. T. et al. CD45 modulates galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-glycans. *J. Immunol.*, v.167, n.10, p.5697-707, Nov 15, 2001.
- NISHII, K. et al. ts BCR-ABL kinase activation confers increased resistance to genotoxic damage via cell cycle block. *Oncogene*, v.13, n.10, p.2225-34, Nov 21, 1996.
- NORLING, L. et al. Endogenous Galectins and the control of host inflammatory response. *J Endocrinol.*, Jan 20, 2009.
- NOVELLI, F. et al. Negative cell cycle control of human T cells by beta-galactoside binding protein (beta GBP): induction of programmed cell death in leukaemic cells. *J. Cell. Physiol.*, v.178, n.1, p.102-8, Jan, 1999.
- NOWELL, P. C.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J.Natl. Cancer Inst.*, v.25, p.85-109, Jul, 1960.
- O'BRIEN, S. G. et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, v.348, n.11, p.994-1004, Mar 13, 2003.
- O'DRISCOLL, L. et al. Galectin-3 expression alters adhesion, motility and invasion in a lung cell line (DLKP), in vitro. *Anticancer Res.*, v.22, n.6A, p.3117-25, Nov-Dec, 2002.
- OCHIENG, J. et al. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj. J.*, v.19, n.7-9, p.527-35, 2004.
- OCHSENBEIN, A. F. Principles of tumor immunosurveillance and implications for immunotherapy. *Cancer Gene Ther.*, v.9, n.12, p.1043-55, Dec, 2002.

OGRYZKO, V. V. et al. Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol. Cell Biol.*, v.16, n.9, p.5210-8, Sep, 1996.

OHNISHI, K. et al. A randomized trial comparing interferon-alpha with busulfan for newly diagnosed chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Blood*, v.86, n.3, p.906-16, Aug 1, 1995.

OKUDA, K. et al. The C-terminus of c-ABL is required for proliferation and viability signaling in a c-ABL/erythropoietin receptor fusion protein. *Blood*, v.92, n.10, p.3848-56, Nov 15, 1998.

PACE, K. E. et al. CD7 delivers a pro-apoptotic signal during galectin-1-induced T cell death. *J. Immunol.*, v.165, n.5, p.2331-4, Sep 1, 2000.

PACE, K. E. et al. Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J. Immunol.*, v.163, n.7, p.3801-11, Oct 1, 1999.

PANE, F. et al. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood*, v.88, n.7, p.2410-4, Oct 1, 1996.

PAPAMICHAIL, M. et al. Natural killer lymphocytes: biology, development, and function. *Cancer Immunol Immunother.*, v.53, n.3, p.176-86, Mar, 2004.

PASTERNAK, G. et al. Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects. *J Cancer Res Clin Oncol.*, v.124, n.12, p.643-60, 1998.

PAZ, A. et al. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene*, v.20, n.51, p.7486-93, Nov 8, 2001.

PELLETIER, S. D. et al. Lack of the adhesion molecules P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 accelerate the development of BCR/ABL-induced chronic myeloid leukemia-like myeloproliferative disease in mice. *Blood*, v.104, n.7, p.2163-71, Oct 1, 2004.

PENDERGAST, A. M. et al. BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell*, v.66, n.1, p.161-71, Jul 12, 1991.

PENDERGAST, A. M. et al. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell*, v.75, n.1, p.175-85, Oct 8, 1993.

PERAZZONA, B. et al. Kinase domain mutants of Bcr enhance Bcr-Abl oncogenic effects. *Oncogene*, v.27, n.15, p.2208-14, Apr 3, 2008.

PERILLO, N. L. et al. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*, v.378, n.6558, p.736-9, Dec 14, 1995.

PERILLO, N. L. et al. Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J. Exp. Med.*, v.185, n.10, p.1851-8, May 19, 1997.

PERROTTI, D. et al. TLS/FUS, a pro-oncogene involved in multiple chromosomal translocations, is a novel regulator of BCR/ABL-mediated leukemogenesis. *Embo J.*, v.17, n.15, p.4442-55, Aug 3, 1998.

- PERROTTI, D.; CALABRETTA, B. Post-transcriptional mechanisms in BCR/ABL leukemogenesis: role of shuttling RNA-binding proteins. *Oncogene*, v.21, n.56, p.8577-83, Dec 9, 2002b.
- PERROTTI, D. et al. BCR-ABL suppresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2. *Nat. Genet.*, v.30, n.1, p.48-58, Jan, 2002a.
- PINILLA-IBARZ, J. et al. CML vaccines as a paradigm of the specific immunotherapy of cancer. *Blood Rev.*, v.14, n.2, p.111-20, Jun, 2000.
- PLUK, H. et al. Autoinhibition of c-Abl. *Cell*, v.108, n.2, p.247-59, Jan 25, 2002.
- PORAKISHVILI, N. et al. Cytotoxic CD4+ T cells in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia kill via a perforin-mediated pathway. *Haematologica*, v.89, n.4, p.435-43, Apr, 2004.
- PRENDERGAST, G. C.; JAFFEE, E. M. Cancer immunologists and cancer biologists: why we didn't talk then but need to now. *Cancer Res.*, v.67, n.8, p.3500-4, Apr 15, 2007.
- PUIL, L. et al. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *Embo J.*, v.13, n.4, p.764-73, Feb 15, 1994.
- QUACKENBUSH, R. C. et al. Analysis of the biologic properties of p230 Bcr-Abl reveals unique and overlapping properties with the oncogenic p185 and p210 Bcr-Abl tyrosine kinases. *Blood*, v.95, n.9, p.2913-21, May 1, 2000.
- QUINTAS-CARDAMA, A. et al. Imatinib mesylate therapy may overcome the poor prognostic significance of deletions of derivative chromosome 9 in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood*, v.105, n.6, p.2281-6, Mar 15, 2005.
- RABINOVICH, G. A. Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death Differ.*, v.6, n.8, p.711-21, Aug, 1999a.
- RABINOVICH, G. A. Galectin-1 as a potential cancer target. *Br. J. Cancer*, v.92, n.7, p.1188-92, Apr 11, 2005.
- RABINOVICH, G. A. et al. Molecular mechanisms implicated in galectin-1-induced apoptosis: activation of the AP-1 transcription factor and downregulation of Bcl-2. *Cell Death Differ.*, v.7, n.8, p.747-53, Aug, 2000.
- RABINOVICH, G. A. et al. Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology*, v.97, n.1, p.100-6, May, 1999c.
- RABINOVICH, G. A. et al. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol.*, v.23, n.6, p.313-20, Jun, 2002.
- RABINOVICH, G. A. et al. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J. Exp. Med.*, v.190, n.3, p.385-98, Aug 2, 1999b.
- RABINOVICH, G. A. et al. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu. Rev. Immunol.*, v.25, p.267-96, 2007b.
- RABINOVICH, G. A. et al. Specific inhibition of lymphocyte proliferation and induction of apoptosis by CLL-I, a beta-galactoside-binding lectin. *J. Biochem. (Tokyo)*, v.122, n.2, p.365-73, Aug, 1997.

- RABINOVICH, G. A. et al. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v.17, n.5, p.513-20, Oct, 2007a.
- RASCHKE, W. C. et al. Oncogenic transformation of murine lymphoid cells by in vitro infection with Abelson leukemia virus. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.54, n.5, p.1249-53, May, 1975.
- RAZ, A. et al. Transformation-related changes in the expression of endogenous cell lectins. *Int. J. Cancer*, v.39, n.3, p.353-60, Mar 15, 1987.
- REBBAA, A. et al. The role of histone acetylation versus DNA damage in drug-induced senescence and apoptosis. *Cell Death Differ.*, v.13, n.11, p.1960-7, Nov, 2006.
- REBOLLO, A.; MARTINEZ, A. C. Ras proteins: recent advances and new functions. *Blood*, v.94, n.9, p.2971-80, Nov 1, 1999.
- REDAELLI, S. et al. Activity of Bosutinib, Dasatinib, and Nilotinib Against 18 Imatinib-Resistant BCR/ABL Mutants. *J. Clin. Oncol.*, Dec 15, 2008.
- REUTHER, G. W. et al. Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family. *Science*, v.266, n.5182, p.129-33, Oct 7, 1994.
- ROBLES, S. J.; ADAMI, G. R. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene*, v.16, n.9, p.1113-23, Mar 5, 1998.
- ROMAN-GOMEZ, J. et al. Repetitive DNA hypomethylation in the advanced phase of chronic myeloid leukemia. *Leuk. Res.*, v.32, n.3, p.487-90, Mar, 2008.
- RORIVE, S. et al. Galectin-1 is highly expressed in human gliomas with relevance for modulation of invasion of tumor astrocytes into the brain parenchyma. *Glia*, v.33, n.3, p.241-55, Mar 1, 2001.
- ROSENBERG, N. et al. In vitro transformation of lymphoid cells by Abelson murine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v.72, n.5, p.1932-6, May, 1975.
- ROWLEY, J. D. Chromosomal patterns in myelocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, v.289, n.4, p.220-1, Jul 26, 1973.
- RUBINSTEIN, N. et al. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell*, v.5, n.3, p.241-51, Mar, 2004.
- RUTZ, S.; SCHEFFOLD, A. Towards in vivo application of RNA interference - new toys, old problems. *Arthritis Res. Ther.*, v.6, n.2, p.78-85, 2004.
- SABHERWAL, Y. et al. Integrin alpha2beta1 mediates the anti-angiogenic and anti-tumor activities of angiocidin, a novel tumor-associated protein. *Exp. Cell Res.*, v.312, n.13, p.2443-53, Aug 1, 2006.
- SACCHETTINI, J. C. et al. Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction. *Biochemistry*, v.40, n.10, p.3009-15, Mar 13, 2001.
- SAGE, J. et al. Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization. *Genes Dev.*, v.14, n.23, p.3037-50, Dec 1, 2000.
- SALGIA, R. et al. Increased tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins in myeloid cell lines expressing p210BCR/ABL. *Oncogene*, v.11, n.6, p.1149-55, Sep 21, 1995.

SALVATORE, P. et al. Galectin-1 gene expression and methylation state in human T leukemia cell lines. *Int. J. Oncol.*, v.17, n.5, p.1015-8, Nov, 2000.

SALVATORE, P. et al. Characterization and functional dissection of the galectin-1 gene promoter. *FEBS Lett.*, v.373, n.2, p.159-63, Oct 9, 1995.

SAMBROOK, J. et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Date. 1989

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Calcium-phosphate-mediated Transfection of Eukaryotic Cells with Plasmid DNAs. 2006: pdb.prot3871- p. 2006.

SANCHEZ-GARCIA, I.; GRUTZ, G. Tumorigenic activity of the BCR-ABL oncogenes is mediated by BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, v.92, n.12, p.5287-91, Jun 6, 1995.

SANJUAN, X. et al. Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression. *Gastroenterology.*, v.113, n.6, p.1906-15, Dec, 1997.

SANTUCCI, L. et al. Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology.*, v.31, n.2, p.399-406, Feb, 2000.

SATO, S.; HUGHES, R. C. Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages. *J. Biol. Chem.*, v.269, n.6, p.4424-30, Feb 11, 1994.

SATTLER, M.; SALGIA, R. Activation of hematopoietic growth factor signal transduction pathways by the human oncogene BCR/ABL. *Cytokine Growth Factor Rev.*, v.8, n.1, p.63-79, Mar, 1997.

SATTLER, M. et al. SHIP1, an SH2 domain containing polyinositol-5-phosphatase, regulates migration through two critical tyrosine residues and forms a novel signaling complex with DOK1 and CRKL. *J. Biol. Chem.*, v.276, n.4, p.2451-8, Jan 26, 2001.

SAVAGE, D. G. et al. Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *Br. J. Haematol.*, v.96, n.1, p.111-6, Jan, 1997.

SAWYERS, C. L. Chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, v.340, n.17, p.1330-40, Apr 29, 1999.

SAWYERS, C. L. et al. Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes. *Cell.*, v.70, n.6, p.901-10, Sep 18, 1992.

SAWYERS, C. L. et al. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood.*, v.99, n.10, p.3530-9, May 15, 2002.

SAWYERS, C. L. et al. Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene. *J. Exp. Med.*, v.181, n.1, p.307-13, Jan 1, 1995.

SCHER, C. D.; SIEGLER, R. Direct transformation of 3T3 cells by Abelson murine leukaemia virus. *Nature.*, v.253, n.5494, p.729-31, Feb 27, 1975.

SCHINDLER, T. et al. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science.*, v.289, n.5486, p.1938-42, Sep 15, 2000.

SCOTT, K.; WEINBERG, C. Galectin-1: a bifunctional regulator of cellular proliferation. *Glycoconj. J.*, v.19, n.7-9, p.467-77, 2004.

SEELLENMEYER, C. et al. Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 and galectin-1 does not require shedding of plasma membrane-derived vesicles. *FEBS Lett.*, v.582, n.9, p.1362-8, Apr 16, 2008.

SEELLENMEYER, C. et al. Cell surface counter receptors are essential components of the unconventional export machinery of galectin-1. *J. Cell Biol.*, v.171, n.2, p.373-81, Oct 24, 2005.

SEETHARAMAN, J. et al. X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-A resolution. *J. Biol. Chem.*, v.273, n.21, p.13047-52, May 22, 1998.

SERRANO, M. et al. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.*, v.88, n.5, p.593-602, Mar 7, 1997.

SEXL, V. et al. Stat5a/b contribute to interleukin 7-induced B-cell precursor expansion, but abl- and bcr/abl-induced transformation are independent of stat5. *Blood.*, v.96, n.6, p.2277-83, Sep 15, 2000.

SHAH, N. P. et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell.*, v.2, n.2, p.117-25, Aug, 2002.

SHAH, N. P. et al. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science.*, v.305, n.5682, p.399-401, Jul 16, 2004.

SHALOM-FEUERSTEIN, R. et al. K-ras nanoclustering is subverted by overexpression of the scaffold protein galectin-3. *Cancer Res.*, v.68, n.16, p.6608-16, Aug 15, 2008.

SHERR, C. J. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev.*, v.12, n.19, p.2984-91, Oct 1, 1998.

SHERR, C. J. Principles of tumor suppression. *Cell.*, v.116, n.2, p.235-46, Jan 23, 2004.

SHERR, C. J.; MCCORMICK, F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell.*, v.2, n.2, p.103-12, Aug, 2002.

SHI, Y. et al. Abl-interactor-1, a novel SH3 protein binding to the carboxy-terminal portion of the Abl protein, suppresses v-abl transforming activity. *Genes Dev.*, v.9, n.21, p.2583-97, Nov 1, 1995.

SIRARD, C. et al. Expression of bcr-abl abrogates factor-dependent growth of human hematopoietic M07E cells by an autocrine mechanism. *Blood.*, v.83, n.6, p.1575-85, Mar 15, 1994.

SKORSKI, T. et al. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *Embo J.*, v.16, n.20, p.6151-61, Oct 15, 1997.

SKORSKI, T. et al. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood.*, v.86, n.2, p.726-36, Jul 15, 1995.

SKRINCOSKY, D. M. et al. Galaptin-mediated adhesion of human ovarian carcinoma A121 cells and detection of cellular galaptin-binding glycoproteins. *Cancer Res.*, v.53, n.11, p.2667-75, Jun 1, 1993.

SMITH, K. M. et al. Autoinhibition of Bcr-Abl through its SH3 domain. *Mol. Cell.*, v.12, n.1, p.27-37, Jul, 2003.

SMYTH, M. J. et al. Cutting edge: granzymes A and B are not essential for perforin-mediated tumor rejection. *J. Immunol.*, v.171, n.2, p.515-8, Jul 15, 2003b.

SOGN, J. A. Tumor immunology: the glass is half full. *Immunity*, v.9, n.6, p.757-63, Dec, 1998.

SOKAL, J. E. et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood*, v.63, n.4, p.789-99, Apr, 1984.

SPECK, B. et al. Allogeneic bone-marrow transplantation for chronic myelogenous leukaemia. *Lancet*, v.1, n.8378, p.665-8, Mar 24, 1984.

STILLMAN, B. N. et al. Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. *J. Immunol.*, v.176, n.2, p.778-89, Jan 15, 2006.

TABRIZI, S. J. et al. T cell leukemia/lymphoma 1 and galectin-1 regulate survival/cell death pathways in human naive and IgM⁺ memory B cells through altering balances in Bcl-2 family proteins. *J. Immunol.*, v.182, n.3, p.1490-9, Feb 1, 2009.

TAKEDA, K. et al. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J. Exp. Med.*, v.195, n.2, p.161-9, Jan 21, 2002.

TAKEDA, N. et al. The BCR-ABL oncoprotein potentially interacts with the xeroderma pigmentosum group B protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v.96, n.1, p.203-7, Jan 5, 1999.

TAKENAKA, Y. et al. Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. *Mol. Cell Biol.*, v.24, n.10, p.4395-406, May, 2004.

TAKENAKA, Y. et al. Malignant transformation of thyroid follicular cells by galectin-3. *Cancer Lett.*, v.195, n.1, p.111-9, May 30, 2003.

TALPAZ, M. et al. Leukocyte interferon-induced myeloid cytoreduction in chronic myelogenous leukemia. *Blood*, v.62, n.3, p.689-92, Sep, 1983.

TALPAZ, M. 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, n.6, p.1928-37, Mar 15, 2002.

TAO, W. J. et al. BCR-ABL oncogenic transformation of NIH 3T3 fibroblasts requires the IL-3 receptor. *Oncogene*, v.27, n.22, p.3194-200, May 15, 2008.

TEJLER, J. et al. Synthesis of multivalent lactose derivatives by 1,3-dipolar cycloadditions: selective galectin-1 inhibition. *Carbohydr. Res.*, v.341, n.10, p.1353-62, Jul 24, 2006.

THIJSEN, V. L. et al. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v.103, n.43, p.15975-80, Oct 24, 2006.

THOMAS, J. et al. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood*, v.104, n.12, p.3739-45, Dec 1, 2004.

TINARI, N. et al. Glycoprotein 90K/MAC-2BP interacts with galectin-1 and mediates galectin-1-induced cell aggregation. *Int. J. Cancer*, v.91, n.2, p.167-72, Jan 15, 2001.

TOSCANO, M. A. et al. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat. Immunol.*, v.8, n.8, p.825-34, Aug, 2007.

TOSCANO, M. A. et al. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *J. Immunol.*, v.176, n.10, p.6323-32, May 15, 2006.

TRAINA, F. et al. BCR-ABL binds to IRS-1 and IRS-1 phosphorylation is inhibited by imatinib in K562 cells. *FEBS Lett.*, v.535, n.1-3, p.17-22, Jan 30, 2003.

TSIFTSOGLU, A. S. et al. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacol. Ther.*, v.100, n.3, p.257-90, Dec, 2003.

ULKU, A. S.; DER, C. J. Ras signaling, deregulation of gene expression and oncogenesis. *Cancer Treat. Res.*, v.115, p.189-208, 2003.

VAN DEN BRULE, F. et al. Galectin-1 accumulation in the ovary carcinoma peritumoral stroma is induced by ovary carcinoma cells and affects both cancer cell proliferation and adhesion to laminin-1 and fibronectin. *Lab. Invest.*, v.83, n.3, p.377-86, Mar, 2003.

VAN DEN BRULE, F. A. et al. Galectin-1 modulates human melanoma cell adhesion to laminin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.209, n.2, p.760-7, Apr 17, 1995.

VAN DER LEIJ, J. et al. Strongly enhanced IL-10 production using stable galectin-1 homodimers. *Mol. Immunol.*, v.44, n.4, p.506-13, Jan, 2007.

VAN ETEN, R. A. Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol.*, v.9, n.5, p.179-86, May, 1999.

VAN ETEN, R. A. et al. The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell.*, v.58, n.4, p.669-78, Aug 25, 1989.

VARDIMAN, J. W. et al. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood.*, v.100, n.7, p.2292-302, Oct 1, 2002.

VARTICOVSKI, L. et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cells expressing abl oncogene variants. *Mol. Cell Biol.*, v.11, n.2, p.1107-13, Feb, 1991.

VAS, V. et al. Biphasic effect of recombinant galectin-1 on the growth and death of early hematopoietic cells. *Stem Cells.*, v.23, n.2, p.279-87, Feb, 2005.

VAZ DE CAMPOS, M. G. et al. Clinical implications of der(9q) deletions detected through dual-fusion fluorescence in situ hybridization in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v.178, n.1, p.49-56, Oct 1, 2007.

VAZIRI, H.; BENCHIMOL, S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr. Biol.*, v.8, n.5, p.279-82, Feb 26, 1998.

VERFAILLIE, C. M. Direct contact between human primitive hematopoietic progenitors and bone marrow stroma is not required for long-term in vitro hematopoiesis. *Blood.*, v.79, n.11, p.2821-6, Jun 1, 1992.

VERMA, D. S. et al. Human leukocyte interferon preparation blocks granulopoietic differentiation. *Blood.*, v.54, n.6, p.1423-7, Dec, 1979.

VESPA, G. N. et al. Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation. *J. Immunol.*, v.162, n.2, p.799-806, Jan 15, 1999.

- VIGNERI, P.; WANG, J. Y. Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat. Med.*, v.7, n.2, p.228-34, Feb, 2001.
- VONCKEN, J. W. et al. Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants. *Cell.*, v.80, n.5, p.719-28, Mar 10, 1995.
- WANG, J. Y. Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene.*, v.19, n.49, p.5643-50, Nov 20, 2000.
- WANG, Z. et al. Disruption of the inhibitor of apoptosis protein survivin sensitizes Bcr-abl-positive cells to STI571-induced apoptosis. *Cancer Res.*, v.65, n.18, p.8224-32, Sep 15, 2005.
- WATARI, K. et al. Identification of a melanoma antigen, PRAME, as a BCR/ABL-inducible gene. *FEBS Lett.*, v.466, n.2-3, p.367-71, Jan 28, 2000.
- WEN, S. T.; VAN ETTEN, R. A. The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity. *Genes Dev.*, v.11, n.19, p.2456-67, Oct 1, 1997.
- WERTHEIM, J. A. et al. BCR-ABL-induced adhesion defects are tyrosine kinase-independent. *Blood.*, v.99, n.11, p.4122-30, Jun 1, 2002.
- WHITE, D. L. et al. Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. *Blood.*, v.110, n.12, p.4064-72, Dec 1, 2007.
- WOOD, K. W. et al. ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. *Cell.*, v.68, n.6, p.1041-50, Mar 20, 1992.
- WOODRING, P. J. et al. Regulation of F-actin-dependent processes by the Abl family of tyrosine kinases. *J Cell Sci.*, v.116, n.Pt 13, p.2613-26, Jul 1, 2003.
- WU, J.; LANIER, L. L. Natural killer cells and cancer. *Adv. Cancer Res.*, v.90, p.127-56, 2003.
- WYLLIE, A. H. et al. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, v.68, p.251-306, 1980.
- XIE, S. et al. Jak2 is involved in c-Myc induction by Bcr-Abl. *Oncogene.*, v.21, n.47, p.7137-46, Oct 17, 2002.
- XU, X. C. et al. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am. J. Pathol.*, v.147, n.3, p.815-22, Sep, 1995.
- XUE, W. et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature.*, v.445, n.7128, p.656-60, Feb 8, 2007.
- YAMAOKA, K. et al. Expression of galectin-1 mRNA correlates with the malignant potential of human gliomas and expression of antisense galectin-1 inhibits the growth of 9 glioma cells. *J Neurosci. Res.*, v.59, n.6, p.722-30, Mar 15, 2000..
- YANG, R. Y. et al. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, v.93, n.13, p.6737-42, Jun 25, 1996.
- YANG, R. Y. et al. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert. Rev. Mol. Med.*, v.10, p.e17, 2008.

- YOSHIDA, K. Nuclear trafficking of pro-apoptotic kinases in response to DNA damage. *Trends Mol Med*, v.14, n.7, p.305-13, Jul, 2008.
- YOSHII, T. et al. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.*, v.277, n.9, p.6852-7, Mar 1, 2002.
- YOSHII, T. et al. Galectin-3 maintains the transformed phenotype of thyroid papillary carcinoma cells. *Int. J. Oncol.*, v.18, n.4, p.787-92, Apr, 2001.
- YU, F. et al. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J. Biol. Chem.*, v.277, n.18, p.15819-27, May 3, 2002.
- ZERMATI, Y. et al. Effect of tyrosine kinase inhibitor STI571 on the kinase activity of wild-type and various mutated c-kit receptors found in mast cell neoplasms. *Oncogene*, v.22, n.5, p.660-4, Feb 6, 2003.
- ZHOU, Q.; CUMMINGS, R. D. L-14 lectin recognition of laminin and its promotion of in vitro cell adhesion. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.300, n.1, p.6-17, Jan, 1993.
- ZHU, J. et al. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev.*, v.12, n.19, p.2997-3007, Oct 1, 1998.

Anexos

Anexo A

“Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas”

Anexo B

**“Regulation of Galectin-1 by BCR-ABL and the consequences
for cellular malignancy”**

Anexo C

“Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis”

Um dos mecanismos executores importante na resposta imune antitumoral e antiviral é a citotoxicidade celular mediada pelas células NK (“Natural Killer”) e pelos linfócitos T CD8⁺, também chamados linfócitos citotóxicos ou simplesmente CTL (“cytotoxic T lymphocyte”) (OCHSENBEIN, 2002; ADAM *et al.*, 2003), embora linfócitos T CD4⁺ também possam exercer atividade citotóxica em algumas circunstâncias (PORAKISHVILI *et al.*, 2004). Enquanto as células NK participam, sobretudo, da resposta imune inata, as CTLs atuam durante a resposta imune adaptativa (WU e LANIER, 2003; PAPAMICHAIL *et al.*, 2004).

As moléculas envolvidas na interação entre NK ou CTL com os seus alvos são, a grosso modo, conhecidas. Porém, ainda estamos longe de compreender completamente os sinais bioquímicos que regulam a ativação, diferenciação e viabilidade destas células, bem como os eventos moleculares que participam da sua função citotóxica e imunomoduladora (ARANCIA *et al.*, 1990; GRIFFITHS e ARGON, 1995).

A morte celular induzida pelas células citotóxicas pode ser iniciada por dois mecanismos distintos (KAGI *et al.*, 1994; HENKART, 1994a; HENKART e SITKOVSKY, 1994b). O principal mecanismo é a exocitose de grânulos citotóxicos contendo, entre outros mediadores, perforina e granzimas. Além disto, linfócitos T citotóxicos e células NK também podem iniciar o programa apoptótico nas células alvo através da interação de receptores de morte e seus ligantes, tais como Fas/FasL (CALDWELL *et al.*, 2003; CHAKRABORTY *et al.*, 2003), TRAIL/TRAILR (TAKEDA *et al.*, 2002) e TNF- α /TNFR (KAFROUNI *et al.*, 2003).

Embora diversos estudos tenham estabelecido o papel fundamental da perforina, das granzimas A e B e da interação com os receptores de morte na citotoxicidade celular, trabalhos recentes têm fomentado a idéia de que nenhuma destas moléculas é essencial para a resposta imune citotóxica. Por exemplo, a rejeição de tumores em certos modelos murinos

independe da expressão de perforina ou de FasL pelas CTLs (LEE *et al.*, 2004). Em adição, embora CTL e NK provenientes de camundongos deficientes em granzima A, B ou ambas, apresentem alterações em sua capacidade de induzir apoptose em células alvo *in vitro*, estes animais ainda são capazes de eliminar tumores *in vivo* sugerindo, portanto, o envolvimento de outras vias ou moléculas nesta citotoxicidade (DAVIS *et al.*, 2001; SMYTH *et al.*, 2003b). Apesar do grande número de trabalhos na área de resposta imune contra tumores, não existem estudos envolvendo resposta imune contra células tumorais senescentes, ou contra células senescentes, em geral.

A senescência celular é definida como um programa fisiológico de parada do ciclo celular que limita a longevidade das células prevenindo desta forma uma proliferação ilimitada. Hayflick e Moorhead postularam, em 1961 (HAYFLICK e MOORHEAD, 1961), que todo tipo de célula normal tem um potencial intrínseco limitado de proliferação, ou senescência replicativa (SR). As células senescentes não são mais capazes de se dividir, no entanto permanecem metabolicamente ativas. Além disso, as células sofrem alterações morfológicas: a célula fica maior, mais achatada e apresenta um grande número de lisossomos com alta atividade proteolítica (CAMPISI, 2000).

Este fenômeno biológico pode ser desencadeado por diferentes fatores sendo que muitos deles são estímulos oncogênicos. Por esse motivo é muito provável que a senescência seja um mecanismo de segurança para prevenir a proliferação de células potencialmente tumorais, ou seja, atua como um mecanismo supressor de tumor.

A senescência replicativa foi inicialmente observada em culturas de fibroblastos humanos (HAYFLICK e MOORHEAD, 1961). Mais tarde, outros estudos indicaram que a SR em alguns casos está relacionada ao encurtamento dos telômeros, estruturas terminais que protegem os cromossomos lineares (BODNAR *et al.*, 1998; VAZIRI e BENCHIMOL, 1998). Existem outros fatores que induzem a senescência, por exemplo, danos no DNA (CHEN *et al.*, 1995; ROBLES e ADAMI, 1998), inibidores de histona desacetilases que atuam no remodelamento da cromatina (OGRYZKO *et al.*, 1996; LAGGER *et al.*, 2003; REBBAA *et al.*, 2006) e oncogenes (SERRANO *et al.*, 1997; ZHU *et al.*, 1998; DIMRI *et al.*, 2000; LOWE *et al.*, 2004). A primeira evidência de que a sinalização oncogênica levaria também a uma parada irreversível no ciclo celular surgiu de um estudo *in vitro* (SERRANO *et al.*, 1997). Neste caso, seria fácil esperar que esta correlação *in vivo* pudesse ser um mecanismo

de segurança para prevenir a proliferação de células potencialmente tumorais, ou seja, atuando como um mecanismo supressor de tumor (CAMPISI, 2001; BENNETT, 2003; LOWE *et al.*, 2004). Entre os oncogenes que ativam o processo de senescência estão: a proteína p16^{INK4A} (inibidor de kinase dependente de ciclina (MCCONNELL *et al.*, 1998) (LOWE e SHERR, 2003), p14/ARF (“alternative reading frame”) (regulador de MDM2) (KAMIJO *et al.*, 1999; DIMRI *et al.*, 2000), p53 (HARVEY e LEVINE, 1991; SHERR, 1998; SHERR e MCCORMICK, 2002) e RB (retinoblastoma tumor-suppressor gene) (DANNENBERG *et al.*, 2000; SAGE *et al.*, 2000; SHERR e MCCORMICK, 2002).

A proteína p53 é um importante gene supressor de tumor que restringe a proliferação celular em resposta a danos no DNA ou desregulação de oncogenes mitóticos induzindo a parada em diversos pontos de checagem do ciclo celular, apoptose ou senescência (SHERR, 2004) (HARRIS e LEVINE, 2005). Em 2007, Xue e *cols.* mostraram, em um modelo de hepatocarcinoma murino, que a reativação de p53 por meio de RNA de interferência (RNAi) condicional, promoveu regressão completa do tumor e que isto não era devido a apoptose. Os autores observaram que houve, nesse caso, a indução de senescência associada a superexpressão de citocinas inflamatórias (XUE *et al.*, 2007). Além disso, foi observado um atraso nesta regressão quando os camundongos foram depletados de alguns componentes do sistema imune como células NK, macrófagos e eosinófilos. Assim, esse trabalho mostrou um novo mecanismo de supressão tumoral no qual o programa de senescência coopera com o sistema imune inato. Dados preliminares obtidos durante o meu estágio de 2 meses nesse laboratório sugerem que as células que entram em senescência mediada pelo estímulo oncogênico de RAS tornam-se mais sensíveis ao ataque citotóxico de células NK.

Nesse sentido, o objetivo do trabalho realizado durante o doutorado “sanduíche” foi o de investigar o mecanismo pelo qual as células senescentes se tornam sensíveis ao ataque citotóxico de células NK e verificar se este efeito é um fenômeno geral que ocorre na senescência induzida pelos diferentes estímulos ou se é particular à senescência induzida por oncogenes.

Os resultados, discussão e conclusões desta parte da tese estão apresentados, neste anexo, sob a forma de artigo uma vez que este foi publicado, em 2008, na revista “CELL”

Anexo D

**“Implications of Cellular Senescence in Tissue Damage Response,
Tumor Suppression, and Stem Cell Biology”**

Anexo E

Carta de Avaliação do Dr. Scott Lowe

June 13, 2008

Dear Sir or Madam:

This is to serve as a formal letter of evaluation of Monica Yon, who was a visiting graduate student in my laboratory. Monica is currently a graduate student with Dr. Gustavo Amarante-Mendes at the University of San Paolo. She worked in my laboratory from July 1, 2007 through December 31, 2007.

Monica came to my lab as a visiting student to learn RNAi technology to support her research project -the idea was for her to develop stable RNAi tools to probe the biology of NK cell mediated apoptosis. During the course of her stay, she not only accomplished her goals but also made essential contributions to my laboratory's research. She was an outstanding student, and I was very pleased to have her in my group.

My laboratory is interested in the role of apoptosis and cellular senescence in tumor suppression; particularly, how these processes work to limit tumorigenesis and mediate cellular responses to conventional and molecularly targeted therapies. About two years ago, my laboratory discovered that tumor cells triggered to undergo senescence (a cytostatic program) – could be cleared from tissue as a result of attack by components of the innate immune system. The results suggest that senescence could activate a novel form of immune surveillance premalignant or cancer cells.

Although senescence has recently been established as a potent mechanism of tumor suppression, its role in other pathologies has not been functionally examined. When Monica joined my group, she began to work with Valery Krizhanovsky, a postdoctoral fellow in my laboratory, who had noted that senescent cells accumulate in murine livers treated to produce fibrosis, a precursor pathology to cirrhosis. Valery showed that the senescent cells are derived primarily from activated hepatic stellate cells, which initially proliferate in response to liver damage and produce much of the extracellular matrix deposited in the fibrotic scar. In mice lacking p53, a key senescence regulator, stellate cells continue to proliferate, leading to excessive liver fibrosis.

Owing in part to her expertise in immunology, Monica was able to work with Valery to demonstrate that senescent activated stellate cells are targets for natural killer cells; indeed, in a remarkably result, Monica showed that natural killer cells preferentially kill senescent activated stellate cells in vitro and are required to efficiently eliminate these cells in vivo, thereby facilitating the resolution of fibrosis. Together these findings indicate that the senescence program limits the fibrogenic response to acute tissue damage. The paper describing these results was recently accepted at *Cell*, with Monica listed as second author. This was well deserved, as Monica brought expertise to my laboratory that we did not have and her results were absolutely essential to the study's success. She also has produced data on the mechanisms of NK mediated killing of senescent cells which will contribute to subsequent papers from my group.

During the course of her stay in my laboratory, Monica performed extremely well, and functioned as successfully as other graduate students in my group. She was always knowledgeable about the current literature, and proved to be a careful scientist that accepted criticism and was constantly trying to improve. I was impressed by Monica's technical skills, and her ability to perform well-controlled experiments. Monica was always a diligent worker, and often came into the laboratory in the evenings or on weekends to keep her experiments moving. Her presentations were always thoughtful and informative. I found her to be a wonderful person and great colleague, and was extremely pleased to have her in my laboratory. She did an outstanding job.

Please let me know if you have additional questions.

Sincerely,



Scott W. Lowe, Ph.D.
Investigator, HHMI
Deputy Director, CSHL Cancer Center

Anexo F

Tabela S1. Características clínicas e índice de Sokal dos pacientes com LMC.

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Fase da LMC	Ph	Sokal (RR)
1	36	M	Crônica	95%	B (0.65)
2	68	F	Crônica	100%	A (1.13)
3	57	M	Crônica	100%	I (0.82)
4-1	47	M	Crônica	100%	B (0.77)
5	62	M	Crônica	100%	I (0.92)
6	63	M	Crônica	100%	A (1.77)
7	39	M	Crônica	100%	I (1.03)
8	60	M	Crônica	100%	I (1.21)
9	52	F	Crônica	100%	A (1.33)
10	62	M	Crônica	100%	I (1.10)
11	46	M	Crônica	100%	B (0.60)
12	48	M	Crônica	100%	I (0.81)
13	19	M	Crônica	100%	B (0.63)
14	33	F	Crônica	85%	I (1.25)
15	37	F	Crônica	95%	I (0.97)
16	38	M	Crônica	95%	B (0.74)
17-1	45	M	Crônica	100%	I (1.29)
18	28	F	Crônica	80%	B (0.64)
19	52	F	Crônica	100%	A (3.54)
20	55	M	Crônica	100%	B (0.73)
21	48	M	Crônica	100%	A (1.64)
22	65	M	Crônica	100%	B (0.75)
23	65	M	Crônica	100%	I (0.90)
24	21	F	Crônica	100%	I (1.23)
25	42	F	Crônica	100%	B (0.77)
26	46	M	Crônica	100%	I (0.94)
27	62	F	Acelerada	100%	I (0.83)
28	73	F	Acelerada	100%	I (0.97)
29	22	M	Acelerada	100%	I (0.80)
30	19	F	Acelerada	100%	B (0.69)
31	65	M	Acelerada	100%	I (1.06)
32	31	M	Acelerada	100%	B (0.78)
33	57	F	Acelerada	100%	I (0.80)
34	67	F	Acelerada	100%	I (1.25)
35	35	F	Acelerada	100%	I (1.15)

36	55	M	Acelerada	100%	I (1.23)
37-1	23	M	Acelerada	100%	A (13.93)
38	70	F	Acelerada	100%	I (1.13)
39	32	M	LMA-Blástica	100%	B (0.63)
40-1	77	F	LMA-Blástica	100%	I (1.23)
41	30	M	LMA-Blástica	100%	B (0.56)
42	16	M	LLA-Blástica	100%	I (0.92)
43	54	F	LMA-Blástica	100%	A (2.13)
44-1	39	F	LMA-Blástica	100%	A (2.67)
37-2	23	M	LMA-Blástica	100%	A (13.93)
45	67	F	LMA-Blástica	100%	I (1.08)
4-2	47	M	RCC	Negativo	B (0.77)
46	29	F	RCC	Negativo	I (2.03)
47	75	F	RCC	Negativo	I (1.15)
48	67	M	RCC	Negativo	I (1.52)
49	34	F	RCC	Negativo	I (1.05)
50	37	M	RCC	Negativo	I (1.28)
51	22	F	RCC	Negativo	I (0.87)
17-2	45	M	RCC	Negativo	I (1.29)
52	23	F	RCC	Negativo	B (0.61)
53	33	M	RCC	Negativo	I (0.83)
54	57	M	RCC	Negativo	A (1.91)
40-2	77	F	R-MI	100%	I (1.23)
55	23	F	R-MI	100%	B (0.67)
56	40	M	R-MI	100%	B (0.75)
57	50	F	R-MI	100%	A (1.98)
44-2	39	F	R-MI	100%	A (2.67)
58	39	M	R-MI	100%	I (0.80)

F: feminino; M: masculino; LMA: leucemia mielóide aguda; LLA: leucemia aguda linfocítica; RCC: remissão citogenética completa; R-MI: resistente ao mesilato de imatinibe; RR: risco relativo; B:baixo risco; I: risco intermediários; A: alto risco; Ph: Porcentagem de metáfases com cromossomo Philadelphia (Cariótipo).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)