



PATRÍCIA DE SANTANA FONSECA RIBEIRO RODRIGUES
Licenciada em Bioquímica

NOVAS ESTRATÉGIAS PARA COMBATER A RESISTÊNCIA A MÚLTIPLOS FÁRMACOS NA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

MESTRADO EM GENÉTICA MOLECULAR E BIOMEDICINA

Universidade NOVA de Lisboa
Novembro, 2021

NOVAS ESTRATÉGIAS PARA COMBATER A RESISTÊNCIA A MÚLTIPLOS FÁRMACOS NA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

PATRÍCIA DE SANTANA FONSECA RIBEIRO RODRIGUES

Licenciada em Bioquímica

Orientadora: Professora Doutora Maria Alexandra Nuncio de Carvalho
Ramos Fernandes
Professora Auxiliar, Universidade NOVA de Lisboa

Co-orientador: Professor Doutor Pedro Miguel Ribeiro Viana Baptista
Professor Catedrático, Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Professora Doutora Margarida Casal Ribeiro Castro Caldas Braga
Arguente: Professor Doutor Pedro Manuel Brôa Costa
Vogal: Professora Doutora Maria Alexandra Nuncio de Carvalho Ramos
Fernandes

MESTRADO EM GENÉTICA MOLECULAR E BIOMEDICINA

Universidade NOVA de Lisboa
Novembro, 2021

Novas estratégias para combater a resistência a múltiplos fármacos na leucemia mieloide crónica

Copyright © Patrícia de Santana Fonseca Ribeiro Rodrigues, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação foi um gratificante processo de aprendizagem, que não teria sido possível sem a ajuda direta ou indireta de certas pessoas às quais gostaria de expressar um especial agradecimento.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus orientadores, Professora Alexandra Fernandes e Professor Pedro Baptista, a oportunidade de me terem concedido a realização deste projeto. Muito obrigada aos dois pela confiança que depositaram em mim; pelo apoio prestado; pela liberdade e ao mesmo tempo pela exigência; pela partilha de conhecimento, as opiniões e as críticas que contribuíram e muito para o meu crescimento académico e pessoal. Sinto que cresci muito ao longo deste ano! Muito obrigada!

À Dra. Catarina Roma-Rodrigues, pelo auxílio que me deu na parte experimental, pela disponibilidade que sempre demonstrou para esclarecer as minhas dúvidas, e por todo o conhecimento transmitido ao longo deste ano.

Um agradecimento especial à Daniela, Margarida, Beatriz Oliveira e Sandra pelos ensinamentos e pelo tempo que dispensaram para ficar comigo até mais tarde no laboratório de modo a puder terminar os meus ensaios. Sem vocês teria sido muito mais complicado!

Ao Bilal, por ter-se demonstrado sempre pronto para me ajudar. Muito obrigada!

Aos meus colegas de laboratório do 319 e 315, António, Beatriz Costa, Rúben e André, pela boa disposição e entreajuda. Foi um ano exigente, mas conseguimos superar os desafios!

Não poderia deixar de escrever um especial agradecimento ao António e à Beatriz Costa, por terem sido uma ajuda preciosa ao longo deste ano. Ao António, obrigada pela tua amizade que já vinha de trás, mas que ficou mais forte ao longo deste ano. Obrigada pelos bons momentos que passámos, pela paciência, pelo apoio e pela entreajuda que sempre tivemos! Juntos tornámos este caminho muito mais fácil! À Beatriz Costa, pela companhia e pelo apoio constante de parte a parte! Foste uma alegre surpresa!

À minha mãe e ao meu pai, que sempre primaram pela minha educação, obrigada por me terem tornado aquilo que sou hoje, pelo apoio, força e incentivo incondicionais.

Ao meu irmão Bernardo, pelo companheirismo e amizade.

À minha avó, por acreditar sempre em mim, ainda mais do que eu acredito.

A todos os meus amigos e amigas, pelos momentos, pelas gargalhadas, pelas conversas, pela partilha de sucessos e insucessos e por tantas outras coisas que tornam tudo muito mais fácil. Obrigada por estarem sempre presentes.

A todos, um sincero obrigada!

Este trabalho foi financiado por fundos nacionais da FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito do projeto UIDP/04378/2020 e UIDB/04378/2020 da Unidade de Investigação em Biociências Moleculares Aplicadas - UCIBIO e o projeto LA/P/0140/2020 do Instituto Associado de Saúde e Bioeconomia - i4HB.

“The important thing is to never stop questioning.”

Albert Einstein

RESUMO

Os inibidores de tirosina quinase têm demonstrado excelentes resultados no tratamento da maioria dos doentes com leucemia mieloide crónica (LMC). Contudo, cerca de 20 a 30% dos doentes acabam por desenvolver resistência ao tratamento ao longo do tempo. A sobre-expressão da glicoproteína-P (P-gp), um transportador capaz de expulsar uma variedade de fármacos, incluindo o imatinib (IM), através da membrana celular, é considerado um dos mecanismos predominantes no fenótipo de quimiorresistência em diversas neoplasias como é o caso da LMC.

Nesse sentido, este projeto teve como principal objetivo aumentar a sensibilidade de células LMC resistentes através da combinação de um inibidor de tirosina quinase tradicional com a nanovetorização de oligonucleotídeos *antisense* (ASOs, do inglês *antisense oligonucleotides*) que visam o silenciamento génico de *MDR1*. Para isso, desenhou-se uma sequência de ssDNA complementar ao mRNA de *MDR1* e procedeu-se à funcionalização e caracterização dos nanoconjugados para silenciamento génico. Posteriormente, avaliou-se a expressão de *MDR1* e de P-gp em células LMC resistentes a IM (K562-IM) incubadas na presença dos nanoconjugados por RT-qPCR e *Western Blot* respetivamente. Por fim, a viabilidade celular após exposição aos nanoconjugados em combinação com IM foi avaliada através do ensaio padrão 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS).

Utilizando nanopartículas de ouro funcionalizadas com polietilenoglicol como vetores de entrega de oligonucleotídeos complementares ao mRNA de *MDR1* foi possível levar a uma redução em cerca de 45% da expressão de *MDR1* após 48 horas de incubação em células K562-IM. Adicionalmente, a redução do mRNA de *MDR1* também se repercute ao nível da diminuição da expressão de P-gp em cerca de 60%. No entanto, apesar dos efeitos demonstrados, não foi possível observar uma reversão do fenótipo de resistência das células K562-IM quando incubadas na presença dos nanoconjugados e do IM em simultâneo durante 48 horas ou desfasadamente, expondo as células primeiramente aos nanoconjugados durante 24 horas e de seguida ao IM durante mais 24 horas, perfazendo um período total de 48 horas.

Em suma, apesar da nanovetorização de ASOs ter levado ao silenciamento de *MDR1* não se conseguiu aumentar a sensibilidade das células resistentes ao IM, impossibilitando a reversão do fenótipo resistente.

Palavras-chave: Leucemia Mieloide Crónica; Resistência a múltiplos fármacos; Glicoproteína-P; Silenciamento génico; oligonucleotídeos ssDNA.

ABSTRACT

Tyrosine kinase inhibitors have shown excellent results in the treatment of most patients with chronic myeloid leukemia (CML). However, about 20 to 30% of patients end up developing resistance over time. Overexpression of P-glycoprotein (P-gp), a transporter capable of expelling a variety of drugs, including imatinib (IM), across the cell membrane, is considered one of the main mechanisms in the chemoresistance phenotype in several cancers, such as CML.

In this sense, this project aimed to increase the sensitivity of CML cells resistant by combining traditional chemotherapy with nanovectorization of antisense oligonucleotides (ASOs) targeting *MDR1* silencing. To this end, a complementary ssDNA sequence to *MDR1* mRNA was designed and the nanoconjugates were functionalized and characterized for gene silencing. Subsequently, it was evaluated the expression of *MDR1* and P-gp in CML cells resistant to IM (K562-IM) incubated in the presence of nanoconjugates by RT-qPCR and Western Blot respectively. Finally, the cell viability after exposure to the nanoconjugates in combination with IM was assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay.

Using gold nanoparticles functionalized with polyethylene glycol as delivery vectors of oligonucleotides complementary to *MDR1* mRNA, it was possible to lead to a 45% reduction of *MDR1* mRNA expression after 48 hours of exposure. Additionally, exposure to the nanoconjugates also seemed to have an effect at the protein level, decreasing its expression ($\approx 60\%$). However, it was not possible to observe a reversal of the resistance phenotype of the cells when incubated in the presence of the nanoconjugates and IM simultaneously for 48 hours or staggered by exposing the cells first to the nanoconjugates for 24 hours and then to IM for additional 24 hours.

In conclusion, although the nanovectorization of ASOs led to *MDR1* silencing, it was not possible to increase the sensitivity of IM resistant cells

Keywords: Chronic Myeloid Leukemia; Multidrug resistance; P-glycoprotein; Gene silencing; Antisense oligonucleotides.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	VII
RESUMO.....	XI
ABSTRACT	XIII
ÍNDICE.....	XV
ÍNDICE DE FIGURAS	XVII
ÍNDICE DE TABELAS	XIX
ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	XXI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.....	1
1.1.1. <i>Biologia molecular e progressão da doença</i>	1
1.1.2. <i>Tratamento</i>	4
1.1.3. <i>Resistência ao tratamento</i>	5
1.1.3.1. Resistência a múltiplos fármacos mediada pela glicoproteína-P	8
1.2. NANOMEDICINA NO CANCRO.....	10
1.2.1. <i>Nanopartículas de ouro</i>	11
1.2.1.1. Silenciamento génico com ASOs mediado por nanopartículas de ouro	12
1.2.2. <i>Desafios na translação da nanomedicina dos laboratórios de investigação para a clínica.</i> ..	12
1.3. ÂMBITO DA TESE.....	14
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1. MATERIAIS.....	17
2.2. MÉTODOS.....	21
2.2.1. <i>Nanopartículas de ouro</i>	21
2.2.1.1. Síntese.....	21
2.2.1.2. Funcionalização com polietilenoglicol	21
2.2.1.3. Funcionalização das AuNPs@PEG com o oligonucleotídeo ssDNA tiolado.....	21
2.2.1.4. Caracterização.....	22
2.2.2. <i>Cultura Celular</i>	22
2.2.2.1. Ensaio de viabilidade celular	23
2.2.2.2. Ensaio de silenciamento <i>in vitro</i>	24
2.2.3. <i>Biologia Molecular</i>	24
2.2.3.1. Isolamento do RNA total.....	24
2.2.3.2. Análise da expressão génica por RT-qPCR.....	25
2.2.3.3. Isolamento da proteína	25

2.2.3.4. <i>Western Blot</i>	26
2.2.4. <i>Análise Estatística</i>	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1. SOBREEXPRESSÃO DE GLICOPROTEÍNA-P EM CÉLULAS K562 RESISTENTES A IMATINIB.....	29
3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCONJUGADOS DE OURO PARA SILENCIAMENTO GÊNICO.....	31
3.2.1. <i>Projeção e análise da sequência ssDNA</i>	31
3.2.2. <i>Caracterização dos nanoconjugados de ouro</i>	32
3.3. SILENCIAMENTO DE <i>MDR1</i> <i>IN VITRO</i> EM CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA RESISTENTES A IMATINIB.....	35
3.3.1. <i>Otimização da reação de amplificação dos genes 18S e MDR1 por RT-qPCR</i>	35
3.3.2. <i>Os nanoconjugados de ouro são capazes de silenciar MDR1</i>	37
3.4. VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO AOS NANOCONJUGADOS DE OURO EM COMBINAÇÃO COM O IMATINIB	39
4. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	43
BIBLIOGRAFIA	45
A. APÊNDICE	57

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - VIAS DE SINALIZAÇÃO ATIVADAS PELA ONCOPROTEÍNA BCR-ABL1.....	3
FIGURA 1.2 - ESTRUTURA SIMPLIFICADA DA GLICOPROTEÍNA-P	8
FIGURA 1.3 - ESQUEMATIZAÇÃO DA HIPÓTESE DO SILENCIAMENTO DE <i>MDR1</i> <i>IN VITRO</i> COM NANOCONJUGADOS DE OURO	15
FIGURA 3.1 - SOBREEXPRESSÃO DE GLICOPROTEÍNA-P EM CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA RESISTENTES A IMATINIB	30
FIGURA 3.2 - CARACTERIZAÇÃO DAS AUNPs, AUNPs@PEG E AUNPs@PEG@MDR1 POR ESPECTROSCOPIA UV-Vis E DLS	33
FIGURA 3.3 - EXPOSIÇÃO DE CÉLULAS K562-IM A AUNPs@PEG NÃO PARECE INDUZIR CITOTOXICIDADE AO LONGO DO TEMPO	34
FIGURA 3.4 - AMPLIFICAÇÃO POR RT-QPCR DOS GENES <i>18S</i> (CONTROLO ENDÓGENO) E <i>MDR1</i> (GENE ALVO) NAS LINHAGENS CELULARES K562 E K562-IM	36
FIGURA 3.5 - SILENCIAMENTO <i>IN VITRO</i> DO GENE <i>MDR1</i> EM CÉLULAS K562-IM USANDO AUNPs@PEG@MDR1	37
FIGURA 3.6 - EXPRESSÃO DE GLICOPROTEÍNA-P EM CÉLULAS K562-IM APÓS EXPOSIÇÃO AOS NANOCONJUGADOS DURANTE 48 HORAS.....	38
FIGURA 3.7 - EXPOSIÇÃO DE CÉLULAS K562-IM AOS NANOCONJUGADOS EM COMBINAÇÃO SIMULTÂNEA COM O IMATINIB (IM) DURANTE 48 HORAS NÃO PARECE AUMENTAR A SENSIBILIDADE DAS CÉLULAS LMC RESISTENTES AO IM	39
FIGURA 3.8 - EXPOSIÇÃO DE CÉLULAS K562-IM AOS NANOCONJUGADOS DURANTE 24 HORAS SEGUIDA DA EXPOSIÇÃO AO IMATINIB (IM) DURANTE MAIS 24 HORAS NÃO PARECE AUMENTAR A SENSIBILIDADE DAS CÉLULAS LMC RESISTENTES AO IM.....	40

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1.1 - INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE APROVADOS PARA O TRATAMENTO DE DOENTES COM LMC.	6
TABELA 2.1 - LISTA DE MATERIAIS E REAGENTES.....	17
TABELA 2.2 – LISTA DE EQUIPAMENTOS	20
TABELA 2.3 - LISTA DE PRIMERS USADOS NAS REAÇÕES DE RT-QPCR.	25
TABELA 3.1 - IC ₅₀ DO IMATINIB (IM) EM CÉLULAS K562 SENSÍVEIS E CÉLULAS K562 RESISTENTES (K562-IM)	30
TABELA 3.2 - CARACTERIZAÇÃO DAS AUNPs, AUNPs@PEG E AUNPs@PEG@MDR1 POR ESPECTROSCOPIA UV-Vis E DLS.	33

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABCB1 – do inglês, *ATP-binding cassette, subfamily B, member 1*
ABL1 – do inglês, *abelson murine leukemia*
Abs – Absorvância
ASOs – do inglês, *Antisense Oligonucleotides*
AuNPs – Nanopartículas de ouro
AuNPs@PEG – Nanopartículas de ouro funcionalizadas com polietilenoglicol
AuNPs@PEG@MDR1 – Nanopartículas funcionalizadas com polietilenoglicol e um oligonucleotídeo ssDNA complementar ao mRNA do gene *MDR1*.
BCR – do inglês, *breakpoint cluster region*
BCRP – proteína de resistência ao cancro da mama (do inglês, *breast cancer resistance protein*)
DEPC – Dietilpirocarbonato
DLS – do inglês, *Dynamic Light Scattering*
DMEM – do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO – Dimetilsulfóxido
DTT – ditioneitol
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMA – do inglês, *European Medicines Agency*
EPR – Permeabilidade e retenção aumentada (do inglês, *Enhanced Permeability and Retention*)
FBS – Soro fetal bovino (do inglês, *Fetal Bovine Serum*)
FDA – do inglês, *Food and Drug Administration*
Fw – do inglês, *Forward*
IC₅₀ – metade da concentração inibitória máxima (do inglês, *half maximal inhibitory concentration*)
IM – Imatinib
INF- α – Interferão- α
K562-IM – Células K562 resistentes a imatinib
LMA – Leucemia mieloide aguda
LMC – Leucemia Mieloide Crónica
LSPR – Ressonância plasmónica de superfície localizada (do inglês, *Localized Surface Plasmon Resonance*)

MDR - Resistência a múltiplos fármacos (do inglês, *Multidrug Resistance*)

MDR1 - do inglês, *multidrug resistance 1*

mPEG tiol - O-(2-Mercaptoetil)-O'-metil-hexa(etilenoglicol)

MRP1 - proteína 1 associada a resistência a múltiplos fármacos (do inglês, *multidrug resistance-associated protein 1*)

MTS - 3-(4,5-ensaio de dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazólio

NPs - Nanopartículas

OCT1 - Transportador de catiões orgânicos 1 (do inglês, *organic cation transporter 1*)

PBS - tampão de fosfato salino (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*)

PCR - reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

PEG - Polietilenoglicol

Pen-Strep - Penicilina/Estreptomicina

PES - etossulfato de fenazina (do inglês, *Phenazine Ethosulfate*)

P-gp - Glicoproteína-P (do inglês, *P-Glycoprotein*)

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonil (do inglês, *Phenylmethanesulfonyl Fluoride*)

RT-qPCR - do inglês, *Reverse Transcription quantitative Polymerase chain Reaction*

Rv - do inglês, *Reverse*

SDS -Dodecil sulfato de sódio (do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate*)

siRNA - do inglês, *Small interfering RNA*

ssDNA - Oligonucleotídeos de DNA de cadeia simples (do inglês, *single strand DNA*)

TAE -Tris-Acetato-EDTA

TBS-T - Tampão Tris Salino- Tween-20 (do inglês, *Tris-Buffered Saline-Tween 20*)

TKI - Inibidor de tirosina quinase (do inglês, *Tyrosine Kinase Inhibitor*)

UV-Vis - Ultravioleta-Visível

ΔG - Energia livre de Gibbs

INTRODUÇÃO

A leucemia é uma neoplasia hematológica com origem na medula óssea e que afeta o processo de hematopoiese. Durante a diferenciação hematopoiética, há possibilidade de ocorrência de mutações e outros eventos disruptivos que podem resultar na proliferação descontrolada dos glóbulos brancos anormais ou imaturos (blastos) ^{1,2}. Consoante a linhagem celular afetada (mieloide ou linfoide) e o grau de proliferação celular (aguda ou crónica), a leucemia pode ser classificada em quatro categorias: leucemia mieloide aguda (LMA); leucemia mieloide crónica (LMC); leucemia linfoblástica aguda; e leucemia linfoblástica crónica ².

Este projeto terá como foco principal a LMC.

1.1. Leucemia Mieloide Crónica

A LMC é uma neoplasia mieloproliferativa maligna com uma incidência anual de 1-2 novos casos por 100 000 adultos, sendo responsável por 15 % dos casos recém-diagnosticados de leucemia em adultos ³.

Os primeiros casos documentados de LMC remontam à década de 1840, tendo sido a primeira categoria de leucemia a ser reportada ⁴. Desde então, com a evolução das metodologias citogenéticas e moleculares houve um grande avanço na compreensão da biologia molecular da doença.

1.1.1. Biologia molecular e progressão da doença

Em 1960, Nowell e Hungerford observaram uma versão encurtada do cromossoma 22 na maioria das células de LMC, tendo sido a primeira anomalia cromossómica associada a uma neoplasia humana específica a ser identificada ⁵. Desde então, tem sido apelidado de cromossoma Filadélfia e está presente em pelo menos 90% dos doentes com LMC, representando o principal marcador da doença ^{5,6}. O cromossoma Filadélfia resulta da translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomas 9 e 22 – t(9; 22) (q34.1; q11.2) – ⁶ e sua consequência molecular é a fusão do gene *abelson murine leukemia* (*ABL1*), presente no cromossoma 9, com o gene *breakpoint cluster region* (*BCR*), presente no cromossoma 22, originando o oncogene de fusão *BCR-ABL1* ^{2,7}. Devido à variabilidade de pontos de interrupção presentes

em *BCR* e *ABL1* e a fenómenos de *splicing* alternativo, uma diversidade de transcritos de fusão podem ser formados originando variantes de proteínas BCR-ABL1 com diferentes pesos moleculares ^{8,9}. A maioria dos doentes positivos para o cromossoma Filadélfia ($\approx 95\%$) apresenta os transcritos e14a2 (b3a2) ou e13a2 (b2a2), resultando na produção de uma proteína BCR-ABL1 com 210 kDa ^{10,11}. Contudo, ainda que menos frequente ($< 5\%$), outros doentes apresentam o transcrito e1a2, que resulta numa proteína de fusão BCR-ABL1 com 190 kDa ^{10,11}. Adicionalmente, outras variantes BCR-ABL1 mais raras ($< 1\%$) podem ser encontradas, como por exemplo e1a3 (190 kDa), e6a2 (195 kDa), e8a2 (200 kDa), e13a3 (210 kDa), e14a3 (210 kDa), e18a2 (225 kDa) e e19a3 (230 kDa) ^{10,11}.

Independentemente dos transcritos de fusão resultantes, a oncoproteína BCR-ABL1 exibe uma atividade tirosina quinase constitutiva, sendo capaz de recrutar e fosforilar uma série de substratos intracelulares e perturbar múltiplas vias de sinalização a jusante incluindo RAS/MAPK, PI3K/AKT e JAK2/STAT5 (**Figura 1.1**) ^{2,7,12}. Consequentemente, são despoletadas diversas transformações celulares que suportam a progressão tumoral como alterações na adesão celular, um aumento da atividade proliferativa, resistência à apoptose e um aumento da instabilidade genómica ⁷. Estas características adquiridas pelas células mieloides malignas permitem-lhes resistir aos mecanismos de controlo celular, conferindo-lhes vantagem proliferativa em detrimento das células saudáveis.

Clinicamente, a progressão da LMC segue um percurso trifásico, encontrando-se a maioria dos doentes ($\approx 85\%$) diagnosticados numa fase crónica que é relativamente longa (3 a 5 anos) e caracterizada pela acumulação de células blásticas mieloides no sangue, medula óssea e baço ¹³⁻¹⁶. Os primeiros sinais e sintomas da doença são a fadiga, esplenomegalia, anemia, episódios de infeções e desconforto abdominal. Contudo, uma porção significativa dos doentes é assintomática ¹⁶. Durante a progressão da LMC, esta pode evoluir para uma fase acelerada caracterizada por uma rápida expansão dos elementos mieloides circundantes, resultando num aumento dos níveis de mRNA de *BCR-ABL1* e da oncoproteína BCR-ABL1. Adicionalmente, podem surgir outras aberrações cromossómicas, um fenómeno conhecido como evolução clonal ^{15,17,18}. As anomalias citogenéticas mais frequentes em casos de evolução clonal são a duplicação do cromossoma Filadélfia (38%), trissomia 8 (34%) e o isocromossoma 17 (20%). Com menor frequência ($< 10\%$), alterações como trissomia 17, trissomia 19, trissomia 21 e a deleção 7 também podem ocorrer ¹⁷. Em casos mais severos, a doença pode culminar numa crise blástica caracterizada pela presença de mais de 30% das células blásticas imaturas no sangue periférico ou na medula óssea ^{15,19}. A crise blástica assemelha-se a uma LMA e pode levar à formação de metástases, falência de órgãos e em última instância, à morte ²⁰. A crise blástica tem sido o principal desafio no tratamento da LMC. Normalmente, quando um doente atinge esta fase terminal o seu tempo de vida sem tratamento é em média de 3 a 4 meses

²¹.

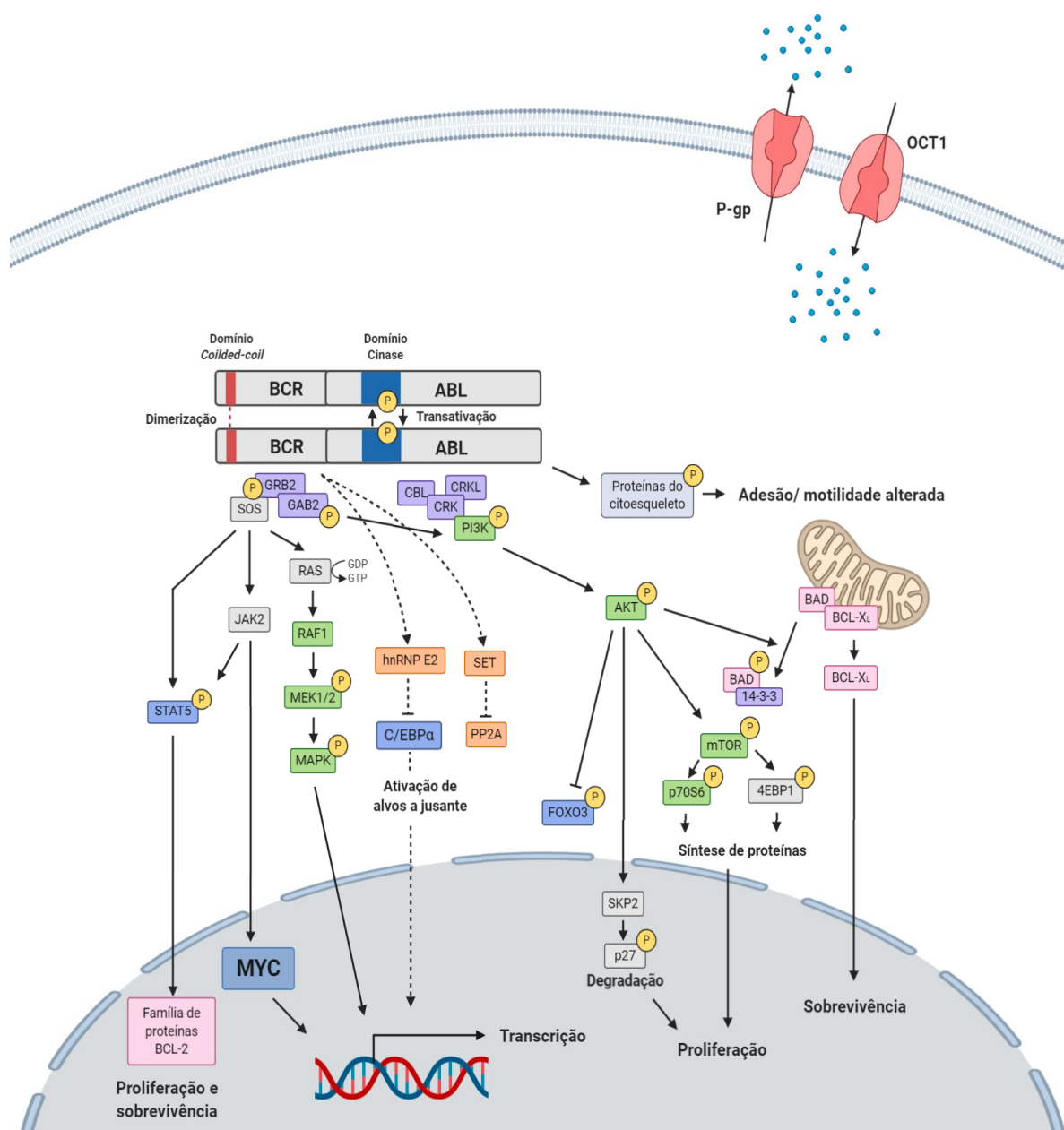


Figura 1.1 – Vias de sinalização ativadas pela oncoproteína BCR-ABL1. Diagrama simplificado das vias de sinalização ativadas por BCR-ABL1, na qual se representam os: fatores de transcrição (azul), a serina/treonina quinases (verde), e as proteínas envolvidas na apoptose (rosa). A dimerização de BCR-ABL1 permite a ativação da quinase por autofosforilação nos resíduos de tirosina possibilitando a exposição de sítios de ligação a proteínas adaptadoras (roxo). A sinalização dependente de BCR-ABL1 permite a ativação de múltiplas vias de sinalização intracelulares a jusante da proteína que conduzem a um aumento da proliferação celular e sobrevivência, inibição da apoptose e perturbação da adesão e migração celular ²². A glicoproteína-P (P-gp) e o transportador de cátions inorgânicos 1 (OCT-1) são bombas de efluxo e influxo respectivamente, e a alteração das suas expressões tem sido implicada na resistência a múltiplos fármacos em diversas neoplasias, incluindo na LMC. Figura adaptada de ²² e criada com BioRender.com.

1.1.2. Tratamento

O tratamento da LMC depende do estadio da doença, do historial do tratamento, da idade e do estado de saúde do doente, bem como do seu perfil genético. Atualmente, a opção terapêutica para a maioria dos doentes é a terapia direcionada com inibidores de tirosina quinase (TKIs, do inglês *tyrosine kinase inhibitors*), no entanto, em alguns casos, podem ser submetidos a radioterapia, transplante de células estaminais ou a quimioterapia ²¹

Antes da aprovação clínica dos TKIs, as principais opções terapêuticas para doentes com LMC em fase crónica e que não podiam realizar transplante alogénico de células estaminais hematopoiéticas incluíam fármacos citotóxicos, como o busulfan e a hidroxiureia ^{23,24}. Embora estes fármacos levassem a uma remissão hematológica completa (contagem normal das células sanguíneas, baço não palpável e desaparecimento de todos os sinais e sintomas da doença), não eram capazes de impedir a progressão da LMC em cerca de 50-80 % dos doentes ^{25,26}. Mais tarde, a introdução na prática clínica do interferão- α (INF- α) permitiu que a maioria dos doentes pudesse atingir a remissão hematológica completa e cerca de 13-27 % dos doentes a remissão citogenética completa (ausência de qualquer metáfase positiva para o cromossoma Filadélfia) ^{13,20}. Contudo, a terapia com INF- α não foi bem tolerada devido aos seus efeitos adversos ²⁰. O transplante alogénico de células estaminais hematopoiéticas é também uma abordagem terapêutica para doentes com LMC e apresenta potencial curativo, ao contrário das terapias anteriores que apenas impedem a progressão da doença ^{13,20}. No entanto, não só apresenta uma taxa significativa de morbilidade e mortalidade, como requer a presença de um dador compatível, pelo que é a escolha terapêutica apenas para uma pequena percentagem dos doentes ($\approx 25\%$) ^{13,20,27}.

Com a descoberta do papel da tirosina quinase BCR-ABL1 e a compreensão dos mecanismos moleculares associados à LMC, esta proteína constituiu um alvo específico para o tratamento da doença. O tratamento de doentes com LMC foi revolucionado com o desenvolvimento de pequenas moléculas capazes de interferir e inibir a atividade quinase da oncoproteína BCR-ABL1 ¹³ – os TKIs – possibilitando taxas de sobrevivência globais superiores a 80 % após 8 anos ²⁸. Atualmente, os TKIs são considerados a terapia de primeira linha para a maioria dos doentes diagnosticados com LMC em fase crónica e positivos para o cromossoma Filadélfia ²⁹, demonstrando a importância da sinalização ativada pela oncoproteína BCR-ABL1.

O imatinib (IM) (Glivec®, Novartis) foi o primeiro TKI aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da LMC ³⁰. Este fármaco liga-se à proteína ABL quando esta está na sua conformação inativa e bloqueia competitivamente o local de ligação da molécula de ATP, impedindo que ocorra a mudança conformacional responsável pela ativação da oncoproteína ³⁰⁻³². Consequentemente, os substratos da tirosina quinase BCR-ABL1 não podem ser fosforilados e as vias de sinalização intracelulares a jusante da oncoproteína deixam de ser ativadas, levando à apoptose das células tumorais ¹³. O IM é geralmente bem tolerado e considerado como a opção terapêutica de primeira linha para a maioria dos doentes devido à sua elevada eficácia e respostas hematológicas e citogenéticas duradoras ^{33,34}. No entanto, apesar desta notável conquista, a persistência de doença residual mínima (perma-

nência de células tumorais residuais após o tratamento) atenuou o entusiasmo inicial ³⁵. Estima-se que mais de 25% dos doentes terão de trocar de TKI pelo menos uma vez durante a sua vida devido a intolerância ou resistência ao tratamento ^{36,37}. Nesse sentido, o desenvolvimento de novos TKIs mais potentes e que suprimam algumas das resistências ao IM tornou-se uma necessidade. Até ao momento, quatro TKIs além do IM já foram aprovados pela FDA e *European Medicines Agency* (EMA) incluindo, o dasatinib (Sprycel®, Bristol-Myers Squibb) ³⁸, nilotinib (Tasigna®, Novartis) ³⁹, bosutinib (Bosulif®, Pfizer) ⁴⁰ e ponatinib (Iclusig®, Takeda/Incyte) ⁴¹. Um quinto TKI, o radotinib (Supect®, Dae Wong Pharmaceuticals), apenas foi aprovado na Coreia do Sul e por isso não será considerado daqui em diante ^{29,33}. A escolha do TKI é baseada em diversos fatores como as comorbidades do doente de modo a evitar efeitos colaterais adversos, eficácia, tolerabilidade, toxicidade precoce e tardia e o custo do medicamento ²⁹. Na **tabela 1.1.** encontram-se as indicações para a seleção do TKI mais apropriado em doentes diagnosticados com LMC positivos para o cromossoma Filadélfia.

1.1.3. Resistência ao tratamento

Apesar dos progressos significativos no tratamento da LMC, um conjunto de doentes não respondem desde o início à terapia (resistência inata) e cerca de 20-30% dos doentes acabam por desenvolver resistência ao longo do tempo (resistência adquirida) ^{33,42,43}.

Os mecanismos moleculares que permitem que as células leucémicas escapem à inibição com TKIs têm sido classificados em dependentes ou independentes de *BCR-ABL1*. Alguns foram descritos detalhadamente por Moraes, G. N. *et al* em ⁴⁴.

Os mecanismos de resistência dependentes de *BCR-ABL1* resultam de eventos mutacionais no domínio quinase da proteína ABL1 ou da sobreexpressão da oncoproteína BCR-ABL1, como resultado da amplificação génica de *BCR-ABL1* ou de uma duplicação do cromossoma Filadélfia ^{36,45,46}. A aquisição de mutações pontuais é o mecanismo de resistência adquirida aos TKIs mais comum e é responsável por prejudicar a ligação do IM à proteína alvo, diminuindo assim a sua eficácia terapêutica ^{47,48}. Desde a identificação da primeira mutação em 2001 ⁴⁹, já foram identificadas mais de 100 mutações diferentes de resistência ao IM ⁵⁰. No entanto, 85% da resistência associada a mutações ocorre por substituição de aminoácidos em apenas sete resíduos específicos: M244V, G250E, Y253F/H, E255K/V, T315I, M351T e F359V ⁵¹. As estratégias terapêuticas atuais para superar a resistência associada a mutações incluem o uso de TKIs de segunda (dasatinib, nilotinib e bosutinib) e terceira (ponatinib) geração ^{41,52}. A mutação T315I é insensível a todos os TKIs de segunda geração, sendo o ponatinib o único TKI aprovado, até ao momento, para uso clínico ⁵³. O rastreio de mutações em BCR-ABL pode auxiliar clinicamente a seleção do TKI mais adequado contudo, não é garantido que a existência de uma mutação “sensível”, implique a resposta favorável a determinado TKI ³⁶. Embora os TKIs de segunda e terceira geração tenham tido um impacto extraordinário na inibição de muitas proteínas BCR-ABL1 com mutações de resistência, uma pequena parte dos doentes com LMC em fase crónica e uma proporção considerável de doentes em fase avançada são resistentes a estes ou acabam por desenvolver resistência impossibilitando a erradicação completa de BCR-ABL1 ^{41,52,54}. Nestes casos, a falha de resposta à terapia poderá dever-se a mecanismos de resistência independentes de *BCR-ABL1* ³⁶.

Tabela 1.1 - Inibidores de tirosina quinase aprovados para o tratamento de doentes com LMC. Adaptado de ⁵⁵.

TKIs	Fase Crônica		Fase Acelerada	Crise Blástica	Mutações sensíveis	Referências
	1ª linha*	2ª linha de tratamento ou posterior				
Imatinib (1ª geração)	Aprovado	Após falha com o INF- α .	Aprovado	Aprovado	-	55,56
Dasatinib (2ª geração)	Aprovado	Resistência a TKIs anteriores, incluindo IM, exceto para casos com mutações T315I/A.	Aprovado	Aprovado	Y253H, E255V/K, F359V/I/C	29,38,55,57
Nilotinib (2ª geração)	Aprovado	Resistência ou intolerância à terapia anterior, incluindo IM, exceto para casos com mutações T315I, V379I.	Aprovado	Não aprovado	V299L, T315A, F317L/V/I/C	29,39,55,58
Bosutinib (2ª geração)	Aprovado	Doentes tratados anteriormente com um ou mais TKIs e para os quais IM, nilotinib e dasatinib não são considerados opções terapêuticas adequadas, exceto para casos com mutações V299L e T315I detetáveis.	Aprovado	Aprovado	Y253H, E255V/K ^a , F359V/I/C, T315A, F317L/V/I/C	29,40,55,59
Ponatinib (3ª geração)	Não aprovado	Resistência ou intolerância ao dasatinib ou nilotinib e para quem o tratamento subsequente com IM não é clinicamente apropriado; ou com a mutação T315I.	Aprovado	Aprovado	T315I, V299L, Y253H, E255V/K, F359V/I/C, T315A, F317L/V/I/C	29,55,60

NOTA: Radotinib apenas foi aprovado na Coreia do Sul, pelo que não foi considerado.

^a Existem dados limitados disponíveis em relação às mutações associadas à resistência clínica do bosutinib *in vivo*. Alguns dados *in vitro* sugerem que a mutação E255K e, em menor extensão a mutação E255V podem ser pouco sensíveis ao bosutinib ²⁹.

IM - Imatinib; TKIs - do inglês, *tyrosine kinase inhibitors*; INF- α - interferon alfa.

Um dos mecanismos de resistência independentes de *BCR-ABL1* inclui a ativação de vias de sinalização intracelulares alternativas ³⁶. Como mencionado na subsecção 1.1.1. (*Biologia molecular e progressão da doença*), as células leucémicas orquestram uma rede de vias de sinalização que sustentam a sua sobrevivência. Quando uma via dominante é inibida, por exemplo pela ação de um TKI, a ativação de vias de sinalização intracelulares alternativas possibilita a reativação de efetores críticos a jusante permitindo que as células cancerígenas consigam resistir e manter o crescimento contínuo do tumor. Vias de sinalização intracelulares como SRC ^{61,62}, PI3K ⁶³, KRAS ⁶⁴ e JAK2 ⁶⁵ são capazes de compensar a inibição de BCR-ABL pelos TKIs. Particularmente, a inativação de genes supressores de tumores (e.g. *p53*) ou a regulação positiva de proto-oncogenes (e.g. *c-myc*), tendem a promover eventos neoplásicos podendo estar envolvidos no desenvolvimento da LMC ⁶⁶. Além disso, os transportadores de efluxo, que são mecanismos envolvidos no fenótipo de multirresistência, foram extensivamente estudados em diversas neoplasias e também têm sido associados à falha no tratamento da LMC ⁶⁷.

Resistência a múltiplos fármacos

O fenómeno de multirresistência consiste na resistência a uma ampla gama de fármacos anticancerígenos que podem ter diferentes estruturas e mecanismos de ação e tem sido um dos principais desafios no tratamento do cancro ⁶⁸⁻⁷⁰. Os mecanismos responsáveis pela resistência a múltiplos fármacos (MDR, do inglês *multidrug resistance*) podem incluir a redução da absorção de fármacos; regulação positiva ou negativa de transportadores de efluxo ou influxo respetivamente; modificações nas vias celulares por alteração dos *check-points* do ciclo celular; aumento da biotransformação de fármacos; inibição da apoptose; alteração dos mecanismos de reparação de DNA; entre outros ⁷¹⁻⁷³. Entre os mecanismos referidos, o aumento do efluxo de fármacos pelos transportadores presentes na membrana celular é considerado o mecanismo predominante no fenótipo de quimiorresistência ⁷⁴.

Os transportadores de efluxo mais estudados pertencem à superfamília *ATP-binding cassette* (ABC), dos quais 49 membros são conhecidos em humanos ⁷⁵. Embora a estrutura varie entre os diferentes membros, todos eles são caracterizados por dois domínios distintos: um domínio de ligação de nucleótido altamente conservado (NBDs, do inglês *nucleotide-binding domain*) e um domínio transmembranar variável (TMDs, do inglês *transmembrane domain*) ⁷⁵. Quando um substrato se liga às regiões transmembranares, a hidrólise de ATP no local de ligação do nucleótido leva a uma mudança conformacional capaz de libertar o substrato para fora da célula ⁷⁵. Este mecanismo desempenha um papel importante na prevenção da acumulação excessiva de toxinas no interior da célula. No entanto, embora o efluxo por meio de transportadores ABC seja um processo fisiológico normal, também constitui um mecanismo utilizado pelas células cancerígenas para se tornarem tolerantes aos fármacos ⁷⁵. A sobreexpressão da glicoproteína-P (P-gp); proteína 1 associada a resistência a múltiplos fármacos (MRP1, do inglês *multidrug resistance-associated protein 1*); e proteína de resistência ao cancro da mama (BCRP, do inglês *breast cancer resistance protein*) têm sido associadas ao fenótipo MDR em diversas neoplasias ⁷⁵. Entre os três transportadores efluxo mencionados, a sobreex-

pressão da P-gp continua a ser o mecanismo mais estudado e mais potente para induzir quimiorresistência ⁷⁶. Particularmente na LMC, a P-gp tem sido identificada como estando envolvida na libertação de TKIs para fora das células leucêmicas ^{44,68,77,78}, e será discutida com maior detalhe na subsecção seguinte (1.1.3.1 – Resistência a múltiplos fármacos mediada pela Glicoproteína-P).

Embora menos estudado, a regulação negativa de transportadores de influxo de drogas, como é o caso do transportador de catiões orgânicos 1 (OCT1, do inglês *organic cation transporter 1*), também tem sido associada à resistência ao IM, conduzindo também a uma diminuição da concentração intracelular do agente quimioterapêutico ⁷⁹.

1.1.3.1. Resistência a múltiplos fármacos mediada pela glicoproteína-P

Em 1976, Juliano e Ling descreveram pela primeira vez a P-gp como uma glicoproteína de 170 kDa capaz de alterar a permeabilidade membranar de células resistentes a fármacos ⁸⁰. Desde então, inúmeros estudos têm sido realizados de modo a compreender melhor a estrutura e função da P-gp.

Em humanos, a P-gp é codificada pelo gene *multidrug resistance 1* (*MDR1*) também conhecido por *ATP-binding cassette, subfamily B, member 1* (*ABCB1*), localizado no cromossoma 7q21. *MDR1* codifica uma cadeia polipeptídica que é dobrada para formar duas partes homólogas, cada uma composta por um TMD, constituído por seis hélices- α transmembranares, e um NBD unidos por uma região de ligação citoplasmática. (Figura 1.2) ⁸¹. Os doze segmentos transmembranares nos TMDs formam um poro ativo, com ambos os NBDs orientados para o citoplasma, sendo os substratos exportados através desse poro ⁸².

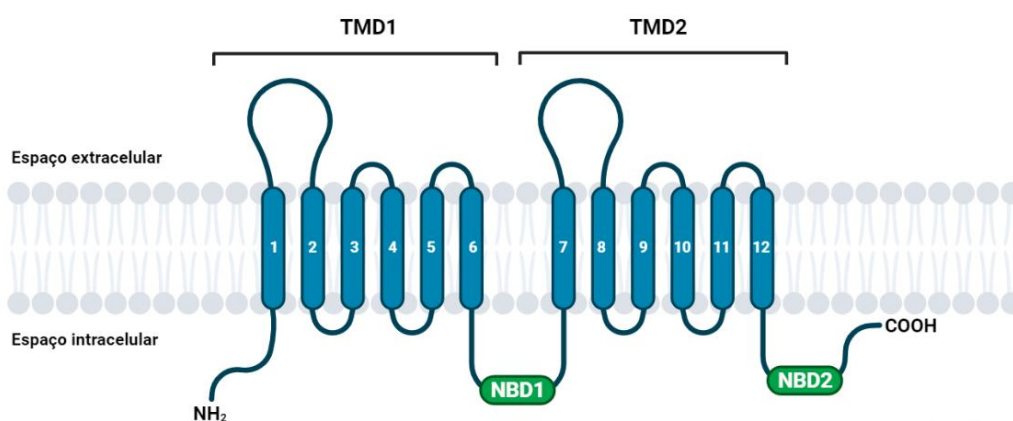


Figura 1.2 - Estrutura simplificada da glicoproteína-P. A glicoproteína-P é constituída por duas metades homólogas, cada uma com um domínio transmembranar (TMD), contendo seis hélices- α transmembranares altamente hidrofóbicas e um domínio de ligação de nucleotéio (NBD) localizado no lado citoplasmático da membrana. Figura adaptada de ⁸³ e criada com *BioRender.com*.

Quanto à sua localização celular, a P-gp encontra-se principalmente presente na membrana plasmática de células saudáveis incluindo células precursoras hematopoiéticas, células epiteliais do intestino, hepatócitos, túbulos proximais do rim, entre outros ^{84,85}. Contudo, a expressão de P-gp é significativamente aumentada em células tumorais resistentes a fármacos,

permitindo que estas sejam capazes de expulsar com eficiência uma variedade de fármacos quimicamente não relacionados incluindo imatinib, taxanos, antraciclinas, epipodofilotoxinas, alcalóides da vinca, actinomicina D e antifolatos lipofílicos,^{74,82}. A translocação de fármacos anticancerígenos contra o gradiente de concentração usando a energia gerada a partir da hidrólise de ATP é capaz de reduzir a concentração intracelular dos fármacos para níveis sub-tóxicos estando relacionada com a falha terapêutica num número considerável de neoplasias, incluindo as leucemias^{44,74,78,86,87}.

Particularmente, no que diz respeito à MDR na LMC, alguns estudos têm demonstrado a contribuição da P-gp na resistência ao IM. Recentemente, Ammar *et al* analisaram a expressão da P-gp em linfócitos de sangue periférico de 59 doentes com LMC (27 doentes que respondem ao IM *vs.* 32 doentes que não respondem ao IM). Os resultados mostraram uma sobreexpressão significativa da P-gp no grupo de doentes que não respondem à terapia, sugerindo que a monitorização dos níveis de expressão de P-gp pode identificar doentes com probabilidade de desenvolver insensibilidade ao IM⁸⁵. Adicionalmente, Eaddie *et al.*, analisaram amostras de 155 doentes com LMC 22 dias após o início da terapia com IM e verificaram que as amostras que apresentavam níveis elevados de mRNA de *MDR1* mostraram respostas indesejáveis em comparação com as que apresentaram baixos níveis de mRNA de *MDR1*⁴³. Outro estudo desenvolvido por Vasconcelos *et al.* revelou um aumento dos níveis de expressão de P-gp com a progressão da doença⁸⁸. Além disso, dados *in vitro* evidenciaram que o IM induziu um aumento dos níveis de mRNA de *MDR1* e da P-gp na linha celular resistente, pelo que os resultados obtidos apoiam que o IM poderá contribuir para o fenótipo de resistência na LMC⁸⁸. Deste modo, a diminuição da expressão ou a inibição da atividade da P-gp é uma estratégia terapêutica atraente para superar a MDR.

Diversos inibidores da P-gp de primeira (e.g. quinidina, ciclosporina-A, amiodarona e verapamil), segunda (e.g. valspodar e doxiverapamil) e terceira (e.g. tariquidar, biricodar, zosuquidar, laniquidar e ONT-093) geração têm sido investigados com o objetivo de aumentar a sensibilidade das células malignas à quimioterapia^{67,89}. Contudo, infelizmente, estas moléculas inibidoras não passaram os ensaios clínicos devido à sua falta de especificidade, que implica a administração de doses demasiado elevadas para obter uma inibição clínica (primeira geração); interações farmacocinéticas imprevisíveis (segunda geração); segurança a longo prazo não estabelecida (terceira geração)^{67,89-92}.

A terapia de DNA *antisense* tem surgido como uma grande promessa no silenciamento génico de alvos biológicos críticos associados a doenças, com potencial para ser usada como adjuvante da quimioterapia convencional⁹³. Contudo, apesar dos ácidos nucleicos fornecerem ferramentas terapêuticas promissoras são naturalmente suscetíveis à degradação enzimática, além de apresentarem baixa penetração intracelular^{94,95}. Sistemas à nanoescala têm demonstrado elevado potencial na vectorização de modalidades de terapia génica distintas tanto devido às suas propriedades intrínsecas como pela possibilidade de transporte e direcionamento de carga^{96,97}. Deste modo, o silenciamento de *MDR1* e o seu impacto na viabilidade de células LMC resistentes, em combinação com as terapias tradicionais de inibição da tirosina quinase,

são passos importantes para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para combater a multirresistência na LMC. Esta tendência será discutida na secção 1.2. (*Nanomedina no cancro*).

1.2. Nanomedicina no cancro

Nos últimos anos, progressos significativos têm sido realizados no âmbito da nanotecnologia, tendo-se tornado uma ferramenta poderosa para aplicações médicas. Consequentemente, surgiu uma nova área conhecida como nanomedicina na qual novos dispositivos e tecnologias são desenvolvidos à nanoescala para melhorar as abordagens terapêuticas e de diagnóstico tradicionais ^{92,98}.

Em particular, novos (nano)medicamentos baseados em nanopartículas (NPs) têm recebido especial atenção para aplicações oncológicas ⁸⁰. Devido ao seu pequeno tamanho, ideal para a absorção intracelular, e à sua grande relação área superficial-volume, que permite a funcionalização com diferentes biomoléculas para fins terapêuticos e de diagnóstico, as NPs oferecem a possibilidade de vectorização e entrega melhorada dos agentes anticancerígenos quando comparados com a quimioterapia convencional e a monitorização em tempo real das respostas terapêuticas ⁹⁹⁻¹⁰¹. Esta flexibilidade é uma das grandes vantagens da nanomedicina possibilitando o teranóstico de doenças, ou seja, o seu diagnóstico e tratamento em simultâneo ⁹⁹.

Contudo, para que as NPs consigam direccionar eficazmente a carga a transportar necessitam de superar diversas barreiras biológicas. Nas terapias anticancerígenas atuais baseadas em NPs, estas são geralmente administradas por via intravenosa ¹⁰². Uma vez na corrente sanguínea, as NPs estão suscetíveis à opsonização pelas proteínas presentes no plasma circulante (opsoninas), podendo ser reconhecidas pelo sistema reticuloendotelial e serem eliminadas da circulação ¹⁰². Na maioria dos casos, as NPs que conseguem evitar a eliminação pelo sistema reticuloendotelial necessitam posteriormente de extravasar com sucesso os vasos sanguíneos em direção ao microambiente tumoral ¹⁰². De seguida, como a maioria dos fármacos exercem os seus efeitos intracelularmente, a membrana extracelular da célula tumoral e a maquinaria intracelular representam as barreiras finais que as NPs têm que ultrapassar para direccionarem eficazmente a carga a transportar ¹⁰². Os tumores sólidos têm sido o principal foco da nanomedicina devido ao aproveitamento do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR, do inglês *enhanced permeability and retention*) para acumular passivamente os fármacos no tecido alvo, melhorando assim a sua eficácia terapêutica ^{103,104}. Contudo, nos tumores líquidos, como é o caso da leucemia e outras malignidades hematológicas, as células tumorais estão livres em circulação pelo que o efeito EPR não pode ser considerado ¹⁰³. Na verdade, a maioria das barreiras que as NPs enfrentam para alcançar os tumores sólidos não são críticas nos tumores líquidos. No entanto, as NPs fornecem estratégias inovadoras simples e não invasivas tanto para o diagnóstico como para o tratamento de neoplasias hematológicas ¹⁰⁰. A possibilidade de incorporação de biomoléculas específicas (e.g. anticorpos, pequenas moléculas, péptidos, entre outros) na superfície das NPs, que são reconhecidas pela célula alvo, possibilita o direccionamento ativo melhorando a sua absorção e seletividade ⁹⁷.

As NPs podem ser sintetizadas a partir de diversos materiais e apresentam um tamanho que varia entre 1-100 nm. Atualmente, existe uma grande variedade de NPs orgânicas (e.g. lipossomas; dendímeros; polímeros) e inorgânicas (e.g. carbono; metálicas (e.g. ouro, prata, óxido de ferro); *quantum dots*) suscetíveis de serem usadas para aplicações oncológicas ¹⁰⁵.

Entre a diversidade de NPs existentes, esta secção irá focar-se nas vantagens das nanopartículas de ouro (AuNPs) como abordagem terapêutica para o silenciamento génico de alvos biológicos críticos envolvidos na LMC.

1.2.1. Nanopartículas de ouro

As NPs de metais nobres, em particular as AuNPs, estão entre os nanomateriais mais estudados e levaram ao desenvolvimento de diversas metodologias para diagnóstico molecular, administração de fármacos, imagem e terapêutica ¹⁰⁶.

AuNPs podem ser facilmente sintetizadas pela redução dos sais de ouro, geralmente de Au³⁺ a Au⁰. O método de redução com citrato desenvolvido por Turkevich *et al* ¹⁰⁷ e mais tarde otimizado por Frens ¹⁰⁸ e Lee Meisel ¹⁰⁹, é uma das metodologias mais comuns para sintetizar AuNPs esféricas hidrofílicas (10-30 nm) estáveis.

O grande interesse pelas AuNPs não se deve apenas ao seu pequeno tamanho, mas também às suas propriedades físicas (elétricas, magnéticas, óticas) e químicas únicas, que não se observam em partículas com a mesma composição química à escala macroscópica ^{96,110}. Uma das suas propriedades intrínsecas mais exploradas, principalmente para ensaios moleculares que envolvem resultados colorimétricos ^{111,112}, é a modulação da ressonância plasmónica de superfície localizada (LSPR, do inglês *localized surface plasmon resonance*), que se refere à oscilação coletiva dos eletrões à superfície das NPs metálicas que são excitados pelos fótons incidentes na frequência ressonante ^{113,114}. A localização da banda LSPR é influenciada pela composição da NP ⁶⁶ e por alterações na forma ¹¹⁵, distância inter-partículas ¹¹⁶, tamanho ¹¹⁵ e constante dielétrica do meio circundante ¹¹⁷. Normalmente, uma solução coloidal de AuNPs esféricas e de tamanho inferior a 40 nm apresenta uma cor vermelha intensa e uma banda LSPR com um máximo de absorção a 520 nm ¹⁰⁶.

Adicionalmente, o ouro é um material inerte, pelo que as AuNPs oferecem diversas outras vantagens como uma baixa toxicidade e maior biocompatibilidade ¹¹⁸. No entanto, caso as AuNPs não sejam funcionalizadas, isto é sejam administradas “nuas”, ficam suscetíveis à agregação e adsorção por opsoninas ¹¹⁹. Na verdade, embora a maioria das barreiras biológicas que as NPs enfrentam para alcançar os tumores sólidos não sejam críticas nos tumores líquidos, as NPs continuam a estar suscetíveis à opsonização e de serem reconhecidas pelo sistema reticuloendotelial e possível posterior eliminação destas da corrente sanguínea ^{100,102}. A modificação da superfície das NPs com polímeros tem sido uma estratégia usada para aumentar efetivamente o tempo de meia-vida em circulação. O polietilenoglicol (PEG) é uma das moléculas estabilizadoras mais utilizadas, capaz de se ligar à superfície das AuNPs e aumentar o seu tempo de meia-vida em circulação e a sua captação celular, com redução da imunogenicidade ^{120,121}.

Como mencionado anteriormente, as NPs podem ainda ser funcionalizadas com diversos agentes terapêuticos (e.g. ácidos nucleicos, fármacos) possibilitando o alcance simultâneo

de vários biomarcadores tumorais. Esta abordagem pode fornecer uma estratégia terapêutica sinérgica para abordar a heterogeneidade tumoral e a multirresistência ^{93,97}. A modificação química de oligonucleotídeos com um grupo tiol constitui um método eficaz para ancorar ácidos nucleicos à superfície da AuNP sem inibir a sua atividade biológica ^{122,123}, uma vez que a forte interação entre o ouro e o enxofre forma uma ligação Au-S de carácter quase covalente ⁹⁴. Deste modo, as AuNPs têm demonstrado elevado potencial na vectorização de modalidades de terapia génica distintas (e.g. ASOs, do inglês *antisense oligonucleotides* ^{93,124,125}; siRNAs, do inglês *small interfering RNA* ¹²⁶⁻¹²⁹). Esta particularidade das AuNPs poderem atuar como veículos de entrega de ácidos nucleicos será explorada neste trabalho e será discutida com maior detalhe na subsecção seguinte (1.2.1.1. – *Silenciamento génico com ASOs mediado por nanopartículas de ouro*).

1.2.1.1. Silenciamento génico com ASOs mediado por nanopartículas de ouro

A terapia *antisense* de DNA fornece uma estratégia poderosa para modular a expressão de genes associados a tumores, com potencial para ser usada como adjuvante da quimioterapia convencional ⁹³. Oligonucleotídeos de DNA de cadeia simples (ssDNA, do inglês *single strand DNA*) complementares ao mRNA do gene de interesse podem ser entregues nas células e promover posteriormente a diminuição da expressão de uma proteína de interesse por bloqueio da tradução ou degradação dos híbridos de DNA-RNA ¹²⁷. Contudo, apesar dos ácidos nucleicos fornecerem ferramentas terapêuticas promissoras são naturalmente suscetíveis à degradação enzimática, além de apresentarem baixa penetração celular ^{94,95}.

As AuNPs protegem os oligonucleotídeos da degradação por RNases, aumentando assim o seu tempo de meia-vida em circulação, e portanto a carga útil de agente terapêutico que é entregue às células ⁹³. Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado como a nanovectorização mediada por AuNPs, tem beneficiado o silenciamento génico mediado por ASOs ^{93,124,130-132}. Em particular, alguns estudos têm recorrido a esta abordagem terapêutica para silenciar alvos biológicos críticos na LMC ⁹³. Além disso, o silenciamento génico combinado com as terapias convencionais de inibição da tirosina quinase têm demonstrado grande potencial para melhorar o tratamento da LMC. Por exemplo, Gossai *et al.* usou AuNPs funcionalizadas com oligonucleotídeos complementares a uma sequência do gene *BIRC5*, que é sobreexpresso em linhas celulares de LMC (K562), e posteriormente incorporou dasatinib. Os resultados demonstraram grande eficácia de tratamento tanto *in vitro* como *in vivo* ¹³³. Vinhas *et. al.* combinou o silenciamento génico através de AuNPs funcionalizadas com um ASO seletivo para *BCR-ABL1* com o IM, aumentando a apoptose em células de LMC (K562) ⁹³.

1.2.2. Desafios na translação da nanomedicina dos laboratórios de investigação para a clínica

As NPs têm feito contribuições importantes para a medicina clínica nas áreas da terapêutica e do diagnóstico. Particularmente, a investigação na área da oncologia tem recebido especial atenção pelo que, o desenvolvimento de nanomedicamentos para aplicações oncológicas tem sido a principal aposta das indústrias farmacêuticas ¹³⁴. Estes nanomedicamentos

visam melhorar o índice terapêutico dos fármacos anticancerígenos através da modificação da sua farmacocinética e distribuição nos tecidos ¹³⁴. Um exemplo do sucesso da nanomedicina para a terapia do cancro foi demonstrada clinicamente com a aprovação da doxorubicina lipossomal peguilada (Doxil TM / Caelyx TM) pela FDA em 1995. Doxil TM / Caelyx TM foi a primeira formulação anticancerígena baseada em nanomedicina, tendo apresentado uma eficácia terapêutica superior à doxorubicina livre ^{135,136}. Desde então, outros nanomedicamentos já foram aprovados para uso clínico no tratamento do cancro ¹³⁴.

Apesar dos avanços consideráveis, a translação da nanomedicina dos laboratórios de investigação para a clínica ainda está numa fase inicial e enfrenta alguns desafios.

Uns dos principais obstáculos derivam da complexidade da biologia tumoral e de uma compreensão incompleta das interações nano-bio ¹³⁷. Numa primeira instância, estudos em modelos *in vitro* são importantes para identificar candidatos biocompatíveis e podem melhorar a compreensão sobre as interações NP-célula ¹³⁷. Contudo, os modelos convencionais *in vitro* carecem da complexidade dos tecidos biológicos não enfrentando as barreiras fisiológicas ¹³⁷. Assim, antes de se iniciar um ensaio clínico, é necessária uma avaliação rigorosa em modelos *in vivo* ¹³⁴. Estudos pré-clínicos em animais fornecem frequentemente informações úteis para a adequação da nanomedicina no tratamento de doentes ¹³⁴. Adicionalmente, para avaliar o potencial risco toxicológico para os doentes, protocolos padronizados para avaliação da citotoxicidade, imunotoxicidade e genotoxicidade necessitam de ser implementados ¹³⁴.

Outro desafio consiste na dificuldade de criar um processo de síntese controlável e reprodutível. A síntese em larga escala de NPs sofre de reprodutibilidade lote a lote insuficiente, características físicas e químicas variáveis e baixo rendimento ^{134,137}. E nesse sentido, processos de fabricação complexos raramente chegam à clínica devido aos inconvenientes causados às indústrias farmacêuticas ¹³⁴.

Em suma, as nanoformulações devem ter um perfil farmacológico e de toxicidade favorável e demonstrar segurança e eficiência nos ensaios clínicos para que sejam atrativos para a indústria farmacêutica ¹³⁸. Além disso, é necessário projetar NPs com propriedades físico-químicas e comportamentos biológicos adequados, otimizar processos de fabricação reprodutíveis e selecionar métodos de análise confiáveis para uma caracterização adequada ¹³⁸. Para isso, a colaboração é um fator chave para o sucesso dos nanomedicamentos, uma vez que o desenvolvimento da nanomedicina é uma ciência multidisciplinar e requer conhecimentos em diversas áreas para desenvolver terapêuticas traduzíveis devido à sua diversidade e complexidade ¹³⁸. Enfrentando estes desafios e resolvendo os seus problemas, a nanomedicina irá crescer e fornecer um valor realista e significativo para a medicina e para os cuidados de saúde humanos ¹³⁸.

1.3. Âmbito da tese

Os TKIs têm demonstrado excelentes resultados no tratamento da maioria dos doentes com LMC. Contudo, cerca de 20-30% dos doentes desenvolve resistência a este tratamento ⁴³. A sobreexpressão da P-gp, uma proteína de efluxo capaz de expulsar uma variedade de fármacos anticancerígenos, incluindo o IM, através da membrana celular, tem sido identificada como um dos mecanismos de resistência associados ao tratamento com este fármaco ^{43,85}. Nesse sentido, a procura por estratégias que superem as limitações das terapias anticancerígenas, como a resistência a múltiplos fármacos, é de grande importância e tem sido um desafio.

A combinação da quimioterapia tradicional com abordagens que visam o silenciamento génico pode auxiliar a morte das células cancerígenas. A utilização de ASOs é uma das estratégias usadas para promover a diminuição da expressão de um gene de interesse. Contudo, apesar dos ácidos nucleicos fornecerem ferramentas terapêuticas promissoras são naturalmente suscetíveis à degradação enzimática, além de apresentarem baixa penetração intracelular ^{94,95}. Nesse sentido, o surgimento da nanovetorização tem beneficiado o silenciamento génico mediado por ASOs ^{94,95}. Deste modo, o silenciamento de *MDR1* e o seu impacto na viabilidade de células LMC resistentes em combinação com a terapia tradicional de inibição da tirosina quinase podem consistir em passos importantes para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Assim, este projeto teve como principal objetivo aumentar a sensibilidade das células LMC resistentes (K562-IM) à terapêutica convencional com TKIs nomeadamente através do silenciamento de *MDR1*, usando AuNPs com um ssDNA complementar à sequência de interesse (**Figura 1.3**).

Para isso, este trabalho foi dividido nas seguintes tarefas:

1. Confirmação da sobreexpressão de P-gp em células LMC resistentes a IM por *Western Blot*.
2. Desenho de uma sequência de ssDNA complementar ao mRNA do gene *MDR1* para posterior funcionalização e caracterização dos nanoconjugados para silenciamento de *MDR1*.
3. Avaliação da expressão de *MDR1* e da P-gp em células LMC resistentes a IM incubadas na presença dos nanoconjugados por RT-qPCR e *Western Blot* respetivamente.
4. Avaliação da viabilidade celular após exposição aos nanoconjugados em combinação com IM.

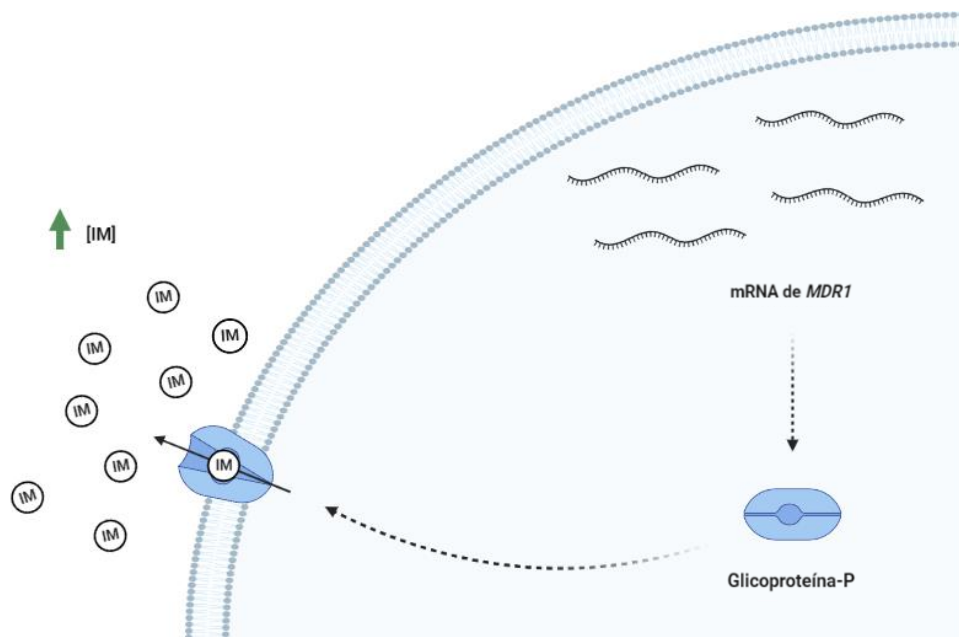
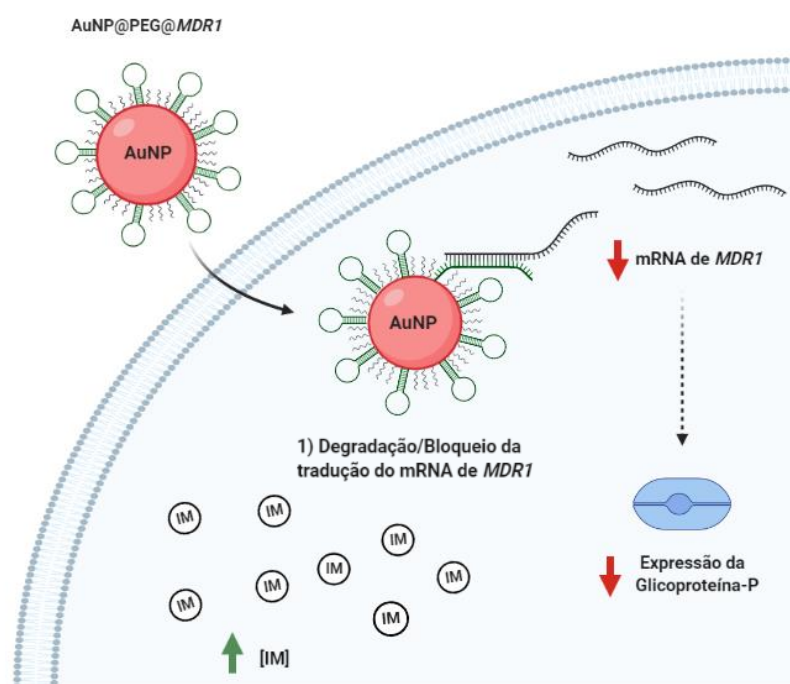
A**B**

Figura 1.3 - Esquemática da hipótese do silenciamento de *MDR1* *in vitro* com nanoconjugados de ouro. (A) Células K562 resistentes a imatinib (K562-IM) sobreexpressam glicoproteína-P (P-gp), uma bomba de efluxo capaz de expulsar o imatinib (IM) para fora da célula, diminuindo a concentração intracelular do fármaco para níveis subtóxicos. **(B)** Células K562-IM expostas a nanopartículas de ouro funcionalizadas com polietilenoglicol (PEG) e um oligonucleotídeo complementar ao mRNA de *MDR1* (AuNPs@PEG@MDR1), podem levar a uma diminuição da expressão do mRNA de *MDR1* e consequentemente de P-gp. Assim, uma menor quantidade de proteína é translocada para a membrana plasmática, sendo espetável que a concentração de IM intracelular aumente e seja capaz de reverter o fenótipo de resistência. Figura criada com *BioRender.com*.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Todos os materiais, reagentes e equipamentos usados nesta tese estão apresentados nas tabelas 2.1 e 2.2. respetivamente. Todas as soluções foram preparadas em água Milli-Q 18.2 M Ω cm⁻¹ a 25 °C exceto quando mencionado o contrário.

Tabela 2.1- Lista de materiais e reagentes

Nome	Empresa	País
Acetato de etilo (CAS: 141-78-6)	Merck	Alemanha
Acetato de magnésio	Sigma-Aldrich	EUA
Ácido acético glacial (CAS 64-19-7 100063)	Merck	Alemanha
Ácido amino-hexanoico (CAS: 60-32-2)	Sigma-Aldrich	EUA
Ácido etilenodiaminotetracético, EDTA diNa salt.2aq (CAS: 6381-92-6)	Chem-Lab	Bélgica
Acrilamida-bisacrilamida 40% (37.5:1) (Nº Cat: 100638)	Merck	Alemanha
Agarose (CAS: 9012-36-6) (Nº Cat: MB02703)	NZYtech	Portugal
Anticorpo <i>anti-mouse</i> IgG HRP-linked (Nº Cat: 7076)	Cell Signaling Technology	Holanda
Anticorpo monoclonal <i>anti-MDR1</i> (D-11) (Nº Cat: sc-55510)	Santa Cruz Biotechnology	EUA
Anticorpo monoclonal <i>anti-β-Actina</i> (Nº Cat: A5441)	Sigma-Aldrich	EUA
Azul de bromofenol (CAS: 115-39-9)	Merck	Alemanha

<i>CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Prolifera- tion Assay</i> (Nº Cat: G3581)	Promega	EUA
Citrato de sódio tribásico dihidratado	Sigma-Aldrich	EUA
Cloreto de ouro (III) trihidratado (CAS: 16961-25-4)	Sigma-Aldrich	EUA
Cloreto de potássio	Merck	Alemanha
Cloreto de Sódio (CAS 7647-14-5)	Sigma-Aldrich	EUA
Clorofórmio (CAS: 67-66-3)	Carlo Erba	França
Coluna Illustra™ NAP™-5 Sephadex™ G-25 DNA Grade (Nº Cat: 17-0853-02)	GE Healthcare Life Sciences	EUA
Cuvettes de plástico, 67.742	Sarstedt	Alemanha
Dietilpirocarbonato, DEPC (CAS: 1609-47-8)	Sigma-Aldrich	EUA
Dimetilsulfóxido, DMSO (Nº Cat: D2650)	Sigma-Aldrich	EUA
Ditiotreitol, DTT (CAS: 3483-12-3)	Sigma-Aldrich	EUA
Dodecil sulfato de sódio, SDS (CAS: 151-21-3)	Merck	Alemanha
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , DMEM (Nº Cat: 41965-039)	TermoFisher Scientific	Reino Unido
Etanol	Sigma-Aldrich	EUA
Fluoreto de fenilmetilsulfonil, PMSF	Sigma-Aldrich	EUA
Fosfato de sódio dibásico (CAS: 7558-79-4)	Sigma-Aldrich	EUA
Fosfato de sódio monobásico mono-hidratado (CAS: 10049-21-5)	Merck	Alemanha
Frascos de cultura T25 cm²	SPL Life Sciences	Coreia do Sul
<i>GelRed® Nucleic Acid Gel Stain</i> (Nº Cat: 41003)	Biotium	EUA
Glicerol (CAS 56-81-5)	Amresco	EUA
Glicina (CAS 56-40-6)	Sigma-Aldrich	EUA
Hidróxido de Sódio (CAS: 1310-73-2)	Sigma-Aldrich	EUA
Inibidor de fosfatase, PhosStop (Nº Cat: 04 906 845 001)	Roche	Suíça

Inibidor de protease, cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EASYpack (Nº Cat: 05 892 791 001)	Roche	Suíça
Isopropanol (CAS: 67-63-0)	Chem-Lab	Bélgica
Leite magro em pó com 0% de matéria gorda	Régilait	França
Marcador de pesos moleculares, <i>GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Mix</i> (Nº Cat: SM0331)	ThermoFisher Scientific	EUA
Marcador de pesos moleculares, <i>NZYSymbol™ Protein Marker II</i> (Nº Cat: MB090)	NZYtech	Portugal
Membrana 0.45 µM PVDF Amersham™ Hybond™ (Nº Cat: 10600023)	GE Healthcare	EUA
Mesilato Imatinib (STI571) (Nº Cat: S1026)	Selleckchem	Reino Unido
Metanol (CAS: 67-56-1)	Honeywell	Alemanha
NP-40 (CAS: 9016-45-9)	Sigma-Aldrich	EUA
NZYSol (Nº Cat: MB18501)	NZYtech	Portugal
O-(2-Mercaptoetil)-O'-metil-hexa(etilenoglicol), <i>mPEG tiol</i> (CAS: 651042-82-9)	Sigma-Aldrich	EUA
Oligonucleotídeo tiolado <i>anti-MDR1</i>	STABVIDA	Portugal
<i>One-step NZY RT-qPCR Green kit</i> (Nº Cat: MB343)	NZYtech	Portugal
Persulfato de amónia, APS (CAS: 7727-54-0)	Sigma-Aldrich	EUA
<i>Pierce 660nm Protein Assay Reagent</i> (Nº Cat: 1861426)	ThermoFisher Scientific	EUA
Placa de cultura celular de 24 poços e 96 poços	SPL Life Sciences	Coreia do Sul
<i>Ponceau S</i> (Nº Cat: 22001)	Biotium	EUA
<i>Pré-Diluted Protein Assays Standards: BSA</i> (Nº Cat: 23208)	ThermoFisher Scientific	EUA
<i>Primers 18S</i>	STABVIDA	Portugal
<i>Primers MDR1</i>	STABVIDA	Portugal
Soro Fetal Bovino, FBS	Invitrogen	EUA
Tariquidar (XR9576) (Nº Cat: S8028)	Selleckchem	Reino Unido

Tetrametiletenodiamina, TEMED (CAS: 110-18-9)	Amresco	EUA
Tris base (CAS: 77-86-1)	Fisher Bioreagents	EUA
<i>Trypan Blue Solution</i> , 0.4% (Nº Cat: 15250061)	ThermoFisher Scientific	EUA
Tween® 20 (CAS: 9005-64-5)	Sigma-Aldrich	EUA
WesternBright ECL Kit (Nº Cat: K-12045-D50)	Advansta	EUA

Tabela 2.2 – Lista de equipamentos

Nome	Empresa	País
Centrífuga 5424 R	Eppendorf	Alemanha
Centrífuga Sigma 1-14K	Sigma-Aldrich	Alemanha
Centrífuga Sigma 3-16K	Sigma-Aldrich	Alemanha
Espectrofotômetro Nanodrop ND-1000	Termo Fisher Scientific	EUA
Espectrofotômetro UVmini-1240	Shimadzu	Alemanha
Estufa de CO ₂	Electric Biomedical Co	Japão
Gel Doc™ EZ Imager	Bio-Rad	EUA
Hemocitómetro	Hirschmann	Alemanha
Leitor de Microplacas Tecan Infinite F200	Tecan	Suíça
Medidor de pH PH700 Benchtop pH Meter	Apera Instruments	Alemanha
Microscópio ótico invertido Eclipse Ti-U	Nikon TMS	Japão
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad	EUA
Rotor-Gene Q®	Qiagen	Alemanha
Sistema Eletroforese E Mini-PROTEAN®	Bio-Rad	EUA
Tina de eletroforese para DNA Mini-Sub®, Sub-Cell, ReadyAgarose™	Bio-Rad	EUA
Ultrassons, Elmasonic S10 H	Elma	Alemanha
Zetasizer NanoZS ZEN 3500	Malvern	Reino Unido

2.2. Métodos

2.2.1. Nanopartículas de ouro

2.2.1.1. Síntese

A síntese das AuNPs foi realizada pelo Lorenzo Rivas-García de acordo com o método de redução do citrato descrito por Lee e Meisel¹⁰⁹. Resumidamente, a 225 mL de uma solução de 1 mM cloreto de ouro (III) trihidratado em ebulição foram adicionados 25 mL de 38,8 M de citrato de sódio sob agitação. Quando uma cor vermelha intensa foi observada, indicando a formação de AuNPs, a solução foi deixada em agitação contínua e protegida da luz durante 20 minutos e posteriormente deixou-se arrefecer até atingir a temperatura ambiente. As AuNPs foram filtradas e armazenadas à temperatura ambiente.

As AuNPs foram posteriormente caracterizadas por espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis) e *Dynamic Light Scattering* (DLS) conforme descrito na subsecção 2.2.1.4. (*Caracterização*).

2.2.1.2. Funcionalização com polietilenoglicol

As AuNPs foram funcionalizadas com O-(2-Mercaptoetil)-O'-metil-hexa(etilenoglicol) (*m*PEG tiol, C₁₅H₃₂O₇S: 356,48 g/mol) (AuNPs@PEG) de modo a atingir uma cobertura de cerca de 30% PEG à superfície das AuNPs. Para isso, 10 nM de AuNPs foram incubadas com 0,003 mg/mL de *m*PEG tiol e 0,028% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*) durante 10 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi incubada durante a noite à temperatura ambiente e em agitação. Posteriormente, de modo a remover todas as cadeias de PEG que não ficaram ligadas, as AuNPs@PEG foram centrifugadas a 14 000 x g durante 30 minutos a 4 °C (Sigma 3-16K rotor 12154) e o sedimento foi ressuspensionado em água tratada com 0.1% (p/v) dietilpirocarbonato (DEPC). Este processo foi realizado três vezes.

As AuNPs@PEG foram caracterizadas por espectroscopia de UV-Vis e DLS conforme descrito na subsecção 2.2.1.4. (*Caracterização*).

2.2.1.3. Funcionalização das AuNPs@PEG com o oligonucleotídeo ssDNA tiolado

As AuNPs@PEG foram funcionalizadas com um oligonucleotídeo ssDNA complementar ao mRNA do gene *MDR1* (AuNPs@PEG@MDR1). Este oligonucleotídeo foi desenhado para adotar uma conformação em *hairpin* e foi modificado com um grupo tiol-C6 na extremidade 5'. Sequência anti-*MDR1*: 5'- TTTTCGGTTCAAGATCCATCCCGACCTCGCGCCGAAA - 3'.

O oligonucleotídeo tiolado foi ressuspensionado em 1 mL de 0,1 M de ditioneitol (DTT) e incubado durante 3 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, o DTT foi removido por adição de uma solução de acetato de etilo seguido de centrifugação a 21 130 x g durante 5 minutos à temperatura ambiente (5424 R, Eppendorf). Este passo foi realizado 5 vezes. Seguidamente, a fase aquosa foi purificada na coluna Illustra™ NAP™-5 Sephadex™ G-25 DNA

Grade usando 10 mM de tampão fosfato pH 8 como eluente. De seguida, a quantidade de oligonucleotídeo foi quantificada por recurso ao espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop ND-1000.

Posteriormente, as AuNPs@PEG foram misturadas com o oligonucleotídeo numa proporção 1:200 (AuNP:oligonucleotídeo). De seguida, adicionou-se um volume específico da solução AGE I [2% (p/v) SDS, 10 mM tampão fosfato pH 8] de modo a atingir uma concentração final de 0,01 % (p/v) SDS, 10 mM de tampão fosfato pH 8. A mistura foi sonicada durante 1 minuto num banho de ultrassons e incubada durante 20 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Seguidamente, adicionou-se sequencialmente volumes específicos da solução AGE II [1,5 M NaCl, 0,01 % (p/v) SDS, 10 mM tampão fosfato pH 8] de modo a aumentar a força iónica da solução (incrementos de NaCl foram adicionados de modo a atingir sequencialmente uma concentração final de 0,05 M, 0,1 M, 0,2 M e 0,3 M de NaCl, 0,01 % (p/v) SDS, 10 mM tampão fosfato pH 8). Após cada incremento, a mistura de AuNPs foi sonicada durante 1 minuto num banho de ultrassons e incubada durante 20 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. No último incremento, a mistura foi incubada durante a noite à temperatura ambiente e na ausência de luz.

No dia seguinte, a solução foi lavada três vezes com água tratada com 0,1 % (p/v) DEPC por centrifugação a 14 000 x g durante 45 minutos a 4 °C (Sigma 3-16K rotor 12154) de modo a remover o excesso de oligonucleotídeo que não ficou ligado às AuNPs. A quantidade de oligonucleotídeo presente nos sobrenadantes foi quantificada por recurso ao espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop ND-1000. Subtraindo a quantidade de oligonucleotídeo presente nos sobrenadantes à quantidade de oligonucleotídeo adicionado, estimou-se o número de oligonucleotídeos que ficaram ligados à AuNP.

As AuNPs@PEG@MDR1 foram posteriormente caracterizadas por espectroscopia de UV-Vis e DLS conforme descrito na subsecção 2.2.1.4. (*Caracterização*).

2.2.1.4. Caracterização

Todas as tipologias de AuNPs foram caracterizadas por UV-Vis e DLS.

Os espectros de absorção UV-Vis foram adquiridos à temperatura ambiente no espectrofotómetro UVmini-1240 num intervalo 400-800 nm com cuvettes de plástico de 1 cm de percurso ótico. A concentração das AuNPs foi determinada usando a lei de *Lambert-Beer* assumindo um coeficiente de extinção molar para o máximo da banda de ressonância plasmónica de superfície (520 nm) de $2,33 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ¹³⁹.

O diâmetro hidrodinâmico das AuNPs foi determinado por DLS usando o Zetasizer NanoZS ZEN 3500 a 25 °C (procedimento realizado pela Nano4Global). As formulações de AuNPs foram diluídas para uma concentração final de 1 nM antes da análise. Foram realizadas três medições para cada amostra.

2.2.2. Cultura Celular

Neste trabalho foram usadas linhas celulares humanas de leucemia mieloide crónica obtidas a partir da *American Type Culture Collection* (ATCC®, Manassas, VA, USA).

A linha celular imortalizada K562 (ATCC® CCL-243™) é derivada de uma doente do sexo feminino com 53 anos e com LMC em crise blástica (linha celular positiva para o transcrito de fusão *BCR-ABL1* e14a2)¹⁴⁰.

Células K562 resistentes a IM (K562-IM) foram derivadas de células K562 sensíveis por adição de concentrações crescentes de IM ao longo de cada passagem, até uma concentração final de 1 µM (este procedimento foi realizado pela Dra. Catarina Roma-Rodrigues).

As células K562 e K562-IM foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% (v/v) soro fetal bovino (FBS, e uma mistura de 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Pen-Strep) e mantidas num frasco de cultura de 25 cm² a 37 °C com 5% (v/v) CO₂ e 99% (v/v) de humidade relativa até atingirem a confluência pretendida. A confluência das células foi avaliada periodicamente por recurso ao microscópio ótico invertido (Nikon TMS, Nikon Instruments).

Semanalmente, as culturas celulares foram analisadas por possível contaminação com micoplasma. Este controlo de qualidade foi realizado por PCR e/ou marcação com Hoescht pela Dra. Catarina Roma-Rodrigues ou Daniela Ferreira.

2.2.2.1. Ensaios de viabilidade celular

Para avaliação da viabilidade celular foi realizado o ensaio padrão 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazólio (MTS).

Para a realização deste ensaio foi utilizado o kit *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* que é composto por dois reagentes: o MTS e o etossulfato de fenazina (PES)¹⁴¹. Em células viáveis, o reagente de MTS, de coloração amarela, é reduzido pelo PES, levando à formação de formazano na mitocôndria, um produto colorido que absorve a 490 nm. Deste modo, a quantidade de formazano produzida pode ser quantificada pela medição da absorvância a 490 nm que é diretamente proporcional ao número de células viáveis na cultura (método indireto)¹⁴¹.

Para estes ensaios, células K562-IM foram cultivadas em placas de 96 poços com uma densidade celular de 2×10^4 células por poço (volume final = 100 µL) e incubadas com 0,52 nM de AuNPs@PEG@MDR1, correspondendo a 30 nM de oligonucleotídeo (rácio Au:oligonucleotídeo =1:58); ou com 1-24 µM de IM sozinho ou em conjunto com 0,52 nM AuNPs@PEG@MDR1. Como controlo, foram cultivadas células K562-IM expostas aos solventes usados nas condições de tratamento na mesma proporção [água tratada com 0,1% (p/v) DEPC (controlo para as AuNPs) e/ou DMSO (controlo para o IM)]; e células expostas a 0,52 nM AuNP@PEG (veículo controlo). As células foram incubadas a 37 °C com 5% (v/v) CO₂ e 99% (v/v) de humidade relativa durante 24 ou 48 horas

Após o período de incubação desejado, 20 µL da solução de MTS foi adicionado a cada poço. Posteriormente, a placa foi incubada a 37 °C com 5% (v/v) CO₂ e 99% (v/v) de humidade relativa durante 1 hora e 30 minutos. De seguida, a absorvância a 490 nm foi medida no leitor de microplacas *Tecan Infinite M200*, e os valores foram corrigidos para o branco (sem células). A viabilidade celular foi calculada de acordo com a **equação 2.1**.

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{\text{média da Abs}_{490\text{nm}} \text{ corrigida amostra}}{\text{média da Abs}_{490\text{nm}} \text{ corrigida do controlo}} \times 100 \quad (\text{Equação 2.1})$$

O valor de IC₅₀ do IM também determinado por recurso ao ensaio de MTS após exposição de células K562-IM a concentrações crescentes de IM (1-100 µM) durante 24 ou 48 horas.

2.2.2.2. Ensaios de silenciamento *in vitro*

Para os ensaios de silenciamento *in vitro*, células K562-IM foram cultivadas em placas de 24 poços com uma densidade celular de 1 x 10⁵ células por poço (volume final = 500 µL) e incubadas com 0,52 nM de AuNPs@PEG@MDR1, correspondendo a 30 nM de oligonucleotídeo (rácio AuNP:oligonucleotídeos =1:58). Como controlo, foram cultivadas células expostas a água tratada com 0,1% (p/v) DEPC na proporção usada na condição tratada com AuNPs; e células expostas a 0,52 nM AuNP@PEG (veículo controlo). Diferentes tempos de incubação foram testados (14, 24, 48 ou 72 horas).

Para análise da expressão génica de *MDR1*, após o período de incubação pretendido, o RNA total foi isolado como descrito na subsecção 2.2.3.1. (*Isolamento do RNA total*) e subsequentemente a expressão relativa do mRNA de *MDR1* foi avaliada por RT-qPCR como descrito na subsecção 2.2.3.2. (*Análise da expressão génica por RT-qPCR*).

Para análise da expressão de glicoproteína-P, após 48 horas de incubação, procedeu-se à extração de proteína como descrito na subsecção 2.2.3.3 (*Isolamento da proteína*) e subsequentemente realizou-se a técnica de *Western Blot* como descrito na subsecção 2.2.3.4 (*Western Blot*).

2.2.3. Biologia Molecular

2.2.3.1. Isolamento do RNA total

Primeiramente, cada amostra foi centrifugada a 500 x g durante 5 minutos à temperatura ambiente (Sigma 1-14K) e o sobrenadante foi removido. De seguida, as células foram lisadas com NZYol e incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se clorofórmio, agitou-se vigorosamente as amostras durante 15 segundos e incubou-se as mesmas durante 3 minutos à temperatura ambiente. Para promover uma separação em três fases (fase orgânica, interfase e fase aquosa), as amostras foram centrifugadas a 12 000 x g durante 15 minutos à temperatura ambiente (Sigma 1-14K) e de seguida, a fase aquosa foi transferida com muito cuidado para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Posteriormente, precipitou-se o RNA com álcool isopropílico frio e incubou-se durante a noite a - 20 °C. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 12 000 x g durante 10 minutos a 4 °C (Sigma 3-16K rotor 12154) e o sobrenadante foi removido. De seguida, o sedimento foi lavado com 75 % (v/v) etanol frio e centrifugado a 12 000 x g durante 5 minutos a 4 °C (Sigma 3-16K rotor 12154). O sobrenadante foi removido e o sedimento foi deixado a secar ao ar durante 10 minutos. Seguidamente, ressuspendeu-se o sedimento em água tratada com 0,1 % (p/v) DEPC e incubou-se durante 10 minutos a 60 °C. O RNA foi armazenado a - 80 °C até ser usado.

A concentração e a pureza (Abs_{260nm}/Abs_{280nm} e Abs_{260nm}/Abs_{230nm}) do RNA total extraído foram determinadas usando o espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop ND-1000.

2.2.3.2. Análise da expressão gênica por RT-qPCR

Células expostas a diferentes condições (sem tratamento, AuNPs@PEG ou AuNPs@PEG@MDR1) numa placa de 24 poços foram recolhidas após diferentes tempos de incubação (12, 24, 48 ou 72 horas). O RNA total foi isolado conforme descrito na subsecção 2.2.3.1. (*Isolamento do RNA total*).

Posteriormente, a expressão gênica foi avaliada por RT-qPCR usando o kit *One-step NZY RT-qPCR Green kit*. Os oligonucleotídeos iniciadores (designados de *primers*) usados encontram-se descritos na **tabela 2.3**. A mistura de PCR da reação de amplificação dos genes *18S* e *MDR1* otimizada incluiu: *one-step NZY qPCR Probe master mix* 1x, 0,4 uL/ amostra de *NZYRT mix*, 0,15 µM *primers* e RNA num volume de reação de 10 µL sob as seguintes condições: transcrição reversa a 50 °C durante 20 minutos; ativação da polimerase a 95 °C durante 10 minutos; 40 ciclos de 95 °C durante 30 segundos (desnaturação), 55 °C durante 15 segundos (*annealing*/extensão).

Os produtos da amplificação foram analisados através de uma eletroforese em gel com 2 % (p/v) de agarose em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x [40 mM Tris base, 20 mM ácido acético e 1 mM etilenodiamino tetra-acético (EDTA)] e *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain* com uma tensão elétrica constante de 80 V aplicada durante 1 hora.

Os dados obtidos por RT-qPCR foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ¹⁴², onde a expressão relativa do gene é dada pela quantificação do gene de interesse (*MDR1*) em relação ao gene de controlo interno (*18S*), normalizando para a condição controlo (células expostas a AuNPs@PEG):

$$\Delta C_t = C_{t_{MDR1}} - C_{t_{18S}} \quad (\text{Equação 2.3})$$

$$\Delta\Delta C_t = C_{t_{AuNPs@PEG@MDR1}} - C_{t_{AuNPs@PEG}} \quad (\text{Equação 2.4})$$

Tabela 2.3 - Lista de primers usados nas reações de RT-qPCR. Fw - Forward. Rv - Reverse.

Gene	Sequência (5'-3')	Tamanho do produto de PCR
<i>MDR1</i>	Fw 5' TTGAAATGAAAATGTTGTCTGG	110 bp
	Rv 5' CAAAGAAACAACGGTTCGG	
<i>18S</i>	Fw 5' GTAACCCGTTGAACCCCAT	151 bp
	Rv 5' CCATCCAATCGGTAGTAGCG	

2.2.3.3. Isolamento da proteína

Cada amostra foi centrifugada a 500 x g durante 5 minutos à temperatura ambiente (Sigma 1-14K) e o sobrenadante foi removido. De seguida, as amostras foram lavadas com tampão de fosfato salino (PBS) 1x (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*) e centrifugadas a 750 x g

durante 5 minutos a 4 °C (Sigma 3-16K rotor 12154). O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em tampão de lise NaCl-Tris-EDTA 4x [150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA, 2% (p/v) NP-40, inibidores de proteases 1x (cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EASYpack), inibidores de fosfatases 1x (PhosSTOP™), 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 0,1 % (p/v) DTT] e armazenadas durante a noite a - 80 °C. Posteriormente, as amostras foram submetidas a 6 pulsos contínuos num banho de ultrassons em gelo durante 2 minutos e 30 segundos, com pausas de 30 segundos em gelo. De seguida, os lisados celulares foram centrifugados a 8 000 x g durante 10 minutos a 4 °C (Sigma 3-16K rotor 12154) e o sobrenadante foi recuperado.

A quantificação da proteína foi determinada usando o *Pierce 660nm Protein Assay Reagent kit* de acordo com as instruções descritas pelo fornecedor ¹⁴³.

2.2.3.4. Western Blot

Após quantificação da proteína como descrito na subsecção 2.2.3.3 (*Isolamento da proteína*), 30 µg de proteína foram transferidos para um novo tubo de microcentrifuga, juntamente com uma solução de *Loading Buffer* [SDS 4x; 3% (p/v) DTT] e incubou-se as amostras durante 2 horas à temperatura ambiente.

Posteriormente, os extratos proteicos foram fervidos a 95 °C durante 5 minutos e de seguida adicionou-se 3 % (p/v) DTT a todas as amostras. De seguida, 30 µg de proteína total por poço foram separadas por SDS-PAGE num gel de 8% (p/v) acrilamida-bisacrilamida (37.5:1). Foi também aplicado no gel um marcador de pesos moleculares (NZYColour Protein Marker II). As proteínas foram separadas durante 1 hora e 30 minutos a 100 V num tampão Tris-Glicina no sistema de eletroforese E Mini-PROTEAN®.

De seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana 0,45 µm PVDF Amersham™ Hybond™ durante 1 hora e 15 minutos e uma corrente constante de 130 mA usando um sistema de transferência semi-seco.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada com uma solução de leite 5% (p/v) em tampão Tris salino-Tween-20 (TBS-T) 1x [100 mM Tris, 0,9 % (p/v) NaCl e 0,1% (v/v) de Tween-20, pH = 7,5] durante 2 horas à temperatura ambiente sob agitação. De seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário *anti-MDR1* (1:500) (sc-55510) durante a noite a 4 °C. No dia seguinte, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T 1x e incubadas com o anticorpo secundário *anti-mouse IgG HRP-linked* (1:3000) (7076) durante 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. De seguida, a membrana foi novamente três vezes com TBS-T 1x.

A membrana foi revelada utilizando o WesternBright ECL. Preparou-se uma solução de 1,5 mL com peróxido de rabano e reagente de ECL (1:1), e de seguida, cobriu-se a membrana com a solução preparada durante 5 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Posteriormente, um filme foi exposto à membrana numa câmara escura.

Posteriormente, para normalizar os resultados procedeu-se à realização do controlo contra a proteína β-actina. De modo a remover as ligações específicas dos anticorpos, a membrana foi incubada três vezes com tampão de *stripping* (0,1 M glicina, 20 mM acetato de magnésio, 50 mM cloreto de potássio) durante 10 minutos sob agitação. De seguida, a membrana foi

novamente bloqueada com a solução de leite 5% (p/v) em TBS-T 1x durante a noite a 4 °C. No dia seguinte, incubou-se a membrana com o anticorpo primário *anti-β actina* (1:5000) (Sigma-Aldrich) durante 1 hora à temperatura ambiente sob agitação e de seguida com o anticorpo secundário *anti-mouse* IgG HRP-linked (1:3000) (7076) nas mesmas condições. Posteriormente, a membrana foi revelada usando o WesternBright ECL nas mesmas condições descritas acima.

A quantificação das bandas de proteína foi realizada por recurso ao programa *ImageJ*.

2.2.4. Análise Estatística

Todos os dados apresentados foram expressos como média (quando apenas uma experiência foi realizada) ou média $\pm$ desvio padrão (quando mais do que uma experiência independente foi realizada).

A análise estatística foi realizada por recurso ao programa Graph Pad Prism 8.0.2. A significância estatística dos dados das figuras 3.3, 3.7 e 3.8 foi analisada através do teste t de Student (*Student's t-test*). As diferenças entre as médias dos grupos analisados foram determinadas com um intervalo de confiança de 95%. Resultados com um *p-value* < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Sobreexpressão de glicoproteína-P em células K562 resistentes a imatinib

A sobreexpressão da P-gp em tecidos tumorais constitui um dos mecanismos de multirresistência mais comuns desenvolvidos pelas células cancerígenas para escapar à morte induzida pela quimioterapia, estando relacionada com a falha terapêutica num número considerável de neoplasias, incluindo leucemias ^{44,78,86,87}. Particularmente, no que diz respeito à LMC, diversos estudos têm relacionado a sobreexpressão da P-gp como um dos mecanismos de resistência ao IM ^{85,88}.

Para estudar *in vitro* novas estratégias terapêuticas para combater a MDR na LMC, células K562 resistentes a imatinib (K562-IM) foram derivadas de células K562 sensíveis por adição de concentrações crescentes de IM ao longo de cada passagem, até uma concentração final de 1 μM (este procedimento realizado pela Dra. Catarina Roma-Rodrigues).

A aquisição de resistência ao IM foi averiguada pela comparação do valor de IC_{50} do IM em células K562-IM e células K562 sensíveis através do ensaio de MTS. Os resultados obtidos revelam que, enquanto as células K562-IM necessitam de uma concentração do fármaco de 11,27 μM para levar a uma redução na viabilidade celular de 50% após 48 horas de exposição, as células K562 sensíveis necessitam de uma concentração muito inferior, de 0,22 μM ⁹³, para levar à mesma resposta celular (**Tabela 3.1**). Assim, o valor de IC_{50} do IM parece ser cerca de 50x superior em células K562-IM em relação a células K562 sensíveis, demonstrando a tolerância ao IM adquirida pelas células K562-IM.

Tabela 3.1 - IC₅₀ do imatinib (IM) em células K562 sensíveis e células K562 resistentes (K562-IM). O IC₅₀ do IM após 48 horas de exposição foi determinado a partir do gráfico dose-resposta obtido com recurso ao programa *Graph Pad Prism 8.0.2* (figura I.1 - apêndice). *resultados obtidos anteriormente no laboratório pela Dra. Raquel Vinhas⁹³. IC₅₀: concentração de fármaco necessária para uma inibição de 50%.

	Tempo de exposição (horas)	K562 sensíveis (K562)*	K562 resistentes (K562-IM)
IC ₅₀ Imatinib (μM)	48	0,22 ⁹³	11,27 ± 2,31

De seguida, a expressão de P-gp em células K562-IM e células K562 sensíveis foi avaliada por *Western Blot*. Tal como esperado, os resultados obtidos parecem indicar que a P-gp se encontra sobreexpressa nas células K562-IM em relação às células K562 sensíveis ao IM (**Figura 3.1**), demonstrando que a tolerância das células K562-IM ao IM pode estar associada ao aumento da expressão de P-gp.

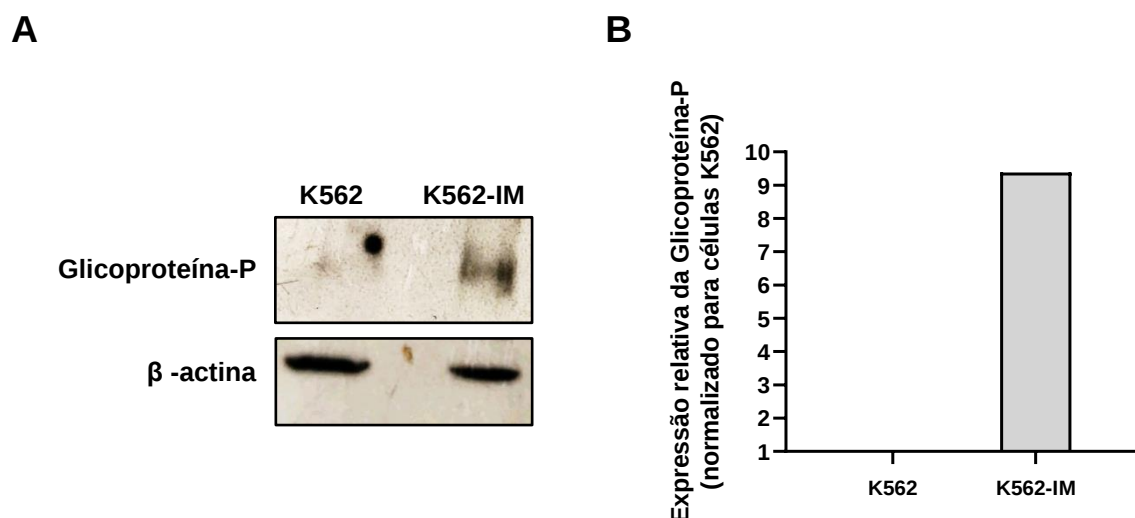


Figura 3.1 - Sobreexpressão de glicoproteína-P em células de leucemia mieloide crónica resistentes a imatinib. (A) Expressão de glicoproteína-P (170 kDa) e β-actina (42 kDa) em células K562 sensíveis e K562 resistentes a IM (K562-IM). (B) Expressão relativa da glicoproteína-P. A quantificação das bandas foi primeiro normalizada contra a β-actina e, posteriormente, contra as células K562 (=1). Os dados correspondem à média de uma experiência independente.

Assim, a linha celular K562-IM foi utilizada ao longo do presente projeto para estudar daqui em diante *in vitro* uma estratégia terapêutica para combater a resistência a múltiplos fármacos na LMC, tendo como alvo a P-gp.

3.2. Caracterização dos nanoconjugados de ouro para silenciamento génico

A combinação da quimioterapia tradicional com abordagens que visam o silenciamento génico pode auxiliar a morte celular das células cancerígenas. A terapia génica com ASOs é uma das estratégias usadas para promover a diminuição da expressão de uma proteína de interesse por bloqueio da tradução e/ou degradação dos híbridos de DNA-RNA ¹²⁷. No entanto, apesar dos ácidos nucleicos fornecerem ferramentas terapêuticas promissoras são naturalmente suscetíveis à degradação enzimática, além de apresentarem baixa penetração intracelular ^{94,95}. O surgimento da nanovetorização (e.g. AuNPs) tem beneficiado o silenciamento génico mediado por ASOs ^{94,95}.

Assim, tendo em vista a funcionalização de AuNPs que visam o silenciamento de *MDR1*, o primeiro passo consistiu em desenhar uma sequência de ssDNA complementar ao mRNA de *MDR1*. Para silenciamento génico, as AuNPs devem ser estáveis em condições biológicas e, para atender esse requisito, AuNPs previamente sintetizadas foram posteriormente funcionalizadas com PEG (AuNPs@PEG). Trabalhos anteriores mostraram que uma cobertura de 30% de PEG à superfície das AuNPs é suficiente para manter a estabilidade e impedir a sua agregação, possibilitando ainda a conjugação posterior com outras biomoléculas ¹⁴⁴. Seguidamente, as AuNPs@PEG foram funcionalizadas com o ASO (AuNPs@PEG@MDR1). Todas as tipologias de AuNPs foram caracterizadas por espectroscopia UV-Vis e DLS de modo a averiguar se as etapas de funcionalização foram bem-sucedidas.

3.2.1. Projecção e análise da sequência ssDNA

O desenho da sequência de ssDNA complementar à sequência de mRNA do gene *MDR1* teve em consideração diversos fatores.

Primeiramente, selecionou-se uma sequência de ssDNA complementar e específica para o gene de interesse. Com base na literatura, a sequência de ssDNA 5'-TTCAAGATCCATCCCGACCTCGCG-3' é descrita por vários autores como ser capaz de promover silenciamento do gene *MDR1* ¹⁴⁵⁻¹⁴⁹. Adicionalmente, a análise no programa BLAST (GenBank: AF016535.1) permitiu confirmar que a sequência tem 100% homologia apenas com o gene de interesse, tendo por isso sido a sequência eleita.

Posteriormente, uma região palindrômica foi adicionada a ambas as extremidades do oligonucleotídeo ssDNA selecionado anteriormente de modo a promover uma conformação em *hairpin*. A formação desta estrutura permite que o *hairpin* só tenha tendência a abrir caso encontre o seu alvo complementar, aumentando assim a especificidade da sonda para o alvo. Experiências *in silico* foram realizadas no programa NUPACK e a sequência final projetada foi 5'-TTTCGGTTTCAAGATCCATCCCGACCTCGCGCCGAAA-3' (a sequência palindrômica encontra-se sublinhada). Os resultados revelam que a sequência palindrômica adicionada promove a formação de uma estrutura em *hairpin* perfeita evitando uma hibridação interna (complementaridade entre a região palindrômica e a sequência complementar ao alvo) (Figura II.1. - apêndice). Adicionalmente, a variação da energia livre de Gibbs (ΔG) também

fornece informações que o *hairpin* projetado irá provavelmente abrir na presença do alvo complementar, uma vez que a $\Delta G_{\text{hairpin aberto/alvo}} = -34,78 \text{ kcal/mol}$ enquanto que a $\Delta G_{\text{hairpin fechado/sem alvo}} = -2,75 \text{ kcal/mol}$ (**Figura II.1. – apêndice**). A sequência final foi ainda analisada no programa BLAST (GenBank: AF016535.1) e não mostrou homologia com nenhum gene, além do *MDR1*.

Adicionalmente, o oligonucleotídeo ssDNA foi ainda modificado quimicamente por adição de um grupo tiol à sua extremidade 5', uma vez que o ouro tem elevada afinidade para os átomos de enxofre, formando uma ligação quase covalente ⁹⁴. Assim, a ligação Au-S consiste num método forte e eficaz para ancorar os oligonucleotídeos à superfície da AuNP ⁹⁴.

3.2.2. Caracterização dos nanoconjugados de ouro

Devido à banda de ressonância plasmónica de superfície localizada (LSPR, do inglês *localized surface plasmon resonance*) característica das AuNPs, a espectroscopia UV-Vis consiste numa técnica muito útil que permite avaliar o sucesso das etapas de funcionalização das AuNPs. O espectro LSPR é influenciado por mudanças na forma ou tamanho das NPs ¹¹⁵, distância interpartículas ¹¹⁶ ou constante dielétrica do meio circundante ¹¹⁷. Os valores do máximo de absorção são uma característica da absorvância da SPR das AuNPs esféricas induzidas pela interação entre a luz incidente e os eletrões de condução da NP metálica esférica ¹⁵⁰. Por outro lado, a técnica de DLS permite determinar o tamanho médio geral da partícula, tendo em consideração o núcleo inorgânico das AuNPs e a camada de revestimento orgânica, possibilitando avaliar modificações à superfície das AuNPs e apoiar os resultados obtidos pela espectroscopia UV-Vis ¹⁵¹.

A solução de AuNPs utilizada apresentou uma coloração vermelha intensa e uma banda LSPR estreita e bem definida com um máximo de absorção centrado a 519 nm (**Figura 3.2 – A e B**). O perfil da banda LSPR e o seu máximo de absorção não alteraram desde a altura da sua síntese sugerindo a manutenção da estabilidade da solução. Adicionalmente, os dados obtidos por DLS mostram que o diâmetro hidrodinâmico das AuNPs é de $12 \pm 3,7 \text{ nm}$. Os resultados obtidos vão de encontro ao que seria espectável, uma vez que o diâmetro esperado após a síntese de AuNPs com o método utilizado é de 14 nm e uma solução coloidal de AuNPs esféricas de tamanho inferior a 40 nm deve apresentar um pico SPR em torno dos 520 nm ^{106,152}.

Após a funcionalização das AuNPs com PEG, observa-se um desvio do pico SPR para 520 nm (**Figura 3.2 – A e Tabela 3.2 – A**), o que está de acordo com estudos anteriores ⁹³. O deslocamento do pico SPR para a região azul/vermelha do espectro pode ser consequência de uma diminuição/ aumento do índice de refração em torno das AuNPs ¹⁵⁰. Assim, a conjugação do PEG à superfície da AuNPs pode alterar o ambiente dielétrico do meio circundante (aumento do índice de refração local na superfície da AuNP), podendo justificar o desvio observado e ser uma indicação do sucesso da peguilação das AuNPs. Não obstante, como referido anteriormente, o espectro LSPR também é dependente do tamanho das AuNPs pelo que o desvio observado poderá resultar de uma seleção das AuNPs de maiores dimensões/ mais pesadas aquando das etapas de centrifugação que foram realizadas para remover o PEG que não ficou ligado às AuNPs. Os resultados obtidos pela técnica de DLS (**Figura 3.2 – B e Tabela**

3.2 - B) revelam um aumento do diâmetro hidrodinâmico das AuNPs@PEG em relação às AuNPs, o que também vai de encontro a estudos anteriormente publicados ⁹³. Deste modo, os resultados obtidos por espectroscopia de UV-Vis e DLS estão em concordância levando a crer que a etapa de peguilação foi bem-sucedida.

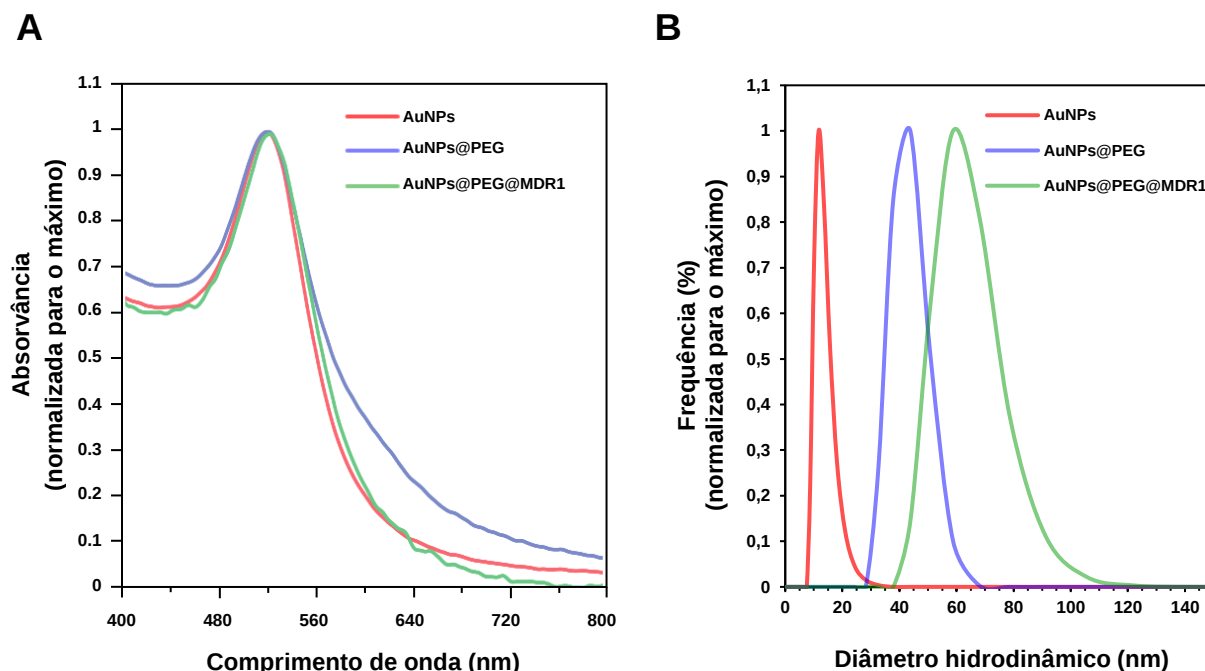


Figura 3.2 – Caracterização das AuNPs, AuNPs@PEG e AuNPs@PEG@MDR1 por espectroscopia UV-Vis e DLS. (A) Espectros de absorção UV-Vis das AuNPs (vermelho), AuNPs@PEG (azul) e AuNPs@PEG@MDR1 (verde) adquiridos à temperatura ambiente num intervalo 400-800 nm em *cuvettes* de plástico com 1 cm de percurso ótico. (B) Curva de distribuição representativa do diâmetro hidrodinâmico (nm) das AuNPs (vermelho), AuNPs@PEG (azul) e AuNPs@PEG@MDR1 (verde) obtidas por DLS.

Tabela 3.2 - Caracterização das AuNPs, AuNPs@PEG e AuNPs@PEG@MDR1 por espectroscopia UV-Vis e DLS. (A) Comprimento de onda correspondente ao máximo da banda de ressonância plasmônica de superfície (SPR, do inglês *surface plasmon resonance*), determinado calculando a primeira derivada do espectro no programa LabPlot (Figura III.1 – em apêndice). (B) Diâmetro hidrodinâmico (nm) das diferentes tipologias de AuNPs. Os valores apresentados correspondem ao diâmetro hidrodinâmico $\pm$ desvio padrão, calculado através da largura do pico.

A		B	
Pico SPR (nm)		Diâmetro hidrodinâmico (nm)	
AuNPs	519	AuNPs	12 $\pm$ 3,7
AuNPs@PEG	520	AuNPs@PEG	43 $\pm$ 6,3
AuNPs@PEG@MDR1	522	AuNPs@PEG@MDR1	63 $\pm$ 11,6

Após a funcionalização das AuNPs@PEG com os oligonucleotídeos ssDNA tiolados, observa-se um desvio do pico SPR para 522 nm (**Figura 3.2 - A e Tabela 3.2 - A**). Três passos de centrifugação foram realizados para remover os oligonucleotídeos que não ficaram ligados às AuNPs@PEG. A quantidade de oligonucleotídeos presentes no sobrenadante foi estimada medindo a absorção ótica do sobrenadante de DNA a 260 nm. Subtraindo a quantidade de oligonucleotídeos presentes no sobrenadante à quantidade de oligonucleotídeos adicionados,

estabeleceu-se o número de oligonucleotídeos que ficaram ligados à AuNP, resultando numa proporção de 1:58 (AuNP: oligonucleotídeos). Assim, é espectável que o desvio do pico SPR se deva à alteração do ambiente dielétrico do meio como resultado da conjugação dos oligonucleotídeos ssDNA às AuNPs. Resultados semelhantes já foram reportados na literatura^{93,124}. Os resultados obtidos pela técnica de DLS vão de encontro aos resultados anteriores e a trabalhos anteriormente publicados^{93,124}, mostrando uma aumento do diâmetro hidrodinâmico das AuNPs@PEG@MDR1 em relação às AuNPs@PEG (**Figura 3.2 - B e Tabela 3.2 - B**).

Deste modo, uma vez que os resultados obtidos mostram evidências de que as etapas de funcionalização foram bem-sucedidas, antes de se prosseguir para os ensaios de silenciamento, avaliou-se se o veículo usado para direcionar os oligonucleotídeos de ssDNA poderia apresentar citotoxicidade. Para isso, a viabilidade de células K562-IM após exposição a AuNPs@PEG (veículo controlo) ao longo do tempo foi avaliada por recurso ao ensaio de MTS. Os resultados obtidos revelam que células K562-IM sem tratamento e expostas a AuNPs@PEG não parecem apresentar diferenças significativas na percentagem de células viáveis, sugerindo que não apresentam toxicidade significativa para as células nos períodos de tempo testados (**Figura 3.3**). Estes resultados fornecem assim uma boa indicação para seu uso *in vitro*. Adicionalmente, trabalhos anteriores no laboratório desenvolvidos por Conde *et al.* permitiram uma avaliação toxicológica integrada de *nanobeacons* de ouro sintetizados de acordo com os mesmos procedimentos das AuNPs desenvolvidas neste projeto e concluíram que estes não exibem toxicidade significativa, o que é extremamente relevante quando traduzido num modelo *in vivo*¹³².

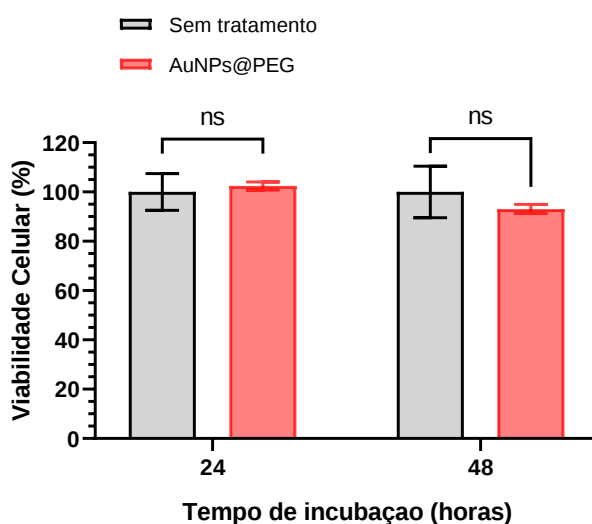


Figura 3.3 - Exposição de células K562-IM a AuNPs@PEG não parece induzir citotoxicidade ao longo do tempo. Viabilidade de células K562-IM após exposição a 0,52 nM de AuNPs@PEG durante 24 ou 48 horas. A viabilidade celular foi medida através do ensaio MTS. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de duas experiências independentes. Não foram observadas diferenças significativas entre a condição AuNPs@PEG e a condição controlo sem tratamento (ns: *p-value* > 0,05, *Student's t-test*)

3.3. Silenciamento de *MDR1* *in vitro* em células de leucemia mieloide crônica resistentes a imatinib

De modo a avaliar se os nanoconjugados de ouro são capazes de provocar o silenciamento *in vitro* do gene *MDR1* em células K562-IM, a expressão relativa de *MDR1* foi avaliada por RT-qPCR. Para isso, foi necessário primeiramente otimizar a reação de amplificação dos genes *MDR1* (gene alvo) e *18S* (controle endógeno utilizado para a quantificação relativa) por RT-qPCR e avaliar a eficiência das respectivas reações.

3.3.1. Otimização da reação de amplificação dos genes *18S* e *MDR1* por RT-qPCR

O sucesso de um PCR é altamente dependente da especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores (designados de *primers*) reconhecerem apenas a sua sequência alvo. Deste modo, é essencial otimizar esta interação molecular para garantir posteriormente uma análise correta por RT-qPCR. Nesse sentido, procedeu-se à otimização da reação de amplificação dos genes *18S* e *MDR1* por RT-qPCR alterando algumas condições da reação nomeadamente a temperatura de *annealing* (T_a), o tempo de *annealing* e o tempo de extensão. *18S* consiste num gene *housekeeping* cujo seu nível de expressão não difere entre as condições experimentais, tendo sido por isso utilizado como controle endógeno para permitir a normalização da expressão do gene alvo.

A capacidade dos *primers* hibridarem apenas com a sua sequência complementar perfeita ou de hibridarem também com outras sequências que não apresentam 100% de complementaridade é criticamente dependente da T_a ¹⁵³. Teoricamente, quanto mais elevada for a T_a maior a especificidade dos *primers* ou seja, maior a probabilidade de ocorrer apenas amplificação da sequência alvo¹⁵³. Por outro lado, quanto mais baixa for a T_a , maior a probabilidade de ocorrerem hibridações incompatíveis entre os *primers* e o *template* e consequentemente amplificação de produtos inespecíficos¹⁵³. Foram testadas T_a entre os 53-57 °C. Os resultados obtidos mostram que a partir de uma T_a de 57 °C e 55 °C deixam de se observar produtos inespecíficos para os genes *18S* e *MDR1* respetivamente (**Figura III.1 - apêndice**). Contudo, para facilitar o procedimento é preferível que o controle endógeno e o gene alvo possam ser analisados nas mesmas condições de reação. Deste modo, procurou-se otimizar a reação nesse sentido.

A T_a selecionada foi de 55 °C uma vez que, acima desta temperatura a reação de amplificação do gene *MDR1* revela-se bastante desfavorecida. Posteriormente, avaliou-se se o tempo de *annealing* poderia aumentar a especificidade da reação, testando por um período de 30 ou 15 segundos. Uma diminuição do tempo de *annealing* pode favorecer a especificidade da reação uma vez que a polimerase tem atividade à T_a selecionada pelo que, quanto maior o tempo da reação maior a probabilidade de amplificação de produtos inespecíficos¹⁵³. Os resultados obtidos revelam que a especificidade da reação melhorou com a redução do tempo de *annealing* para 15 segundos (**Figura III.2 - apêndice**). No entanto, para o gene *18S* ainda se

verifica a presença de produtos inespecíficos não estando por isso a reação de amplificação otimizada.

Por fim, uma vez que os produtos inespecíficos observados anteriormente apresentam peso molecular superior aos genes de interesse testou-se diferentes períodos de tempo de extensão a 72 °C nomeadamente 30, 15 ou 0 segundos (remoção da etapa de extensão). Os resultados obtidos mostram que a melhor condição e a que permitiu a otimização da reação de amplificação para ambos os genes foi quando se removeu a etapa de extensão (**Figura III.3 - apêndice**). A condição de RT-qPCR otimizada encontra-se apresentada na **Figura 3.4**.

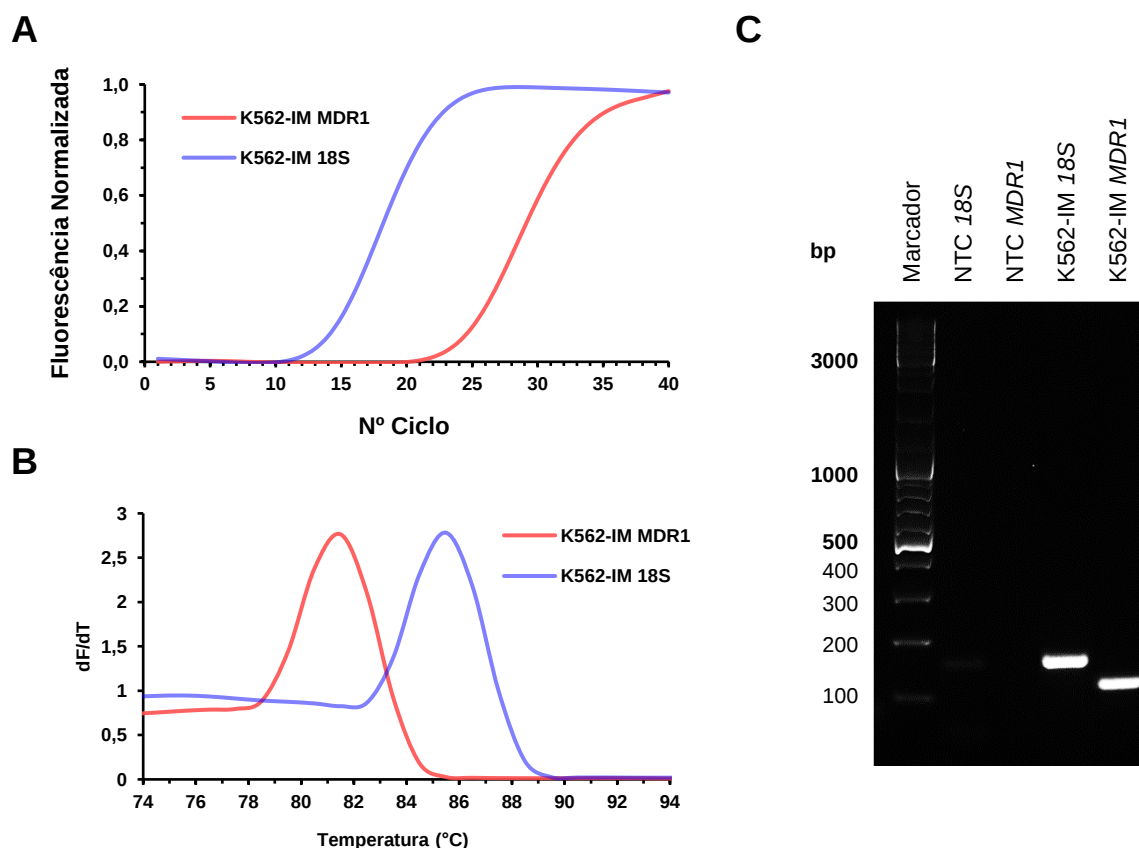


Figura 3.4 - Amplificação por RT-qPCR dos genes 18S (controlo endógeno) e MDR1 (gene alvo) nas linhagens celulares K562 e K562-IM. Curvas de amplificação (**A**) e curvas de *melting* (**B**) dos genes 18S e MDR1 obtidas por RT-qPCR. (**C**) Análise por eletroforese em gel de agarose 2% (p/v) dos produtos de amplificação dos genes 18S e MDR1 por RT-qPCR. O tamanho do produto esperado para o gene 18S e MDR1 é de 151 bp e 110 bp respetivamente. NTC (do inglês, *no template control*) - controlo negativo (sem RNA). Marcador - GeneRuler DNA Ladder Mix SM0331 (Thermo Scientific).

As eficiências de amplificação de ambos os genes foram determinadas e revelaram ser bastante semelhantes pelo que daqui em diante a expressão de mRNA de MDR1 foi calculada através de uma quantificação relativa com base no método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ¹⁵⁴.

3.3.2. Os nanoconjugados de ouro são capazes de silenciar *MDR1*

A análise por RT-qPCR revela que após 24 horas de exposição de células K562-IM a 0,52 nM de AuNPs@PEG@MDR1 (correspondendo a 30 nM de oligonucleotídeo) a expressão relativa do mRNA de *MDR1* diminuiu até atingir um mínimo às 48 horas, que corresponde a cerca de 45% de silenciamento (**Figura 3.5**). A diminuição da expressão de *MDR1* ao longo do tempo pode ser explicada pela internalização de um maior número de nanoconjugados com o tempo e pelo tempo necessário à ação do agente silenciador. Às 72 horas, a expressão de *MDR1* começa a ser restaurada, possivelmente devido à degradação de oligonucleotídeos ou expansão celular ao longo do tempo, o que diminui o rácio AuNP: célula no meio celular. Este efeito de silenciamento transitório já havia sido observado anteriormente com outros alvos biológicos ⁹³.

Em resumo, os nanoconjugados de ouro em estudo parecem ser capazes de provocar um silenciamento do gene *MDR1 in vitro*, sugerindo ser máximo após 48 horas de incubação. Estes resultados permitem ainda corroborar o sucesso das etapas de funcionalização das AuNPs.

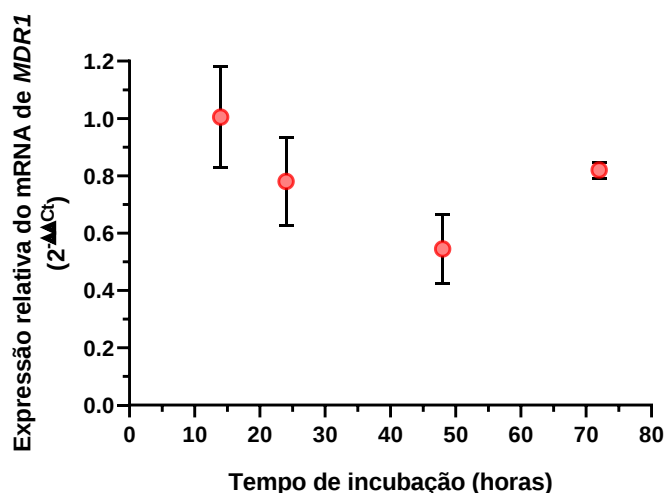


Figura 3.5 - Silenciamento *in vitro* do gene *MDR1* em células K562-IM usando AuNPs@PEG@MDR1. O gráfico representa a expressão relativa do mRNA de *MDR1* após exposição de células K562-IM a 0,52 nM de AuNPs@PEG@MDR1 (correspondendo a 30 nM de oligonucleotídeo) durante 14, 24, 48 ou 72 horas. Os dados foram normalizados para o gene *18S* (controlo endógeno) e posteriormente para células expostas a 0,52 nM de AuNPs@PEG (condição controlo). Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de duas experiências independentes. Ct – *threshold cycle*.

De forma a confirmar os resultados obtidos por RT-qPCR e averiguar o impacto do silenciamento de *MDR1* na expressão de P-gp após 48 horas de exposição aos nanoconjugados, foi realizada a técnica de *Western Blot*. Os resultados obtidos mostram que após exposição a AuNPs@PEG durante 48 horas a expressão da P-gp parece aumentar cerca de 30% (Figura 3.6). É descrito na literatura que a região promotora de *MDR1* contém vários locais para a ativação de fatores de transcrição, incluindo myc, Sp1, AP-1, NF- κ B, TCF (revisto em ¹⁵⁵), Sp3 ¹⁵⁶, OCT-4 / POU5F1 ¹⁵⁷ e PITX2 ^{158,159}, e que muitos dos fatores de transcrição mencionados são alterados em resposta ao stress, sendo *MDR1* altamente suscetível à regulação positiva

durante uma resposta ao stress ⁸¹. Assim, ainda que sejam necessárias mais experiências para verificar se o aumento de expressão observado após a incubação com AuNPs@PEG é estatisticamente significativo, uma possível justificação poderá dever-se ao facto das AuNPs, sendo um material estranho para as células, poderem induzir stress e consequentemente levarem à regulação positiva de P-gp como resposta celular. Por outro lado, após exposição a AuNPs@PEG@MDR1 durante 48 horas a expressão de P-gp parece diminuir cerca de 60% quando comparado com células incubadas com AuNPs@PEG (**Figura 3.6**). Estes resultados apoiam os resultados obtidos anteriormente por RT-qPCR evidenciando que além dos nanoconjugados exibirem efeito *in vitro* ao nível do mRNA também parecem apresentar efeito ao nível da proteína, diminuindo a sua expressão. No entanto, mais experiências independentes devem ser realizadas para obter resultados estatisticamente significativos que permitam corroborar esta afirmação e determinar com maior robustez a percentagem de redução da expressão de P-gp que se observa após 48 horas de exposição aos nanoconjugados de ouro. Adicionalmente, a expressão de P-gp após 72 e 96 horas de exposição aos nanoconjugados também poderia ser avaliada, uma vez que apesar do silenciamento máximo de *MDR1* ter-se observado após 48 horas de exposição, não é possível extrapolar que a expressão mínima de P-gp por ação dos nanoconjugados se observe nesse mesmo período de tempo. Por exemplo, Nieth *et al*, utilizando siRNAs, uma outra abordagem para silenciamento génico, observaram também o silenciamento máximo de *MDR1* após 48 horas de exposição contudo, o pico de redução da expressão da P-gp só foi observado mais tarde ¹⁶⁰.

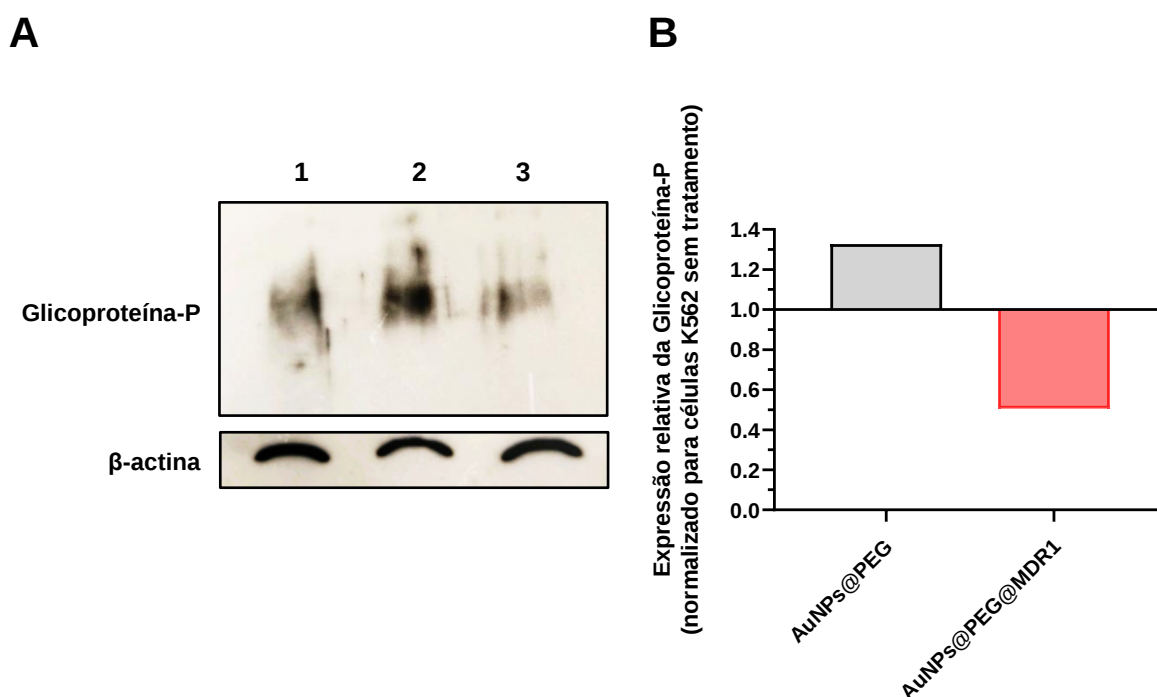


Figura 3.6 - Expressão de glicoproteína-P em células K562-IM após exposição aos nanoconjugados durante 48 horas. (A) Expressão de glicoproteína-P (170 kDa) e β-actina (42 kDa) em células K562-IM sem tratamento (1) e após exposição a 0,52 nM de AuNPs@PEG (2) ou 0,52 nM de AuNPs@PEG@MDR1 (correspondendo a 30 nM de oligonucleotídeo) (3) durante 48 horas. (B) Expressão relativa de glicoproteína-P. A quantificação das bandas foi primeiro normalizada contra a β-actina e, posteriormente, contra a células sem tratamento (valor representado pelo limiar). Os dados correspondem à média de uma experiência independente.

3.4. Viabilidade celular após exposição aos nanoconjugados de ouro em combinação com o imatinib

De modo a verificar se o silenciamento de *MDR1*/ diminuição da expressão de P-gp *in vitro* por ação dos nanoconjugados em combinação com as estratégias terapêuticas tradicionais de inibição da tirosina quinase poderiam aumentar a sensibilidade das células LMC resistentes, avaliou-se a viabilidade de células K562-IM após exposição aos nanoconjugados em combinação com o IM.

Uma vez que o silenciamento máximo de *MDR1* se observou após 48 horas de exposição (Figura 3.5), células K562-IM foram expostas simultaneamente aos nanoconjugados e ao IM durante esse período de tempo. Os resultados obtidos indicam que a combinação simultânea de AuNPs@PEG@MDR1 com o IM durante 48 horas não parece aumentar a sensibilidade de células K562-IM ao IM por comparação com a sua condição controlo (células K562-IM expostas a AuNPs@PEG + IM) (Figura 3.7). Perante estes resultados colocou-se a possibilidade de a combinação simultânea dos nanoconjugados com o IM não ser a estratégia mais eficaz para levar ao aumento da morte celular das células LMC resistentes, uma vez que estas não irão apresentar uma diminuição da expressão da P-gp aquando da administração do IM. Assim, colocou-se a hipótese de que uma primeira exposição aos nanoconjugados, de modo a permitir que as células ao fim desse período de tempo já apresentem uma expressão diminuída de mRNA de *MDR1*/ P-gp, seguida da exposição ao IM poderia resultar numa abordagem mais adequada.

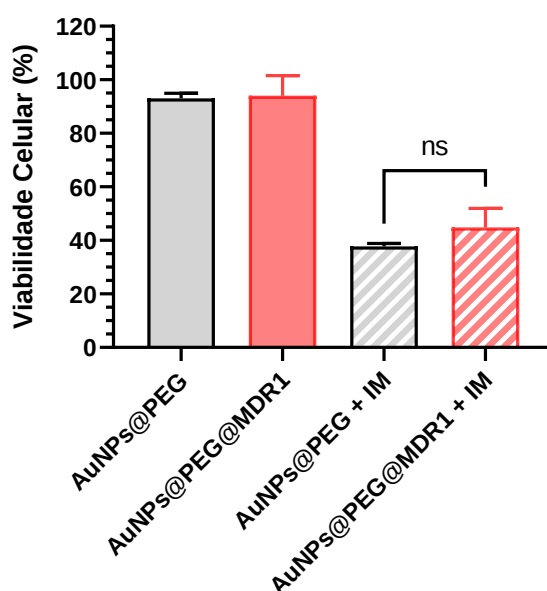


Figura 3.7 - Exposição de células K562-IM aos nanoconjugados em combinação simultânea com o imatinib (IM) durante 48 horas não parece aumentar a sensibilidade das células LMC resistentes ao IM. Viabilidade celular após exposição de células K562-IM a 0,52 nM de AuNPs@PEG e 0,52 nM de AuNPs@PEG@MDR1 (correspondendo a 30 nM de oligonucleotídeo) só ou em combinação simultânea com o IM, numa concentração correspondente ao valor de IC₅₀. A viabilidade celular foi medida através do ensaio MTS. Os dados apresentados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de duas experiências independentes. Não foram observadas diferenças significativas entre a condição AuNPs@PEG@MDR1 + IM e a sua condição controlo AuNPs@PEG + IM (ns: p -value > 0,05, Student's t -test).

De acordo com os resultados obtidos anteriormente por RT-qPCR, que indicam existir um silenciamento *in vitro* de cerca de 22% e 45% após 24 ou 48 horas de exposição aos nanoconjugados (**figura 3.5**), testou-se primeiramente incubar as células K562-IM apenas com os nanoconjugados durante 24 horas e de seguida, administrar o IM durante mais 24 horas, perfazendo um período de incubação total com os nanoconjugados de 48 horas, que corresponde ao tempo de silenciamento máximo de *MDR1*. A viabilidade celular foi avaliada por recurso ao ensaio de MTS. À semelhança do que se tinha verificado anteriormente, a combinação desfasada dos nanoconjugados com o IM também não parece aumentar a sensibilidade de células K562-IM ao TKI (**Figura 3.8**). Estes resultados sugerem que, nas condições testadas, os efeitos observados dos nanoconjugados ao nível da expressão do mRNA de *MDR1* e da P-gp parecem não ser suficientes para reverter a resistência das células. Contudo, mais experiências independentes devem ser realizadas para corroborar a afirmação anterior.

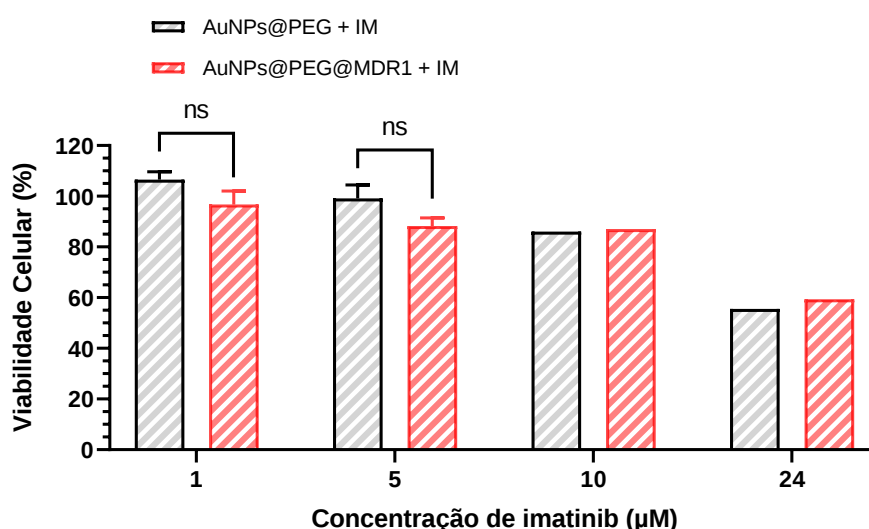


Figura 3.8 - Exposição de células K562-IM aos nanoconjugados durante 24 horas seguida da exposição ao imatinib (IM) durante mais 24 horas não parece aumentar a sensibilidade das células LMC resistentes ao IM. Viabilidade celular após exposição de células K562-IM a 0,52 nM de AuNPs@PEG e 0,52 nM de AuNPs@PEG@MDR1 (correspondendo a 30 nM de oligonucleotídeo) durante 24 horas e posteriormente ao IM (1-24 μM) durante mais 24 horas, perfazendo um período total de incubação com os nanoconjugados de 48 horas. A viabilidade celular foi medida através do ensaio MTS. Para os ensaios com 1 e 5 μM, os dados apresentados correspondem à média ± desvio padrão de duas experiências independentes. Não foram observadas diferenças significativas entre a condição AuNPs@PEG@MDR1 + IM e a sua condição controlo AuNPs@PEG + IM (ns: *p*-value > 0,05, Student's *t*-test). Para os ensaios com 10 e 24 μM, os dados apresentados correspondem à média de uma experiência independente.

Diversas hipóteses poderão justificar os resultados obtidos.

Tendo-se observado uma redução parcial (≈ 60%) da expressão de P-gp (**Figura 3.6**), a quantidade de P-gp remanescente à superfície da célula pode estar ativa e ser suficiente para bombear o IM para fora da célula, impossibilitando a reversão do fenótipo resistente. Na secção seguinte 4. (*Conclusão e Perspetivas futuras*) será proposto um ensaio para testar esta hipótese.

Contudo, e apesar de nenhum dos estudos ter utilizado células K562 resistentes ao IM, já foi descrito na literatura que ASOs direcionados a *MDR1*¹⁶¹, em particular à mesma sequência alvo que a utilizada neste trabalho^{145,148}, foram capazes de aumentar a sensibilidade de células tumorais resistentes à quimioterapia *in vitro*. Outros estudos descritos na literatura, foram capazes reverter a MDR com ASOs direcionados a *MDR1* e/ou outros alvos biológicos

críticos no desenvolvimento de multirresistência ^{146,162}. Por exemplo, Pakunlu *et al* utilizaram lipossomas encapsulados com doxorubicina e ASOs direcionados a *MDR1* e/ou *BCL-2* (elemento chave na defesa antiapoptótica da maioria das células tumorais) e demonstraram que a modulação simultânea da resistência celular com bomba e sem bomba aumenta a capacidade da doxorubicina induzir a apoptose em células cancerígenas de ovário humano (A2780/AD) e de mama (MCF-7/AD) multirresistentes a fármacos ¹⁴⁶. Yu-Li Lo *et al* foram pioneiros na inibição de vários genes envolvidos no desenvolvimento de multirresistência *in vivo* ao utilizar uma variedade de ASOs distintos, sendo estes direcionados a *MDR1*, *MRP1*, *MRP2* e *BCL-2/BCL-xL* ¹⁶². Usando esta "terapia combinada" e com recurso a um transportador lipossomal peguado para melhorar o direcionamento desses ASOs, conseguiram aumentar notavelmente a citotoxicidade do fármaco anticancerígeno epirrubicina em células CT26 (adenocarcinoma do cólon) ¹⁶². Na verdade, não se pode excluir a hipótese de que outros mecanismos alternativos à sobreexpressão da P-gp possam estar a ser utilizados pelas células K562-IM impossibilitando a reversão do fenótipo resistente. De forma semelhante ao que é observado durante o tratamento dos doentes ^{88,163}, as células resistentes que são selecionadas *in vitro* podem exibir múltiplos fenótipos de resistência que variam durante os diferentes estádios do processo de seleção ¹⁶⁴. Neste sentido, e como a linha celular utilizada neste trabalho resultou da seleção de células resistentes a doses progressivamente mais elevadas de IM, a resistência adquirida pelas células K562-IM pode não se dever exclusivamente à sobreexpressão da P-gp. Gromicho *et al* demonstraram que durante o desenvolvimento de resistência através da administração de doses crescentes de IM, células K562 sobreexpressaram vários transportadores como *ABCB1* (*MDR1*), *ABCC1* (*MRP1*), *ABCG2* (*BCRP*), *SLC22A1* e *MVP*) e que o padrão de expressão destes era dinâmico, variando com a exposição crónica ao medicamento ¹⁶⁵. Coerentemente, Berger *et al* mostraram que a exposição crónica ao IM leva a uma redução da concentração intracelular do fármaco pela indução das bombas de efluxo *ABCG2* (*BCRP*) e *ABCB1* (*MDR1*) ¹⁶⁶. Nesse sentido, a sobreexpressão de outros transportadores de efluxo, além da P-gp, pode estar a auxiliar a expulsão do IM impossibilitando a reversão da resistência. Adicionalmente, tem sido descrito na literatura que outros mecanismos alternativos envolvidos na multirresistência como a inibição da apoptose ¹⁶⁷ e a regulação negativa de transportadores de influxo (e.g. *OCT1*) ⁷⁹ também estão associados à resistência ao IM na LMC. Por outro lado, sendo a neoplasia em estudo a LMC, o desenvolvimento de mecanismos de resistência dependentes de *BCR-ABL1* como a sobreexpressão de *BCR-ABL1* e a aquisição de mutações pontuais em *BCR-ABL1* também podem auxiliar a manutenção da resistência das células K562-IM. Inclusivamente, estudos anteriormente desenvolvidos no laboratório por Vinhas *et al* mostraram que a tolerância das células K562-IM ao IM foi associada a um aumento da expressão de *BCR-ABL1* ⁹³. Assim, sendo a resistência resultado de uma rede complexa envolvendo múltiplos mecanismos celulares e moleculares que podem operar isoladamente ou em conjunto, em alguns casos, a sua resolução pode não ser conseguida contornando apenas uma proteína individual.

Para além da tecnologia com ASOs, o silenciamento de *MDR1* com siRNAs também já foi descrito na literatura como sendo capaz de reverter a resistência de células tumorais resistentes à quimioterapia ^{160,168}. Contudo, à semelhança do que foi observado nos estudos que

utilizaram ASOs ^{145,148,161}, o silenciamento com siRNAs apenas foi capaz reverter parcialmente a multirresistência *in vitro* ^{160,168}, provavelmente devido aos efeitos combinados de curta duração de ambas as moléculas terapêuticas e um tempo de semi-vida longo da P-gp (14-17 horas) ¹⁶⁹. Diferentes tecnologias de terapia genética têm diferentes pontos fortes e fracos, no entanto, o principal problema é que a maioria dos estudos ainda não passou as fases pré-clínicas.

CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Neste estudo, procurou-se aumentar a sensibilidade de células LMC resistentes ao IM (K562-IM) através da combinação das estratégias tradicionais de inibição da tirosina quinase com a nanovetorização de oligonucleotídeos ssDNA complementares ao mRNA de *MDR1*. *MDR1* codifica a P-gp, uma proteína envolvida no efluxo de uma variedade de fármacos incluindo o IM, e desempenha um papel predominante na aquisição de multirresistência constituindo um bom alvo terapêutico. A terapia génica com ASOs poderá levar ao silenciamento de *MDR1* e/ou diminuição da expressão da P-gp e resultar possivelmente num aumento da concentração intracelular de IM suficiente para reverter o fenótipo resistente.

AuNPs funcionalizadas com PEG e oligonucleotídeos ssDNA complementares ao mRNA de *MDR1* (rácio AuNP: oligonucleotídeos 1:58) mostraram silenciar *MDR1 in vitro*, uma vez que uma redução dos níveis de mRNA de *MDR1* foi observada. O silenciamento máximo de *MDR1* (cerca de 45%) foi observado após exposição aos nanoconjugados durante 48 horas. Adicionalmente, o efeito dos nanoconjugados pareceu também apresentar efeito ao nível da proteína, tendo-se verificado uma diminuição da expressão da P-gp (cerca de 60%). Contudo, mais experiências devem ser realizadas para obter resultados estatisticamente significativos que permitam determinar com maior robustez a percentagem de redução da expressão de P-gp observada. No entanto, apesar dos efeitos demonstrados ao nível do mRNA e da proteína, não foi possível observar uma reversão do fenótipo de resistência das células K562-IM aquando da sua exposição aos nanoconjugados e ao IM em simultâneo durante 48 horas ou desfasadamente, expondo as células primeiramente aos nanoconjugados durante 24 horas e de seguida ao IM durante mais 24 horas, perfazendo um período total de 48 horas.

Numa perspetiva futura, de modo a testar a possibilidade de a quantidade de P-gp remanescente à superfície da célula estar ativa e ser suficiente para bombear o IM para fora da célula impossibilitando a reversão do fenótipo resistente, poder-se-ia além de expor as células aos nanoconjugados e ao IM também expô-las a um inibidor potente e seletivo da P-gp (e.g. tariquidar). Ou seja, se bloqueando parte da P-gp remanescente com o seu inibidor seletivo se observasse um aumento da morte celular nas células K562-IM expostas a AuNPs@PEG@MDR1 + Inibidor P-gp + IM em comparação com a sua condição controlo (células K562-IM expostas a AuNPs@PEG + Inibidor P-gp + IM) haveria indicação que a não

observação da reversão do fenótipo anteriormente poderia dever-se de facto à P-gp remanescente ser capaz de expulsar uma quantidade de fármaco suficiente que impossibilite a reversão da resistência.

Por outro lado, de modo a testar a possibilidade de a resistência adquirida pelas células K562-IM não se dever exclusivamente à sobreexpressão da P-gp, poder-se-ia, no futuro, avaliar, por *Western Blot*, a expressão de alvos biológicos descritos como estando envolvidos em mecanismos alternativos de multirresistência. Por exemplo, avaliar a expressão de transportadores efluxo como MRP1 e BCRP, de transportadores de influxo como OCT1 e de proteínas envolvidas na inibição da apoptose como BCL-2/BCL-XL em células K562 sensíveis e em células K562-IM sem tratamento e após exposição aos nanoconjugados. De notar que, apesar da estratégia abordada ao longo deste trabalho ter tido como alvo *MDR1*, as AuNPs podem ser funcionalizadas com oligonucleotídeos ssDNA distintos visando diferentes marcadores moleculares chave na aquisição de multirresistência/ patogénese da LMC (e.g. *BCR-ABL1*, genes que codificam para proteínas envolvidas no efluxo de fármacos, genes que codificam para proteínas anti-apoptóticas). Uma "terapia combinada" com oligonucleotídeos ssDNA distintos poderia representar uma nova abordagem abordar a resistência na LMC.

De modo a otimizar o trabalho desenvolvido, dever-se-ia aumentar o número de experiências independentes para obter resultados mais robustos e com significado estatístico. Adicionalmente, embora se tenha mostrado o silenciamento de *MDR1 in vitro*, outros parâmetros ainda podem ser testados afim de otimizar as condições de silenciamento. Nomeadamente, averiguar se existe uma condição em que se observe uma menor expressão de *MDR1*/P-gp através da exposição de células K562-IM a diferentes concentrações de oligonucleotídeos e diferentes períodos de incubação e posterior análise por RT-qPCR/*Western Blot*.

Adicionalmente, também se poderia comparar o efeito da nanoformulação AuNPs@PEG@MDR1 em relação ao efeito dos ASOs sozinhos ou em combinação com outros veículos à nanoescala que também têm sido usados para alcançar uma terapia génica eficaz (e.g. lipossomas).

BIBLIOGRAFIA

1. Hu, D. & Shilatifard, A. Epigenetics of hematopoiesis and hematological malignancies. *Genes Dev.* **30**, 2021–2041 (2016).
2. Abdulmawjood, B., Roma-rodrigues, C., Fernandes, A. R. & Baptista, P. V. Liquid biopsies in myeloid malignancies. *Cancer Drug Resist* **2**, 1044–1061 (2019).
3. Jabbour, E. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol.* **95**, 691–709 (2020).
4. Goldman, J. M. Chronic Myeloid Leukemia: A Historical Perspective. *Semin. Hematol.* **47**, 302–311 (2010).
5. Nowell, P. & Hungerford, D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* **132**, 1497 (1962).
6. Rowley, J. D. L. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**, 290–293 (1973).
7. Deininger, M. W. N., Goldman, J. M. & Melo, J. V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* **96**, 3343–3356 (2000).
8. Score, J. *et al.* Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR-ABL indicate distinct mechanisms of formation. *Leukemia* **24**, 1742–1750 (2010).
9. Laurent, E., Talpaz, M., Kantarjian, H. & Kurzrock, R. The BCR Gene and Philadelphia Chromosome-positive Leukemogenesis. *Cancer Res.* **61**, 2343–2355 (2001).
10. Melo, J. V. The Diversity of BCR-ABL Fusion Proteins and Their Relationship to Leukemia Phenotype. *Blood* **88**, 2375–2384 (1996).
11. Vinhas, R. *et al.* Current trends in molecular diagnostics of chronic myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* **58**, 1791–1804 (2016).
12. Chen, M. *et al.* Targeting Primitive Chronic Myeloid Leukemia Cells by Effective Inhibition of a New AHI-1-BCR-ABL-JAK2 Complex. *Oxford Univ. Press* **105**, 405–423 (2013).
13. Santos, F. P. S., Kantarjian, H., Quintás-Cardama, A. & Cortes, J. Evolution of Therapies for Chronic Myelogenous Leukemia. *Cancer J.* **17**, 465–476 (2011).
14. Nowell, P. & Hungerford, D. The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **132**, 164–172 (1999).

15. Melo, J. V & Barnes, D. J. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nature* **7**, 441–453 (2007).
16. Chereda, B. & Melo, J. V. Natural course and biology of CML. *Ann Hematol* **94**, S107–S121 (2015).
17. Quinta, A. Molecular biology of bcr-abl1 – positive chronic myeloid leukemia. *Am. Soc. Hematol.* **113**, 1619–1630 (2009).
18. Cortes, J. & Dwyer, M. E. O. Clonal evolution in chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* **18**, 671–684 (2004).
19. Baccarani, M. & Castagnetti, F. A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. *Ann Hematol* **94**, S141–S147 (2015).
20. An, X. *et al.* BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: A review. *Leuk. Res.* **34**, 1255–1268 (2010).
21. Hehlmann, R. How I treat CML blast crisis. *Blood* **120**, 737–747 (2012).
22. Hare, T. O., Deininger, M. W. N., Eide, C. A., Clackson, T. & Druker, B. J. Targeting the BCR-ABL Signaling Pathway in Therapy-Resistant Philadelphia Chromosome-Positive Leukemia. *Clin Cancer Res* **17**, 212–221 (2011).
23. Kennedy, B. J. Hydroxyurea therapy in chronic myelogenous leukemia. *Cancer* **29**, 1052–1056 (1972).
24. Bolin, R. W., Robinson, W. A., Sutherland, J. & Hamman, R. F. Busulfan Versus Hydroxyurea in Long-Term Therapy of Chronic Myelogenous Leukemia. *Am. Cancer Soc.* **50**, 1683–1686 (1982).
25. Sera, A. *et al.* Chronic Myeloid Leukemia: An Update of Concepts and Management Recommendations of European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* **27**, 6041–6051 (2009).
26. Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z. & Kantarjian, H. M. Chronic Myelogenous Leukemia: Biology and Therapy. *Ann. Intern. Med.* **131**, 207–219 (1999).
27. 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.* **348**, 994–1004 (2003).
28. Deininger, M. *et al.* International Randomized Study of Interferon vs STI571 (IRIS) 8-Year Follow up: Sustained Survival and Low Risk for Progression or Events in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Treated with Imatinib. *Blood* **114**, 1126 (2009).
29. Hochhaus, A. *et al.* European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **34**, 966–984 (2020).
30. Druker, B. J. *et al.* Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature* **2**, 561–566 (1996).
31. Sacha, T. Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia: an Overview. *Mediterr J Hematol Infect Dis* **6**, 2014007 (2014).
32. Savage, D. G. & Antman, K. H. Imatinib Mesylate - A New Oral Targeted Therapy. *N. Engl. J. Med.* **346**, 683–693 (2002).

33. Pophali, P. A., Clinic, M. & Patnaik, M. M. The Role of New Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer J.* **22**, 40–50 (2017).
34. Manley, P. W. & Cowan-jacob, S. W. Advances in the structural biology, design and clinical development of Bcr-Abl kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Biochim. Biophys. Acta* **1754**, 3–13 (2005).
35. Orfão, A., Velden, V. H. J. Van Der, Miguel, J. F. S. & Dongen, J. J. M. Van. Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet Oncol.* **2**, 409–417 (2001).
36. Patel, A. B. *et al.* Mechanisms of resistance to ABL kinase inhibition in CML and the development of next generation ABL kinase inhibitors. *Hematol Oncol Clin North Am.* **31**, 589–612 (2018).
37. Steegmann, J. L. *et al.* European LeukemiaNet recommendations for the management and avoidance of adverse events of treatment in chronic myeloid leukaemia. *Nat. Publ. Gr.* **30**, 1648–1671 (2016).
38. Hochhaus, A. *et al.* Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy. *Blood* **109**, 2303–2310 (2016).
39. Kantarjian, H. M. *et al.* Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome – positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood* **110**, 3540–3547 (2016).
40. Cortes, J. E. *et al.* Safety and efficacy of bosutinib (SKI-606) in chronic phase Philadelphia chromosome – positive chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib. *Blood* **118**, 4567–4576 (2011).
41. Vener, C. *et al.* First-line imatinib vs second- and third-generation TKIs for chronic-phase CML: a systematic review and meta-analysis. *Blood* **4**, 2723–2735 (2020).
42. Jabbour, E. J., Cortes, J. E. & Kantarjian, H. M. Resistance to Tyrosine Kinase Inhibition Therapy for Chronic Myelogenous Leukemia: A Clinical Perspective and Emerging Treatment Options. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* **13**, 515–529 (2014).
43. Eadie, L. N. *et al.* The clinical significance of ABCB1 overexpression in predicting outcome of CML patients undergoing first-line imatinib treatment. *Leukemia* **31**, 1–29 (2016).
44. Moraes, G. N. De *et al.* The Interface between BCR-ABL-Dependent and -Independent Resistance Signaling Pathways in Chronic Myeloid Leukemia. *Leuk. Res. Treatment* **2012**, 1–19 (2012).
45. Vinhas, R. *et al.* A double Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patient, co-expressing P210 BCR-ABL1 and P195 BCR-ABL1 isoforms. *Haematologica* **103**, 549–552 (2018).
46. Otero, L., Ornellas, M. H., Dobbin, J. & de Souza Fernandez, T. Double Philadelphia-chromosome: a resistance factor on the imatinib mesylate therapy for chronic myeloid leukemia. *J. Lab. Hematol.* **30**, 346–348 (2008).
47. Melo, J. V & Chuah, C. Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. *Cancer Lett.* **249**, 121–132 (2007).

48. Walz, C. & Sattler, M. Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML). *Oncol. Hematol.* **57**, 145–164 (2006).
49. Gorre, M. E. *et al.* Clinical Resistance to STI-571 Cancer Therapy Caused by Amplification BCR-ABL Gene Mutation or Amplification. *Science* **293**, 876–880 (2001).
50. Eide, C. A., Health, O., City, S. L., Malignancies, H. & City, S. L. Chronic Myeloid Leukemia: Advances in Understanding Disease Biology and Mechanisms of Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors. *Curr Hematol Malig Rep* **10**, 158–166 (2016).
51. Soverini, S. *et al.* Clinical Contribution of ABL Kinase Domain Mutations to Imatinib Resistance in Different Subsets of Philadelphia-Positive Patients: By the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* **12**, 7374–7380 (2006).
52. Jabbour, E., Kantarjian, H. & Cortes, J. Use of Second- and Third-Generation Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia: An Evolving Treatment Paradigm. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* **15**, 323–334 (2015).
53. Hare, T. O. *et al.* AP24534, a Pan-BCR-ABL Inhibitor for Chronic Myeloid Leukemia, Potently Inhibits the T315I Mutant and Overcomes Mutation-Based Resistance. *Cancer Cell* **16**, 401–412 (2009).
54. Rumjanek, V. M., Vidal, R. S. & Maia, R. C. Multidrug resistance in chronic myeloid leukaemia: how much can we learn from MDR – CML cell lines? *Biosci. Rep.* **33**, 875–888 (2013).
55. García-gutiérrez, V. & Hernández-boluda, J. C. Tyrosine Kinase Inhibitors Available for Chronic Myeloid Leukemia: Efficacy and Safety. *Front. Oncol.* **9**, 1–10 (2019).
56. Novartis Gleevec: Prescribing information. (2015).
57. Squibb BM. Sprycel: Full Prescribing Information. (2015).
58. Novartis Tasigna: Full prescribing information. (2015).
59. Pfizer Laboratories Div Pfizer Inc. Bosulif: Full Prescribing Information. (2014).
60. Ariad Iclusig: Full Prescribing Information. (2014).
61. Donato, N. J. *et al.* BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood* **101**, 690–698 (2003).
62. Gioia, R. *et al.* Quantitative phosphoproteomics revealed interplay between Syk and Lyn in the resistance to nilotinib in chronic myeloid leukemia cells. *Blood* **118**, 2211–2222 (2011).
63. Burchert, A. *et al.* Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development. *Leukemia* **19**, 1774–1782 (2005).
64. Sj, C. *et al.* An activating KRAS mutation in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **22**, 2269–2272 (2008).
65. Wang, Y. *et al.* Adaptive secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) mediates imatinib and nilotinib resistance in BCR / ABL+ progenitors via JAK-2 / STAT-5 pathway activation. *Blood* **109**, 2147–2155 (2007).
66. Baptista, P. V *et al.* Alloy metal nanoparticles for multicolor cancer diagnostics. *Colloid. Quantum Dots/Nanocrystals Biomed. Appl.* **7909**, 1–10 (2011).

67. Robey, R. W. *et al.* Revisiting the role of efflux pumps in multidrug-resistant cancer. *Nat. Rev Cancer* **18**, 452–464 (2019).
68. Hamada, A., Miyano, H., Watanabe, H. & Saito, H. Interaction of Imatinib Mesilate with Human P-Glycoprotein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **307**, 824–828 (2003).
69. Saraswathy, M. & Gong, S. Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer. *Biotechnol. Adv.* **31**, 1397–1407 (2013).
70. Szakács, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A. & Booth-genthe, C. Targeting multidrug resistance in cancer. **5**, 219–234 (2006).
71. Conde, J., Fuente, J. M. De & Baptista, P. V. Nanomaterials for reversion of multidrug resistance in cancer: a new hope for an old idea? *Front. Pharmacol.* **4**, 1–5 (2013).
72. He, Q. & Shi, J. MSN Anti-Cancer Nanomedicines: Chemotherapy Enhancement, Overcoming of Drug Resistance , and Metastasis Inhibition. *Adv. Mater.* **26**, 391–411 (2014).
73. Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S. & Baradaran, B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Tabriz Univ. Med. Sci.* **7**, 339–348 (2017).
74. Zhang, H. *et al.* Chemical molecular - based approach to overcome multidrug resistance in cancer by targeting P-glycoprotein (P - gp). *Med Res. Rev* **41**, 525–555 (2020).
75. Housman, G. *et al.* Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers* **6**, 1769–1792 (2014).
76. Lai, J., Tseng, Y., Chen, M. & Huang, C. F. Clinical Perspective of FDA Approved Drugs With P-Glycoprotein Inhibition Activities for Potential Cancer Therapeutics. *Front. Oncol.* **10**, 1–12 (2020).
77. Illmer, T., Schaich, M., Platzbecker, U., Freiberg-Richter, J., Oelschlägel, U., von Bonin, M., Schleyer, E. P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. *Leukemia* **18**, 401–408 (2004).
78. Mahon, F. *et al.* MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* **101**, 2368–2373 (2013).
79. Crossman, L. C. . hOCT 1 and resistance to imatinib. *Blood* **106**, 1133–1135 (2016).
80. Hospital, T., Sick, J. & Biophysics, M. A surface glycoprotein modulating drug in chinese hamster ovary cell mutants permeability. *Biochim. Biophys. Acta* **455**, 152–162 (1976).
81. Lee, W. & Thévenod, F. Teaching an old dog new tricks: reactivated developmental signaling pathways regulate ABCB1 and chemoresistance in cancer. *Cancer Drug Resist* **4**, 424–452 (2021).
82. Katayama, K., Noguchi, K. & Sugimoto, Y. Regulations of P-Glycoprotein/ABCB1/MDR1 in Human Cancer Cells. *New J. Sci.* **2014**, 1–10 (2014).
83. Lopes-Rodrigues, V., Sousa, E. & Vasconcelos, M. H. Curcumin as a Modulator of P-Glycoprotein in Cancer: Challenges and Perspectives. *Pharmaceuticals* **9**, 1–11 (2016).

84. Callaghan, R. *et al.* P-glycoprotein: So Many Ways to Turn It On. *J Clin Pharmacol* **48**, 365–378 (2008).
85. Ammar, M. *et al.* Overexpression of P-glycoprotein and resistance to Imatinib in chronic myeloid leukemia patients. *J Clin Lab Anal.* **34**, e23374 (2020).
86. Fromm, M. F. Importance of P-glycoprotein at blood – tissue barriers. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 423–429 (2004).
87. Eechoute, K., Sparreboom, A. & Burger, H. Drug Transporters and Imatinib Treatment: Implications for Clinical Practice. *Clin Cancer Res* **17**, 406–415 (2011).
88. Vasconcelos, F. C. *et al.* Variation of MDR Proteins Expression and Activity Levels According to Clinical Status and Evolution of CML Patients. *Cytom. Part B* **80B**, 158–166 (2011).
89. Patil, Y. B. *et al.* The use of nanoparticle-mediated targeted gene silencing and drug delivery to overcome tumor drug resistance. *Biomaterials* **31**, 358–365 (2010).
90. Choi, Y. H., Yu, A. & Korea, S. ABC Transporters in Multidrug Resistance and Pharmacokinetics, and Strategies for Drug Development Young. *Curr Pharm Des.* **20**, 793–807 (2014).
91. Markman, J. L., Rekechenetskiy, A., Holler, E. & Ljubimova, J. Y. Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 1866–1879 (2013).
92. Mendes, R., Fernandes, A. R. & Baptista, P. V. Gold Nanoparticle Approach to the Selective Delivery of Gene Silencing in Cancer – The Case for Combined Delivery? *Genes* **8**, 1–16 (2017).
93. Vinhas, R., Fernandes, A. R. & Baptista, P. V. Gold Nanoparticles for BCR-ABL1 Gene Silencing: Improving Tyrosine Kinase Inhibitor Efficacy in Chronic Myeloid Leukemia. *Mol. Ther.* **7**, 408–416 (2017).
94. Ding, Y. *et al.* Gold Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. *Mol. Ther.* **22**, 1075–1083 (2014).
95. Fernandes, A. R. *et al.* Multifunctional gold-nanoparticles: A nanovectorization tool for the targeted delivery of novel chemotherapeutic agents. *J. Control. Release* **245**, 52–61 (2016).
96. Roma-rodrigues, C., Rivas-garc, L., Baptista, P. V & Fernandes, A. R. Gene Therapy in Cancer Treatment: Why Go Nano? *Pharmaceutics* **12**, 233 (2020).
97. Ferreira, D. *et al.* Gold Nanoparticles for Vectorization of Nucleic Acids for Cancer Therapeutics. *Molecules* **25**, 3489 (2020).
98. Tomuleasa, C., Braicu, C., Irimie, A. & Craciun, L. Nanopharmacology in translational hematology and oncology. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 3465–3479 (2014).
99. Pedrosa, P., Vinhas, R., Fernandes, A. & Baptista, P. V. Gold Nanotheranostics: Proof-of-Concept or Clinical Tool? *Nanomaterials* **5**, 1853–1879 (2015).

100. Vinhas, R., Mendes, R., Fernandes, A. R. & Baptista, P. V. Nanoparticles – emerging Potential for Managing Leukemia and Lymphoma. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **5**, 1–10 (2017).
101. Vinhas, R. *et al.* Gold nanoparticle-based theranostics: disease diagnostics and treatment using a single nanomaterial. *Nanobiosensors Dis. Diagnosis* **4**, 11–23 (2015).
102. Sriraman, S. K., Aryasomayajula, B. & Torchilin, V. P. Barriers to drug delivery in solid tumors. *Tissue Barriers* **2**, 1–10 (2014).
103. Fang, J., Islam, W. & Maeda, H. Exploiting the dynamics of the EPR effect and strategies to improve the therapeutic effects of nanomedicines by using EPR effect enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **157**, 142–160 (2020).
104. Shi, Y., Meel, R. Van Der, Chen, X. & Lammers, T. Theranostics The EPR effect and beyond : Strategies to improve tumor targeting and cancer nanomedicine treatment efficacy. *Theranostics* **10**, 7921–7924 (2020).
105. Mendes, R. *et al.* Non-small cell lung cancer biomarkers and targeted therapy - two faces of the same coin fostered by nanotechnology coin fostered by nanotechnology. *Expert Rev. Precis. Med. Drug Dev.* **1**, 155–168 (2016).
106. Veigas, B. *et al.* Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications. *Sensors* **12**, 1657–1687 (2012).
107. Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **11**, 55–75 (1951).
108. Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat. Phys. Sci.* **241**, 20–22 (1973).
109. Lee, C. & Meisel, D. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols'. *Am. Chem. Soc.* **88**, 3391–3395 (1982).
110. Conde, J., Dias, J. T., Grazú, V., Moros, M. & Baptista, P. V. Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. *Front. Chem.* **2**, 1–27 (2014).
111. Vinhas, R. *et al.* Colorimetric assessment of BCR-ABL1 transcripts in clinical samples via gold nanoprobe. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 5277–5284 (2016).
112. Baptista, P., Henriques, D. & Franco, R. Colorimetric detection of eukaryotic gene expression with DNA-derivatized gold nanoparticles. *J. Biotechnol.* **119**, 111–117 (2005).
113. Barnes, W. L., Dereux, A. & Ebbesen, T. W. Surface plasmon subwavelength optics. *Nature* **424**, 824–830 (2003).
114. Sui, M., Kunwar, S., Pandey, P. & Lee, J. Strongly confined localized surface plasmon resonance (LSPR) bands of Pt, AgPt, AgAuPt nanoparticles. *Sci. Rep.* **9**, 1–14 (2019).
115. Jain, P. K., Lee, K. S., El-sayed, I. H. & El-sayed, M. A. Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size , Shape , and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *J. Phys. Chem. B.* **110**, 7238–7248 (2006).
116. Reinhard, M., Liphardt, J. & Alivisatos, A. P. A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles. *Nat. Biotechnol.* **23**, 741–745 (2005).

117. Mahmoud, M. A., Chamanzar, M., Adibi, A. & El-sayed, M. A. Effect of the Dielectric Constant of the Surrounding Medium and the Substrate on the Surface Plasmon Resonance Spectrum and Sensitivity Factors of Highly Symmetric Systems: Silver Nanocubes. *J. Am. Chem. Soc* **134**, 6434–6442 (2012).
118. Wan, Z. *et al.* Research advances in nanomedicine, immunotherapy, and combination therapy for leukemia. *J. Leukoc. Biol.* **109**, 425–436 (2021).
119. Cabral, R. M. & Baptista, P. V. Anti-cancer precision theranostics: a focus on multifunctional gold nanoparticles. *Expert Rev. Mol. Diagn* **14**, 1041–1052 (2014).
120. Maldiney, T. *et al.* Effect of Core Diameter, Surface Coating, and PEG Chain Length on the Biodistribution of Persistent Luminescence Nanoparticles in Mice. *ACS Nano* **5**, 854–862 (2011).
121. Suk, J. S. *et al.* PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **99**, 28–51 (2016).
122. Rosi, N. L. *et al.* Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles for Intracellular Gene Regulation. *Science* **312**, 1027–1030 (2006).
123. Mirkin, C. A., Letsinger, R. L., Mucic, R. C. & Storhoff, J. J. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* **382**, 607–609 (1996).
124. Roma-Rodrigues, C., Pereira, F., Fernandes, M., Baptista, P. V & Fernandes, A. R. Smuggling gold nanoparticles across cell types – a new role for exosomes in gene silencing. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **13**, 1389–1398 (2017).
125. Yoshida, S. *et al.* MXD3 antisense oligonucleotide with superparamagnetic iron oxide nanoparticles: A new targeted approach for neuroblastoma. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **24**, 102127 (2020).
126. Chen, C. *et al.* Dextran-Conjugated Caged siRNA Nanoparticles for Photochemical Regulation of RNAi-Induced Gene Silencing in Cells and Mice. *Bioconjug. Chem.* **30**, 1459–1465 (2019).
127. Watts, J. K. & Corey, D. R. Gene silencing by siRNAs and antisense oligonucleotides in the laboratory and the clinic. *J. Pathol.* **226**, 365–379 (2012).
128. Mehta, A., Vedove, E. D., Isert, L. & Merkel, O. M. Targeting KRAS Mutant Lung Cancer Cells with siRNA-Loaded Bovine Serum Albumin Nanoparticles. *Pharm. Res.* **36**, 1–13 (2019).
129. Strand, M. S. *et al.* Precision delivery of RAS-inhibiting siRNA to KRAS driven cancer via peptide-based nanoparticles. *Oncotarget* **10**, 4761–4775 (2019).
130. Conde, J., Rosa, J., Fuente, J. M. De & Baptista, P. V. Gold-nanobeacons for simultaneous gene specific silencing and intracellular tracking of the silencing events. *Biomaterials* **34**, 2516–2523 (2013).
131. Cordeiro, M. *et al.* Gold Nanobeacons for Tracking Gene Silencing in Zebrafish. *Nano* **7**, 1–8 (2017).
132. Conde, J. *et al.* Gold-Nanobeacons for gene therapy: evaluation of genotoxicity, cell toxicity and proteome profiling analysis. *Nanotoxicology* **8**, 521–532 (2013).

133. Gossai, N. P. *et al.* Drug conjugated nanoparticles activated by cancer cell specific mRNA. *Oncotarget* **7**, 38243–38256 (2016).
134. Hare, J. I. *et al.* Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: An industry perspective. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **108**, 25–38 (2016).
135. Barenholz, Y. C. Doxil® – The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J. Control. Release* **160**, 117–134 (2012).
136. Gabizon, A., Shmeeda, H. & Barenholz, Y. Pharmacokinetics of Pegylated Liposomal Doxorubicin Review of Animal and Human Studies. *Clin Pharmacokinet* **42**, 419–436 (2003).
137. Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R. & Farokhzad, O. C. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nature* **17**, 20–37 (2017).
138. Wu, L., Wang, D. & Li, Z. Grand challenges in nanomedicine. *Mater. Sci. Eng. C* **106**, 110302 (2019).
139. Conde, J., Rosa, J. & Baptista, P. Gold-Nanobeacons as a theranostic system for the detection and inhibition of specific genes. *Protoc. Exch.* 1–35 (2013).
140. Lozzio, C. B. & Lozzio, B. B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **45**, 321–334 (1975).
141. Corporation, P. *Solution Cell Proliferation CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay.*
142. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-delta-delta CT Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
143. *Pierce 660nm Protein Assay. ThermoFisher Scientific* (2000).
144. Sanz, V., Baptista, P. V & Ibarra, M. R. Effect of PEG biofunctional spacers and TAT peptide on dsRNA loading on gold nanoparticles. *J. Nanopart. Res.* **14**, 1–9 (2012).
145. Motomura, S. *et al.* Inhibition of P-Glycoprotein and Recovery of Drug Sensitivity of Human Acute Leukemic Blast Cells by Multidrug Resistance Gene (mdr1) Antisense Oligonucleotides. *Blood* **91**, 3163–3171 (1998).
146. Pakunlu, R. I., Cook, T. J. & Minko, T. Simultaneous Modulation of Multidrug Resistance and Antiapoptotic Cellular Defense by MDR1 and BCL-2 Targeted Antisense Oligonucleotides Enhances the Anticancer Efficacy of Doxorubicin. *Pharma* **20**, 351–359 (2003).
147. Lo, Y. & Liu, Y. Reversing Multidrug Resistance in Caco-2 by Silencing Antisense Oligonucleotides. *PLoS One* **9**, e90180 (2014).
148. Nadali, F. *et al.* Multidrug resistance inhibition by antisense oligonucleotide against MDR1/mRNA in P-glycoprotein expressing leukemic cells. *Hematology* **12**, 393–401 (2007).
149. Pakunlu, R. I. *et al.* In vitro and in vivo intracellular liposomal delivery of antisense oligonucleotides and anticancer drug. *J. Control. Release* **114**, 153–162 (2006).
150. Stiufiuc, R. *et al.* One-Step Synthesis of PEGylated Gold Nanoparticles with Tunable Surface Charge. *J. Nanomater.* **2013**, 1–7 (2013).

151. Hinterwirth, H. *et al.* Comparative method evaluation for size and size-distribution analysis of gold nanoparticles. *J. Sep. Sci.* **36**, 2952–2961 (2013).
152. Baptista, P. *et al.* Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Anal Bioanal Chem* **391**, 943–950 (2008).
153. McPherson, M. J. & Møller, S. G. PCR. *Taylor & Francis Group* 2^a edição (2006).
154. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, 16–21 (2001).
155. Scotto, K. W. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene* **22**, 7496–7511 (2003).
156. Gromnicova, R., Romero, I. & Male, D. Transcriptional Control of the Multi-Drug Transporter ABCB1 by Transcription Factor Sp3 in Different Human Tissues. *PLoS One* **7**, e48189 (2012).
157. Lettnin, A. P. *et al.* Silencing the OCT4-PG1 pseudogene reduces OCT-4 protein levels and changes characteristics of the multidrug resistance phenotype in chronic myeloid leukemia. *Mol. Biol. Rep.* **46**, 1873–1884 (2019).
158. Lee, W. & Chakraborty, P. K. Pituitary homeobox 2 (PITX2) protects renal cancer cell lines against doxorubicin toxicity by transcriptional activation of the multidrug transporter ABCB1. *Int. J. Cancer* **133**, 556–568 (2013).
159. Lee, W. & Thévenod, F. Oncogenic PITX2 facilitates tumor cell drug resistance by inverse regulation of hOCT3 / SLC22A3 and ABC drug transporters in colon and kidney cancers. *Cancer Lett.* **449**, 237–251 (2019).
160. Nieth, C., Priebisch, A., Stege, A. & Å, H. L. Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS Lett.* **545**, 144–150 (2003).
161. Li, X., Smyth, A. P., Barrett, D. J., Ivy, S. P. & Hofe, E. Von. Sensitization of multidrug-resistant human leukemia cells with MDR1 -targeted antisense and inhibition of drug-mediated MDR1 induction. 950–957 (1997).
162. Lo, Y., Liu, Y. & Tsai, J. Overcoming multidrug resistance using liposomal epirubicin and antisense oligonucleotides targeting pump and nonpump resistances in vitro and in vivo. *Biomed. Pharmacother.* **67**, 261–267 (2013).
163. Reis, F. R. D. S. *et al.* Survivin and P-glycoprotein are associated and highly expressed in late phase chronic myeloid leukemia. *Oncol. Rep.* **26**, 471–478 (2011).
164. Grandjean, F., Brémaud, L., Verdier, M., Robert, J. & Ratinaud, M.-H. Sequential gene expression of P-glycoprotein (P-gp), multidrug resistance-associated protein (MRP) and lung resistance protein: functional activity of P-gp and MRP present in the doxorubicin-resistant human K562 cell lines. *Anticancer. Drugs* **12**, 247–258 (2001).
165. Gromicho, M., Dinis, J., Magalha, M., Tavares, O. & Sebastia, N. I. O. Development of imatinib and dasatinib resistance: dynamics of expression of drug transporters ABCB1, ABCC1, ABCG2, MVP, and SLC22A1. *Leuk. Lymphoma* **52**, 1980–1990 (2011).
166. Burger, H. *et al.* Chronic Imatinib Mesylate Exposure Leads to Reduced Intracellular Drug Accumulation by Induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) Drug Transport Pumps. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 747–752 (2005).

167. Baran, Y., Ural, A. U. & Gunduz, U. Mechanisms of cellular resistance to imatinib in human chronic myeloid leukemia cells. *Hematology* **12**, 497–503 (2013).
168. Wu, H., Hait, W. N. & Yang, J. Small Interfering RNA-induced Suppression of MDR1 (P-Glycoprotein) Restores Sensitivity to Multidrug-resistant Cancer Cells. *Cancer Res.* **63**, 1515–1519 (2003).
169. Muller, C., Laurent, G. U. Y. & Ling, V. P-glycoprotein Stability Is Affected by Serum Deprivation and High Cell Density in Multidrug-Resistant Cells. *J. Cell. Physiol.* **163**, 538–544 (1995).

Apêndice I – Gráficos dose resposta após exposição de células K562-IM ao imatinib

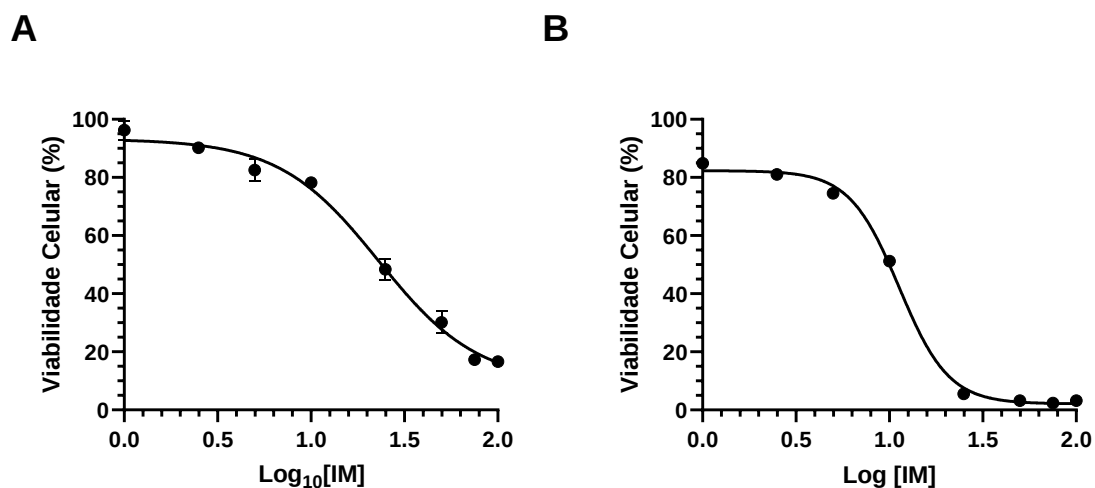


Figura I.1: Gráficos dose-resposta após exposição de células K562-IM ao imatinib (1-100 μ M) durante um período de 24 h (A), 48 h (B). A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio MTS. Os dados foram normalizados para as células K562-IM incubadas com DMSO e correspondem à média $\pm$ desvio padrão pelo menos duas experiências independentes (A) ou uma experiência (B).

Apêndice II – Análise *in silico* da sequência ssDNA anti-MDR1

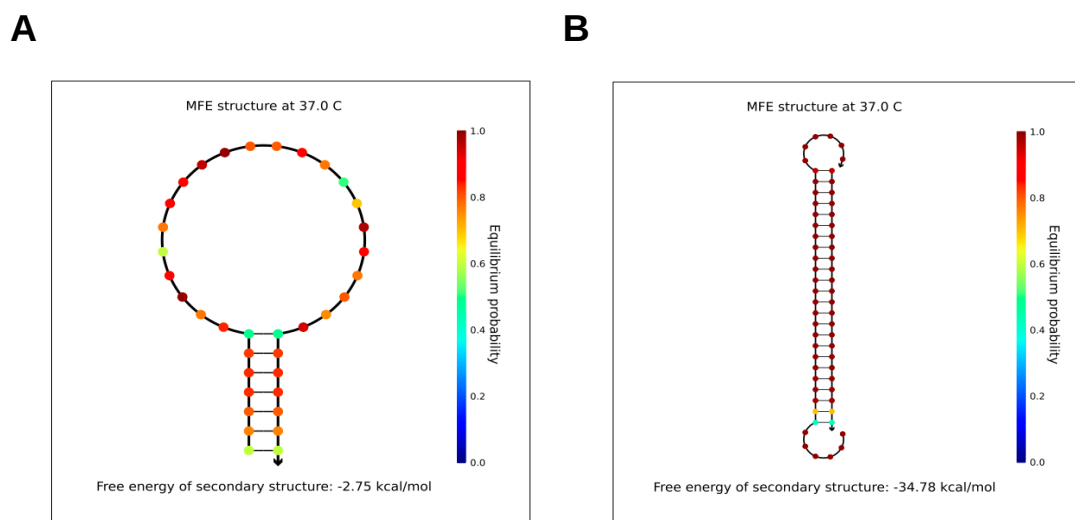


Figura II.1: Análise *in silico* da sonda anti-MDR1 no programa NUPACK. (A) Sonda anti-MDR1 (5'-TTTCGGTTCAAGATCCATCCCGACCTCGCGCCGAAA-3') (B) Sonda anti-MDR1 e sequência alvo (3'-AAGUUCUAGGUAGGGCUGGAGCGC-5'). As análises foram realizadas usando as condições padrão do programa NUPACK.

Apêndice III – Caracterização dos nanoconjugados por espectroscopia de UV-Vis

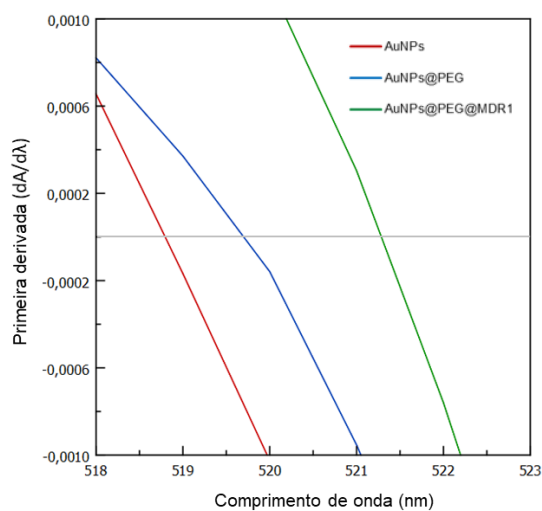


Figura III.1: Primeira derivada do espectro de absorção UV-Vis das AuNPs. A primeira derivada do espectro foi calculada no programa LabPlot. AuNPs (vermelho), AuNPs@PEG (azul) e AuNPs@PEG@MDR1 (verde).

Apêndice IV – Otimização da reação de amplificação dos genes *18S* e *MDR1* por RT-qPCR

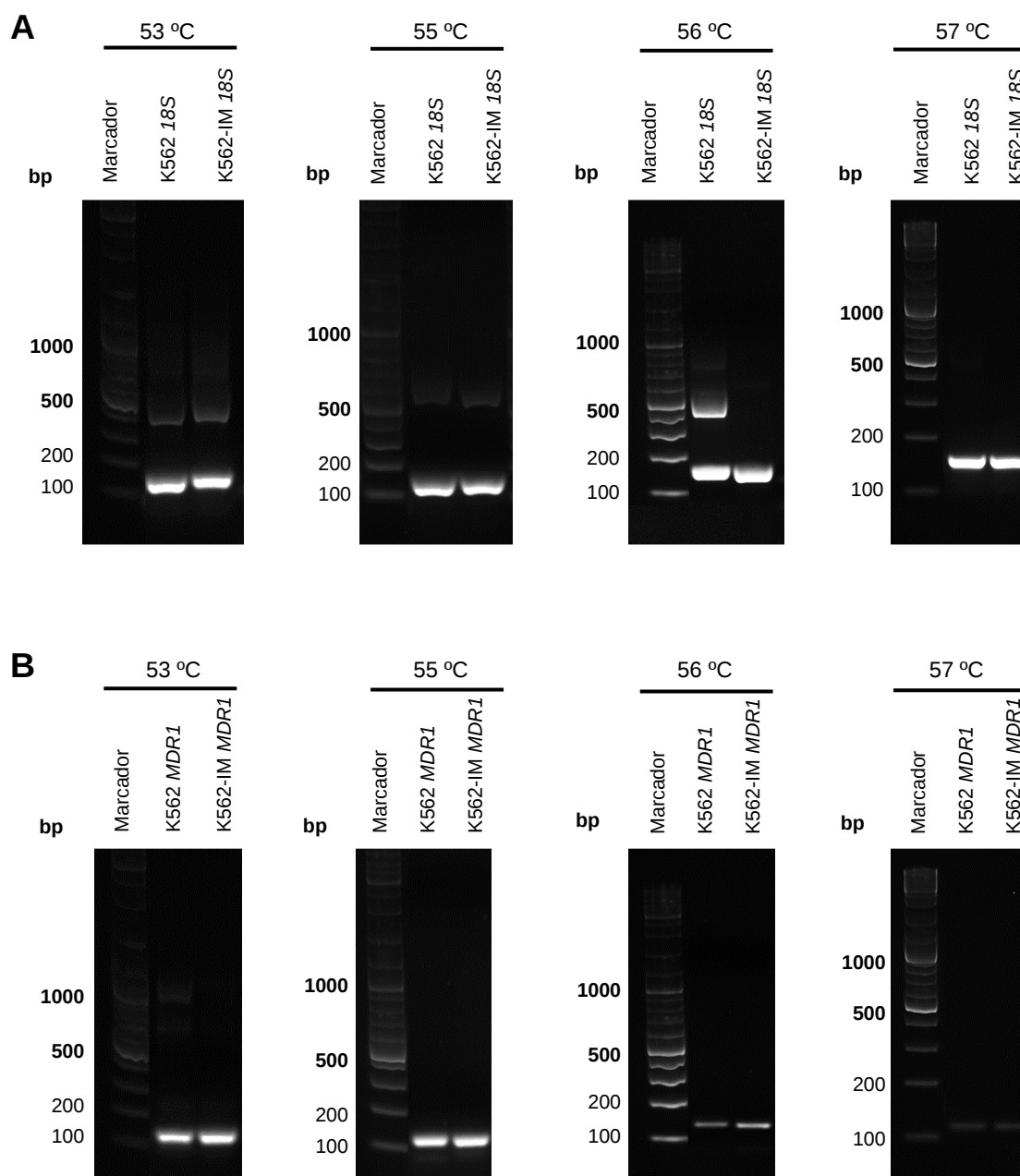


Figura IV.1: Efeito da temperatura de *annealing* na amplificação por RT-qPCR dos genes *18S* (controle interno) e *MDR1* nas linhagens celulares K562 e K562-IM. **(A)** Análise da amplificação por RT-qPCR do gene *18S* (tamanho do produto: 151 bp). **(B)** Análise da amplificação por RT-qPCR do gene *MDR1* (tamanho do produto: 110 bp). Condições: transcrição reversa a 50 °C durante 20 minutos; ativação da polimerase a 95 °C durante 10 minutos; 40 ciclos de 95 °C durante 30 segundos (desnaturação), 53-57 °C (*annealing*), 72 °C durante 30 segundos (extensão). Os produtos de RT-qPCR foram analisados através de uma eletroforese em gel de agarose. Marcador – GeneRuler DNA Ladder Mix SM0331 (Thermo Scientific).

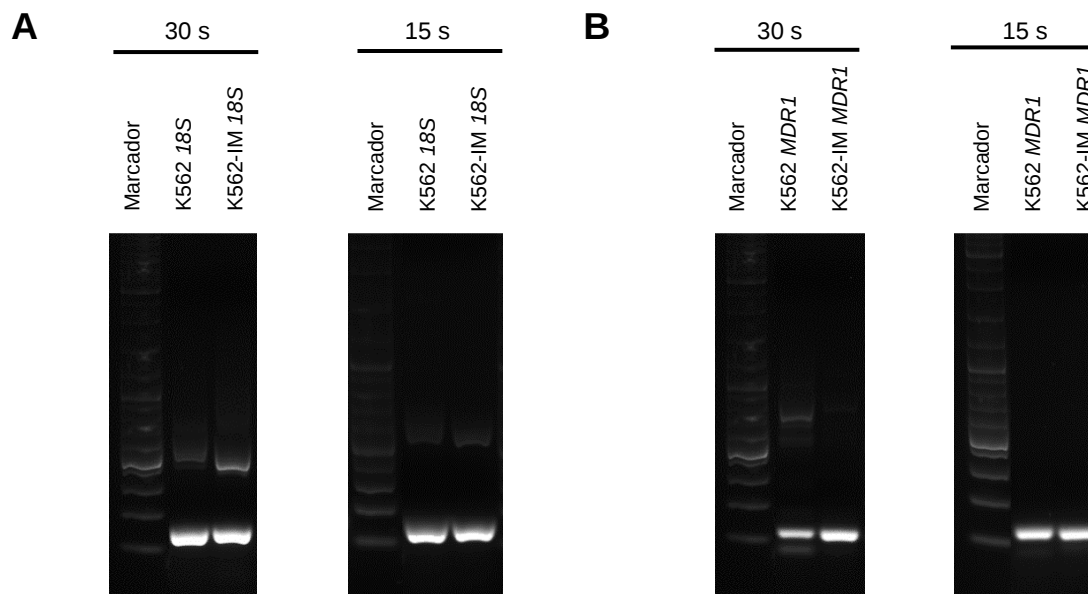


Figura IV.2: Efeito do tempo de *annealing* na amplificação por RT-qPCR dos genes 18S (controle interno) e MDR1 nas linhagens celulares K562 e K562-IM. (A) Análise da amplificação por RT-qPCR do gene 18S (tamanho do produto: 151 bp). **(B)** Análise da amplificação por RT-qPCR do gene MDR1 (tamanho do produto: 110 bp). Condições: transcrição reversa a 50 °C durante 20 minutos; ativação da polimerase a 95 °C durante 10 minutos; 40 ciclos de 95 °C durante 30 segundos (desnaturação), 55 °C durante 30 ou 15 segundos (*annealing*), 72 °C durante 30 segundos (extensão). Os produtos de RT-qPCR foram analisados através de uma eletroforese em gel de agarose. Marcador – GeneRuler DNA Ladder Mix SM0331 (Thermo Scientific).

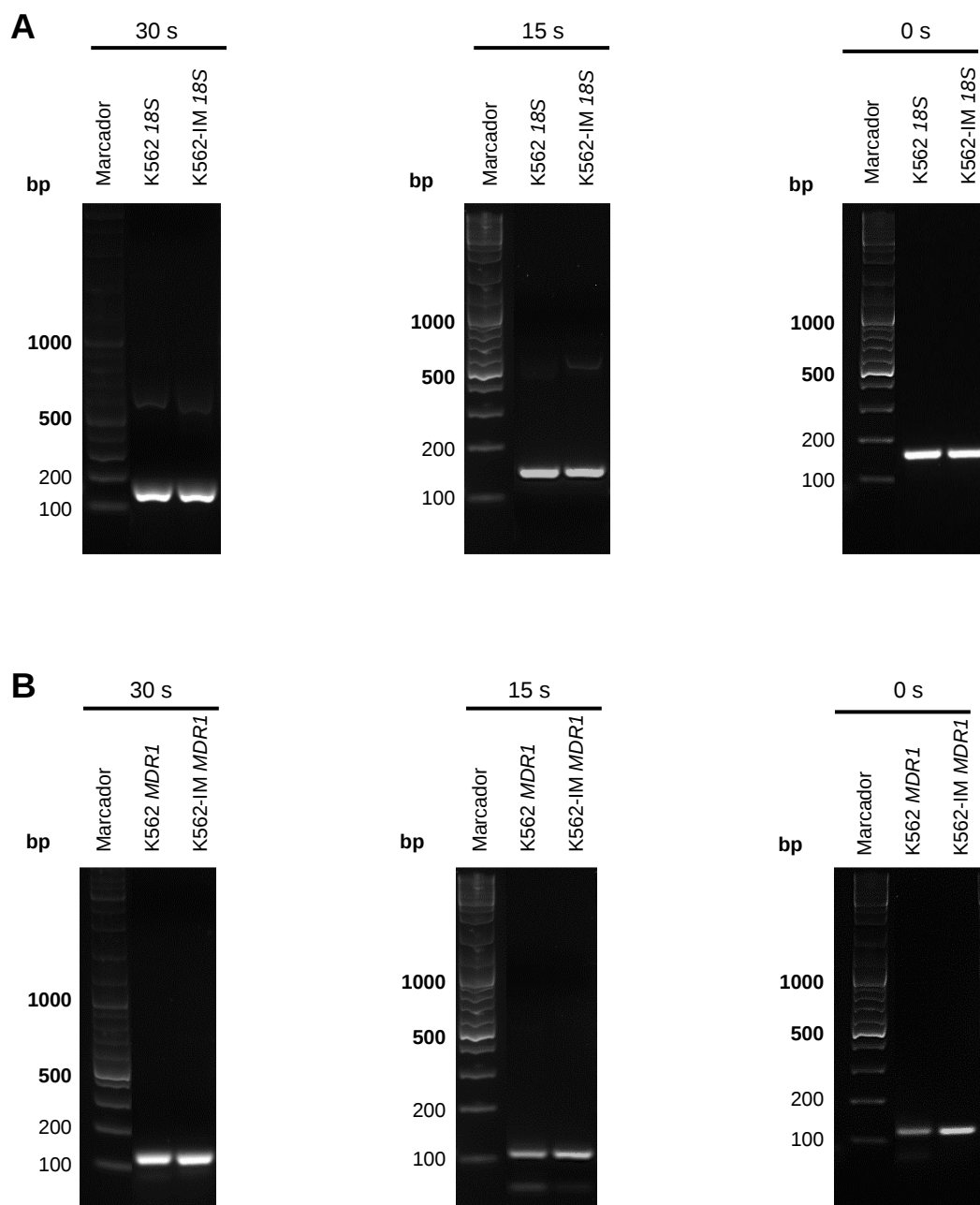


Figura IV.3: Efeito do tempo de extensão na amplificação por RT-qPCR dos genes 18S (controle interno) e MDR1 nas linhagens celulares K562 e K562-IM. (A) Análise da amplificação por RT-qPCR do gene 18S (tamanho do produto: 151 bp). **(B)** Análise da amplificação por RT-qPCR do gene MDR1 (tamanho do produto: 110 bp). Condições: transcrição reversa a 50 °C durante 20 minutos; ativação da polimerase a 95 °C durante 10 minutos; 40 ciclos de 95 °C durante 30 segundos (desnaturação), 55 °C durante 15 segundos (*annealing*), 72 °C durante 30, 15 ou 0 segundos (extensão). Os produtos de RT-qPCR foram analisados através de uma eletroforese em gel de agarose. Marcador - GeneRuler DNA Ladder Mix SM0331 (Thermo Scientific).



2021

PATRÍCIA DE SANTANA FONSECA
RIBEIRO RODRIGUES

NOVAS ESTRATÉGIAS PARA COMBATER A RESISTÊNCIA A
MÚLTIPLOS FÁRMACOS NA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA