



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM ONCOLOGIA

ALINE RANGEL POZZO

**MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AS ANTRACICLINAS E A CITARABINA EM
LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA**

Orientadora: Prof. Dra. Raquel Ciuvalschi Maia

**RIO DE JANEIRO
2017**



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM ONCOLOGIA

ALINE RANGEL POZZO

**MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AS ANTRACICLINAS E A CITARABINA EM
LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA**

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como
parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em
Oncologia

Orientadora: Prof. Dra. Raquel Ciuvalschi Maia

**RIO DE JANEIRO
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

P894m Pozzo, Aline Rangel.

Mecanismos de resistência as antraciclina e a citarabina em leucemia mielóide aguda / Aline Rangel Pozzo. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.
152 f. il.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2017.

Orientador: Raquel Ciuvalschi Maia.

1. Leucemia Mieloide Aguda. 2. Resistência a Medicamentos.
3. Antraciclina. 4. Citarabina.

CDD 616.99419



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM ONCOLOGIA

ALINE RANGEL POZZO

**MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AS ANTRACICLINAS E A CITARABINA EM
LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA**

Orientadora: Prof. Dra. Raquel Ciuvalschi Maia

Rio de Janeiro, 29 de agosto de 2017.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Miguel Angelo Martins Moreira – INCA/RJ

Profa. Dra. Bárbara da Costa Reis Monte-Mor – INCA/RJ

Prof. Dr. Angelo Maiolino – UFRJ/RJ

Prof. Dr. André Luiz Mencialha – UERJ/RJ

Profa. Dra. Mariana Emerenciano – INCA/RJ - Suplente Interno

Profa. Dra. Tatiana Simão – UERJ/RJ - Suplente Externo

RIO DE JANEIRO

2017

AGRADECIMENTOS

Ao meu filho, Enzo Pozzo, por aceitar que a mamãe precisava trabalhar e não podia brincar durante muitos finais de semana.

Aos meus pais, Carlos Pozzo e Jozilda Pozzo, por me apoiarem em todos os momentos em que precisei e ao meu marido, Jeferson Guandalin, por me apoiar nesta nova etapa da minha vida.

À minha orientadora, Dra. Raquel Ciuvalschi Maia, por ter me recebido em seu laboratório e pelas constantes discussões que enriqueceram muito o trabalho.

Aos meus colaboradores em trabalhos submetidos ou aceitos, Thais Hancio, Dr. Luciano Mazzoccoli, Msc. Luíze Otero, Dra. Flavia Vasconcelos, Dra. Fernanda Costas, Msc. Marcos Scheiner e Dr. Marcos Pinho. Muito obrigada pela parceria científica, pelas discussões e troca de conhecimento durante todo o trabalho.

À Dra. Karina Lani, que me ajudou muito nas análises dos meus experimentos de citometria de fluxo e a Telma Pereira por ter cedido as amostras de medula óssea de doadores saudáveis.

Ao Dr. Martin Bonamino e a Dra. Luciana Carvalho, por terem me auxiliado o projeto do CRISPR.

À Dra. Paloma Souza e Dra. Gabriela Nestal pelas ideias e discussões dos resultados que enriqueceram muito o trabalho

A todos os membros do grupo de Hemato-Oncologia, Dra. Claudete, Dra. Roberta, Daniele, Rebeca, Mariana, Lauana, Gustavo, Dra. Paula, Michele, Dra. Marcela, Debora, Tandressa, Patrícia, Gabriel e Gisele pelo apoio, diversão e amizade de todas as horas.

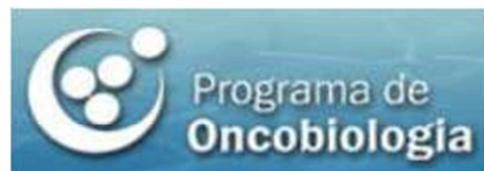
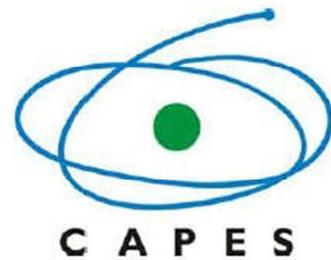
Ao Ministério da Saúde/INCA pelo auxílio financeiro desde 2005, quando comecei como aluna de Iniciação Científica.

Aos membros da banca por terem gentilmente aceitado o convite.

Aos meus amigos, as minhas tias Elisabete Cruz e Joseni Cruz e meus parentes que sempre me apoiaram e que torcem por mim.

Às agências de fomento, pelo apoio financeiro.

Este projeto teve o apoio das seguintes instituições:





INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES
DA SILVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
ONCOLOGIA

MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AS ANTRACICLINAS E A CITARABINA EM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

Aline Rangel Pozzo

Resumo

A leucemia mielóide aguda (LMA) é uma doença heterogênea em relação às características citogenéticas, moleculares, resposta ao tratamento, sobrevida global e livre de doença. A maioria dos pacientes apresenta recidiva precoce e evolui para o óbito devido à resistência à quimioterapia. O tratamento atual, baseado na associação das antraciclina Idarrubicina (IDA) ou Daunorrubicina (DNR) com a Citarabina (Ara-c), se mantém por mais de 40 anos apesar dos resultados insatisfatórios. Objetivos: Avaliar os mecanismos de resistência aos quimioterápicos IDA, DNR e Ara-c, em linhagens celulares e em amostras de pacientes com LMA. Metodologia e Resultados: O perfil de resistência das linhagens HL60, Kasumi e U937 foi comparado por imunofenotipagem, citogenética, expressão e atividade das proteínas transportadoras de efluxo: glicoproteína P (Pgp), MRP1 e BCRP e expressão de proteínas envolvidas com a evasão da apoptose. Para avaliar a sensibilidade aos quimioterápicos foram utilizados o ensaio de viabilidade celular (MTT), fragmentação do DNA e ativação de caspase 3. As linhagens celulares foram comparadas, entre si em relação à sensibilidade e resistência aos fármacos. A IDA foi mais eficiente em reduzir a viabilidade celular na linhagem HL60, a IDA e a DNR na linhagem Kasumi, sendo o Ara-c o mais eficiente em reduzir a viabilidade na linhagem U937. O perfil de resistência da linhagem HL60R foi analisado através de um *array* de proteínas fosforiladas, onde encontramos diversas vias de sinalização inibidas na linhagem resistente como a via de sinalização das MAPKs JNK e p38, importantes para o processo de indução de apoptose pelos quimioterápicos. Foi verificado que a ativação de tais vias de sinalização pelos quimioterápicos esta diminuída nas linhagens de LMA resistentes em comparação com as linhagens sensíveis. As vias de sinalização de JNK e p38 nas linhagens de LMA foram inibidas com RNA de interferência. Tal inibição resultou na redução da sensibilidade aos quimioterápicos na linhagem Kasumi e U937, aumento da expressão da Pgp e do miR-27a. A análise das amostras de pacientes com LMA mostrou alta expressão do miR-27a quando comparadas com as amostras dos doadores saudáveis. No entanto, a expressão do miR-27a apresentou baixa correlação com a Pgp e diferenças na sobrevida global apenas em 12 meses após o tratamento. A técnica do CRISPR foi utilizada para editar/silenciar os genes JNK e p38 a fim de corroborar os resultados com o silenciamento. Nossos dados sugerem que alterações na fosforilação das MAPKs JNK e p38, envolvidas no processo de indução de apoptose, estão associadas à resistência aos quimioterápicos na LMA.

Palavras-chaves: Leucemia mielóide aguda, Mecanismos de resistência aos quimioterápicos, Antraciclina, Ara-c, MAPKs JNK, p38 e CRISPR.



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES
DA SILVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
ONCOLOGIA

**MECHANISMS OF ANTHRACYCLINES AND CYTARABINE RESISTANCE IN
ACUTE MYELOID LEUKEMIA**

Aline Rangel Pozzo

Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous disease in relation to cytogenetic and molecular characteristics, treatment response, overall and disease-free. Most patients present early relapse and progress to death due to resistance to chemotherapy. Current treatment, based on the association of anthracycline Idarubicin (IDA) or Daunorubicin (DNR) with cytarabine (Ara-C) was maintained for over 40 years despite unsatisfactory results. Objectives: The aim of this study is to evaluate the mechanisms of resistance to chemotherapy IDA, DNR and Ara-C in AML cell lines and AML patient samples. Methods / Results: The resistance profile of HL60, Kasumi and U937 cell lines was compared by cytogenetics, expression and activity of transport proteins efflux: P-glycoprotein (Pgp), MRP1 and BCRP, and expression of proteins involved in the evasion of apoptosis. To assess the sensitivity to chemotherapeutic agents were used cell viability assay (MTT), DNA fragmentation and caspase-3 activation. The cell lines were treated with equivalent doses used in the clinics and compared in relation to their sensitivity. IDA was more effective in reducing cell viability in HL60 cell line, IDA and DNR in Kasumi cell line, and Ara-C was the most effective in reducing the cell viability of the U937 cell line. The HL60R resistance cell line was compared to its parental by using an array of phosphorylated proteins. Several signaling pathways were found inhibited in the resistant cell line, such as JNK and p38 MAPK, known to be important to the process of apoptosis induction by chemotherapeutic drugs. It was found that chemotherapy drugs have lost the ability to activate these signaling pathways in AML resistant cell lines compared to sensitive ones. JNK and p38 signaling pathways were inhibited in AML cell lines by RNA interference where Kasumi and U937 cell lines showed reduced sensitivity to chemotherapy drugs after inhibition, increased Pgp and miR-27a expression. Patient samples with AML showed high expression of miR-27a when compared to samples from healthy donors. However, miR-27a expression showed low correlation with Pgp and the association with overall survival was observed only 12 months after treatment. The CRISPR technique was used to edit/silence the JNK and p38 genes in order to corroborate the results with RNA interference. Our data suggest that changes in the phosphorylation of JNK and p38 MAPKs are associated with resistance to chemotherapy drugs in AML.

Keywords: Acute myeloid leukemia, Drug resistance mechanisms, Anthracycline, Ara-c, JNK and p38 MAPKs, CRISPR

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Classificação do grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) para a leucemia mielóide aguda.	10
Tabela 1.2	Classificação para a leucemia mielóide aguda da OMS em 2016.	11
Tabela 1.3	Grupos de risco citogenéticos em leucemia mielóide aguda.	13
Tabela 1.4	MicroRNAs associados à sensibilidade ou resistência ao tratamento em estudos utilizando amostras de pacientes com LMA	25
Tabela 1.5	MicroRNAs associados à sensibilidade ou resistência ao tratamento em estudos utilizando linhagens celulares de LMA	25
Tabela 4.1	Painel de anticorpos monoclonais primários utilizados na técnica de Western blotting	48
Tabela 6.1	Caracterização do perfil imunofenotípico das linhagens celulares de LMA	66
Tabela 7.1	Características demográficas e clínicas dos pacientes com leucemia mielóide aguda	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Maturação da célula-tronco hematopoiética.	5
Figura 1.2	Sobrevida global dos pacientes com leucemia mielóide aguda.	7
Figura 1.3	Hipótese de, no mínimo, duas etapas para o desenvolvimento da leucemia mielóide aguda.	9
Figura 1.4	Mecanismos de resistência aos quimioterápicos em leucemia mielóide aguda.	18
Figura 1.5	Esquema das vias intrínseca e extrínseca de indução de apoptose.	20
Figura 1.6	Esquema geral da biossíntese dos miRNAs	23
Figura 1.7	As MAPKs ERK, JNK e p38 controlam vias que induzem a proliferação e sobrevivência ou a diferenciação e apoptose.	28
Figura 1.8	Vias de sinalização das MAPKs JNK e p38 e seus papéis na regulação da apoptose e da autofagia.	29
Figura 1.9	Mecanismos de reparo de quebra de fita dupla (DSB)	34
Figura 1.10	Modelo representativo de clivagem da dupla fita de DNA pelo sistema CRISPR-Cas9	35
Figura 4.1	Genotipagem das linhagens de leucemia mielóide aguda.	39
Figura 4.2	Esquema da transfecção por SiRNA nas linhagens de leucemia mielóide aguda.	50
Figura 4.3	Representação ilustrativa do ranking de RNAs guias e das sequências guias escolhidas para o reconhecimento e posterior clivagem dos genes, JNK1 e p38 α	51
Figura 4.4	Figura representativa da ligação da sequência guia no vetor plasmidial PX458.	53
Figura 4.5	Figura representativa do vetor plasmidial PX459.	54
Figura 4.6	Placa contendo meio Luria Bertani (LB)-ampicilina-ágar.	55
Figura 4.7	Figura representativa da Eletroforese em gel de agarose (A) e sequenciamento (B) confirmando a presença da sequência de interesse, o RNA guia.	56
Figura 4.8	Primers utilizados para identificar as regiões editadas de cada gene (A) e Mapa do plasmídeo de clonagem do kit TA Cloning® kit, pCR2.1 (B)	58

Figura 6.1	Análise por citogenética clássica (Bandeamento GTG) mostrando a alterações cromossômicas encontradas na HL60 (A e B), Kasumi (C e D) e U937 (E)	64
Figura 6.2	Expressão da glicoproteína P (Pgp), da MRP1 (<i>multidrug resistance protein 1</i>) e atividade da Pgp e da BCRP (<i>Breast cancer resistance protein</i>) em linhagens de leucemia mielóide aguda.	67
Figura 6.3	Perfil de expressão de proteínas anti e pró-apoptóticas em linhagens celulares de LMA, por Western blotting.	69
Figura 6.4	Perfil de sensibilidade das linhagens de LMA ao tratamento com concentrações crescentes de Idarrubicina (IDA) por 24, 48 e 72 horas.	71
Figura 6.5	Perfil de sensibilidade das linhagens de LMA ao tratamento com concentrações crescentes de Daunorrubicina (DNR) por 24, 48 e 72 horas.	72
Figura 6.6	Perfil de sensibilidade das linhagens de LMA ao tratamento com concentrações crescentes com citarabina (Ara-c) por 24, 48 e 72h.	73
Figura 6.7	Perfil de sensibilidade das linhagens de leucemia mielóide aguda ao tratamento com as antraciclina e ao Ara-c por 24h.	74
Figura 6.8	Indução de morte celular pela IDA e DNR na linhagem celular HL60 pela análise da população em sub-G0/G1.	76
Figura 6.9	Indução de morte celular pela IDA e DNR na linhagem celular Kasumi pela análise da população em sub-G0/G1.	77
Figura 6.10	Indução de morte celular pela IDA e DNR na linhagem celular U937 pela análise da população em sub-G0/G1.	78
Figura 6.11	Indução de morte celular pela citarabina (Ara-c) nas linhagens celulares de LMA pela análise da população em sub-G0/G1.	79
Figura 6.12	Indução de morte celular pela citarabina (Ara-c) nas linhagens de leucemia mielóide aguda pela detecção de apoptose induzida pelo ensaio de Anexina V.	81
Figura 6.13	Indução de apoptose pelas antraciclina pela avaliação dos níveis de caspase-3 clivada nas linhagens de leucemia mielóide aguda.	83
Figura 6.14	Indução de apoptose pelo Ara-c pela avaliação dos níveis de caspase-3 clivada nas linhagens de leucemia mielóide aguda.	84
Figura 6.15	Cinética de indução de fosforilação de JNK pelas antraciclina em linhagens de leucemia mielóide aguda.	86

Figura 6.16 Cinética de indução de fosforilação de p38 pelas antraciclinas em linhagens de leucemia mielóide aguda.	87
Figura 6.17 Cinética de indução de fosforilação de JNK e p38 pelo Ara-c em linhagens de leucemia mielóide aguda.	89
Figura 6.18 Cinética de indução de fosforilação de JNK e p38 pela DNR e Ara-c nas linhagens de leucemia mielóide aguda resistentes	90
Figura 6.19 Perfil de fosforilação de quinases das linhagens de leucemia mielóide aguda.	91
Figura 6.20 Resultados do perfil de fosforilação das quinases comparando as linhagens de leucemia mielóide aguda, HL60 e HL60R	92
Figura 6.21 Cinética do silenciamento da expressão de JNK e p38 nas células U937 utilizando o RNA de interferência.	93
Figura 6.22 Cinética do silenciamento da expressão de JNK e p38 nas células Kasumi utilizando o RNA de interferência.	94
Figura 6.23 Efeito do silenciamento da expressão de JNK ou p38 na indução de resistência ao tratamento com Idarrubicina (IDA), Daunorrubicina (DNR) ou citarabina (Ara-c), na linhagem U937.	95
Figura 6.24 Efeito do silenciamento da expressão de JNK ou p38 na indução de resistência ao tratamento com Idarrubicina (IDA), Daunorrubicina (DNR) ou citarabina (Ara-c), na linhagem Kasumi.	97
Figura 6.25 Indução de morte celular pelas antraciclinas e o Ara-c nas linhagens celulares Kasumi (A) e U937 (B) silenciadas para JNK e p38 pela análise da população em sub-G0/G1, por citometria de fluxo.	98
Figura 6.26 Esquema da transfecção por siRNA nas linhagens de leucemia mielóide aguda e análise da Pgp.	100
Figura 6.27 Expressão da glicoproteína P (Pgp) na linhagem Kasumi após silenciamento com siRNA para JNK ou para p38	101
Figura 6.28 Expressão da glicoproteína P (Pgp) na linhagem U937 após silenciamento com siRNA para JNK ou para p38	102
Figura 6.29 Padrão de expressão de miR-27a nas linhagens Kasumi (A) e U937 (B) após 72 horas de transfecção com SiRNA para JNK.	104
Figura 7.1 Comparação dos níveis de expressão do miR-27a em amostras de medula óssea dos pacientes com LMA e nos indivíduos saudáveis.	106

Figura 7.2	Comparação dos níveis de expressão do miR-27a nos pacientes com LMA com características clínicas e laboratoriais	108
Figura 7.3	Análise de correlação entre os níveis de expressão do miR-27a com os níveis de expressão da Pgp nos pacientes com LMA	109
Figura 7.4	Análise dos níveis de expressão do miR-27a em relação a sobrevida global e livre de doença.	110
Figura 7.5	Análise da fosforilação de JNK e p38 em amostras de leucemia mielóide aguda, por Western blotting.	112
Figura 11.1	Esquema resumido alguns resultados encontrados e possíveis alvos de regulação	129

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABCB1	<i>ATP-binding cassette sub-family B member 1</i>
ABL	Oncogene viral de leukemia murina de Abelson v-abl
AIF	Fator de indução a apoptose (<i>Apoptosis inducing factor</i>)
ALM	Anterior lenticonus with microphthalmia
AML1 (RUNX1)	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
AN	Análogos de nucleosídeos
AP-1	Proteína ativadora 1
APAF-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
ARA-C	Citarabina
ATF-2	<i>Activating transcription factor 2</i>
ATO	Trióxido de Arsênico
ATP	Adenosina -5'-trifosfato
ATRA	Ácido transretinóico
ATTC	American Type Culture Collection
BAD	<i>BCL2-antagonist of cell death</i>
BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
BAX	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
BCL-XL	<i>B-cell lymphoma extra-large protein</i>
BCR	<i>Breakpoint cluster region protein</i>
BCRP (ABCG2)	<i>Breast cancer resistance protein</i>
BIM	<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
BSA	Albumina sérica bovina fração V
Cas	CRISPR-associated
CBF	<i>Core binding factor</i>
CBP/P300	<i>CREB-binding protein</i>
CD	Código de diferenciação
CEBP α	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
c-IAP2	<i>The cellular inhibitor of apoptosis 2</i>
c-KIT	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>

CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
crRNAs	CRISPR targeting RNA
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DED	Domínio efetor de morte
del	<i>Deleção</i>
DGCR8	<i>DiGeorge Syndrome Critical Region 8 protein</i>
DISC	Complexo sinalizador de morte celular
DMEM/F12	Meio de Dulbecco modificado por Eagle: Mistura Nutriente F-12
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNR	Daunorrubicina
DOX	Doxorrubicina
dsRNA	RNA de fita dupla
ELK	<i>ETS domain-containing protein</i>
ERK	<i>Extracellular-signal-regulated kinases</i>
ETO (RUNXIT1)	<i>Runt-related transcription factor 1; translocated to 1</i>
FAB	Classificação Francesa-Americana-Britânica
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
FANCF	<i>Fanconi Anemia, Complementation Group F</i>
FAS-L	Ligante de Fas
FLT3	<i>FMS-like tyrosina kinase 3</i>
g	Gramma
G0	Gap 0
G1	Gap 1
G2/M	Gap 2/Mitose
gRNA	RNA guia
HDAC	Histona deacetilase
HDR	Recombinação homóloga (<i>Homology-Directed Repair</i>)
HOVON	Grupo cooperativo belga-holandês de Hemato-Oncologia
HOX	Genes Homeotic
IAP	Inibidores da apoptose
IDA	Idarrubicina
INCA	Instituto Nacional de Câncer
inv	Inversão
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
kDa	Quilodalton

KIT	Homólogo de oncogene viral de sarcoma felino v-kit HardyZuckerman 4
LDH	Enzima desidrogenase lática
LMA	Leucemia mieloide aguda
M0	Leucemia mieloblástica aguda indiferenciada
M1	Leucemia mieloblástica aguda sem maturação
M2	Leucemia mieloblástica aguda com maturação
M3	Leucemia promielocítica aguda ou promielocítica
M4	Leucemia mielomonocítica aguda
M5	Leucemia monoblástica aguda (5a) ou Leucemia monocítica aguda (5b)
M6	Leucemia eritroide aguda ou eritroleucemia
M7	Leucemia megacarioblástica aguda
MAP2K	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MAP3K	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCL-1	<i>Myeloid cells leukemia-1</i>
MDR	Resistência a múltiplas drogas
MDR1	Resistência a múltiplos fármacos, membro 1
miRNA	MicroRNA
MKK3	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 3</i>
MKK4	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 4</i>
MKK6	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 6</i>
MKK7	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 7</i>
MLL	<i>Mixed-lineage leukemia</i>
MO	Medula Óssea
MRP1 (ABCC1)	<i>Multidrug resistance related-protein 1</i>
MYC	Homólogo de oncogene viral v-myc de mielocitomatose
NF-kB	Fator de transcrição nuclear Kappa B
NHEJ	Junção das extremidades não homologas (<i>Nonhomologous End Joing</i>)
NPM1	<i>Nucleophosmin</i>
NRF2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
°C	Grauentígrado
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Braço curto
p38	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>

PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i>
pb	Pares de base
PBS	Solução salina de fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDGFbR	<i>Platelet-derived growth factor receptor-beta</i>
Pgp	Glicoproteína P
PML	Leucemia Promielocítica
pre-miRNA	MicroRNA precursor
pri-miRNA	MicroRNA primário
PTPN11	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
q	Braço longo
RARA	Receptor do ácido retinóico
RAS	Rat sarcoma
RIF	Razão de intensidade de fluorescência média
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
RNAm	RNA mensageiro
Rpm	Rotação por minuto
RPMI-1640	Meio de cultura de células
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de Sódio
SFB	Soro fetal bovino
siRNAs	Pequenos RNAs de interferência
SMD	Síndrome mielodisplásica
SMP	Síndrome mieloproliferativa
SNPs	Polimorfismo de nucleotídeo único
STR	Repetição curta em tandem
t	Translocação
T1F1	<i>Type I element binding Factor</i>
TBS	Tampão Tris Salino (<i>Tris buffer saline</i>)
TEL (ETV6)	<i>Ets variant 6</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-1,2-diaminometano
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF-R1	Receptor do fator de necrose tumoral 1

TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UTR	<i>Untranslated region</i>
UV	Ultravioleta
V	Volt
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
μL	Microlitros
μM	Micromolar

Sumário

1. INTRODUÇÃO	4
1.1 Leucemia mielóide aguda	4
1.2 Aspectos epidemiológicos e etiológicos da LMA	6
1.3 Patogênese da LMA.....	8
1.4 Diagnóstico e Classificação da LMA	9
1.5 Fatores prognósticos na LMA	12
1.6 Tratamento da LMA	14
1.7 Mecanismos de resistência ao tratamento na LMA.....	17
1.8 MicroRNAs	22
1.9 Participação das MAPKs, JNK e p38 na resistência ao tratamento	26
1.10 Sistema CRISPR/Cas.....	32
2. Justificativa para o estudo.....	36
3. OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo Geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 Cultura de células	38
4.2 Genotipagem das linhagens celulares.....	38
4.3 Detecção de contaminação por micoplasma por PCR semi-quantitativo	39
4.4 Agentes Farmacológicos e indução de resistência	40
4.5 Citogenética Clássica.....	40
4.5.1 Cultura das linhagens celulares	40
4.5.2 Término das culturas e preparação das lâminas	41
4.5.3 Análise por bandeamento GTG.....	41
4.6 Detecção do perfil de expressão das proteínas transportadoras de efluxo nas linhagens celulares por citometria de fluxo.....	42
4.7 Estudo funcional das bombas de efluxo por citometria de fluxo	43
4.8 Ensaio de MTT: avaliação da citotoxicidade induzida pelos quimioterápicos	44
4.9 Avaliação da fragmentação do DNA e do ciclo celular por citometria de fluxo	44
4.10 Marcação da caspase-3 clivada por citometria de fluxo	45
4.11 Detecção da expressão das proteínas por Western blotting	46
4.12 <i>Array</i> de proteínas fosforiladas	48
4.13 Silenciamento gênico de JNK e p38 por interferência de RNA (RNAi).....	49
4.14 Extração de RNA, quantificação, síntese de cDNA e miRNAs.....	50
4.15 Desenhos do RNA guia (RNAg), Plasmídeos e Clonagem	51

4.16	Transfecção, Sequenciamento e Eletroporação das linhagens de LMA.....	54
4.17	Avaliação molecular de edições genômicas (em andamento).....	57
4.18	Seleção, critérios de inclusão e exclusão, e informações clínicas dos pacientes com LMA.....	59
4.19	Considerações éticas.....	59
4.20	Análises Estatísticas.....	59
5.	DESENHO EXPERIMENTAL DO ESTUDO.....	61
6.	RESULTADOS.....	62
6.1	As linhagens de LMA apresentam uma evolução clonal quanto ao padrão cromossômico descrito na literatura.....	62
6.2	A linhagem celular Kasumi apresentam um imunofenótipo semelhante ao descrito na literatura.....	65
6.3	As linhagens de LMA apresentam diferentes níveis de expressão e atividade das proteínas transportadoras de efluxo associadas à resistência a múltiplas drogas.....	66
6.4	As linhagens de LMA apresentam um perfil distinto de expressão de moléculas reguladoras da apoptose.....	68
6.5	As linhagens de LMA apresentam diferentes perfis de sensibilidade e resistência à inibição da viabilidade celular após tratamento com os quimioterápicos IDA, DNR e Ara-c.....	70
6.6	As antraciclinas e o Ara-c induzem fragmentação do DNA nas linhagens de LMA.....	75
6.7	As antraciclinas e o Ara-c induzem apoptose nas linhagens celulares de LMA.....	80
6.8	A exposição das células as antraciclinas aumenta a fosforilação de JNK e p38 em linhagens de LMA.....	85
6.9	A exposição das células ao Ara-c aumenta a fosforilação de JNK e p38 em linhagens de LMA.....	88
6.10	A DNR e o Ara-c não induzem a fosforilação de JNK e p38 nas linhagens de LMA resistentes nos tempos e concentrações testadas.....	89
6.11	Alterações no perfil de expressão de diversas proteínas fosforiladas na linhagem resistente ao Ara-c.....	90
6.12	O silenciamento da expressão de JNK e p38, por siRNA, aumenta a resistência à morte celular induzida pelas antraciclinas e pelo Ara-c.....	93
6.13	O silenciamento da expressão de JNK e p38, por siRNA, aumenta da expressão da Pgp nas linhagens Kasumi e U937.....	99
6.14	O silenciamento da expressão de JNK e p38, por siRNA, aumenta a expressão do miR-27a nas linhagens Kasumi e U937.....	103
7.	Caracterização clínica dos pacientes com LMA.....	104
7.1	Investigação dos níveis de expressão do miR-27a em amostras de pacientes com LMA.....	106
7.2	Correlação entre os níveis de expressão do miR-27a e da Pgp em amostras de pacientes com LMA.....	109
7.3	Associação entre os níveis de expressão do miR-27a das amostras de pacientes com LMA com a sobrevida global e livre de doença.....	110

7.4	Níveis de fosforilação da JNK e p38 em amostras de pacientes com LMA tratadas com as antraciclinas (em andamento)	111
8.	Discussão	112
9.	Considerações finais.....	126
10.	Conclusões.....	127
11.	Conclusão Geral.....	129
12.	Perspectivas	130
13.	Referências.....	131
14.	Anexos	149
14.1	Manuscrito submetido durante o doutorado.....	149
14.2	Manuscrito em preparo para submissão.....	151
14.3	Manuscrito aceito para publicação durante do doutorado	152

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia mielóide aguda

A leucemia mielóide aguda (LMA) é uma doença clonal caracterizada por um bloqueio na diferenciação da linhagem mielóide, proliferação descontrolada e acúmulo das células precursoras imaturas na medula óssea e no sangue periférico (ESTEY, 2014; GOJO; KARP, 2014; PERRY; ATTAR, 2014) (Figura 1.1). Esses precursores imaturos interferem na hematopoese normal contribuindo para a insuficiência da medula óssea, principal causa de morte dos pacientes com LMA (ESTEY, 2014). As principais manifestações clínicas da LMA são hemorragias, decorrentes da plaquetopenia, infecções, decorrente da neutropenia e cansaço devido à anemia (STEFFEN et al., 2005).

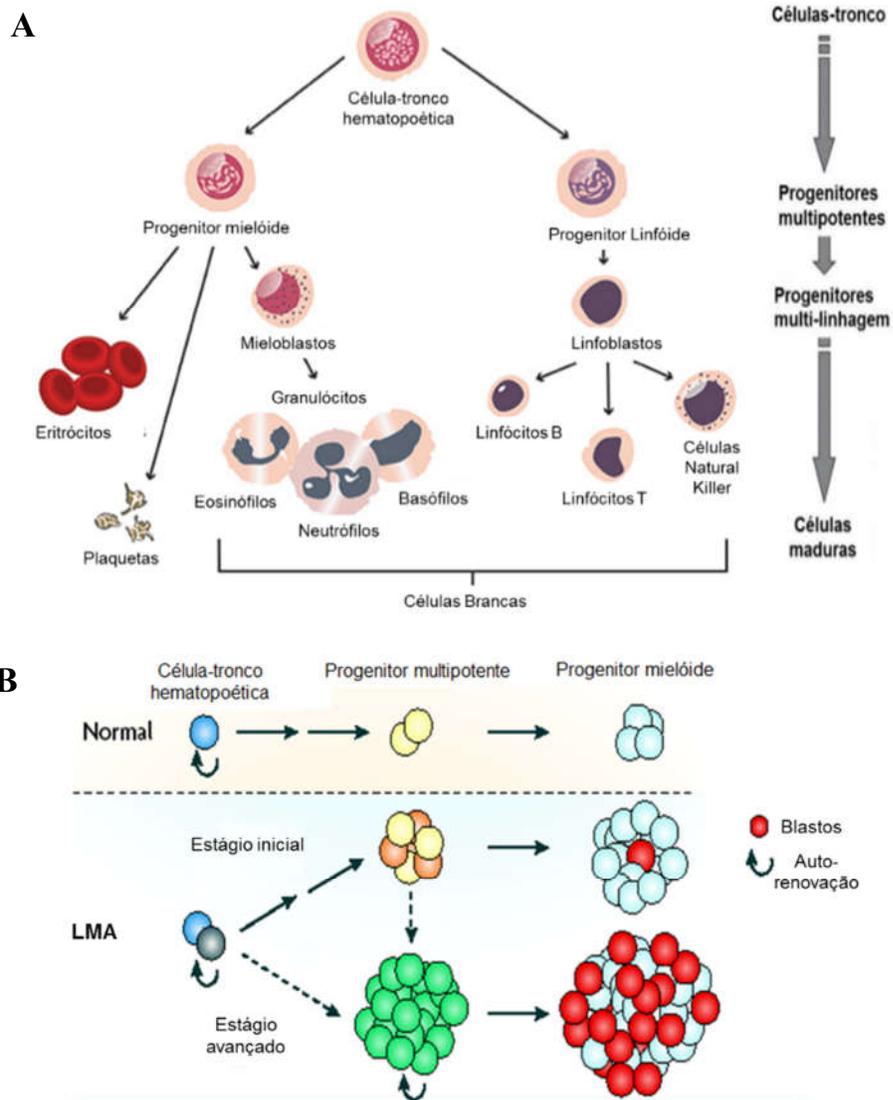


Figura 1.1: Maturação da célula-tronco hematopoiética. As células mielóides têm origem a partir de uma célula precursora multipotente na medula óssea (A). A leucemia mielóide aguda (LMA) resulta em bloqueio na diferenciação da linhagem mielóide e proliferação celular descontrolada (B). Adaptado de (SAVONA; TALPAZ, 2008).

A LMA é uma doença que afeta principalmente os idosos, com uma mediana de idade no momento do diagnóstico de 65 anos (DOMBRET; RAFFOUX; GARDIN, 2008; ESTEY, 2007; POLLYEA; KOHRT; MEDEIROS, 2011). Esta leucemia representa 80 a 90% das leucemias agudas na idade adulta e é o segundo tipo mais comum em crianças, representando 25 a 30% das leucemias agudas na infância (SAKAMOTO et al., 2015).

1.2 Aspectos epidemiológicos e etiológicos da LMA

A LMA é rara em crianças, ocorrendo com uma incidência de oito milhões por ano entre 1-18 anos de idade no mundo. Em adultos, a taxa de incidência aumenta, chegando a 20 milhões por ano na faixa etária entre 18 e 60 anos de idade e 170 milhões por ano na faixa etária acima de 60 anos (CHAUDHURY et al., 2015). Considerando que a incidência da LMA aumenta com a idade, é razoável supor que a LMA é ainda mais rara em lactentes. No entanto, a incidência na população pediátrica é de 15 milhões por ano em crianças com idade inferior a um ano (HOWLADER et al., 2014).

A etiologia da LMA tem um caráter extremamente multifatorial, englobando fatores ambientais, tais como a exposição a agentes genotóxicos, fatores genéticos, como a aquisição de mutações ou alterações cromossômicas e fatores epigenéticos, como alterações na metilação do DNA ou acetilação de histonas (RUBNITZ; GIBSON; SMITH, 2010).

Pacientes com LMA tem uma evolução clínica rápida, resultando em uma sobrevivência em cinco anos menor do que 20% em pacientes, com idade acima de 60 anos, e 50% em pacientes com idades entre 15-59 anos (PERRY; ATTAR, 2014) (Figura 1.2).

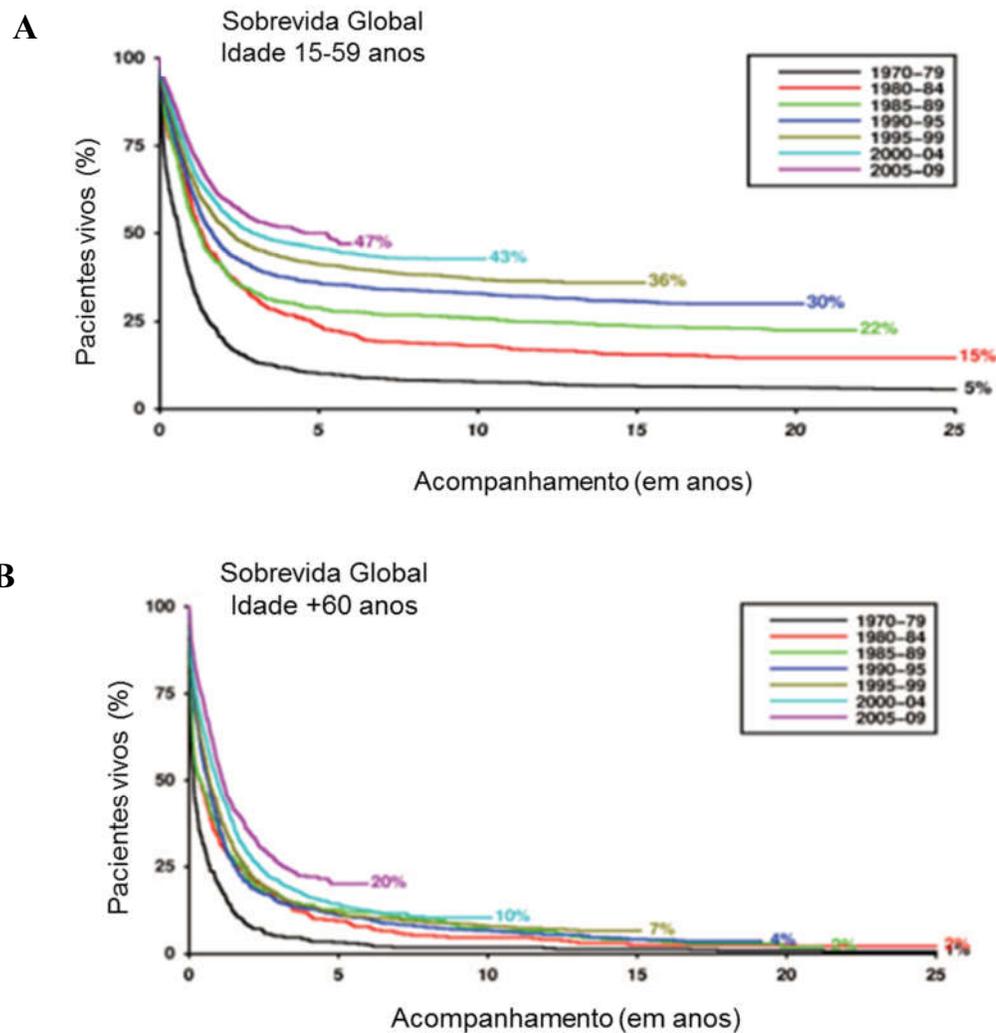


Figura 1.2: Sobrevida global dos pacientes com leucemia mielóide aguda. Sobrevida global dos pacientes com idade entre 15-59 anos (A) e com mais de 60 anos (B). Acompanhamento de 1970 a 2009. Adaptado de (BURNETT, 2012).

A LMA é dita primária ou *de novo*, quando não há fator de risco conhecido para que a doença tenha sido desencadeada e é denominada secundária quando ocorre após exposição a agentes leucemogênicos ou é posterior a uma neoplasia predisponente, como síndromes mielodisplásicas (SMD), mieloproliferativas (SMP) ou doenças associadas com mutações somáticas como anemia de Fanconi, síndrome de Li-Fraumeni, anemia de Bloom, síndrome

de Werner ou de Down que estão associadas com alto risco de desenvolverem LMA (SMITH et al., 2004).

1.3 Patogênese da LMA

A LMA é resultado de mutações genéticas distintas que colaboraram para conferir além de vantagens proliferativas e de sobrevivência, bloqueio na diferenciação mielóide e inibição da apoptose (GILLILAND; TALLMAN, 2002) (Figura 1.3). Este mecanismo é composto por no mínimo duas etapas e é suportado por estudos em modelos murinos (HIGUCHI et al., 2002), análise de gêmeos com LMA (WIEMELS et al., 1999) e pacientes com predisposição familiar para leucemia (SONG et al., 1999). Mutações em genes ou fusões gênicas que conferem aumento do potencial proliferativo e/ou sobrevivência para as células, mas não afetam a diferenciação são chamadas mutações de Classe I e incluem as mutações nos genes *FLT3*, *ALM*, *RAS*, *PTPN11*, e fusões nos genes *BCR/ABL* e *TEL/PDGFR*. De modo semelhante, mutações em genes ou fusões gênicas que prejudiquem a diferenciação ou a apoptose são chamadas de mutações de Classe II e incluem as fusões dos genes *AML1/ETO* e *PML/RAR α* , rearranjos do gene *MLL*, mutações em *CEBP α* , *CBF*, nos membros da família dos genes *HOX*, no gene *CBP/P300*, e em genes co-ativadores de (RUBNITZ; GIBSON; SMITH, 2010). A LMA se desenvolve quando as células precursoras hematopoiéticas adquirem tanto mutações de Classe I quanto as de Classe II. Estas mutações também podem ocorrer em reguladores transcricionais ou epigenéticos (GALLIPOLI; GIOTOPOULOS; HUNTLY, 2015).

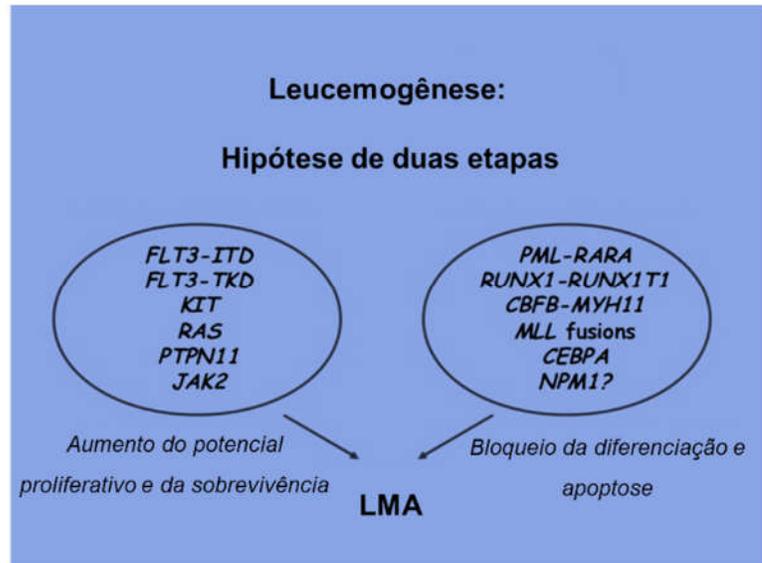


Figura 1.3: Hipótese de, no mínimo, duas etapas para o desenvolvimento da leucemia mielóide aguda. A célula tronco hematopoiética necessita adquirir mutações em genes que aumentem a proliferação e bloqueiem a diferenciação para o desenvolvimento de um clone leucêmico. Adaptado de (DASH; GILLILAND, 2001).

Vários estudos sugerem que as células tronco leucêmicas podem surgir em diferentes estágios da diferenciação celular, resultando em clones extremamente heterogêneos e complexos com capacidade de auto-renovação. Tal característica torna a LMA uma doença extremamente heterogênea em relação às características citogenéticas, moleculares, resposta ao tratamento, sobrevida livre de doença e sobrevida global (RUBNITZ; GIBSON; SMITH, 2010).

1.4 Diagnóstico e Classificação da LMA

O diagnóstico da LMA é realizado primeiramente pela contagem das células no sangue periférico que evidencia a leucocitose. A presença de células blásticas é confirmada pela análise das células da medula óssea (mielograma). O diagnóstico e a classificação do subtipo da LMA é também baseado na análise citoquímica, citogenética, na

imunofenotipagem por citometria de fluxo e em testes moleculares (por exemplo, análise da presença de mutações do gene *FLT3*) (RUBNITZ; GIBSON; SMITH, 2010).

Outro critério diagnóstico importante, de acordo com a classificação atual da Organização Mundial da Saúde (OMS), é a presença de no mínimo 20% de blastos na medula óssea ou no sangue periférico. Este critério difere dos 30% de blastos necessários para a classificação proposta pelo grupo Franco-Americano-Britânico (FAB).

Devido à grande heterogeneidade clínica e biológica da LMA, fez-se necessária a criação de um sistema de subclassificação da doença. O primeiro a ser amplamente aceito foi o proposto pelo grupo FAB em 1976, e levou em consideração principalmente os critérios citomorfológicos, imunofenotípicos e citotóxicos e subdividiu a LMA em oito subtipos: M0 a M7 (Tabela 1.1) (HAYHOE, 1988).

Tabela 1.1: Classificação do grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) para a leucemia mielóide aguda

Classificação FAB para a Leucemia mielóide aguda (LMA)
• M0 : Leucemia mieloblástica aguda indiferenciada
• M1 : Leucemia mieloblástica aguda sem maturação
• M2 : Leucemia mieloblástica aguda com maturação
• M3 : Leucemia promielocítica aguda ou promielocítica
• M4 : Leucemia mielomonocítica aguda
• M5 : Leucemia monoblástica aguda (5a) ou Leucemia monocítica aguda (5b)
• M6 : Leucemia eritróide aguda ou Eritroleucemia
• M7 : Leucemia megacarioblástica aguda

Com os avanços no campo da citogenética e da biologia molecular, observou-se que estes novos parâmetros eram de grande importância clínica e biológica para a doença. Dessa forma, a classificação FAB, apesar de identificar a heterogeneidade morfológica, não refletia a diversidade genética e clínica da LMA (WALTER et al., 2013). Baseando-se nestes novos

conhecimentos, a OMS criou em 2001, com revisão em 2008 e 2016, uma nova classificação, contemplando as características citogenéticas e moleculares da LMA (Tabela 1.2) (ARBER et al., 2016). Apesar da classificação da OMS ser a classificação mais recente, a classificação FAB ainda é muito utilizada (WALTER et al., 2013).

Tabela 1.2: Classificação para a leucemia mielóide aguda da OMS em 2016.

Leucemia mielóide aguda (LMA) e neoplasias de células precursoras relacionadas
• LMA com anormalidades genéticas recorrentes
✓ LMA com t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
✓ LMA com inv(16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
✓ Leucemia promielocítica aguda (LPMA) com t(15;17)(q22;q12); PML-RARA
✓ LMA com t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL
✓ LMA com t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
✓ LMA com inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1
✓ LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1
✓ LMA com mutação de NPM1
✓ LMA com mutação de CEBPA
▪ LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia (LMA/MD)
▪ Neoplasias mielóides relacionadas com terapia (NM-T)
▪ Leucemia mielóide aguda, SOE (LMA, SOE)
✓ LMA com diferenciação mínima
✓ LMA sem maturação
✓ LMA com maturação
✓ Leucemia mielomonocítica aguda
✓ Leucemia monoblástica (LMOB) e leucemia monocítica (LMOc)
✓ Leucemia eritroide aguda (LEA)
✓ Leucemia megacarioblástica aguda
✓ Leucemia basofílica aguda (LBA)
✓ Panmielose aguda com mielofibrose (PMA-MF)

OMS: Organização Mundial da Saúde. Adaptado de (ARBER et al., 2016).

1.5 Fatores prognósticos na LMA

Os fatores prognósticos geralmente estão associados com a resposta ao tratamento padrão. Em LMA, se correlacionam com a resposta a terapia de indução de remissão, sobrevida global, sobrevida livre de doença e com a taxa de recidiva (LIERSCH et al., 2014). Diversos marcadores foram identificados com o objetivo de estratificar pacientes em grupos prognósticos e são utilizados para orientar as decisões de tratamento, tais como idade, citogenética, alterações moleculares, subtipo da LMA, leucometria ao diagnóstico, desidrogenase láctica, presença de alterações epigenéticas, entre outros (LIERSCH et al., 2014).

A idade do paciente no momento do diagnóstico é um importante fator prognóstico na LMA. A influência da idade para o prognóstico é evidente a partir de 50 anos de idade (JULIUSSON et al., 2009) e em pacientes com LMA abaixo dos 30 anos (CREUTZIG et al., 2008). Vários fatores estão relacionados com a idade elevada e influenciam negativamente o prognóstico, tais como a maior frequência de comorbidades, maior frequência de alterações citogenéticas de alto risco e menor frequência das alterações citogenéticas de baixo risco. No entanto, mesmo apresentando fatores prognósticos favoráveis, a idade elevada continua a ser um fator de mau prognóstico independente (BÜCHNER et al., 2009; KRUG et al., 2010). Pacientes com 65 anos ou mais têm um prognóstico desfavorável após o tratamento com quimioterapia, independentemente de apresentarem alterações citogenéticas de baixo risco (APPELBAUM et al., 2006; BÜCHNER et al., 2009; SCHOCH et al., 2004).

Como demonstrado desde 1982, a citogenética é um fator de risco importante para a resposta a quimioterapia em pacientes com LMA (BLOOMFIELD et al., 1984; SHAH; BAROCHIA; LOUGHRAN, 2013). O prognóstico e a citogenética na LMA estão intimamente ligados. A estratificação em grupos de risco divide os pacientes em três grupos principais, aqueles com citogenética favorável (baixo risco), intermediária (risco

intermediário), e desfavorável (alto risco). Embora algumas alterações cromossômicas variem de um estudo para outro, entre todos os estudos, existe um consenso geral (Tabela 1.3) (SHIPLEY; BUTERA, 2009).

Tabela 1.3: Grupos de risco citogenéticos em leucemia mielóide aguda.

	Risco favorável ou Baixo	Risco intermediário	Risco desfavorável
Alterações cromossômicas	t(15;17)(q22;q12-21) t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13q22/ t(16;16)(p13;q22)	Cariótipo normal t(9;11)(p22;q23) del(7q) del(9q) del(11q) del(20q) -Y +8 +11 +13 +21	Cariótipo complexo inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26) t(6;9)(p23;q34) t(6;11)(q27;q23) t(11;19)(q23;p13.1) del(5q) -5 -7

Adaptado de (SHIPLEY; BUTERA, 2009).

Translocações balanceadas ou recíprocas, como a translocação t(15;17) ou aquelas envolvendo os fatores de transcrição da família CBF (*core binding factor*) como a translocação (8;21), a inversão do cromossomo 16 ou t(16;16), representam alterações citogenéticas de bom prognóstico. Pouco consenso existe sobre a definição das alterações de mau prognóstico (LIERSCH et al., 2014).

A análise mais extensa das alterações citogenéticas e sua correlação com o prognóstico foi realizada em 5.800 pacientes com LMA (GRIMWADE et al., 2010). Neste estudo, as seguintes alterações citogenéticas foram classificadas como de mau prognóstico: alterações no 3q (excluindo a t(3;5)(q25;q34)), inv(3)(q21q26)/t(3;3) (q21;q26), alterações no 5q, del(5q), -5, -7, alterações no 7q, del(7q), t(11q23) (excluindo t(9;11)(p21-22;q23) e t(11;19)(q23;p13)), t(9;22)(q34;q11), -17, alterações no 17p e cariótipos complexos com no mínimo, quatro alterações citogenéticas (excluindo alterações de bom prognóstico).

A definição mais amplamente utilizada para cariótipo complexo consiste na presença de pelo menos três alterações citogenéticas, excluindo alterações de bom prognóstico (DOHNER et al., 2010). O cariótipo complexo está presente em aproximadamente 10-20% dos casos de LMA (ZEISIG et al., 2012). O grupo cooperativo belga-holandês de Hemato-Oncologia (HOVON) identificou a existência de um cariótipo dito monossomal, definido como a presença de duas monossomias, ou a presença de uma monossomia associada a uma alteração estrutural como um forte marcador de prognóstico adverso (BREEMS et al., 2008). A presença de alterações citogenéticas de mau prognóstico é considerada como um fator preditivo de resposta à quimioterapia (BURNETT et al., 2007, 2010).

Uma grande porcentagem dos pacientes com LMA (aproximadamente 45%) apresenta cariótipo normal, o que confere prognóstico intermediário devido à presença, na maioria dos casos, de alterações moleculares. Sendo assim, é a associação das alterações citogenéticas com as alterações moleculares que predizem o prognóstico dos pacientes com LMA, tais como mutações no gene *FLT3* (*Fms-like tyrosine kinase 3*), que conferem um mau prognóstico para os pacientes que apresentam alterações citogenéticas de risco intermediário ou favorável (ALLEN et al., 2013; PASCHKA et al., 2013), mutações em *NPM1* (*nucleophosmin 1*) que conferem um prognóstico favorável para os pacientes que apresentam cariótipo normal (SCHLENK et al., 2008), assim como mutações em *CEBPa* (*CCAAT enhancer-binding protein- α*). Mutações em *c-Kit* conferem um prognóstico desfavorável para pacientes com citogenética de bom prognóstico (PASCHKA et al., 2013).

1.6 Tratamento da LMA

Os avanços da biologia molecular no estudo de proteínas de fusão, melhoraram significativamente a nossa compreensão sobre os mecanismos moleculares da LMA. E em alguns casos, esse entendimento tem proporcionado o desenvolvimento de abordagens

terapêuticas muito bem sucedidas, tais como o ácido transretinóico (ATRA), e o trióxido de arsênio (ATO) para pacientes portadores da translocação t(15;17) que leva a fusão do gene *PML* com o receptor alfa do ácido retinóico (*RARA*) (*PML-RARA*). Esses pacientes alcançam uma sobrevida global em cinco anos de aproximadamente 80-90% (LO-COCO et al., 2013). No entanto, o conhecimento atual sobre os mecanismos moleculares nos outros subtipos da LMA é ainda muito limitado e o tratamento, com base principalmente na quimioterapia intensiva é utilizado em todos os pacientes (ESPOSITO; SO, 2014).

O tratamento atual baseado na associação de uma antraciclina (idarrubicina - IDA ou daunorrubicina - DNR) com a citarabina (Ara-c), na combinação (7+3), sete dias de citarabina com três dias de antraciclina é o tratamento de indução de remissão padrão para LMA (SCHIFFER, 2014). Esse mesmo tratamento se mantém há mais de 40 anos, apesar dos resultados insatisfatórios devido à alta taxa de resistência à quimioterapia. No entanto, nenhuma outra terapia foi capaz de sobrepujar os resultados dessa combinação (BURNETT, 2012). O Ara-c em altas doses é utilizado durante a consolidação do tratamento ou para pacientes em recidiva (SCHIFFER, 2014).

A IDA é um análogo sintético da DNR, diferindo apenas na substituição de um átomo de hidrogênio. Esta substituição resulta em um aumento da lipofilicidade e melhor biodisponibilidade oral (CRIVELLARI et al., 2004). No entanto, ambas parecem ter o mesmo mecanismo de ação clássico: são capazes de se intercalar ao DNA, inibindo a DNA e a RNA polimerase e a atividade de enzima topoisomerase II, resultando em quebras da dupla fita de DNA e apoptose (CRIVELLARI et al., 2004).

Todavia, hoje se sabe que estes quimioterápicos possuem um mecanismo de ação muito mais amplo do que o inicialmente descrito, ativam diferentes vias de sinalização celular ou necessitam da regulação de outras vias para induzir a apoptose nas células leucêmicas (RISTIC et al., 2014).

Os análogos de pirimidina, tais como a citarabina (Ara-c), são componentes essenciais para a terapia de indução de remissão na LMA. Estes análogos de nucleosídeos (AN) têm uma estrutura química semelhante à citosina, e uma vez inseridos no DNA, levam a inibição de sua síntese e reparo, levando a apoptose (PETERS, 2014). Diferentes mecanismos de resistência aos AN foram descritos, incluindo a diminuição da concentração intracelular, incapacidade de causar alterações suficientes na dupla fita de DNA e a falha da ativação de vias de sinalização que levam a apoptose (ABRAHAM et al., 2015).

Embora os resultados da quimioterapia gerem altas taxas de remissão, a maioria dos pacientes apresenta recidiva resultando em uma sobrevida livre de doença em cinco anos de apenas 40-45% em pacientes jovens e menos de 10% em idosos (SCHLENK; DÖHNER, 2013).

A probabilidade dos pacientes alcançarem remissão completa depende de muitas variáveis clínicas e biológicas, tais como: 1) A idade avançada é uma variável prognóstica desfavorável. A razão para os piores resultados obtidos em pacientes idosos inclui a intolerância à quimioterapia intensiva e o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR) (LANCET; KARP, 2009); 2) Pacientes com anormalidades citogenéticas de mau prognóstico (-7, -5 -5q) alcançam uma taxa de sobrevida livre de doença de apenas 10% em 5 anos (HONG; MEDEIROS, 2011); 3) Pacientes com alta taxa de proliferação espontânea apresentam alta taxa de recidiva e frequentemente expressam o fenótipo MDR além do antígeno CD34+ (VERGEZ et al., 2011); 4) A mutação no gene *FLT3*, um receptor da tirosina quinase, confere um pior prognóstico em crianças e adultos com LMA (SHEN et al., 2011); 5) A superexpressão de proteínas antiapoptóticas como Survivina e XIAP sugere que ambas estejam envolvidas na resistência à quimioterapia e consequente falha no tratamento das leucemias (DEL POETA et al., 2008). Sendo assim, diversos pacientes evoluem para o óbito devido à resistência intrínscica das células leucêmicas ao tratamento e à recidiva precoce

causada pela aquisição de resistência à terapia inicial (HAMPRAS et al., 2010). Dessa forma, a resistência à quimioterapia permanece sendo o grande desafio na busca por melhores respostas ao tratamento na LMA (SAKAMOTO et al., 2015).

1.7 Mecanismos de resistência ao tratamento na LMA

A resistência aos quimioterápicos na LMA tem sido principalmente atribuída à superexpressão da glicoproteína P (Pgp), uma proteína transportadora de efluxo, dependente de ATP, que promove a extrusão de fármacos citotóxicos e xenobióticos para o exterior das células (ROBEY et al., 2010). A família de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) em humanos é extensa, incluindo 48 membros. No entanto, três, em particular, têm um papel bem definido no transporte de fármacos clinicamente relevantes: a *ABCB1/Pgp*, a proteína de resistência a múltiplas drogas (*ABCC1/MRP-1*) e a proteína de resistência ao câncer de mama (*ABCG2/BCRP*) (SHAFFER et al., 2012).

No entanto, as tentativas na utilização da Pgp como alvo terapêutico na LMA não demonstraram um claro benefício (CRIPE et al., 2010; LIU YIN et al., 2001). Além da Pgp, as proteínas transportadoras de efluxo MRP1 e BCRP também estão associadas a resistência a quimioterapia na LMA (SHAFFER et al., 2012) (Figura 1.4).

Atualmente, diversos fatores já foram associados com a resistência ao tratamento na LMA, tais como o aumento do metabolismo de drogas (SCHIMMER et al., 2001), aumento do reparo ao dano no DNA induzido pelos quimioterápicos (SEEDHOUSE et al., 2006), diminuição da fosforilação das MAPKs JNK e p38 (CHOI et al., 2007; LAGADINOU et al., 2008), inibição da expressão de proteínas pró-apoptóticas como Bim (PARDEE, 2012) ou superexpressão de proteínas anti-apoptóticas como a bcl-2 (GUENOVA et al., 2010), Survivina (MOORE et al., 2014), XIAP (HOLT et al., 2011), c-IAP2 (VALDEZ et al., 2008) entre outras (Figura 1.4).

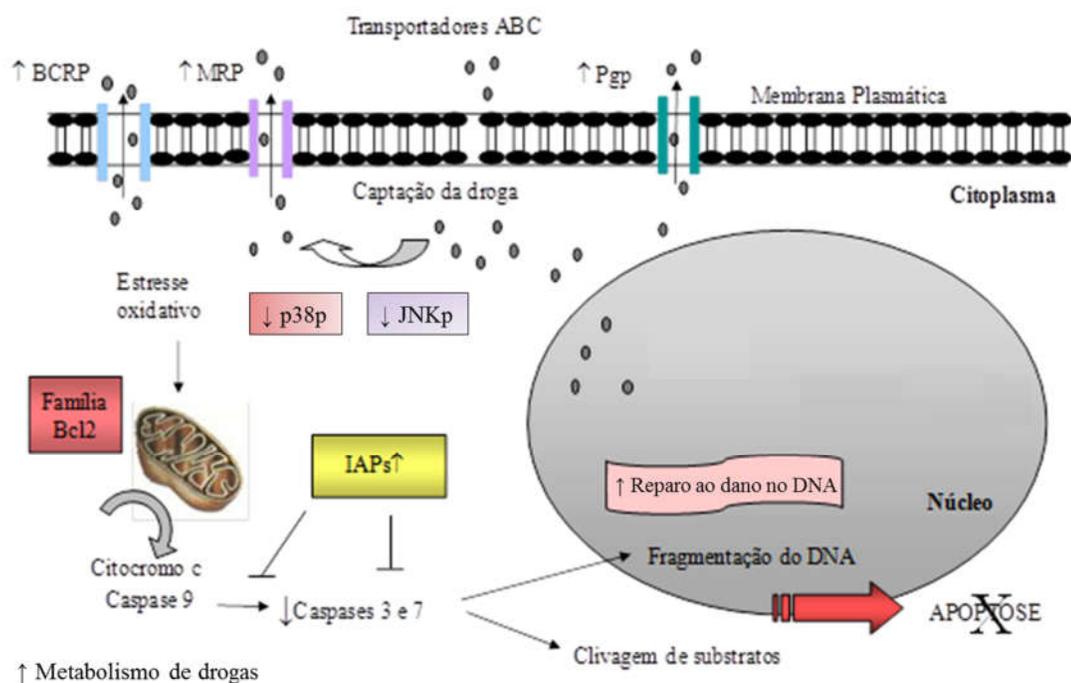


Figura 1.4: Mecanismos de resistência aos quimioterápicos em leucemia mieloide aguda.

Quimioterápicos atravessam a membrana plasmática de células tumorais por difusão e tem seus efeitos citotóxicos reduzidos devido a alguns mecanismos de resistência. As proteínas transportadoras de efluxo: Pgp (Glicoproteína P), BCRP (Proteína de resistência do câncer de mama) e MRP1 (Proteína de resistência a múltiplas drogas) podem transportá-los ativamente para o meio extracelular, diminuindo sua concentração intracelular. Outros fenótipos de quimioresistência correspondem a alterações em proteínas que induzem a apoptose mediante o estresse, com JNK e p38 e mutações em proteínas envolvidas com o metabolismo de drogas. Além disso, a ativação da apoptose pode ser bloqueada por um balanço desfavorável de expressão de membros da família Bcl-2, bem como pela superexpressão das IAPs (Proteínas inibidoras da apoptose). Adaptado de (NESTAL DE MORAES et al., 2012).

A apoptose desempenha um papel fundamental no controle da renovação do tecido hematopoético. Sendo assim, invariavelmente as células leucêmicas apresentam alterações em uma ou mais vias apoptóticas, resultando em vantagens proliferativas, na sobrevivência e consequentemente na aquisição de resistência aos fármacos (DEL POETA et al., 2008). Essas

alterações estão associadas a uma baixa taxa de resposta à quimioterapia padrão e curta sobrevida para os pacientes com LMA (LÜCK et al., 2011).

A apoptose pode ser desencadeada por duas vias moleculares principais, a via intrínseca e a via extrínseca (FAVALORO et al., 2012). A via intrínseca da apoptose prossegue pela via mitocondrial, com a permeabilização da membrana mitocondrial externa, que conduz à liberação de proteínas normalmente encontradas no espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria como citocromo C, AIF (*Apoptosis inducing factor*), entre outros (Figura 1.5). Níveis mais elevados das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1 bloqueiam a permeabilização da membrana mitocondrial e são encontrados em altos níveis em pacientes com LMA que apresentam uma resposta desfavorável ao tratamento (LU et al., 2014; MEHTA; SHUKLA; VORA, 2013; SCHAICH et al., 2001). Ao contrário, o aumento dos níveis das proteínas pró-apoptóticas Bax ou Bad promovem a permeabilização da membrana mitocondrial e correlacionam-se com um bom prognóstico em pacientes com LMA (DEL POETA et al., 2008). A inibição da via intrínseca da apoptose está relacionada com a resistência a quimioterapia e vantagens proliferativas (MAK et al., 2014).

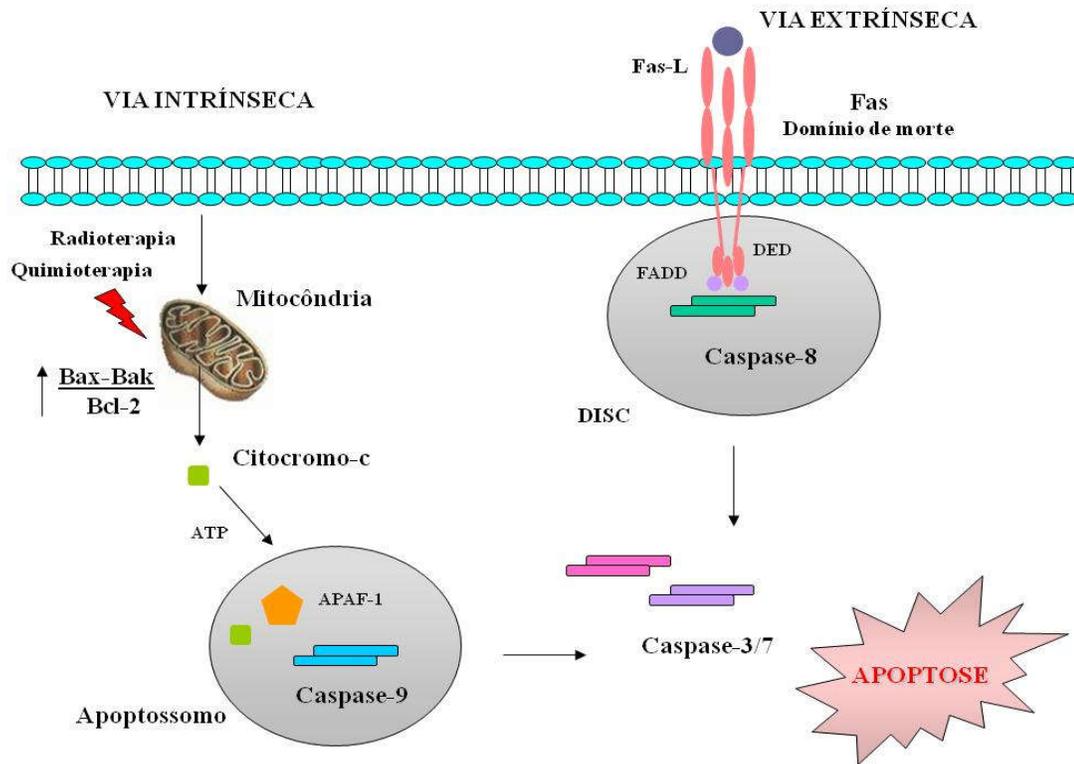


Figura 1.5: Esquema das vias intrínseca e extrínseca de indução de apoptose. A via intrínseca de morte celular por apoptose é iniciada por estímulos como tratamento com agentes quimioterápicos, dano ao DNA e privação de fatores de crescimento. Subsequentemente, a ativação dos membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, como Bax e Bak neutralizam as proteínas antiapoptóticas da família, levando à alteração do potencial da membrana mitocondrial e à liberação do citocromo-c da mitocôndria. No citosol, o citocromo-c forma um complexo denominado apoptossomo com a APAF-1 e a procaspase-9, levando à ativação da caspase-9 e, por fim, das caspases efetoras 3 e 7. A via extrínseca é disparada quando ocorre a interação entre o ligante e seus receptores de morte, exemplificados pelo Fas. A ativação do DED leva ao recrutamento da FADD e da procaspase 8, resultando na ativação da caspase 8 e, posteriormente, das caspases 3 e 7. A ativação das caspases efetoras 3 e 7 pela via intrínseca ou pela via extrínseca é o evento final da cascata de sinalização que culmina com a indução da apoptose. **APAF-1:** *Apoptotic protease activating factor 1*; **DED:** *death effector domain*; **FADD:** *Fas Adaptor Death Domain*, **DISC:** *Death-induced signaling complex*; **FasL:** Ligante de Fas. Figura cedida por Gabriela Nestal de Moraes.

Defeitos na via mitocondrial induzem resistência e alteram o prognóstico dos pacientes com LMA (DEL POETA et al., 2008). Altos níveis da razão Bcl-2 e Bax conferem um prognóstico desfavorável com diminuição das taxas de remissão completa e sobrevida global. A informação prognóstica a partir da razão dessas proteínas é superior aos níveis de Bcl-2 isoladamente. Em 2008, a importância da razão Bcl-2/Bax, determinada por citometria de fluxo, foi novamente reafirmada com impacto na remissão completa e na sobrevida global de 255 pacientes com LMA (DEL POETA et al., 2008).

A via extrínseca da apoptose é desencadeada por sinais extracelulares e resulta na ligação de ligantes a receptores trans-membrana, conhecidos como receptores de morte, pertencentes à família TNF (*Tumor Necrosis Factor*), como TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*). Dessa maneira, a cascata de caspases pode ser ativada via ligação do TNF e Fas-L (ligante de Fas) aos seus respectivos receptores, dentre eles, TNF-R1 e Fas (CD-95), induzindo a formação de um complexo sinalizador de morte celular (DISC) (*Death Initiation Signalling Complex*). Uma vez ativado, DISC recruta a caspase-8 que ativa outras moléculas, bem como as caspases efetoras, como a caspase 3, induzindo a apoptose (SAYERS, 2011).

No contexto da LMA, a via extrínseca da apoptose é ativada pelo tratamento com vários agentes quimioterápicos, como por exemplo, o interferon alfa, o ácido transretinóico ou o tratamento com inibidores de histona desacetilases (CLARKE et al., 2005). A atividade anti-tumoral do ácido transretinóico é bem documentada e utilizada na clínica para o tratamento da leucemia promielocítica aguda (STEIN; TALLMAN, 2014). A modulação da via extrínseca da apoptose também podem resultar na resistência ao tratamento para os pacientes com LMA (MAK et al., 2014; WU et al., 2014).

1.8 MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são uma classe de RNAs de fita simples com 19 a 24 nucleotídeos não codificantes, que regulam a expressão gênica no nível postranscricional através de suas sequências complementares a região 3'UTR (do inglês, untranslated region) dos RNAm alvos. Se o miRNA for capaz de se anelar ao sítio alvo com pareamento completo, o RNAm será clivado, mas se o pareamento for imperfeito ocorrerá apenas a inibição da tradução (DALMAY, 2008; ZEBISCH et al., 2016) (Figura 1.6). Estima-se que 30-40% dos genes sejam regulados por pelo menos um miRNA, tendo os miRNAs um papel chave na regulação de diversos processos celulares como apoptose, diferenciação e proliferação celular (FARAZI et al., 2013).

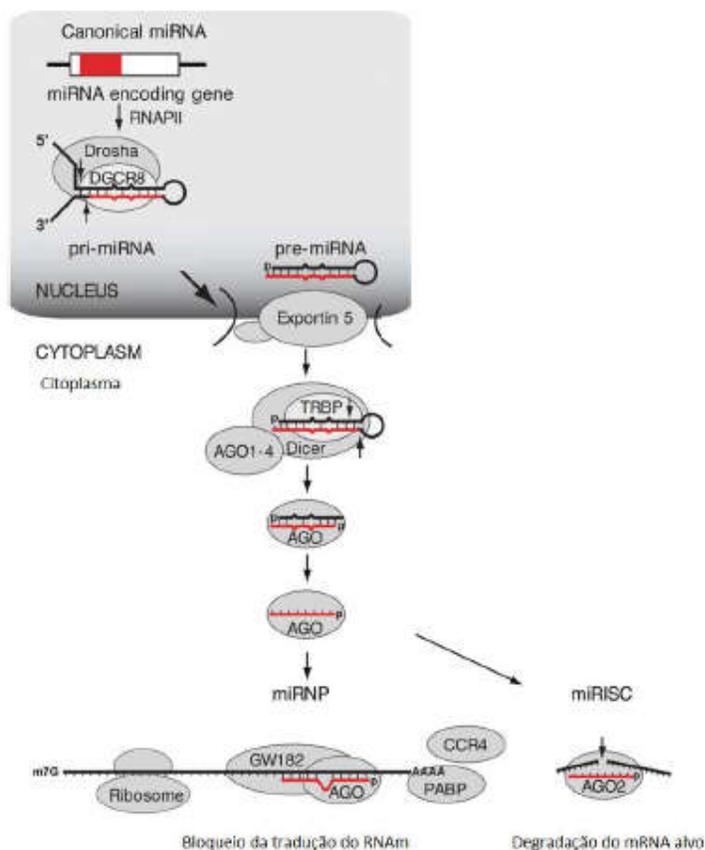


Figura 1.6: Esquema geral da biossíntese dos miRNAs. A RNA polimerase II é responsável pela produção do miRNA primário (pri-miRNA), onde a endorribonuclease Drosha em associação com a DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8 protein*) que apresenta um domínio de ligação para dsRNA (RNA de fita dupla), processam o pri-miRNA em miRNA precursor (pre-miRNA - sequências de 70-100 nts). O pre-miRNA é transportado ao citoplasma pela Exportina 5, onde é clivado pela Dicer (Rnase III) gerando um miRNA maduro. Uma das fitas do miRNA maduro é incorporada ao complexo RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) do qual faz parte juntamente com a proteína Argonauta (Ago2). O complexo RISC permite o pareamento entre a fita do miRNA incorporada e a região homóloga do RNAm-alvo por complementaridade de bases. Normalmente, quando a complementaridade é total, ocorre degradação do RNAm e, quando parcial, ocorre repressão da tradução e posterior degradação do RNAm. Adaptado de (FARAZI et al., 2013).

A expressão alterada dos miRNAs e seu envolvimento na patogênese já foi descrito em diversos tumores (LING et al., 2015; PICHLER; CALIN, 2015). Em LMA, a expressão

alterada dos miRNAs mostrou ser um processo fundamental na transformação maligna de células hematopoiéticas e/ou progenitoras (SCHOTTE; PIETERS; DEN BOER, 2012). A expressão alterada dos miRNAs atua, muitas vezes, como parte de redes complexas que incluem outras alterações genéticas em oncogenes e/ou supressores de tumores, em fatores de transcrição e cascatas de sinalização. (CHIU et al., 2016; GERLOFF et al., 2015; HATZL et al., 2016; HERMEKING, 2012; JONGEN-LAVRENCIC et al., 2008).

Uma ampla variedade de estudos sobre a expressão alterada dos miRNAs e a resistência ao tratamento na LMA foram publicados, permitindo a classificação dos miRNAs em dois grandes grupos (Tabela 1.4 e 1.5). O grupo I compreende os miRNAs, em que o aumento de sua expressão está associado a sensibilidade à quimioterapia ou, ao contrário, em que a diminuição de sua expressão está associada a resistência ao tratamento. O grupo II compreende os miRNAs, em que o aumento de sua expressão está associado a resistência ao tratamento, enquanto que a expressão diminuída está associada a sensibilidade (ZEBISCH et al., 2016).

Tabela 1.4: Os miRNAs associados à sensibilidade ou resistência ao tratamento em estudos utilizando amostras de pacientes com LMA.

Grupos e categoria dos dados	microRNA
Grupo I – Amostra de pacientes com LMA: ↑ expressão associada a sensibilidade ao tratamento	miR-181a let-7f miR-9 (miR-9-3p) miR-96 miR-135a miR-409 miR-10 miR-20a
Grupo II – Amostra de pacientes com LMA: ↑ expressão associada a resistência ao tratamento	miR-155 miR-125b miR-126 miR-210 miR-3151 miR-196b miR-199a miR-191 miR-644 miR-128

Adaptado de (ZEBISCH et al., 2016).

Tabela 1.5: MicroRNAs associados à sensibilidade ou resistência ao tratamento em estudos utilizando linhagens celulares de LMA.

Grupos e categoria dos dados	microRNA
Grupo I – Linhagens celulares de LMA: ↑ expressão associada a sensibilidade ao tratamento	miR-181a let-7f let-7a miR-128 miR-331 miR-27a
Grupo II – Linhagens celulares de LMA: ↑ expressão associada a resistência ao tratamento	miR-125b miR-32 miR-126 miR-20a

Adaptado de (ZEBISCH et al., 2016).

No entanto, apesar dessa associação, ainda existem resultados controversos na literatura em relação ao papel dos miRNAs na resposta ao tratamento na LMA, principalmente dos estudos utilizando linhagens celulares (ZEBISCH et al., 2016). Zhu e colaboradores em 2008, observaram a expressão do miR-27a em linhagens celulares, Pgp positivas e negativas, de câncer de cérvix uterina e ovário e demonstraram que o aumento da expressão do mir-27a resultava em um aumento na expressão da Pgp e consequentemente resistência a quimioterápicos (ZHU et al., 2008). Feng e colaboradores em 2011, viram o contrário, quando analisaram linhagens de leucemias, sensíveis e resistentes a doxorubicina (DOX). Neste estudo, os autores verificaram que a superexpressão do miR-27a resultou em diminuição da Pgp e consequentemente em um aumento da sensibilidade ao quimioterápico nas linhagens resistentes (FENG et al., 2011). Este estudo foi o único a também avaliar a expressão do mir-27a em amostras de pacientes com LMA, entretanto o tamanho amostral de somente 11 pacientes não permitiu correlacionar os níveis de expressão do mir-27a, com a Pgp, sobrevida global (SG) ou sobrevida livre de doença (SLD) dos pacientes.

1.9 Participação das MAPKs, JNK e p38 na resistência ao tratamento

Além dos mecanismos descritos anteriormente, as vias de sinalização envolvendo a família das MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinase*) podem estar relacionadas à resistência a quimioterápicos em neoplasias (KHAVARI; RINN, 2007). Esta família é composta por três grandes grupos: ERK (*Extracellular regulated kinases*), JNK ou SAPK (*c-jun N-terminal kinase or stress-activated protein kinase*) e p38 (*Stress-activated protein kinase 2*). Estas proteínas apresentam várias isoformas em mamíferos como - ERK1/2, ERK3/4, ERK5, ERK7/8; JNK1/2/3 e p38 a/b/c/d (HOMMES; PEPPELENBOSCH; VAN DEVENTER, 2003). A via das MAPKs é ativada através de estímulos extracelulares como radiação ultravioleta, agentes citotóxicos e estresse oxidativo, mas também é ativada por

fatores de crescimento, processos inflamatórios e citocinas (YANG; SHARROCKS; WHITMARSH, 2013).

A via das MAPKs é composta por três componentes: (1) As MAP3Ks (*MAP kinase kinase kinase*), (2) MAP2Ks (*MAP kinase kinase*) e (3) as MAPKs (Figura 1.7). Após um estímulo ocorre uma cascata de fosforilação que segue a partir de uma MAP3K, passando por uma MAP2K e consequente fosforilação e ativação de uma MAPK. Por exemplo, a ativação das MAPKs ERK, JNK e p38 é através da ativação das MAP2Ks (MEK1/2 para ERK; MKK3/6 para p38 e MKK4/7 para JNK) (PETI; PAGE, 2013).

Uma vez ativada, a via das MAPKs exerce um importante papel na conversão de estímulos extracelulares em uma vasta gama de respostas celulares, incluindo apoptose, proliferação, diferenciação, senescência e assim por diante (YANG; SHARROCKS; WHITMARSH, 2013) (Figura 1.7). O papel das MAPK no câncer é tão heterogêneo como o câncer em si. As MAPKs, tais como JNK e p38, parecem atuar de formas diferentes dependendo do tipo de tumor, mas com importantes efeitos no resultado da resposta a quimioterapia (SUI et al., 2014).

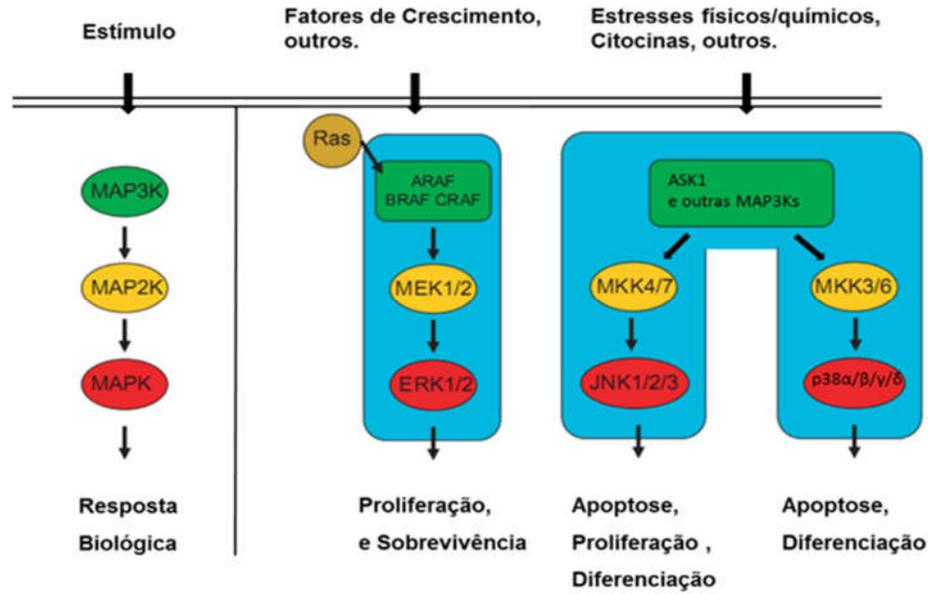


Figura 1.7: As MAPKs ERK, JNK e p38 controlam vias que induzem a proliferação e sobrevivência ou a diferenciação e apoptose. Um estímulo resulta em uma cascata de fosforilação que segue a partir de uma MAP3K, passando por uma MAP2K e consequente fosforilação e ativação de uma MAPK. Adaptado de (PETI; PAGE, 2013).

Durante várias décadas, mostrou-se que as terapias tradicionais contra o câncer têm como alvo principal a indução de apoptose. No entanto, algumas evidências sugerem que os efeitos das terapias anticâncer não se limitam a apoptose, mas também envolvem a indução de autofagia (ROSENFELDT; RYAN, 2009). A autofagia é um processo catabólico de auto-degradação de organelas e macromoléculas citosólicas (Figura 1.8).

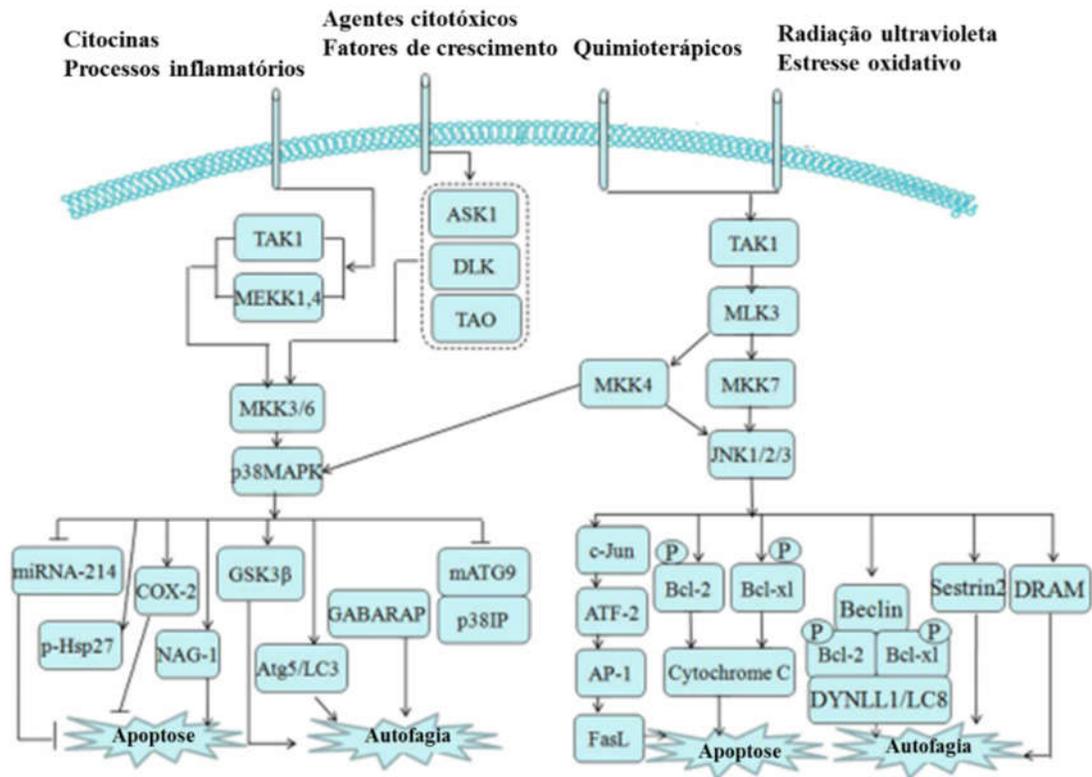


Figura 1.8: Vias de sinalização das MAPKs JNK e p38 e seus papéis na regulação da apoptose e autofagia. Diferentes estímulos, agentes citotóxicos, fatores de crescimento, citocinas, processos inflamatórios e uma grande variedade de outros estímulos podem ativar a via de JNK e p38. Alguns dos alvos descendentes e ascendentes são mostrados. Ambas as MAPKs podem mediar a apoptose e a autofagia em resposta a esses estímulos através de uma gama de efetores. Adaptado de (SUI et al., 2014).

A MAPK JNK é ativada pelas quinases ascendentes MKK4 e MKK7. Quando ativada, a via de JNK regula uma variedade de fatores de transcrição como c-Jun, c-Fos, ATF-2 (*activating transcription factor 2*), AP-1 (*activator protein 1*), p53 e Elk, e também fosforila diversos substratos citoplasmáticos como Bcl-2 e Bcl-x1 (JOHNSON; NAKAMURA, 2007). Subsequentemente, vários processos celulares são ativados incluindo a proliferação celular, apoptose, autofagia e reparo do DNA (JOHNSON; NAKAMURA, 2007).

Há diversas evidências mostrando o papel de JNK na apoptose e a sua inibição tem sido tradicionalmente associada com um fenótipo de resistência a vários estímulos

citotóxicos, tais como os quimioterápicos (MALILAS et al., 2013). A inibição da via MKK7-JNK contribui para a resistência a apoptose no carcinoma hepatocelular (SONG et al., 2012). A ativação de JNK resulta na apoptose das linhagens de osteosarcoma resistentes a cisplatina (SAU et al., 2012).

JNK promove a apoptose por dois diferentes mecanismos: 1) Promove a fosforilação de c-Jun e ATF-2 resultando na ativação de AP-1 e na expressão de proteínas associadas a via extrínseca da apoptose, ativando caspase 8 e conseqüentemente caspase 3, induzindo apoptose (TANG et al., 2012). O silenciamento de FANCF (*Fanconi anemia complementation group-F*), um regulador chave da resposta ao dano no DNA, potencializa os efeitos do mitoxantrone através da ativação de JNK em células de câncer de mama (LI et al., 2012), assim como induz a apoptose em resposta a cisplatina em células de carcinoma de ovário (MANSOURI et al., 2003). 2) JNK fosforila as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL resultando na liberação de citocromo C, ativação de caspase 9, caspase 3 e apoptose (SUI et al., 2014).

Em LMA, foi demonstrado que as antraciclinas DNR e DOX ativam rapidamente JNK em linhagens de LMA, indicando que a apoptose induzida pelas antraciclinas também é mediada por JNK (LAGADINO et al., 2008). Sampath e colaboradores em 2006, analisaram amostras de pacientes com LMA no primeiro dia de tratamento com Ara-c e encontraram uma correlação entre a ativação de JNK e a resposta ao tratamento (SAMPATH et al., 2006). Além disso, este estudo sugere um provável papel da ativação de JNK como um indicador de resposta à quimioterapia em pacientes com LMA, não sendo, portanto, restrita as antraciclinas. Estudos mostram que terapias baseadas em alvos moleculares que efetivamente induzem a apoptose em linhagens de LMA, previamente resistentes, levam a ativação de JNK. Davison e colaboradores em 2004, também sugeriram que a ativação da via de JNK correlaciona-se com reversão da resistência, mostrando uma associação temporal do tratamento com L-butionina-[S,R]-sulfoximina, ativação de JNK e sensibilização ao trióxido

de arsênico na linhagem NB4 (promielocítica aguda; FAB/M3) resistente (DAVISON et al., 2004).

Outro fato interessante foi demonstrado primeiramente por Kang e colaboradores em 2000 e corroborado por estudos posteriores (BARK et al., 2008; BARK; CHOI, 2010; KANG et al., 2000). Estes autores observaram que a regulação negativa da atividade de JNK aumenta a expressão da Pgp e conseqüentemente a resistência à apoptose, sugerindo que exista uma regulação entre JNK e a Pgp.

A MAPK p38 é ativada em resposta a estresses ambientais e citotóxicos (LOESCH; CHEN, 2008). Quatro genes transcrevem a p38 resultando nas isoformas: *a*, *b*, *c* e *d*. Sua expressão varia dependendo do tecido e as isoformas têm afinidades diferentes para ativadores ascendentes e efetores descendentes (ONO; HAN, 2000). A p38a é expressa na maioria dos tecidos, enquanto as outras são tecido específicas (CUENDA; ROUSSEAU, 2007). A maioria dos trabalhos com p38 é referente à p38a. A MAPK p38 é ativada pelas quinases ascendentes MKK3 e MKK6 e algumas vezes pode ser fosforilada por MKK4, quinase que também é ativadora de JNK, mostrando uma conexão entre essas duas vias (BRANCHO et al., 2003). Depois de ativada, a p38 é translocada do citoplasma para o núcleo orquestrando a resposta celular a estímulos via fosforilação de fatores de transcrição (SUI et al., 2014).

Fortes evidências demonstram que a p38 atua como um supressor de tumor e que sua ativação induz apoptose em resposta a quimioterápicos (DEACON et al., 2003). A p38 desempenha um papel importante na regulação da apoptose, parada do ciclo celular, inibição do crescimento e diferenciação (CUADRADO; NEBREDÁ, 2010). Vários quimioterápicos necessitam da atividade de p38 para induzir apoptose (OLSON; HALLAHAN, 2004). Por exemplo, a ciclofosfamida, utilizada para o tratamento do câncer de mama, induz apoptose via

ativação de p38 (PANG et al., 2011). A Oxiplatina também promove a apoptose em células de câncer colorretal via ativação de p38 (CHIU et al., 2008).

Existem poucos estudos sobre a importância de p38 na indução de apoptose pelos quimioterápicos utilizados no tratamento padrão da LMA. No entanto, sua ativação é amplamente relatada na indução de apoptose por novas drogas na LMA (CHATTERJEE et al., 2015; HUANG et al., 2015; KIM et al., 2014) ou na reversão de resistência aos quimioterápicos. Foi demonstrado que a ativação de p38 reverte o fenótipo de resistência a DOX da linhagem AML-2/DX100 (CHOI et al., 2007)(CHOI et al., 2007).

1.10 Sistema CRISPR/Cas

A LMA apresenta uma taxa de sobrevivência em longo prazo de menos de 30%, com uma abordagem terapêutica que pouco mudou nos últimos 40 anos, tendo a associação da citarabina como representativo do último avanço significativo (FERRARA; SCHIFFER, 2013). Sendo uma doença heterogênea, com diversas alterações genéticas e epigenéticas, é provável que os subtipos de LMA necessitem de diferentes abordagens terapêuticas (BRABETZ et al., 2017).

O sequenciamento de última geração revelou que, embora a LMA apresente centenas de genes alterados, apenas um número limitado desses genes seria responsável pelo desenvolvimento da doença, manutenção do perfil leucêmico ou resistência a terapia (METZELER et al., 2016). Assim, identificar vulnerabilidades genéticas em células de LMA é de extrema importância para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (TZELEPIS et al., 2016).

O sistema CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) surgiu recentemente, como uma ferramenta de edição gênica de alta precisão, capaz de realizar a quebra da fita dupla de DNA em células de mamíferos (RAHDAR et al., 2015;

YANG et al., 2014). O CRISPR-Cas foi descoberto como parte do sistema imune de procariotos contra infecções virais e outros plasmídeos. A imunidade é mediada por nucleases Cas (*CRISPR-associated*) que usam RNAs guias, conhecidos como crRNAs (*CRISPR targeting RNA*), para direcionar a clivagem do ácido nucleico invasor (GERSBACH; PEREZ-PINERA, 2014).

O sistema CRISPR-Cas do tipo II, o mais simples dos três tipos conhecidos, a atividade de clivagem do DNA é realizada por uma única endonuclease, a Cas9, guiada por um duplex de RNA. A especificidade é dada pela sequência guia contendo 20 nucleotídeos (crRNAs), que direciona a clivagem no genoma (ESVELT et al., 2014).

Devido a sua alta especificidade e por requerer apenas uma pequena sequência de RNA para direcionar a clivagem via Cas9:crRNA, surgiu a hipótese de que seria possível programar a clivagem da Cas9 para um alvo específico (JINEK et al., 2012). O crRNA quimérico, também denominado RNA guia (gRNA), contém uma sequência de 20 pares de base (pb) idêntica a sequência alvo e possibilitou a edição de genomas de diversos organismos eucarióticos (SAMPSON; WEISS, 2014).

A enzima endonuclease Cas9 contém um domínio denominado HNH, que tem como função clivar a fita complementar à sequência do RNA guia (sequência alvo), e o domínio RuvC que é necessário para a clivagem da fita não complementar, ou seja, a sequência não-alvo. Esses dois domínios resultam na clivagem na cadeia dupla do DNA alvo. Adicionalmente, a enzima Cas9 contém uma região rica em arginina, que é altamente conservada, tendo como função mediar a ligação a ácidos nucleicos (TAYLOR et al., 2015).

A clivagem pela Cas9 pode ativar dois mecanismos de reparo de quebra de fita dupla de DNA: a junção das extremidades não homologas (NHEJ, *Nonhomologous End Joining*) ou a recombinação homóloga (HDR, *Homology-Directed Repair*) (HOU et al., 2013). No reparo por NHEJ, o DNA é religado, gerando mutações pontuais (inserção/deleção, indel) aleatórias

no sítio de junção. Caso essas mutações ocorram numa região codificante do gene, pode resultar em uma mudança de fase de leitura (*frameshift*) ou na criação de um *stop códon* prematuro, culminando em um *knock-out* do gene. O DNA também pode ser reparado por recombinação homóloga, o que permite modificação do locus alvo caso haja uma sequência doadora corrigida (RAN et al., 2013) (Figura 1.9).

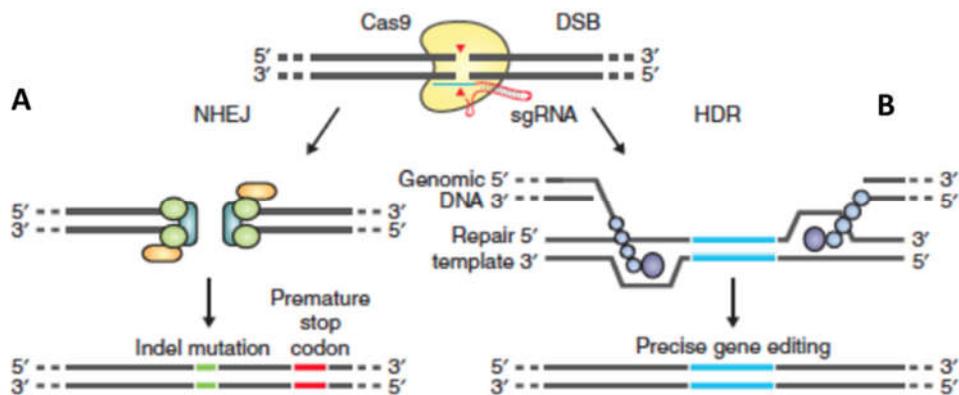


Figura 1.9: Mecanismos de reparo de quebra de fita dupla (DSB). O Reparo por junção das extremidades não homólogas (NHEJ, *Nonhomologous End Joining*): gera mutações pontuais aleatórias no sítio da junção (A). O Reparo por recombinação homóloga (HDR, *Homology-Directed Repair*): permite a inserção de um fragmento flanqueado por sequências adjacentes semelhantes ao local da quebra (B). Adaptado de (RAN et al., 2013).

Para que ocorra o reconhecimento e a clivagem é necessário que haja além de complementariedade de bases entre a sequência alvo e o crRNA, uma sequência PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) na extremidade 3' da sequência alvo (PYZOCHA et al., 2014) (Figura 1.10). O motivo PAM é um componente essencial do sistema CRISPR, pois permite o direcionamento correto da clivagem (MALI et al., 2013). Os sítios PAM variam entre diferentes organismos procaríotos, sendo o mais comum dos sistemas baseado na sequência

PAM de *Streptococcus pyogenes*, que é constituída da sequência NGG, sendo N qualquer nucleotídeo (RAN et al., 2013) (Figura 1.10).

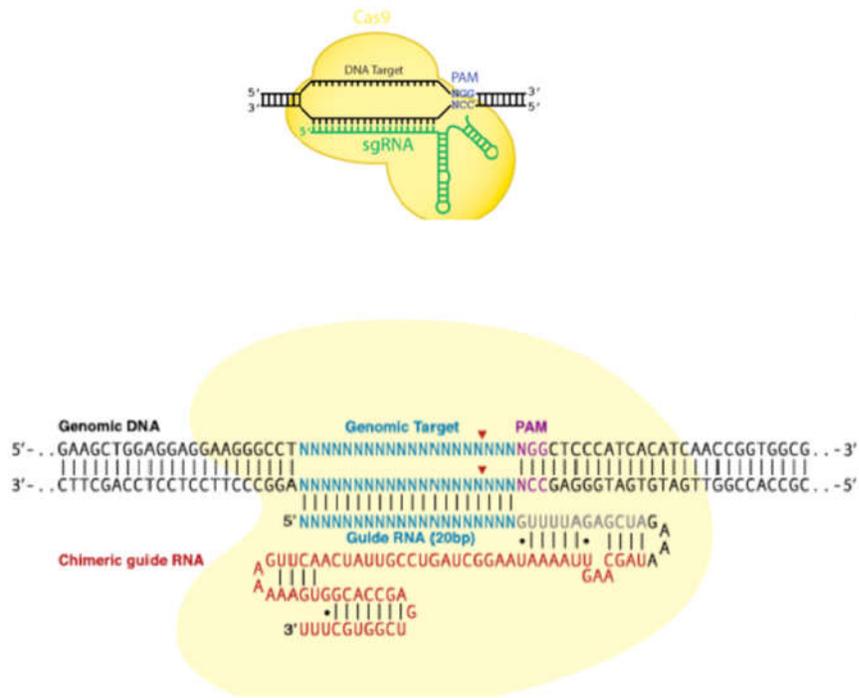


Figura 1.10: Modelo representativo de clivagem da dupla fita de DNA pelo sistema CRISPR-Cas9. A enzima Cas9 interage com a sequência alvo no genoma com a ajuda do RNA guia apresentando 20 pares de bases, complementar a sequência alvo. A sequência alvo é reconhecida e direcionada para clivagem pela Cas9 por meio da sequência PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) - NGG. Adaptado de (PYZOCHA et al., 2014).

Nos últimos 40 anos, os estudos em LMA proporcionaram uma melhor compreensão da patogênese da doença, dos fatores prognósticos e dos mecanismos de resistência ao tratamento (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al., 2013). No entanto, mesmo assim, a maioria dos pacientes com LMA não mantém uma remissão duradoura após o tratamento. Além disso, os clones leucêmicos que sobrevivem ao tratamento inicial tornam-se os clones leucêmicos prevalentes daquele tumor, portanto resistentes a futuros ciclos de quimioterapia (KURATA et al., 2016). A técnica do CRISPR/Cas permitirá a

identificação de vulnerabilidades genéticas envolvidas com a resistência, possibilitando assim o desenvolvimento de combinações farmacológicas mais efetivas.

2. Justificativa para o estudo

A maioria dos pacientes com LMA evolui para o óbito devido ao fenômeno de resistência intrínseca ou adquirida as antraciclina e a citarabina. Os avanços na compreensão da biologia da doença nos últimos anos estão em contraste com a baixa sobrevida dos pacientes com LMA. Dessa forma, o entendimento dos mecanismos envolvidos na quimiorresistência é de fundamental importância para a determinação de novos alvos terapêuticos e orientação nas futuras decisões de tratamento. Os resultados do presente estudo que utiliza diferentes metodologias como a citogenética, imunofenotipagem, citometria de fluxo, western blot, silenciamento por SiRNA, array de proteínas fosforiladas, PCR em tempo real e o CRISPR/CAs, têm o potencial de auxiliar na compreensão das vias de sinalização responsáveis pela quimiorresistência as antraciclina e a citarabina em células da LMA.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar mecanismos envolvidos na resistência as antraciclinas (idarrubicina e daunorrubicina), e a citarabina em linhagens celulares e em amostras de pacientes com LMA.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as três linhagens celulares de LMA (HL60, Kasumi e U937), em relação ao perfil citogenético e imunofenotípico, a expressão e função das proteínas transportadoras de efluxo e a expressão de proteínas envolvidas com a indução ou evasão da apoptose;
- Analisar o perfil de sensibilidade ou resistência das três linhagens de LMA aos quimioterápicos: IDA, DNR e Ara-c correlacionando com os resultados encontrados na caracterização das linhagens;
- Verificar se os quimioterápicos utilizados no tratamento da LMA ativam as vias das MAPKs JNK e p38, for fosforilação, em linhagens celulares de LMA sensíveis e resistentes;
- Verificar se a modulação da expressão das MAPKs JNK e p38, por siRNA, altera a morte induzida pelos quimioterápicos, a expressão da Pgp e do miR-27a;
- Verificar se a expressão do mir-27a, em amostras de pacientes com LMA, correlaciona-se com as características clínicas, expressão da Pgp, sobrevida global e sobrevida livre de doença;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura de células

As linhagens celulares derivadas de LMA HL60 (ATCC[®], CCL-240[™]) FAB M3, U937 (ATCC[®], CRL-1593.2[™]) FAB M4/M5, HL60R (resistente a 50 μ M de citarabina) e U937R (resistente a 0.1 μ M de DNR) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, USA) suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Cripion, SP, BR). A linhagem celular de LMA Kasumi-1 (ATCC[®], CRL-2724[™]) FAB M2, foi cultivada em meio DMEM/F12 (Gibco, CA, USA) suplementados com 20% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Cripion, SP, BR). As células foram mantidas em estufa (Thermo Scientific) contendo 5% de CO₂ a 37°C.

4.2 Genotipagem das linhagens celulares

A genotipagem das linhagens celulares de LMA (HL60, Kasumi e U937), foi determinada através da análise de polimorfismos STR (*short tandem repeats*) por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). As células foram centrifugadas e o DNA foi extraído pelo método DNAzol (DNAzol Reagent[®], Invitrogen). As amostras de DNA foram enviadas ao Laboratório Sonda, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), onde todo o procedimento da genotipagem foi realizado. Foram avaliados dezesseis loci para a linhagem Kasumi (Figura 4.1B) e nove loci para as linhagens HL60 e U937 (Figura 4.1A e 4.1C). Os resultados foram comparados com aqueles previamente descritos no banco de dados do ATCC (*American Type Culture Collection*) para estas linhagens.

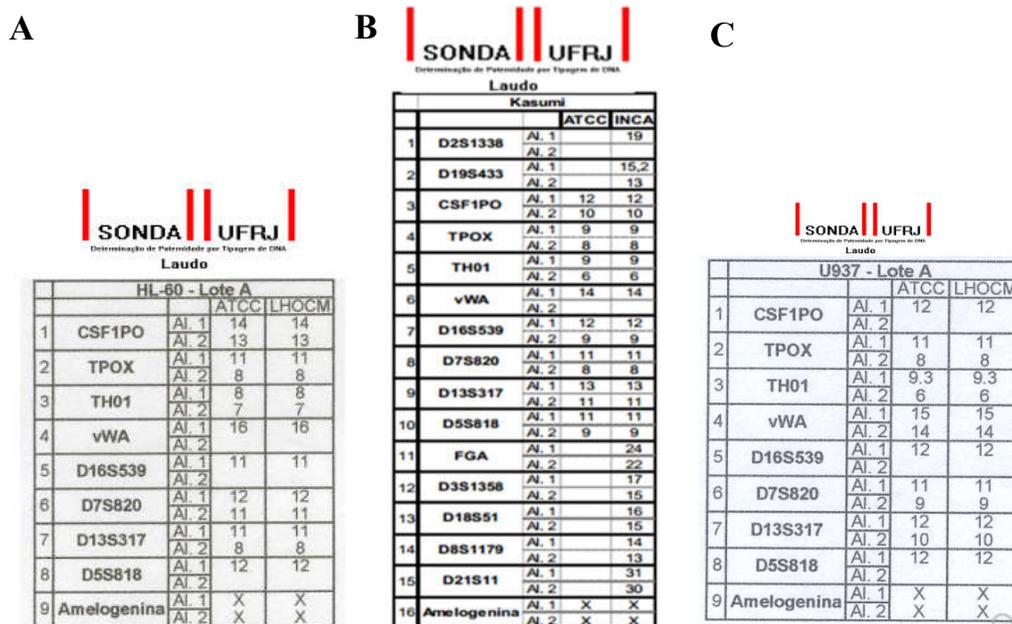


Figura 4.1: Genotipagem das linhagens de leucemia mielóide aguda. Perfis das linhagens HL60 (A), Kasumi (B) e U937 (C) obtidos após a genotipagem, correspondendo a 100% de identidade com os perfis divulgados pelo ATCC.

4.3 Detecção de contaminação por micoplasma por PCR semi-quantitativo

Como controle de qualidade dos cultivos celulares as linhagens de LMA, HL60, Kasumi e U937 e as linhagens resistentes HL60R e U937R (descritas no próximo tópico), foram monitoradas quanto à contaminação por micoplasma. As células foram centrifugadas e o DNA foi extraído pelo método DNAzol (DNAzol Reagent®, Invitrogen). A partir de 100ng do DNA derivado das linhagens celulares de LMA, foi realizado PCR para detecção de micoplasma, como previamente descrito (UPHOFF; DREXLER, 2014). Posteriormente, os amplicons foram submetidos a uma corrida em gel de agarose 1.5% para visualização e análise das bandas coradas com brometo de etídeo. As cinco linhagens de LMA não apresentaram contaminação por micoplasma.

4.4 Agentes Farmacológicos e indução de resistência

O cloridrato de idarrubicina (IDA) foi fornecido pela empresa farmacêutica Evolabis (São Paulo, Brasil), o Cloridrato de Daunorrubicina (DNR) pela Pfizer (São Paulo, Brasil) e a citarabina (Ara-c) pela Accord (São Paulo, Brasil). Os fármacos foram diluídos em RPMI (Sigma, St. Louis, USA) ou DMEM/F12 (GIBCO, CA, USA) dependendo da linhagem antes do uso.

Para indução de resistência foram utilizadas concentrações crescentes de DNR para a linhagem U937, e Ara-c para a linhagem HL60, iniciando na concentração de 0.001 μ M para ambas os quimioterápicos. O tempo de indução de resistência ao Ara-c na linhagem HL60 foi de seis meses resultando na linhagem HL60R, resistente a concentração de 50 μ M de Ara-c. O tempo de indução de resistência a DNR na linhagem U937 foi de 18 meses, resultando na linhagem U937R resistente a concentração de 0.1 μ M de DNR. As linhagens resistentes HL60R e U937R são mantidas na concentração máxima alcançada para ambas às linhagens.

4.5 Citogenética Clássica

4.5.1 Cultura das linhagens celulares

Para este procedimento, foi utilizada a técnica de Testa e colaboradores (1985) (TESTA et al., 1985) com algumas modificações. As linhagens celulares foram lavadas com meio de cultura RPMI (Sigma, St. Louis, USA) ou DMEN/F-12 (GIBCO, CA, USA) e em seguida, incubadas na concentração de 1×10^7 células/mL em 90% de RPMI (Sigma, St. Louis, USA) com 10% de SFB (GIBCO, CA, USA) para as linhagens HL60 e U937, e 80% de DMEN/F-12 (GIBCO, CA, USA) com 20% de SFB (GIBCO, CA, USA) para a linhagem Kasumi. Todas as linhagens foram cultivadas a 37°C, numa atmosfera de 5% de CO₂, durante 24 horas. Duas horas antes do término da cultura, foram adicionados 0.05 μ g/mg de colchicina e a cultura foi incubada novamente por mais 1 hora nas mesmas condições.

4.5.2 Término das culturas e preparação das lâminas

Neste procedimento, o método utilizado foi o de Hungerford (1965) (HUNGERFORD, 1965) com modificações. Ao final da incubação, o material foi centrifugado a 1500 rpm (centrífuga Eppendorf - modelo 5804) por 6 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido em 5 mL de uma solução hipotônica (KCl 0,075 M) por 15 minutos e em seguida centrifugado a 1500 rpm (centrífuga EPPENDORF - modelo 5804) por 6 minutos. O precipitado foi fixado com Solução Carnoy 3:1 (metanol:ácido acético). Após 20 minutos à temperatura ambiente, o material foi centrifugado a 1500 rpm (centrífuga Eppendorf - modelo 5804) durante 6 minutos e o sobrenadante desprezado. As lâminas foram preparadas adicionando-se uma gota de suspensão celular em uma lâmina limpa e umedecida e o material foi fixado sobre a lâmina na chama. A primeira lâmina obtida foi corada com corante Giemsa 2% em tampão fosfato (0,102 M de NaH_2PO_4 ; 0,098 M de Na_2HPO_4 , pH 6,8) e observada ao microscópio ótico para verificar o índice mitótico e a qualidade das metáfases. As demais lâminas foram envelhecidas para o bandeamento GTG.

4.5.3 Análise por bandeamento GTG

Para obtenção de padrões de bandeamento GTG para análise cromossômica foi utilizada a técnica de Seabright (1971) (SEABRIGHT, 1971), com o seguinte procedimento: as lâminas foram incubadas em uma solução de tripsina 0.1% em solução Dulbecco (0,137 M de NaCl; 0,0027 M de KCl; 0,0015 M de KH_2PO_4 ; 0,011 M de NaH_2PO_4 ; pH 7,8). Em seguida, as lâminas foram lavadas com solução de soro fisiológico (NaCl 0,9%) e coradas em uma solução de Giemsa (MERCK) a 2% em tampão fosfato durante 15 minutos. Os cromossomos foram identificados e classificados de acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN) de 2016 (STEVENS-KROEF et al., 2017). A análise cromossômica foi realizada em microscopia ótica utilizando, no mínimo, 30 metáfases

por linhagem. As imagens foram adquiridas através do Sistema de Cariotipagem Cytovision Applied Image, onde 5 a 10 metáfases foram adquiridas para a montagem dos cariótipos de cada linhagem.

4.6 Detecção do perfil de expressão das proteínas transportadoras de efluxo nas linhagens celulares por citometria de fluxo.

A identificação do padrão de expressão das proteínas transportadoras de efluxo *ABCB1/Pgp* e *MRP1* nas linhagens de LMA foi realizada para determinação de seu fenótipo MDR. Apenas para o ensaio da *MRP1* as células foram permeabilizadas previamente com a adição de 500µl de solução de lise 10% (BD FACS™ Lysing Solution) aos tubos por 10 minutos. Em seguida, utilizamos o mesmo protocolo para detecção da expressão de ambas proteínas.

As células foram lavadas com PBS (solução salina de fosfato) e incubadas com solução de bloqueio contendo SFB a 2% por 15 minutos. Em seguida, o pellet celular foi incubado com 2,5µL de anticorpo anti-*ABCB1/Pgp* (clone UIC2 ou 4E3) e 5µL de anticorpo *MRP1* por 30 minutos. Ao término desta incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS/BSA 2%, fixadas com 500µL de formaldeído a 1% e mantidas a 4°C para posterior aquisição no citômetro de fluxo (CyanADP-DAKO – programa Summit v4.3). Todo o procedimento foi realizado a temperatura ambiente. O perfil de expressão da *Pgp* ou da *MRP1* foi definido como a razão entre a média de fluorescência da condição contendo células imunomarcadas com anticorpo e a média de fluorescência da imunomarcção sem o anticorpo (autofluorescência). A razão de intensidade de fluorescência (RIF) foi utilizada como unidade arbitrária dos valores da expressão das proteínas MDR (HUET et al., 1998). O ponto de corte de 1,1 do valor da RIF foi baseado em experimentos realizados com as linhagens derivadas de leucemia mielóide crônica: Lucena (*ABCB1/Pgp+*) e sua parental K562 (*ABCB1/Pgp-*)

(SILVA et al., 2003). Foi definido que células *ABCBI*/Pgp e MRP1 positivas apresentariam a expressão da proteína de resistência quando o RFI for $\geq 1,1$.

4.7 Estudo funcional das bombas de efluxo por citometria de fluxo

A atividade funcional das proteínas transportadoras de efluxo foi medida através da análise da extrusão celular do corante fluorescente Rodamina-123 (Rho-123; Sigma, St. Louis, USA) para Pgp e do corante fluorescente Pheophorbide A (PhA; Fisher Scientific, USA) para BCRP (VASCONCELOS et al., 2013). Os ensaios de extrusão consistem na exposição das células aos corantes fluorescentes (Rho-123 ou PhA) na presença ou ausência do modulador (Ciclosporina A; CSA; Novartis, Suíça) para Pgp ou (Fumitremorgin; FTC; Sigma, St. Louis, USA) para BCRP. As células são então lavadas e expostas ao modulador na presença ou ausência do corante fluorescente. Dessa forma, é possível mensurar a atividade de extrusão do corante pela proteína transportadora de efluxo (LEBEDEVA; PANDE; PATTON, 2011). 5×10^5 células foram incubadas por 45 minutos na presença ou ausência de Rho-123 ou PhA (200ng/mL) com ou sem o agente modulador CSA ou FTC (200ng/mL) a 37°C. Após incubação as células foram lavadas com PBS. Foi então adicionado ao pellet, meio de cultura ou meio de cultura acrescido de CSA. Após incubação de 45 minutos a 37°C, as células foram analisadas no citômetro de fluxo. Células sem tratamento foram utilizadas para definir os limiares de autofluorescência. Os resultados foram expressos como razão (RFI) das células com Rho-123 mais CSA ou PhA mais FTC sobre o RFI das células somente com Rho-123 ou PhA. O ponto de corte da positividade para ambas foi definido como $\text{RFI} \geq 1,1$.

4.8 Ensaio de MTT: avaliação da citotoxicidade induzida pelos quimioterápicos

Esse ensaio foi utilizado para avaliar as alterações na viabilidade celular mediada pelos quimioterápicos: IDA, DNR e Ara-c nas linhagens de LMA. O método mede a atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, baseando-se na capacidade das células viáveis reduzirem o sal MTT 3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2-5-difenil tetrazólio brometo em um produto formazana, formando um precipitado de coloração roxa (MOSMANN, 1983).

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços em uma concentração de 2×10^4 /ml, utilizando quadruplicatas tanto para o controle (sem adição do quimioterápico) quanto para todas as concentrações do quimioterápico. Foram adicionados 100 μ L de célula mais 100 μ L do quimioterápico (ambos diluídos em meio de cultura para cada linhagem) e suplementado com SFB e L-glutamina. As placas foram mantidas na estufa a 37°C contendo 5% CO₂ por 24, 48 e 72 horas. Quatro horas antes do término desses tempos, foram adicionados 20 μ l de MTT (5mg/ml em PBS – solução salina de fosfato) e as placas voltaram para a estufa pelo tempo restante, protegidas da luz. Ao término da incubação, foram retirados 180 μ l do sobrenadante e depois, adicionados 150 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazana. A densidade ótica foi analisada por espectrofotometria (EZ Read 400, Biochrom) no comprimento de onda de 570nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram calculados através das médias dos percentuais de viabilidade celular para cada concentração, obtidas nos três ensaios.

4.9 Avaliação da fragmentação do DNA e do ciclo celular por citometria de fluxo

Um total de 2×10^6 células foi incubado com diferentes concentrações de IDA, DNR e Ara-c por 24 horas. Após este período foram lavadas com PBS, centrifugadas (2000rpm, 5min, aceleração e desaceleração 5, Beckman Coulter) e transferidas para tubos de citômetro.

Foram adicionados 500µl de RNase (Ribonuclease A 100µg/ml diluída em tampão citrato 40mM) e 500µl da solução de iodeto de propídeo (PI) (50µg/ml PI diluído em tampão citrato 4mM e 0,3% Triton X-100) ao pellet e os tubos foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente, protegidos de luz. O conteúdo de DNA foi analisado em citômetro de fluxo (Cyan ADP; Dako), onde foram adquiridos 10.000 eventos por amostra. A leitura foi feita no canal FL-2. Os softwares Summit v4.3 e FlowJo foram utilizados para analisar a distribuição das fases sub-G0/G1, G0/G1, S e G2/M. A fragmentação do DNA induzida pelos agentes antitumorais foi avaliada mediante o aparecimento da população em sub-G0/G1. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.10 Marcação da caspase-3 clivada por citometria de fluxo

As células foram plaqueadas na quantidade de 2×10^6 por garrafa por 24 horas com os quimioterápicos, lavadas com PBS, centrifugadas (2000rpm, 5 minutos, aceleração e desaceleração 5, Beckman Coulter) e transferidas para os tubos do citômetro, onde o protocolo de marcação de proteínas intracelulares foi iniciado. Primeiramente, foram adicionados 500µl de solução de lise 10% (BD FACSTM Lysing Solution) aos tubos, para permeabilização das células. Após 10 minutos, as células foram lavadas com PBS/Tween20 0,5% e bloqueadas por 15 minutos com PBS/SFB 2% para evitar marcações inespecíficas. As células foram centrifugadas e aos tubos, foram adicionados 1.0µl do anticorpo anti-caspase 3 clivada (1:800; Cell Signalling), seguido de 1.0µl do anticorpo secundário anti-rabbit Alexa488 (1:500; Invitrogen). Após 30 minutos de incubação, as células foram submetidas a duas lavagens com PBS/Tween 0,5%, seguidas de centrifugações. Por fim, as células foram fixadas com PBS/formaldeído 1% e a leitura, realizada no citômetro de fluxo (Cyan ADP; Dako) até 24h após o término do protocolo. A análise dos dados adquiridos foi realizada

utilizando o software Summit v4.3 e a expressão da caspase 3 clivada foi estimada pelo percentual de células com marcação positiva.

4.11 Detecção da expressão das proteínas por Western blotting

A expressão das proteínas c-IAP2, Mcl-1, Bim, Survivina, Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Bak, JNK total, JNK fosforilado, p38 total, p38 fosforilado e Hsc70 nas linhagens de LMA foi analisada pela técnica de Western blotting (Tabela 4.1).

As linhagens foram plaqueadas em garrafas médias com ou sem a droga, em concentrações e tempos variados. Depois do término do tratamento, foram lavadas três vezes com PBS e tiveram suas proteínas extraídas (lisado). O lisado foi feito através da adição de 100µl de tampão de extração de proteínas *Cell Extraction Buffer* (Invitrogen), além de 1.0µM dos inibidores de protease e fosfatase (Cell Signaling) e posterior incubação no gelo por 30 minutos para desnaturação proteica. Após esse período, o lisado foi centrifugado em centrífuga refrigerada (4°C) a 13.200 rpm por 10 minutos (Eppendorf). A quantificação das proteínas existentes em cada pellet foi realizada através do Kit BioRad®, baseado no método de Lowry (DAWSON; HEATLIE, 1984). Depois de dosadas, foram adicionados 10µl de tampão loading (115mM Tris-HCl pH 6.8; 15% SDS; 10% de glicerol; 100mM de 2-β-mercaptoetanol; 0,1% de azul de bromofenol) às amostras. Posteriormente, 30µg de proteínas foram submetidas a uma corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida 12% constituído por 3,35 mL de água destilada, 2,5 mL de Tris-HCl, pH 8,8, 1,5 M; 100 µL de SDS 10%; 4 ml de acrilamida/bisacrilamida (30%); 50 µL de persulfato de amônio 10% e 5 µL de TEMED (gel de resolução), para separação de proteínas de acordo com o seu peso molecular. O gel de empilhamento (*stacking gel*) foi de 4%, constituído de 6,1 mL de água destilada, 1,5 mL de Tris-HCl, pH 6,8, 0,5 M; 1,3 mL da solução de acrilamida/bisacrilamida 30% e 100 µL de SDS 10%. Após completa polimerização (aproximadamente 30 minutos), foi acrescentado o

tampão corrida para eletroforese composto por Tris 0,025 M, glicina 0,0192 M, SDS 0,1%, pH 8,3. As amostras foram aplicadas de maneira que sempre houvesse no gel um poço preenchido pelo padrão de peso molecular Novex (Invitrogen). Ao término da aplicação das amostras, teve início à eletroforese das proteínas em gel a 110 V constantes por 1:30 hora. Após eletroforese, as bandas proteicas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond™ECL, (Amersham Biosciences) utilizando-se tampão contendo Tris 25 mM, Glicina 193 mM e 20% de metanol em uma cuba de transferência úmida a 100V por duas horas. Após transferência, as membranas foram coradas com Vermelho de Ponceau (Ponceau S 50mg, Ácido Acético glacial 5%, água Milli-Q q.s.p. 50 mL), para verificar se a transferência foi eficiente. O bloqueio da membrana foi realizado por duas horas com uma solução a 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS-Tween (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 150mM de NaCl; 0,05% Tween-20) por uma hora e lavada três vezes com TBS-Tween 0,05% por 5 min. Depois, a membrana foi marcada com anticorpos primários (Tabela 4.1), individualmente e incubada a 4°C, overnight. A membrana foi, então, submetida a três lavagens com TBS-Tween 0,05% por 5 min e marcada com anticorpos secundários anti-goat (NB7362, Novus Technologies; Littleton, CO, US), anti-mouse ou anti-rabbit (Amersham Biosciences) conjugados a HorseRadish-Peroxidase à temperatura ambiente por 1 hora, sob agitação. Para revelação da quimioluminescência, foi utilizado o kit de revelação ECL Prime (ECL, Western Blotting Analysis System; GE Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante. As membranas foram então escaneadas utilizando C-Digit™ Blot Scanner ou um filme ultrasensível (GE Healthcare). As imagens foram geradas utilizando Image Studio Lite software (Li-cor Biosciences).

Tabela 4.1: Pannel de anticorpos monoclonais primários utilizados na técnica de Western blotting.

Anticorpo primário	Catálogo	Isotipo	(μ l/ml TBS/BSA)	Fabricante
Bax	#2772	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
Bcl-2	M0887	Mouse	1:1000	Dako
Survivina	#2808	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
p53	M 7001	Mouse	1:500	Dako
JNK total	#9252	Rabbit	1:500	Cell Signaling
Fosfo-JNK	#9251	Rabbit	1:500	Cell Signaling
Bim	Aap-330	Rabbit	1:1000	Stressgen
Fosfo-p38	#9211	Rabbit	1:500	Cell Signaling
p38 total	#9212	Rabbit	1:500	Cell Signaling
Mcl1	#5453	Rabbit	1:500	Cell Signaling
Bcl-xL	Sc-8392	Mouse	1:200	Santa Cruz Biotechnology
c-IAP2	AF8171	Goat	1:200	R&D Systems
Bak	#3814	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
Hsc70	Sc7298	Mouse	1:1000	Santa Cruz Biotechnology

Cell Signaling: Danvers, MA, USA; Dako: Glostrup, DK; R&D Systems: Minneapolis, MN, USA; Santa Cruz Biotechnology: Santa Cruz, Texas, USA; Sigma-Aldrich: St Louis, MO, USA; Stressgen: Brussels, BE

4.12 *Array de proteínas fosforiladas*

Para este ensaio, foi utilizado 1×10^7 células/mL processadas utilizando o Human *Phospho-Kinase array* Cat n°ARY003B (Proteome Profiler; R&D Systems, Minneapolis, USA) seguindo as instruções do fabricante. O Kit é composto por quatro conjuntos de duas membranas para visualização de 45 proteínas fosforiladas em duplicata, além de três duplicatas de referência e duas para o controle negativo. O lisado das células sem tratamento foi quantificado e para cada conjunto de duas membranas foi adicionado o equivalente a 300 μ g de proteínas totais. Os resultados do *Phospho-Kinase array* foram gerados em filme de

raio-X após a exposição a reagentes quimioluminescentes por 10 minutos. A quantificação foi feita pela média da densidade de pixel utilizando o programa Labworks, seguindo as instruções do fabricante.

4.13 Silenciamento gênico de JNK e p38 por interferência de RNA (RNAi)

A fim de avaliarmos mais profundamente o papel nas MAPKs JNK e p38 na resistência as antraciclina e ao Ara-c, em linhagens de LMA, a técnica de RNAi foi utilizada. As células da linhagem Kasumi e U937 foram transfectadas com o siRNA controle negativo – *scramble* (#6568; Cell Signaling), com o siRNA para JNK (#6232; Cell Signaling) ou com o siRNA para p38 (#6564; Cell Signaling), utilizando a Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Para análise da eficácia do silenciamento, foi utilizada a técnica de Western blotting. A transfecção foi realizada em placas de seis poços e em cada poço, foram adicionados 2×10^5 células em 500 μ L, 2 μ L de Lipofectamina RNAimax, 6 μ L de siRNA e OPTI-MEM em quantidade suficiente para 600 μ L finais (concentração final de siRNA: 100nM). Após 72 horas de transfecção, os quimioterápicos foram adicionados ao meio e mantidos na cultura celular por mais 24 horas (Figura 4.2). As diferenças no perfil de sensibilidade aos quimioterápicos entre as células transfectadas com o siRNA para JNK ou p38 e com o scramble foram avaliadas por citometria de fluxo pela análise da fragmentação do DNA.

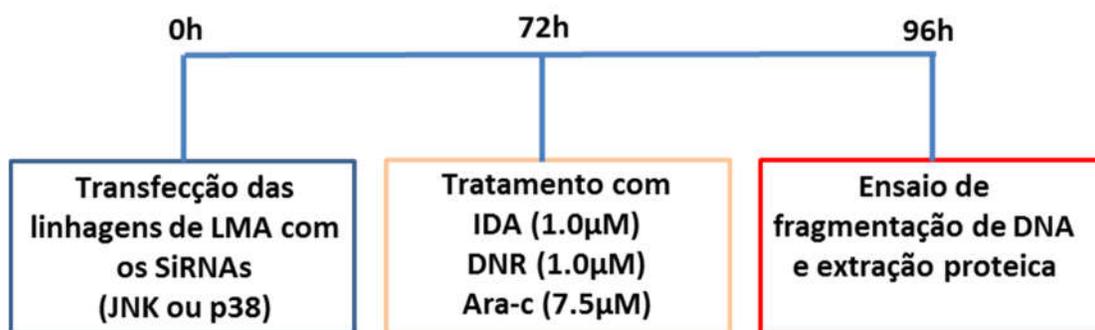


Figura 4.2: Esquema da transfecção por siRNA nas linhagens de leucemia mielóide aguda. As linhagens Kasumi e U937 foram transfectadas com o siRNA controle (scramble), siRNA para JNK ou siRNA para p38 e posterior exposição as antraciclinas e ao Ara-c.

4.14 Extração de RNA, quantificação, síntese de cDNA e miRNAs

A extração do RNA total das amostras de linhagens celulares, doadores saudáveis e medula óssea dos pacientes com LMA, foi realizada pelo método de Trizol, segundo especificações do fabricante. A quantificação e o grau de pureza do RNA total extraído foram obtidos através do espectrofotômetro Nanodrop® ND-1000 (Thermo Scientific). O cDNA foi sintetizado usando o kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), o qual possui os iniciadores fornecidos juntamente com as sondas do kit no Kit TaqMan® MicroRNA Assays. Foram utilizados 20 ng do RNA total para transcrição reversa com uso de iniciadores específicos para hsa_miR-27a (ID 408) e RNU6B (NR_002752) seguido por qPCR com TaqMan® Universal PCR Master Mix e quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os níveis do miRNA foram normalizados mediante expressão dos níveis do miRNA controle RNU6B. As reações foram realizadas em duplicata no Applied Biosystems StepOne™.

4.15 Desenhos do RNA guia (RNAg), Plasmídeos e Clonagem

O CRISPR foi realizado em colaboração com o pesquisador Dr. Martin Bonamino - INCA. O algoritmo utilizado para os desenhos dos RNAs guias (RNAg) foi o Optimized CRISPR Design, disposto em <http://crispr.mit.edu/>. O sistema CRISPR/Cas9 foi desenhado para a clivagem de loci específicos para os genes, JNK1 e p38 α . Para a geração de cada possível sequência de RNA guia, a sequência de reconhecimento da Cas9, PAM (NGG) é primeiramente identificada em um seguimento de 23-250 pb (sequência alvo) e certa pontuação é inferida a cada sequência de acordo com sua qualidade. Qualidade é determinada pela especificidade do possível guia para a região alvo (Figura 4.3A). Foram escolhidos 2 RNAg para cada gene conforme figura 4.3.

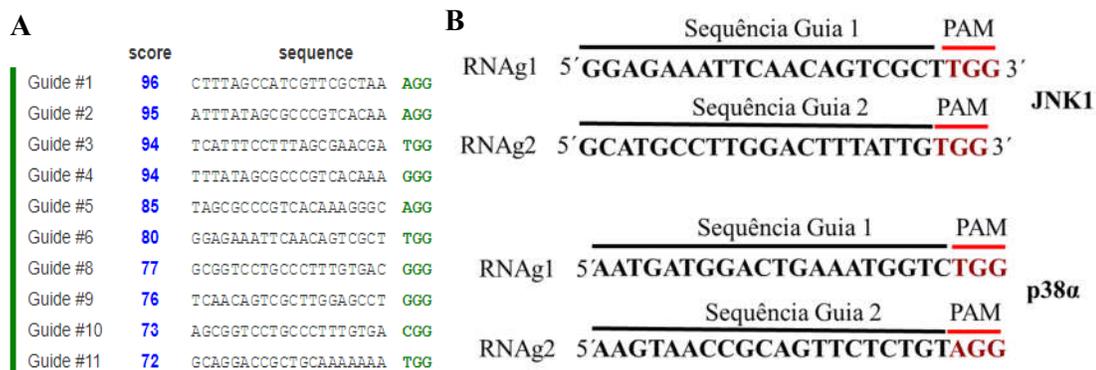


Figura 4.3: Representação ilustrativa do ranking de RNAs guias e das sequências guias escolhidas para o reconhecimento e posterior clivagem dos genes, JNK1 e p38 α . A figura representa a disposição dos gRNAs de acordo com qualidade da sequência (A). Os números presentes na coluna *score* referem-se à pontuação conferida pela ferramenta. Quanto maior a pontuação, melhor o guia. A última coluna dispõe os gRNAs na presença da sequência PAM, últimos 3 nucleotídeos. Duas sequências de 20 nucleotídeos foram escolhidas (B).

As sequências guia para edição de cada loci foram selecionadas de acordo com a maior pontuação e o sítio de restrição da enzima BbsI (New England Biolabs) para a estratégia de clonagem, foi adicionado em suas extremidades. Os plasmídeos, pX459 e pX458, obtidos da empresa Addgene (www.addgene.com), foram utilizados para o processo de clonagem dos RNAs guias, previamente desenhados para JNK e p38. Estes plasmídeos possuem em comum a sequência do RNA guia e da nuclease Cas9. No entanto, além das sequências mencionadas, o pX458 possui em sua estrutura o cassete para expressão da proteína GFP (Green Fluorescent Protein). Além disso, o pX459 possui o cassete de resistência à puromicina. Os oligonucleotídeos correspondentes aos RNAs guias foram anelados na razão molar 1:1 e clonados nos plasmídeos do CRISPR/Cas9 (PX458 e PX459) através de digestão com a enzima BbsI (New England Biolabs) e ligação pela enzima T4 ligase. Os Plasmídeo PX458, que contém o gene que codifica GFP (*Green Fluorescent Protein*) e o plasmídeo pX459 contendo o gene de resistência a puromicina, podem ser visualizados na figura 4.4 e 4.5.

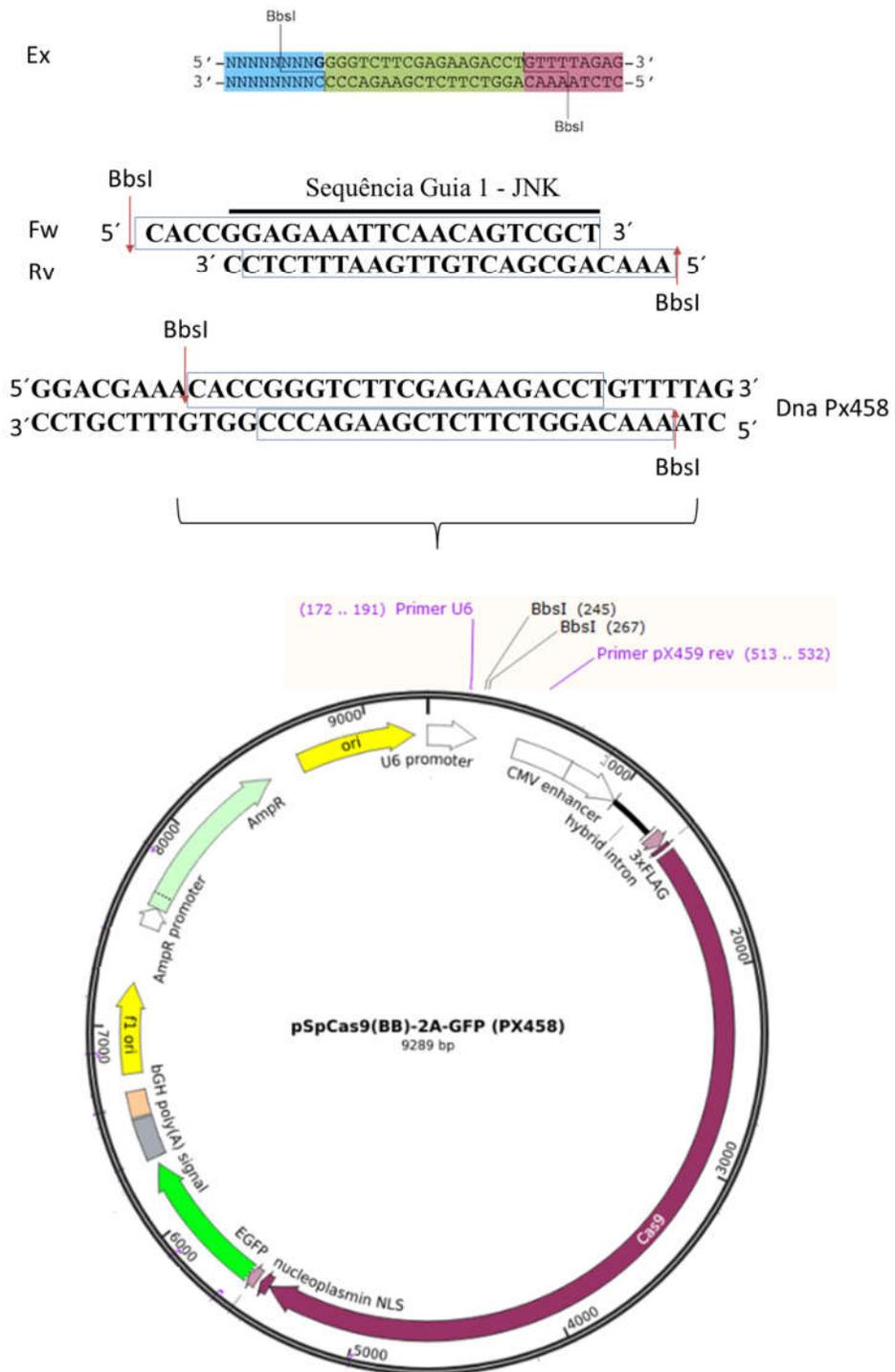


Figura 4.4: Figura representativa da ligação da sequência guia no vetor plasmidial PX458. Os oligonucleotídeos da sequência guia foram anelados e ligados ao sítio de clonagem no plasmídeo PX458 através de anelamento das extremidades coesivas que foram alvo da enzima de restrição BbsI. Representação dos plasmídeos do sistema CRISPR/Cas9

(pX458), este plasmídeo possui além das sequências para a enzima Cas9 selvagem e do gRNA, a proteína GFP. U6: sequência promotora do gRNA; EGFP: proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*); AmpR: cassete de resistência à ampicilina.

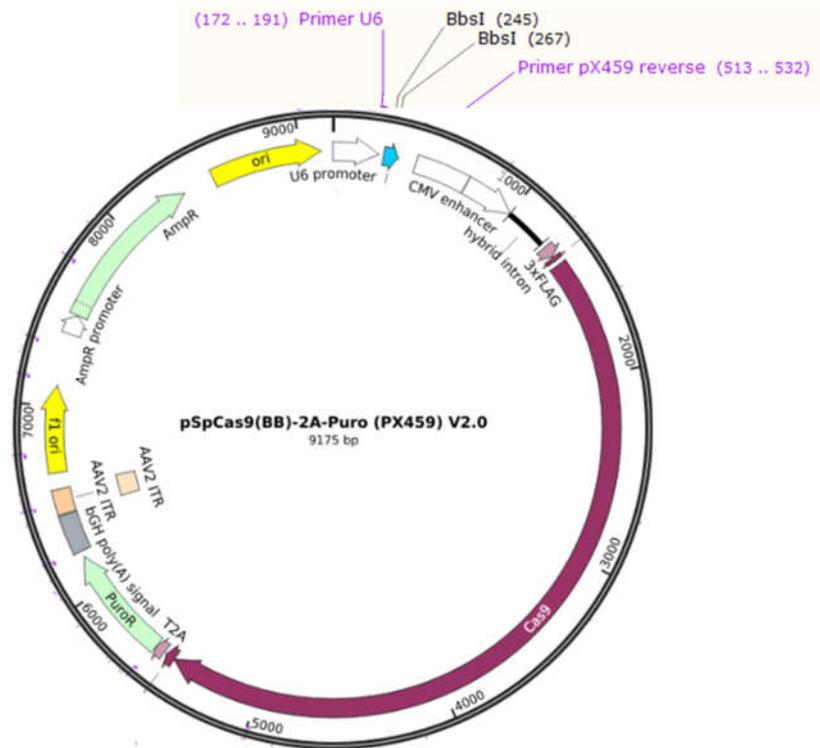


Figura 4.5: Figura representativa do vetor plasmidial PX459. Representação do plasmídeo do sistema CRISPR/Cas9 (PX459). Este plasmídeo possui além das sequências para a enzima Cas9 selvagem e do gRNA, sequências que conferem resistência à puromicina, U6: sequência promotora do gRNA, AmpR: cassete de resistência à ampicilina; PuroR: cassete de resistência à puromicina.

4.16 Transfecção, Sequenciamento e Eletroporação das linhagens de LMA.

Cada plasmídeo, contendo a respectiva sequência de interesse, foi transfectado, separadamente, em bactérias competentes, *E. coli* TOP-10f (Invitrogen Life Science), através de processo de transformação bacteriana. As bactérias transformadas foram cultivadas em placa contendo meio Luria Bertani (LB)-ampicilina-água por 16 horas em estufa a 37°C, onde

foram formadas colônias cujas bactérias apresentavam resistência, fornecida pelo plasmídeo, ao antibiótico ampicilina.

A confirmação das clonagens foi realizada através de minipreparações das colônias, foram selecionadas cinco colônias de cada placa (Figura 4.6) e crescidas em 5 mL de meio LB líquido acrescido de ampicilina (2 µg/mL), durante 16 horas, sob agitação a 250 RPM. Em seguida, com o objetivo de purificar essa pequena quantidade de DNA plasmidial, foi realizada uma mini-preparação plasmidial, seguindo protocolo estabelecido pelo kit Illustra plasmidPrep Mini Spin (GE Healthcare Life Science). As etapas subsequentes consistiram em avaliar a sequência de nucleotídeos que compunham o DNA plasmidial de cada colônia para a confirmação da presença da sequência de interesse, o RNAg, através da técnica PCR e sequenciamento.



Figura 4.6: Placa contendo meio Luria Bertani (LB)-ampicilina-ágar. Formaram-se colônias cujas bactérias apresentavam resistência, fornecida pelos plasmídeos, ao antibiótico Ampicilina.

Após a confirmação por PCR, o DNA de cada colônia foi submetido a reação de sequenciamento (plataforma Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer) com oligonucleotídeos U6 (5'GACTATCATATGCTTACCGT3') Forward e 459 (5' TGGAAAGTCCCTATTGGCGT 3') Reverso (Primers utilizados para as reações de PCR e sequenciamento), que anelam em região compartilhada por todos os plasmídeos e flanqueiam as regiões dos RNAs guias (Figura 4.7).

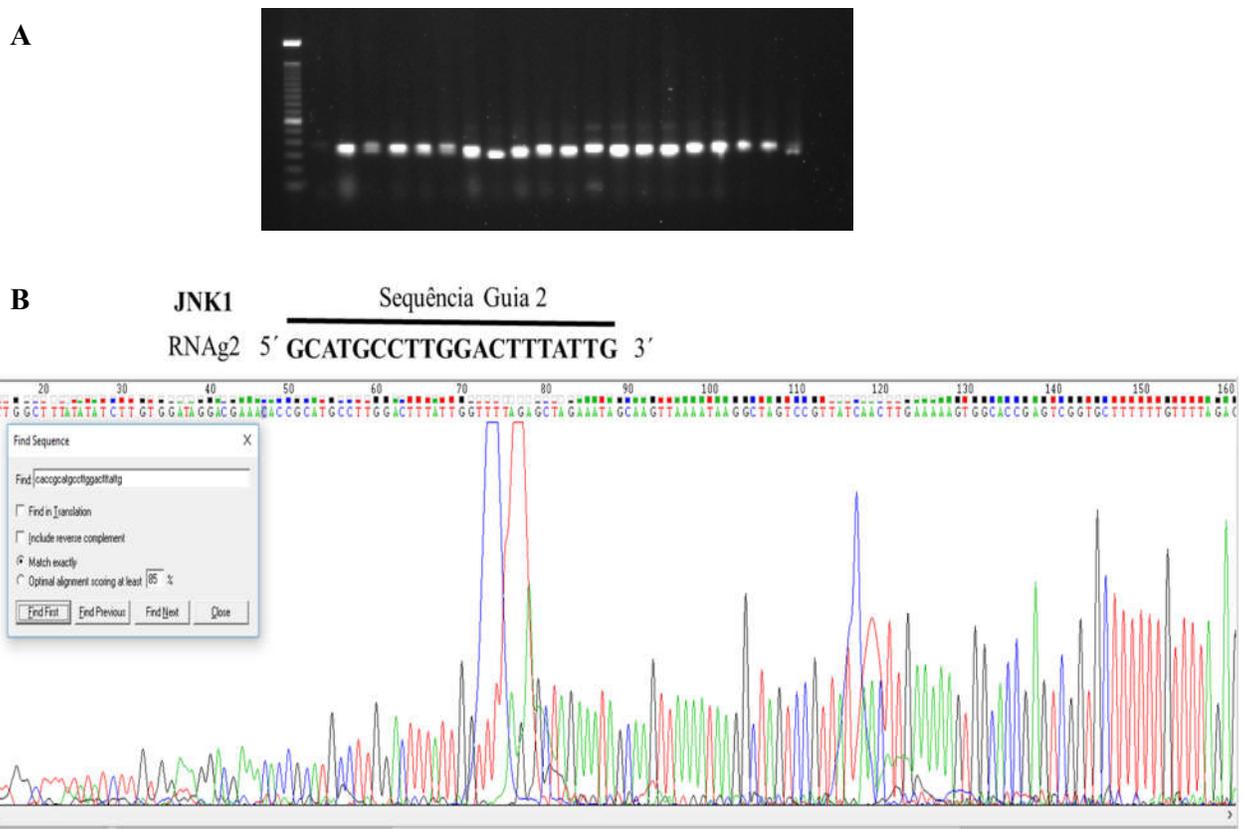


Figura 4.7: Figura representativa da Eletroforese em gel de agarose (A) e sequenciamento (B) confirmando a presença da sequência de interesse, o RNA guia.

Uma vez que as clonagens das construções foram confirmadas, os plasmídeos recombinantes foram transfectados nas linhagens celulares de LMA, HL60, Kasumi e U937, mediante a técnica de eletroporação, seguindo o protocolo descrito por Chicaybam e

colaboradores em 2016 (5 µg do plasmídeo pX458 ou pX459 contendo RNAg 1 e/ou RNAg 2). As células foram ressuspendidas em 100 µL de solução tampão de eletroporação 1SM (CHICAYBAM et al., 2016) e colocadas em cubeta estéril (Mirus Biotech®, Madison, WI, EUA cat.: MIR 50121). Os plasmídeos recombinantes com os RNAs guias, foram adicionados à solução contendo as células, e então, eletroporadas pelo sistema Lonza® Nucleofector®. Após a eletroporação, as células foram gentilmente ressuspensas em 1 mL de meio RPMI suplementado com 2 mM de L-Glutamina e 20% de soro fetal bovino (SFB), selecionadas com 2µM de puromicina para o plasmídeo PX459 por 72 horas e posteriormente colocadas em cultura.

4.17 Avaliação molecular de edições genômicas (em andamento)

Para a análise molecular das edições, o DNA genômico das células editadas foi extraído por Fenol-Clorofórmio (Invitrogen). Um par de oligonucleotídeos flanqueando cada região editada foi desenhado para amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction) Figura 18. Os fragmentos de DNA obtidos por PCR serão clonados no plasmídeo pCR2.1 (TA Cloning® Kit) (Figura 4.8) e, para colônias isoladas, serão realizadas reações de PCR com os oligonucleotídeos universais M13Fw (5'ACTGGCCGTCGTTTTAC3') e M13Rv (5'GTCATAGCTGTTTCCTG3'). Os fragmentos obtidos destas reações de PCR serão sequenciados pela plataforma Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer com os mesmos oligonucleotídeos (M13Fw e M13Rv) para análise de indels.

A Primers

CCTIAGTGCTGCTTTTGACAC	GTGCATCAAACGTTGGTCCC	P38 guia 1 e 2
FW GATTATAGCGCCCGTCACA	Rv AAGCCCATACAGAAGTTTCCA	JNK guia 1
CTGTIATTTTTGCCAAATGCTTCA	TGTGGGGTAAGTCTTATGTTTGT	JNK guia 2

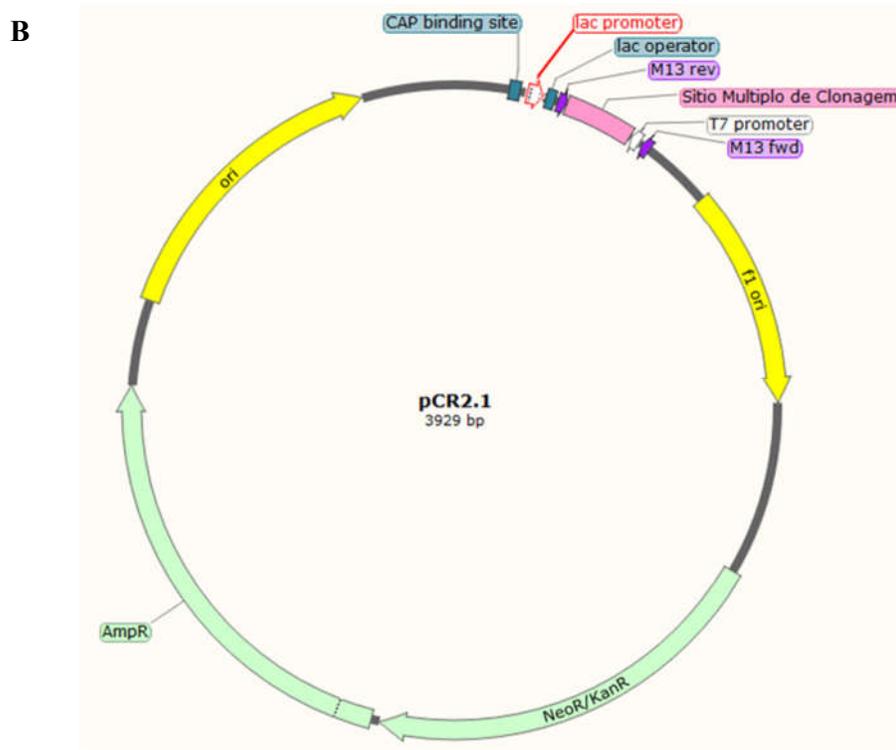


Figura 4.8: Primers utilizados para identificar as regiões editadas de cada gene (A) e Mapa do plasmídeo de clonagem do kit TA Cloning® kit, pCR2.1 (B). F1 ori: origem de replicação (F1 fago); NeoR/KanR: cassete de resistência à neomicina e kanamicina; AmpR: cassete de resistência à ampicilina; ori: origem de replicação; CAP binding site: *Catabolite Activator Protein* (ativador transcricional); Lac promoter: promotor do operon Lac; Operator lac: operon lac; M13 rev e M13 fwd: sequências dos oligonucleotídeos M13; sítio múltiplo de clonagem: sítio de clonagem dos fragmentos; T7 promoter: promotor T7.

4.18 Seleção, critérios de inclusão e exclusão, e informações clínicas dos pacientes com LMA

As amostras de medula óssea dos pacientes com LMA foram coletadas de forma retrospectiva e prospectiva. Foram incluídos neste estudo, 50 pacientes na faixa de 1 a 71 anos de idade com LMA *de novo* ao diagnóstico. Os pacientes foram admitidos no HCI no período de 2007 até agosto de 2015. Os dados demográficos e clínicos dos pacientes foram obtidos da análise dos prontuários, conduzido por um médico hematologista envolvido no presente estudo. Foram excluídos do estudo pacientes que evoluíram para óbito antes do início do tratamento ou que não foram elegíveis para realização de quimioterapia. Os pacientes foram submetidos ao mesmo esquema de tratamento, composto pela associação de uma antraciclina (IDA ou DNR) com o Ara-c. Os resultados obtidos pelo estudo laboratorial (expressão da proteína transportadora de efluxo Pgp e do miR-27a) foram correlacionados entre si ou com fatores prognósticos estabelecidos. O impacto dos resultados obtidos no prognóstico dos pacientes foi avaliado pela análise da sobrevida livre de doença (SLD) e da sobrevida global (SG).

4.19 Considerações éticas

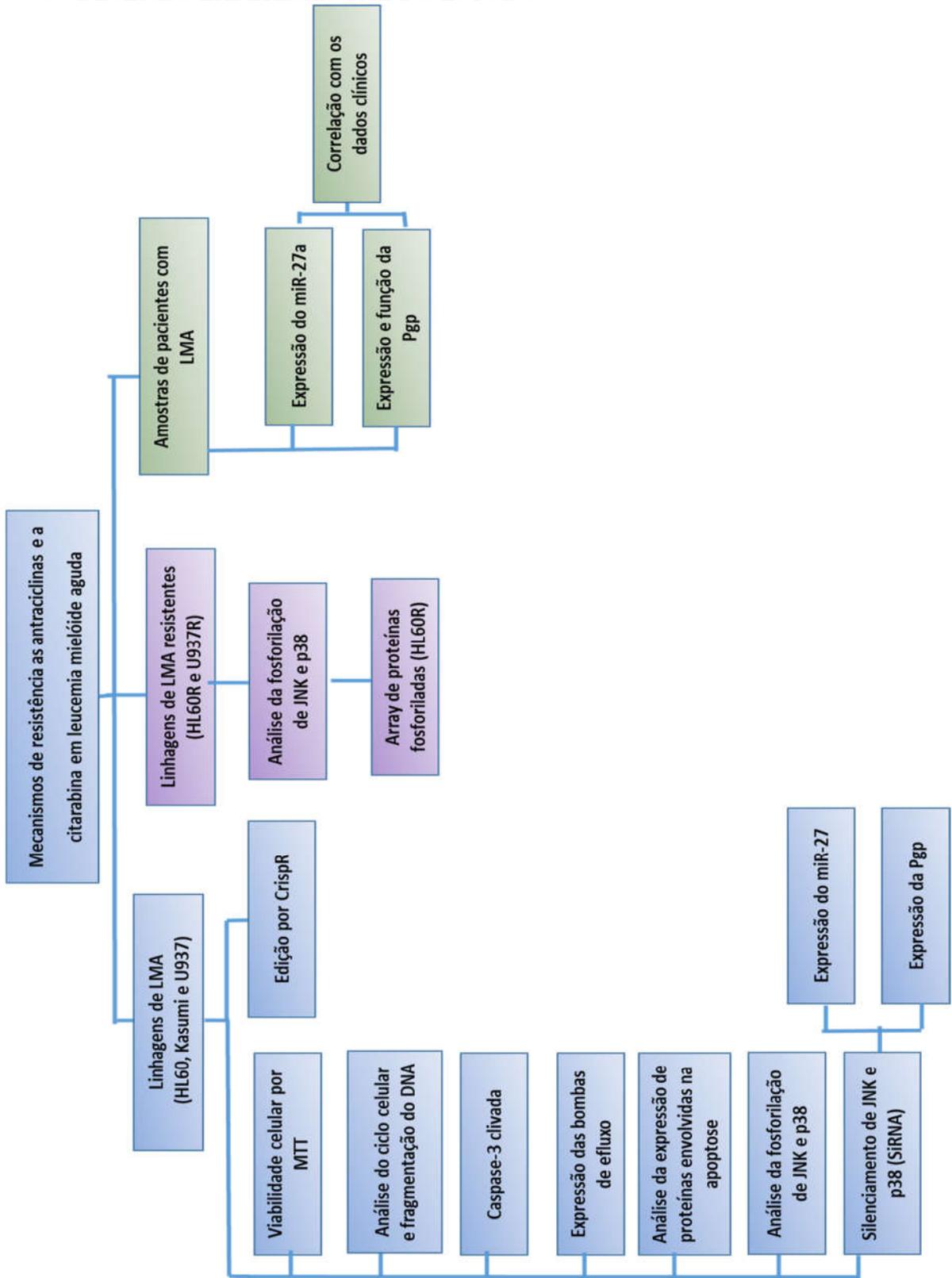
Por se tratar de estudo envolvendo amostras biológicas de seres humanos, o projeto possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Câncer (nº 110/06) com complementação (CAAE - 70945317.4.0000.5274).

4.20 Análises Estatísticas

O teste ANOVA (one-way ANOVA) seguido do pós-teste *Bonferroni* ou *Turkey* foi utilizado para avaliar as diferenças entre os dados obtidos com as células tratadas e não

tratadas (software Graph Pad Prism 6.0). Pelo menos três repetições de cada experimento foram realizadas. O ponto de corte para a expressão positiva do miR-27a foi de 1,5 (mediana \pm 10%). As estatísticas foram realizadas usando o pacote de software GraphPad Prism. O teste exato de Fisher, o teste t e a correlação de Spearman foram realizados para comparar as diferenças das variáveis. A SG e SLD foram analisadas de acordo com o método de Kaplan-Meier. O valor de p foi calculado em um intervalo de confiança de 95%, onde valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

5. DESENHO EXPERIMENTAL DO ESTUDO



6. RESULTADOS

Este tópico foi dividido em duas partes visando o melhor entendimento dos resultados. A parte I é referente aos dados obtidos com as linhagens celulares de LMA, e a parte II é referente aos dados obtidos com as amostras de pacientes com LMA.

PARTE I:

Caracterização do perfil de resistência das linhagens celulares HL60, Kasumi e U937

6.1 As linhagens de LMA apresentam uma evolução clonal quanto ao padrão cromossômico descrito na literatura

O primeiro passo deste trabalho foi avaliar o padrão cromossômico das linhagens celulares de LMA, uma vez que os estudos citogenéticos têm mostrado que a heterogeneidade clínica e biológica da LMA pode ser atribuída, em parte, às alterações cromossômicas distintas. Essas alterações são rotineiramente utilizadas para auxiliar no diagnóstico, estratificação de grupos de risco e avaliação da resposta ao tratamento (BULLINGER; FRÖHLING, 2012). As três linhagens de LMA (HL60, Kasumi e U937) apresentaram um cariótipo complexo (com a presença de três ou mais alterações cromossômicas). As linhagens HL60 e Kasumi apresentaram duas populações coexistindo na mesma cultura celular. Para a linhagem HL60, o seguinte cariótipo foi encontrado: o número de cromossomos variou de 45 - 46 e duas populações celulares foram observadas: 45,X,ins(4q),-5,add(9)(p13),del(10)(p12),add(17)(p13),-18,+2mar (em 60% das metáfases analisadas (Figura 6.1A) e 46,X,ins(4q),-5,add(9)(p13),del(10)(p12),add(17)(p13),-18,+3mar (em 40% das metáfases analisadas) (Figura 6.1B). O número cromossômico variou entre 47- 48 na linhagem Kasumi e duas populações celulares também foram visualizadas: 47,X,-Y,t(8;21)(q22;q22),add(9)(p13),+10,+12,-13,-15,-16,add(17)(p13),+18,-19,+22,+2mar (em

60% das metáfases analisadas) (Figura 6.1C) e 48,X,-Y,t(8;21)(q22;q22),add(9)(p13),+10,+12,-13,-15,-16,add(17)(p13),+18,-19,+22,+3mar (em 40% das metáfases analisadas) (Figura 6.1D). A linhagem U937 apresentou, além de um cariótipo complexo, um cariótipo hiperdiplóide (com mais de 50 cromossomos). No entanto, exibiu apenas uma única população, com cariótipo: 55,X,-Y,+der(1)del(1)(p32),+2,+der(3)t(1;3)(q32;q28),del(5)(q21),+7,+9,add(10)(p15),del(11)(q21),+der(11)add(11)(p15),+12,add(14)(p11),add(15)(p11),+19,-22,+3 mar (Figura 6.1E).

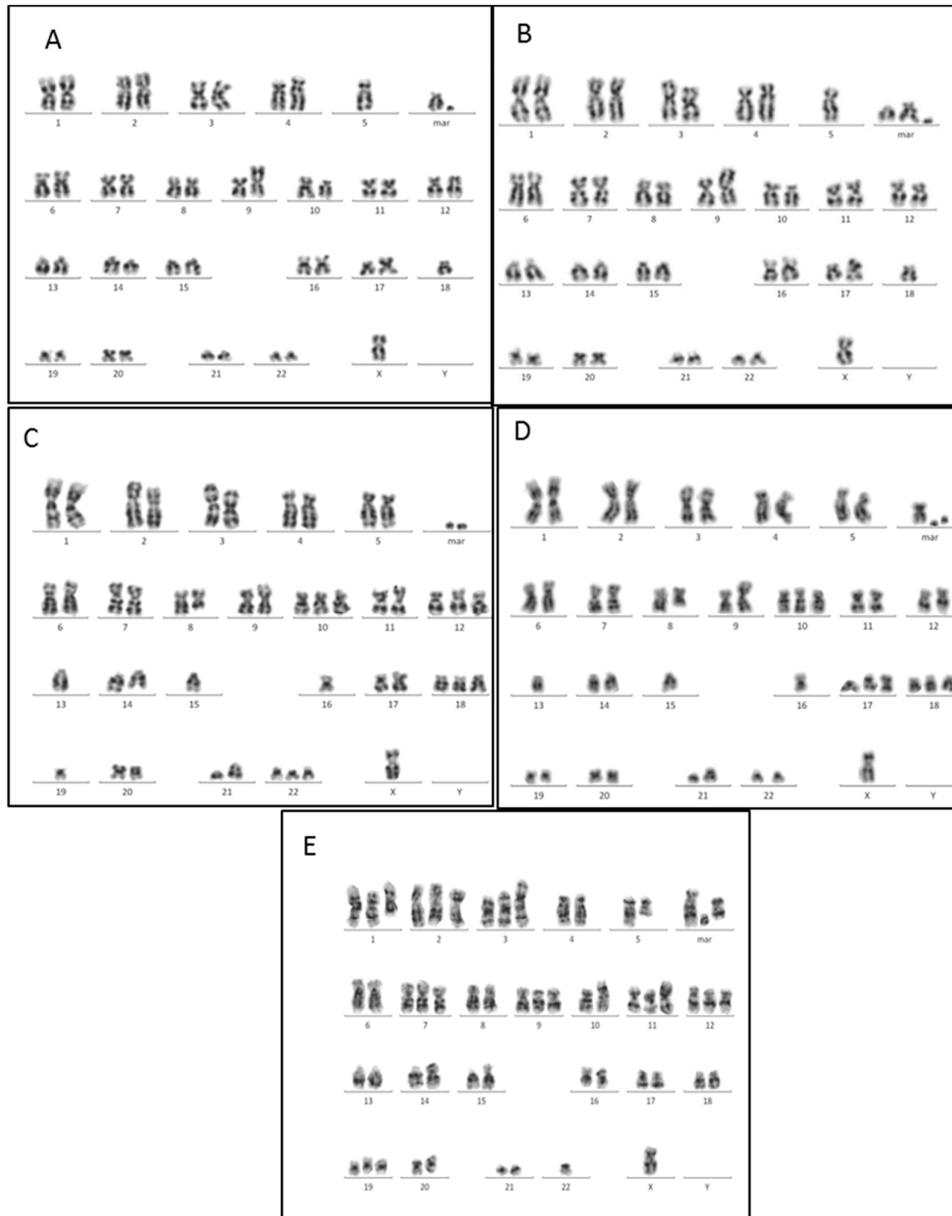


Figura 6.1: Análise por citogenética clássica (Bandeamento GTG) mostrando as alterações cromossômicas encontradas na HL60 (A e B), Kasumi (C e D) e U937 (E). Os cromossomos foram classificados e identificados de acordo com a nomenclatura internacional de citogenética ISCN (2016) (STEVENS-KROEF et al., 2017). As imagens foram adquiridas utilizando o sistema de cariotipagem cytovision.

6.2 A linhagem celular Kasumi apresentam um imunofenótipo semelhante ao descrito na literatura

A imunofenotipagem permite a avaliação da eficácia do tratamento e detecção precoce de recidiva (COSTA et al., 2017). Para o monitoramento é necessário caracterizar o perfil imunofenotípico das células leucêmicas na ocasião do diagnóstico, para que este possa ser detectado e comparado após o tratamento. No entanto, a instabilidade genética das células leucêmicas resulta em alterações no imunofenótipo visualizadas nos pacientes em recidiva (COSTA et al., 2017). Sendo assim, verificamos o perfil imunofenotípico de todas as linhagens celulares de LMA mediante o painel utilizado pelo laboratório de imunofenotipagem do CEMO (Centro de transplante de medula óssea) para os pacientes com LMA, como mostrado na Tabela 6.1.

A linhagem de Kasumi apresentou positividade para os marcadores mielóides e para os marcadores de células mielomonocíticas. Esta linhagem foi negativa para os marcadores testados para células monocíticas. O antigénio CD117 (receptor KIT) foi examinado porque é constitutivamente ativo em células da linhagem Kasumi (LARIZZA; MAGNANI; BEGHINI, 2005). A caracterização imunofenotípica da linhagem HL60 mostrou positividade para CD13+, CD33+, CD45+, CD34+ e CD15++ e negatividade para CD117-/+ , CD14-/+ . As células U937 foram positivas para CD13+, CD33+, CD34+, CD15++ e CD14 +/- e negativas para CD117-.

Tabela 6.1: Caracterização do perfil imunofenotípico das linhagens celulares de LMA

Linhagem	Perfil imunofenotípico
Kasumi	CD13+, CD33+, CD45+, CD34+, CD117+, negCD14 and negCD15.
HL60	CD13+, CD33+, CD45+, CD34+, CD15++, CD14-/+ , CD117-/+
U937	CD13+, CD33+, CD45+, CD34+, CD15++, CD14+/-, negCD117

Marcadores: Mielóides - CD13+, CD33+; Mielomonocíticos - CD45+, CD34+ e CD117+ e Monocíticos - CD14 e CD15. As células foram consideradas positivas de acordo com a seguinte pontuação: ++, mais de 90% de células positivas; +, 50-90% de células positivas; +/-, 20-49% de células positivas; -/+, 10-19% de células positivas; -, menos de 10% de células positivas.

6.3 As linhagens de LMA apresentam diferentes níveis de expressão e atividade das proteínas transportadoras de efluxo associadas à resistência a múltiplas drogas

O desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas (MDR) é frequentemente observado no tratamento da LMA, e é um fenômeno que permite que as células leucêmicas que foram expostas a um agente citotóxico desenvolvam resistência cruzada a uma variedade de compostos estruturalmente e funcionalmente não relacionados (GRUNDY et al., 2011). Em pacientes com LMA, o fenômeno MDR pode estar presente intrinsecamente, na ocasião do diagnóstico, ou pode surgir durante o tratamento com quimioterapia, bem como na recidiva (GRUNDY et al., 2011). Os transportadores de efluxo da família ABC extruem quimioterápicos ativamente e é o mecanismo mais bem caracterizado pelo qual as células leucêmicas desenvolvem MDR, principalmente depois de repetidos ciclos de quimioterapia (GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002). A partir desta informação, nós verificamos o perfil de expressão e atividade da Pgp, expressão da MRP1 e atividade da BCRP nas linhagens celulares de LMA.

A linhagem Kasumi não apresentou expressão da Pgp (RFI=1.0) (Figura 6.2). A linhagem HL60 apresentou uma baixa expressão da Pgp (RFI=1.28) quando comparada com a linhagem U937 (RFI=2.45). Entretanto, apesar da linhagem U937 apresentar a mais alta expressão da Pgp dentre as linhagens de LMA estudadas, a Pgp não apresentou atividade de efluxo após o ensaio de modulação e o mesmo foi visualizado para a linhagem Kasumi. Apenas a linhagem HL60 exibiu expressão e atividade da Pgp (Figura 6.2). O alto nível de expressão da Pgp na linhagem U937 já foi relatado em outros estudos (HU et al., 2002; PRINCIPE et al., 1994), assim como a sua ausência de atividade (JAWAD et al., 2012).

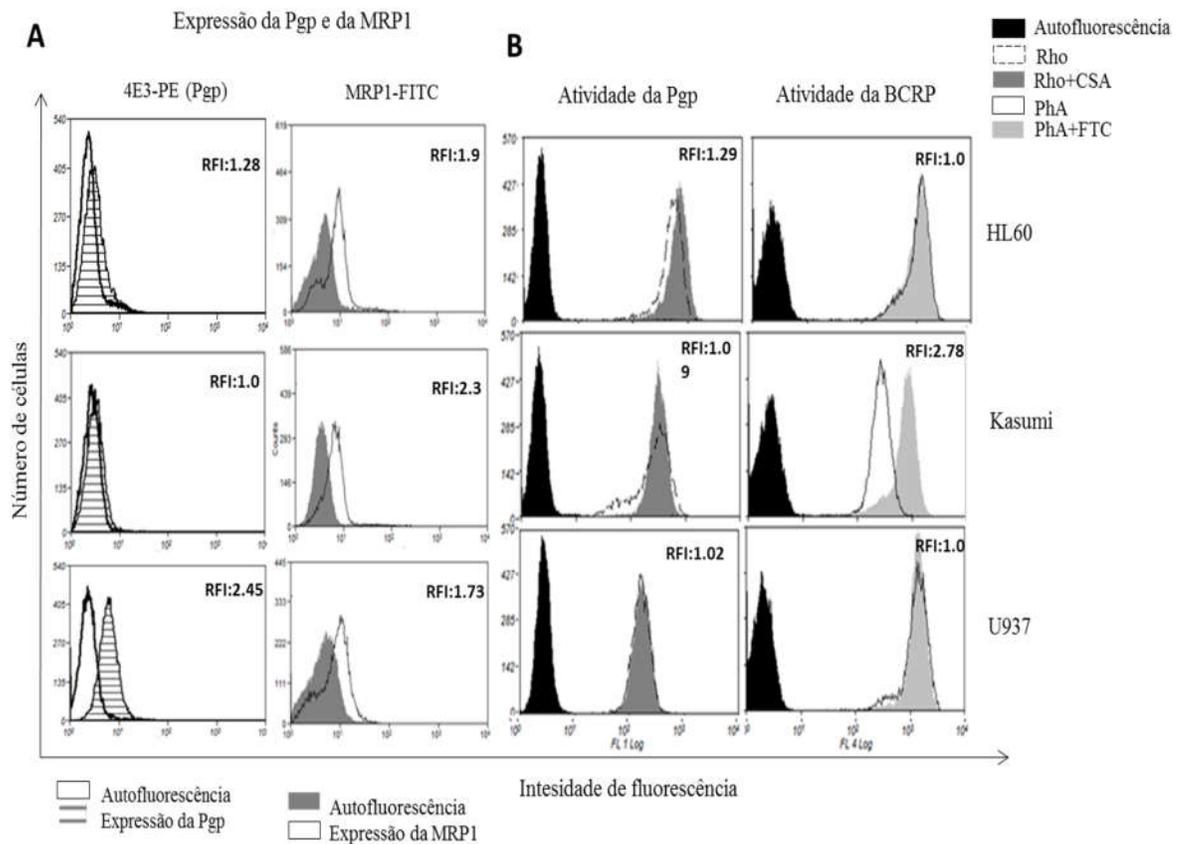


Figura 6.2: Expressão da glicoproteína P (Pgp), da MRP1 (*multidrug resistance protein 1*) e atividade da Pgp e da BCRP (*Breast cancer resistance protein*) em linhagens de leucemia mielóide aguda. Expressão da Pgp e MRP1 nas linhagens HL60, Kasumi e U937 (A). Os resultados da expressão da Pgp (4E3-PE) e da MRP1 (MRP1-FITC) foram expressos

pela razão da intensidade de fluorescência (RFI) como descrito na seção Materiais e Métodos. Amostras apresentando RFI maior do que 1.1 foram consideradas positivas. Atividade da Pgp e da BCRP nas linhagens HL60, Kasumi e U937 (B). A atividade da Pgp foi analisada pelo ensaio de modulação como o corante fluorescente Rodamina-123 e o agente modulador Ciclosporina A (Rho + CSA). A atividade da BCRP foi realizada pelo ensaio com o corante fluorescente Pheophorbide A e o agente modulador Fumitremorgin (PhA + FTC). Todos os ensaios foram analisados por citometria de fluxo. Figura representativa de três experimentos independentes.

Notavelmente, a expressão da MRP1 foi observada nas três linhagens de LMA, sendo um pouco mais elevada na linhagem Kasumi (RFI=2.3) quando comparada com as demais linhagens HL60 (RFI=1.9) e U937 (RFI=1.73) e a atividade da BCRP foi detectada apenas na linhagem Kasumi (Figura 6.2).

6.4 As linhagens de LMA apresentam um perfil distinto de expressão de moléculas reguladoras da apoptose

A apoptose desempenha um papel fundamental no controle da renovação das células do tecido hematopoético. Sendo assim, células leucêmicas invariavelmente apresentam alterações em uma ou mais vias relacionadas a apoptose, levando a maior sobrevivência destas células e o desenvolvimento de resistência a quimioterápicos (DEL POETA et al., 2008). Essas alterações resultam em uma baixa taxa de resposta à quimioterapia e baixa sobrevida global na LMA (DEL POETA et al., 2008).

Diferenças significativas foram encontradas nas linhagens HL60, Kasumi e U937 em relação a expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas (Figura 6.3). A linhagem HL60 apresentou altos níveis de expressão das proteínas anti-apoptóticas c-IAP-2, MCL1, Bcl-2, Bcl-xL e survivina em comparação com as linhagens Kasumi e U937. Esta linhagem também apresentou altos níveis das proteínas pró-apoptóticas Bak e Bim, mas baixos níveis da

proteína Bax. A linhagem Kasumi foi a única que exibiu a expressão da proteína p53. As linhagens HL60 e U937 são p53-null (ATCC) e somente a linhagem Kasumi apresenta a forma mutada da p53 (ATCC). O anticorpo utilizado detecta ambas as isoformas de p53 (selvagem ou mutada). A linhagem Kasumi também exibiu a expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-xL e Survivina, mas somente alta expressão da proteína pró-apoptótica Bak. Na linhagem U937, quatro proteínas anti-apoptóticas encontram-se expressas: MCL1, Bcl-2, Bcl-xL e survivina (Figura 6.3). Nossos dados demonstram que as linhagens de LMA apresentam distintos perfis de expressão de moléculas pró e anti-apoptóticas que podem estar associadas a diferentes respostas aos agentes anti-tumorais.

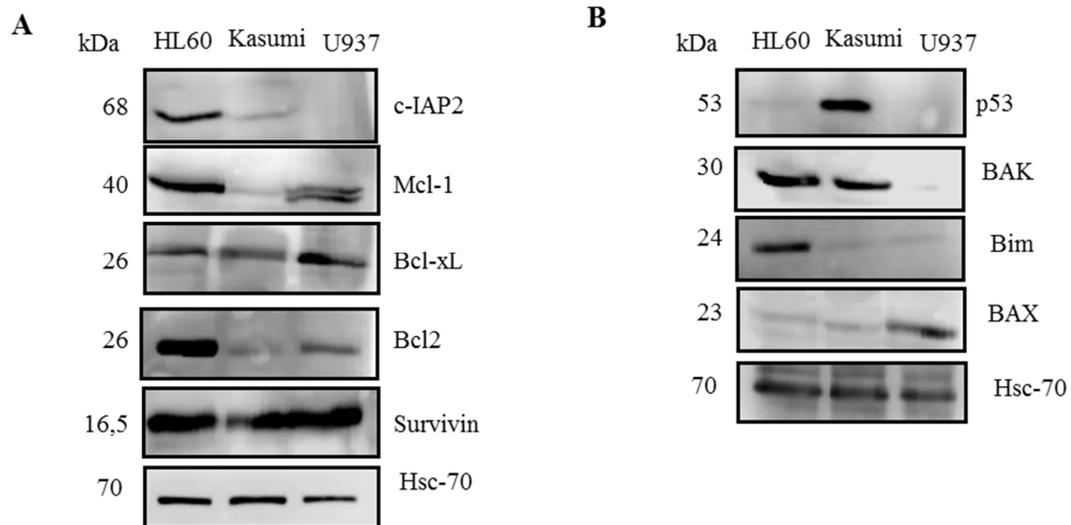


Figura 6.3: Perfil de expressão de proteínas anti e pró-apoptóticas em linhagens celulares de LMA, por Western blotting. As linhagens celulares HL60, Kasumi e U937 expressam diferentemente as proteínas anti-apoptóticas c-IAP2, Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL e Survivina e as proteínas pró-apoptóticas p53, Bak, Bim e Bax. Hsc 70 foi utilizado como um controle endógeno. As figuras são representativas de três experimentos independentes.

6.5 As linhagens de LMA apresentam diferentes perfis de sensibilidade e resistência à inibição da viabilidade celular após tratamento com os quimioterápicos IDA, DNR e Ara-c

Como observado em nossos resultados, as linhagens celulares de LMA são heterogêneas em relação ao padrão citogenético, a expressão e atividade das proteínas transportadoras de efluxo e a expressão das moléculas reguladoras da apoptose. Tais características podem conferir diferentes perfis de sensibilidades ou resistência aos quimioterápicos. Dessa forma, o próximo passo do nosso trabalho, foi avaliar como essas linhagens celulares respondiam ao tratamento com as antraciclinas IDA e DNR e com o Ara-c.

As células foram expostas a uma faixa de concentração dos quimioterápicos que engloba doses equivalentes às empregadas clinicamente: até 1.0 μ M para IDA e DNR e até 7.5 μ M para o Ara-c, bem como doses altas doses (2.5 μ M e 5.0 μ M) para IDA e DNR e até 50 μ M para o Ara-c por 24, 48 e 72 horas e avaliadas pelo ensaio de viabilidade celular por MTT. Como mostrado na Figura 6.4, 6.5 e 6.6, as linhagens apresentaram diferenças de sensibilidade a cada quimioterápico testado. As Figuras 6.4 e 6.5 mostram que a IDA e DNR diminuíram a viabilidade celular ($p < 0.001$) de maneira tempo e dose-dependente nas linhagens HL60, Kasumi e U937 e o Ara-c de maneira tempo-dependente ($p < 0.001$) (Figura 6.6).

O percentual máximo de inibição da viabilidade, atingido com as concentrações equivalentes às empregadas clinicamente, foram de aproximadamente 90% com a IDA para a linhagem HL60 e 70% para as linhagens Kasumi e U937; 80% e 70% com a DNR nas linhagens HL60 e Kasumi respectivamente, e 90% com o Ara-c nas linhagens HL60 e U937 (Figura 6.4, 6.5 e 6.6). A linhagem U937 foi a mais resistente a DNR com uma inibição máxima de 40% em 72h, assim como a linhagem Kasumi a mais resistente ao Ara-c com uma

inibição máxima de viabilidade de 40% após tratamento em 72h com baixas ou altas doses (Figura 6.6 e 6.6). Nossos dados mostram que a IDA, DNR e Ara-c são capazes de diminuir a viabilidade celular das linhagens de LMA, no entanto, algumas linhagens mostraram-se mais resistentes que outras após tratamento com os quimioterápicos empregados na clínica.

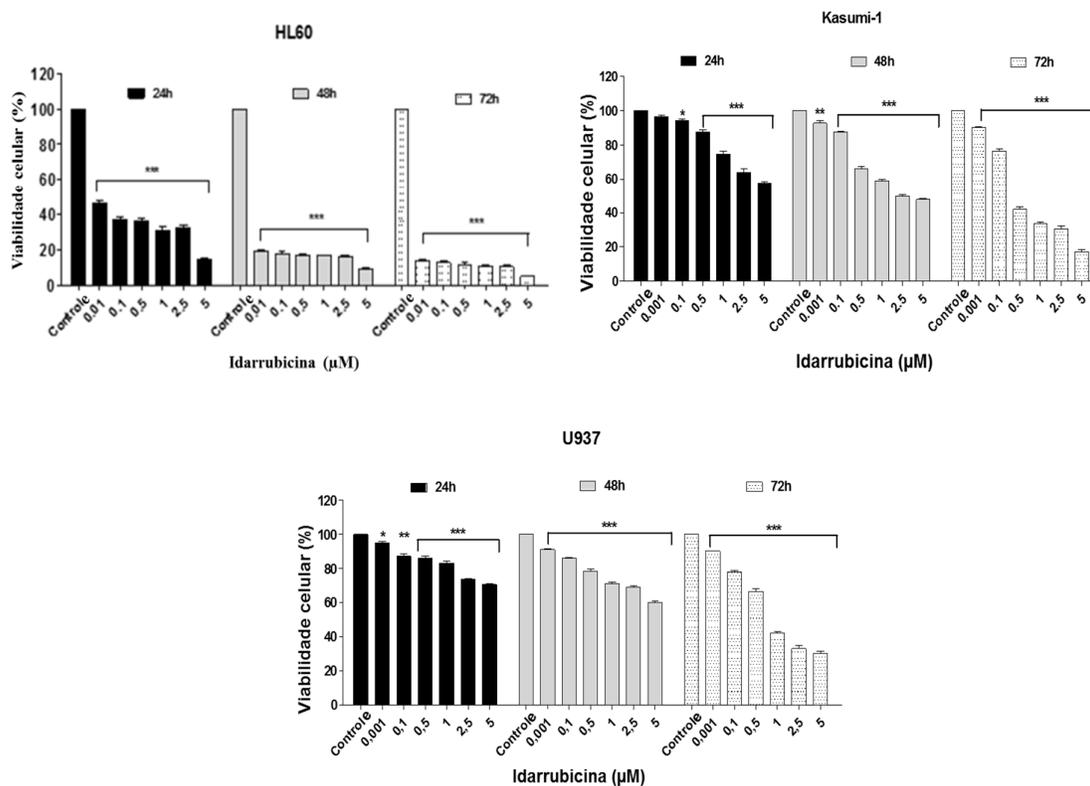


Figura 6.4: Perfil de sensibilidade das linhagens de leucemia mieloide aguda ao tratamento com concentrações crescentes de Idarrubicina (IDA) por 24, 48 e 72 horas, analisado pelo ensaio de MTT. As linhagens celulares foram tratadas com doses crescentes de IDA (0.001-5.0µM). Os resultados estão expressos através da média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0.001$, Teste ANOVA, seguido do pós-teste Bonferroni.

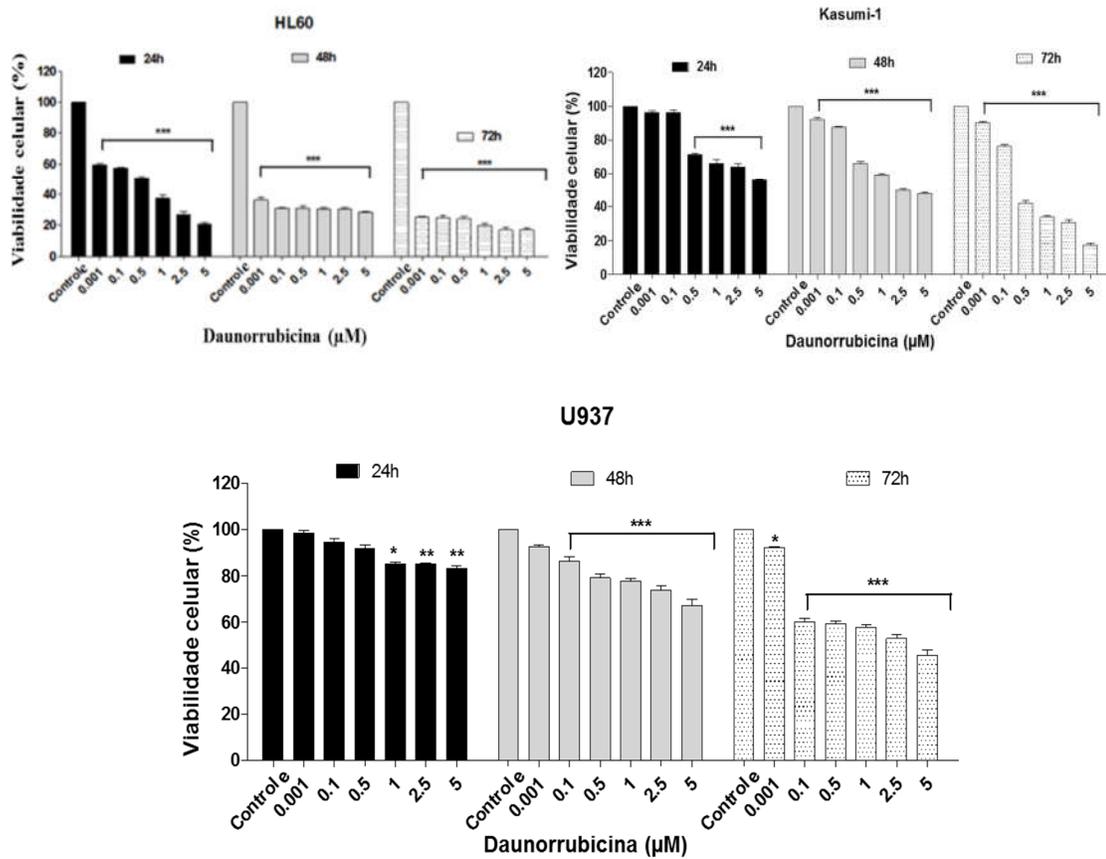


Figura 6.5: Perfil de sensibilidade das linhagens de leucemia mielóide aguda ao tratamento com concentrações crescentes de Daunorubicina (DNR) por 24, 48 e 72 horas, analisado pelo ensaio de MTT. As linhagens celulares foram tratadas com doses crescentes de DNR (0.001-5.0µM). Os resultados estão expressos através da média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0.001$, Teste ANOVA, seguido do pós-teste Bonferroni.

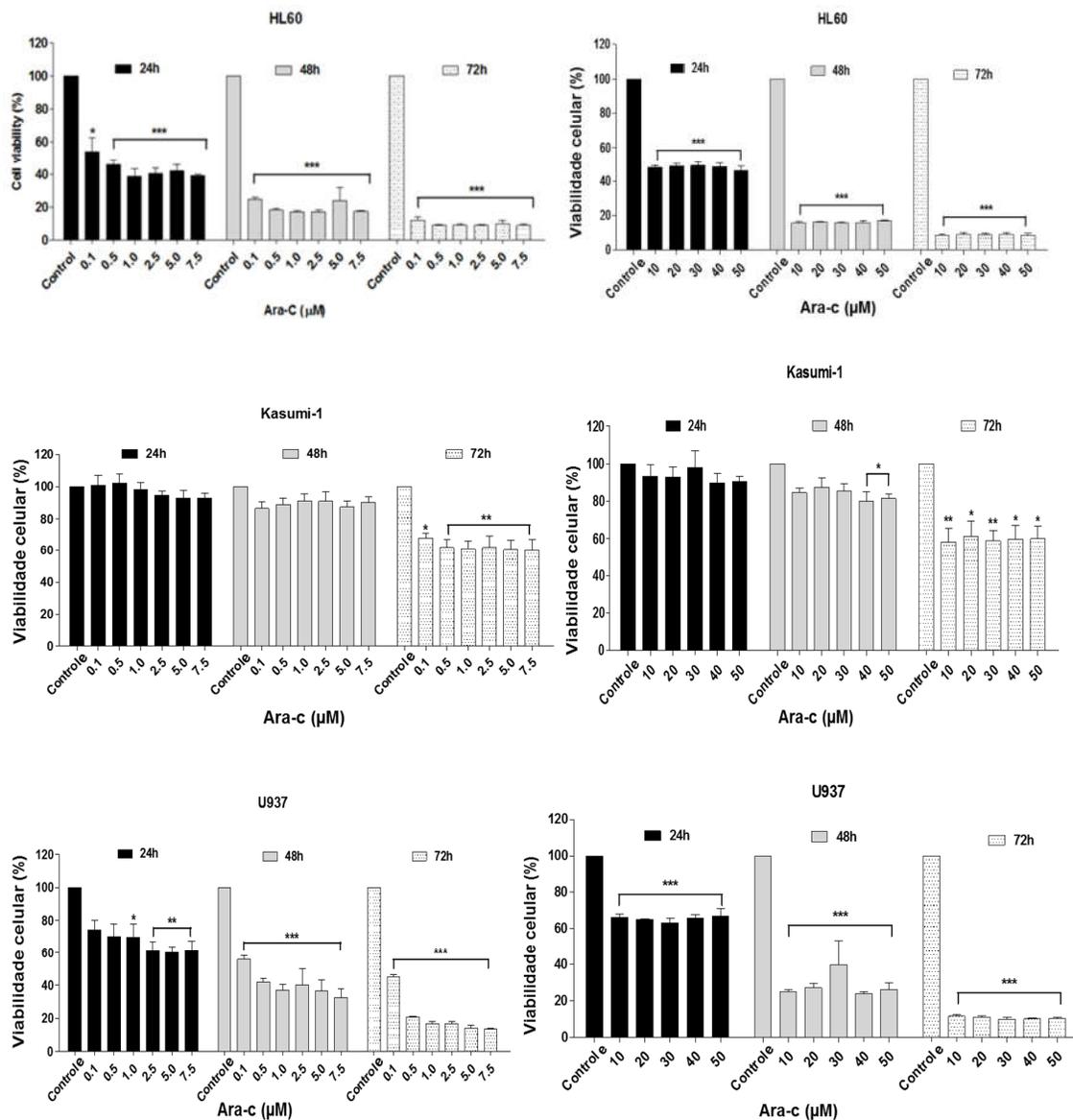


Figura 6.6: Perfil de sensibilidade das linhagens de leucemia mielóide aguda ao tratamento com concentrações crescentes com citarabina (Ara-c) por 24, 48 e 72 horas, analisado pelo ensaio de MTT. As linhagens celulares foram tratadas com doses crescentes de Ara-c (0.01-7.5 μM) e Ara-c em altas doses (10-50 μM). Os resultados estão expressos através da média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0.001$, Teste ANOVA, seguido do pós-teste Bonferroni.

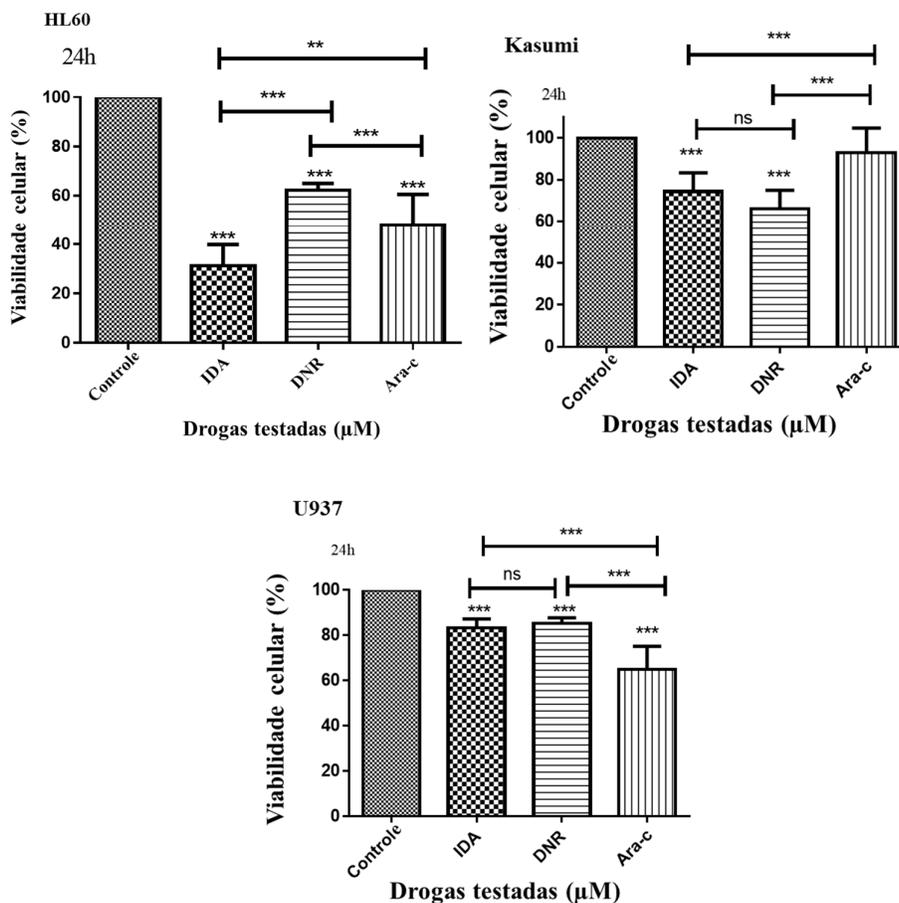


Figura 6.7: Perfil de sensibilidade das linhagens de leucemia mielóide aguda ao tratamento com as antraciclinas, Idarrubicina (IDA) e Daunorrubicina (DNR), e com a citarabina (Ara-c) por 24 horas, analisado pelo ensaio de MTT. As linhagens celulares foram tratadas com as doses máximas equivalentes as utilizadas na clínica, 1.0 μM para IDA e DNR e 7.5μM para o Ara-c por 24h e comparadas em relação a sua efetividade. Os resultados estão expressos através da média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0.001$, ns: Sem significância estatística. Teste ANOVA, seguido do pós-teste Turkey.

Os nossos resultados em relação à inibição da viabilidade pela IDA ou DNR foram muito semelhantes nas linhagens Kasumi e U937, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre elas (Figura 6.7). A antraciclina IDA mostrou-se ser mais eficiente em reduzir a viabilidade celular na linhagem HL60 e o Ara-c para a linhagem U937.

6.6 As antraciclinas e o Ara-c induzem fragmentação do DNA nas linhagens de LMA

A diminuição da viabilidade celular, observada após o tratamento das células com as antraciclinas e o Ara-c, pode ser devido à morte celular ou à inibição do crescimento celular. Dessa forma, a morte celular foi examinada através da avaliação da fragmentação do DNA. As Figuras 6.8, 6.9, 6.10 e 6.11 mostram que as antraciclinas e o Ara-c foram capazes de induzir fragmentação no DNA em 24 horas nas linhagens de LMA ($p < 0.001$), como avaliado pelo o aumento do percentual de células na fase sub-G0/G1. Esses resultados sugerem que as antraciclinas e o Ara-c induzem morte celular nas linhagens HL60, Kasumi e U937.

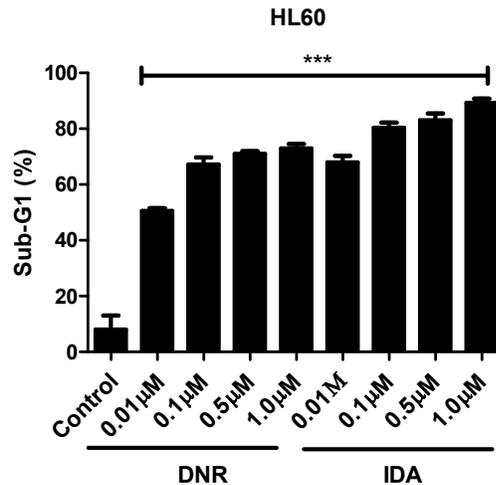
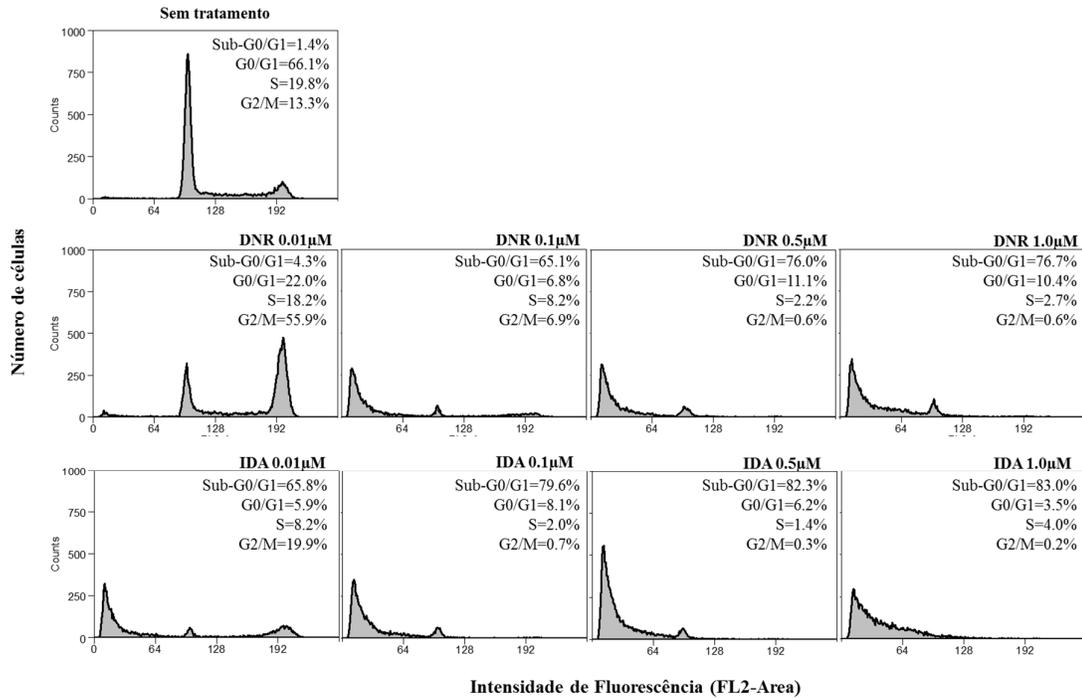


Figura 6.8: Indução de morte celular pela Idarrubicina (IDA) e Daunorrubicina (DNR) na linhagem celular HL60 pela análise da população em sub-G0/G1, por citometria de fluxo. A linhagem HL60 foi exposta a concentrações crescentes de IDA e DNR (0.01; 0.1; 0.5 e 1.0 μ M) por 24h e teve seu conteúdo de DNA avaliado. Os histogramas são representativos de três experimentos independentes. *** $p < 0.001$, Teste ANOVA, seguido do pós-teste Bonferroni.

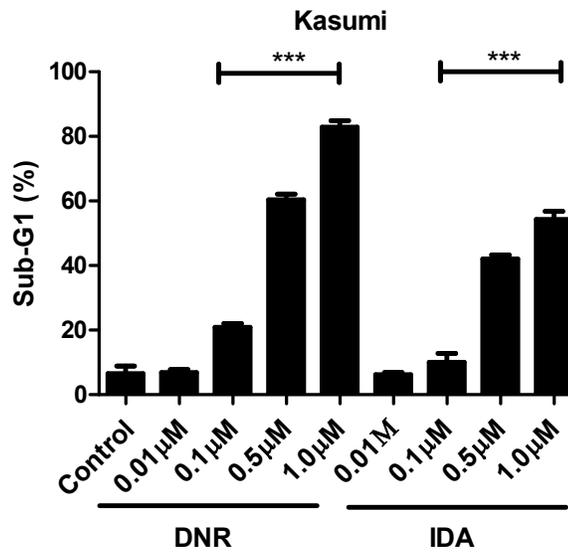
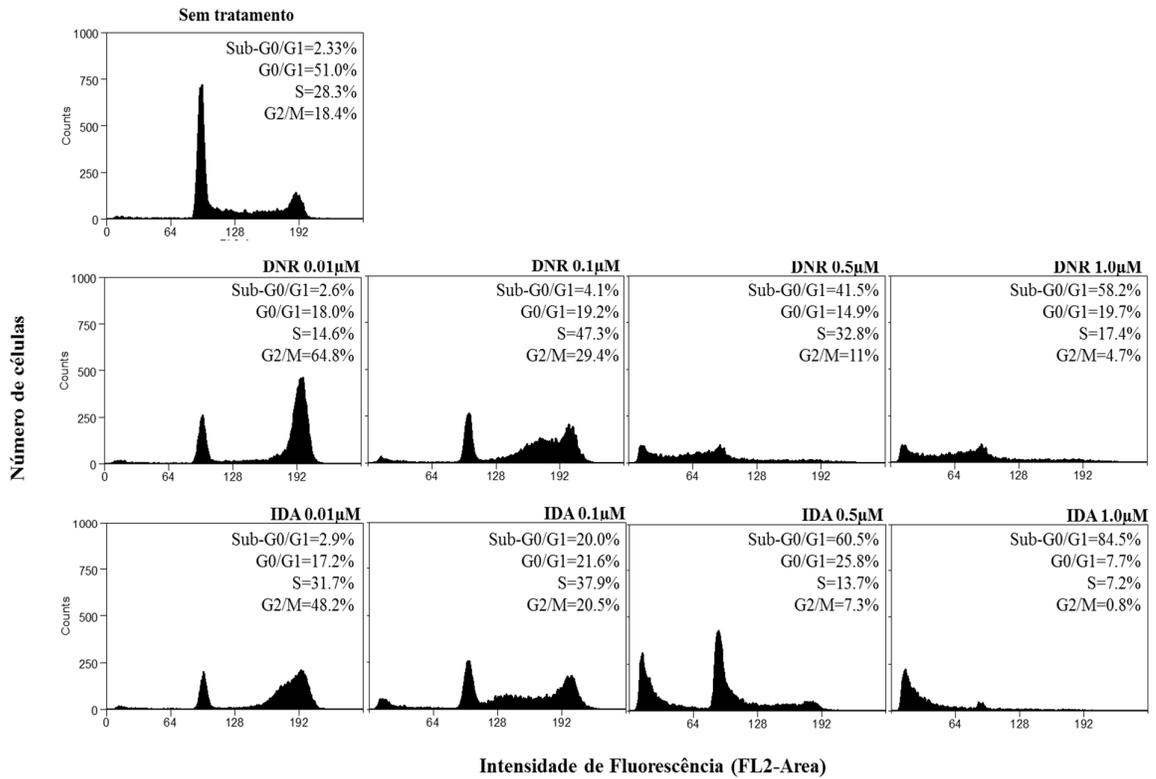


Figura 6.9: Indução de morte celular pela Idarrubicina (IDA) e Daunorrubicina (DNR) na linhagem celular Kasumi pela análise da população em sub-G0/G1, por citometria de fluxo. A linhagem Kasumi foi exposta a concentrações crescentes de IDA e DNR (0.01; 0.1; 0.5 e 1.0 μM) por 24h e teve seu conteúdo de DNA avaliado. Os histogramas são

representativos de três experimentos independentes. *** $p < 0.001$, Teste ANOVA, seguido do pós-teste Bonferroni.

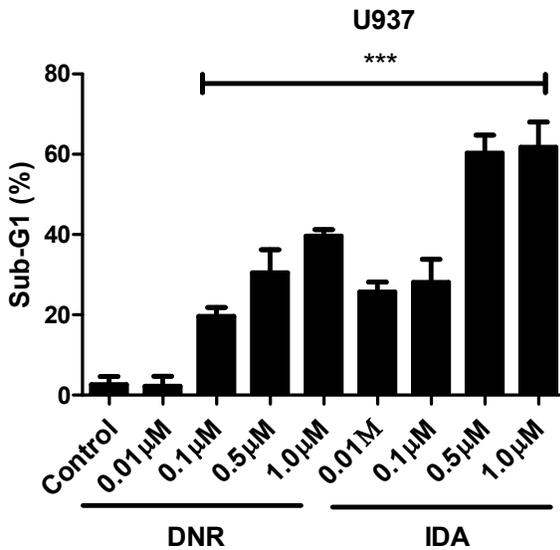
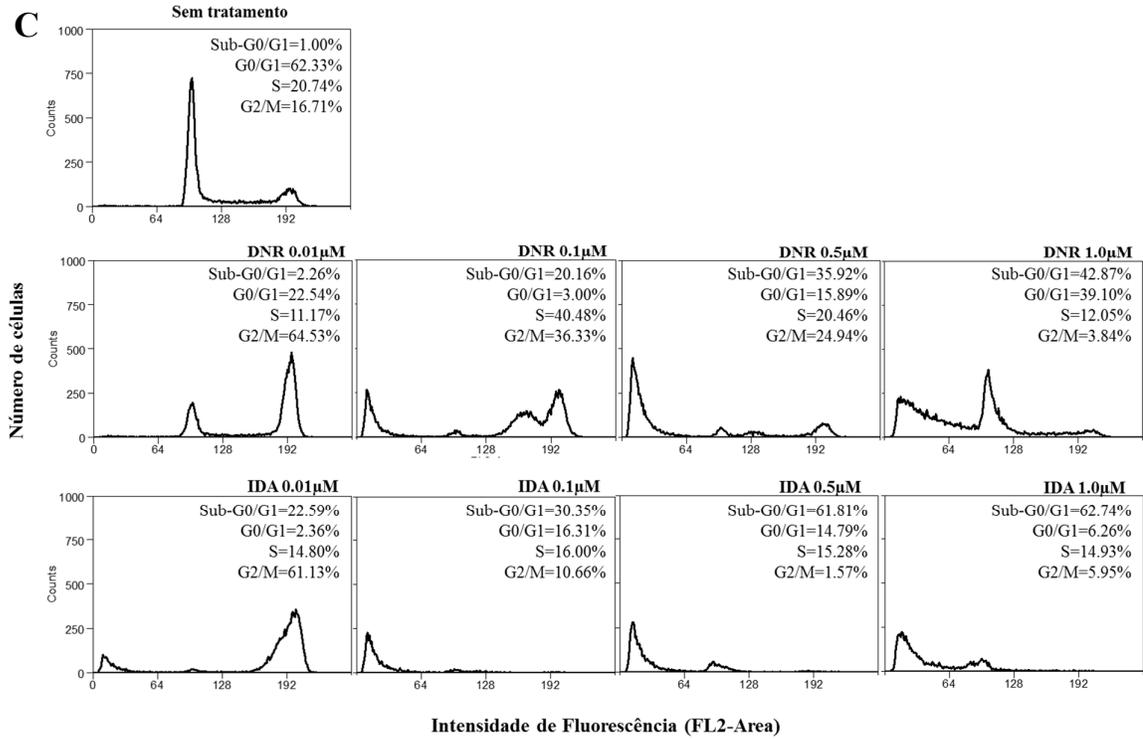


Figura 6.10: Indução de morte celular pela Idarrubicina (IDA) e Daunorrubicina (DNR) na linhagem celular U937 pela análise da população em sub-G0/G1, por citometria de

fluxo. A linhagem U937 foi exposta a concentrações crescentes de IDA e DNR (0.01; 0.1; 0.5 e 1.0 μ M) por 24h e teve seu conteúdo de DNA avaliado. Os histogramas são representativos de três experimentos independentes. *** p <0.001, Teste ANOVA, seguido do pós-teste Bonferroni.

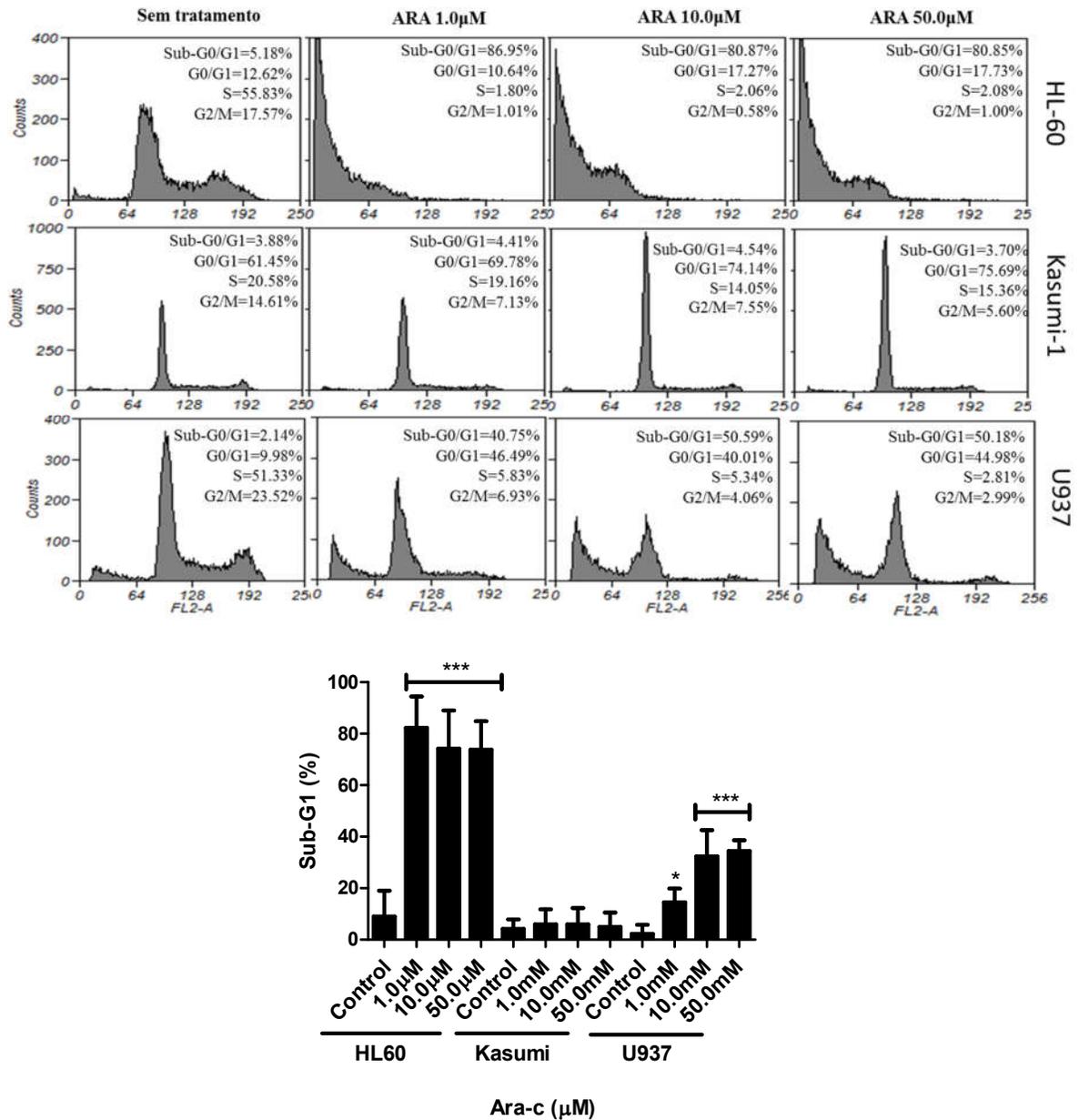


Figura 6.11: Indução de morte celular pela citarabina (Ara-c) nas linhagens celulares de leucemia mieloide aguda pela análise da população em sub-G0/G1, por citometria de fluxo. As linhagens HL60, Kasumi e U937 foram expostas a concentrações crescentes de Ara-c (1.0; 10.0 e 50.0 μ M) por 24h e tiveram seus conteúdos de DNA avaliados para análise

da população em sub-G0/G1. Os histogramas são representativos de três experimentos independentes. *** $p < 0.001$, Teste Anova, seguido do pós-teste Bonferroni.

6.7 As antraciclinas e o Ara-c induzem apoptose nas linhagens celulares de LMA

As antraciclinas são drogas fluorescentes, o que impede a realização de ensaios de indução de apoptose com anexina V, por citometria de fluxo. Dessa forma, avaliamos a indução de células marcadas com anexina V nas linhagens de LMA após tratamento, apenas com Ara-c por 24 horas (Figura 6.12). Em comparação aos controles, o Ara-c induziu aproximadamente 40% de células marcadas com anexina V após 24 horas de incubação nas linhagens HL60 ($p < 0.01$) e U937 ($p < 0.001$). O Ara-c não induziu marcação por Anexina V na linhagem Kasumi, corroborando os dados do MTT. Células marcadas com Anexina V são um indicativo de apoptose (WLODKOWIC; SKOMMER; DARZYNKIEWICZ, 2012).

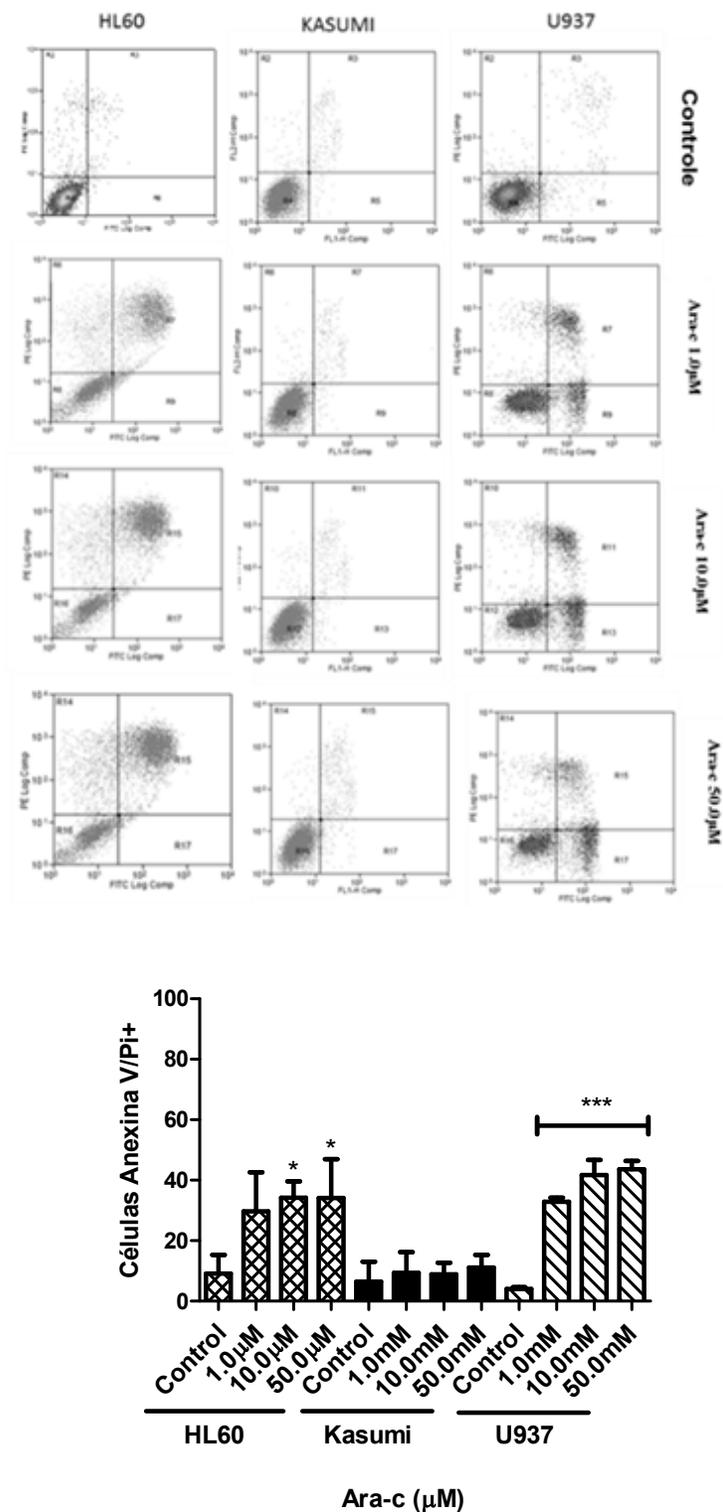


Figura 6.12: Indução de morte celular pela citarabina (Ara-c) nas linhagens de leucemia mieloide aguda pela detecção de apoptose induzida pelo ensaio de Anexina V, por citometria de fluxo. As linhagens HL60, Kasumi e U937 foram expostas a concentrações

crescentes de Ara-c (1.0; 10.0 e 50.0 μ M) por 24h e foram avaliadas para detecção de apoptose com Anexina V e iodeto de propídeo. Os histogramas são representativos de três experimentos independentes. *** $p < 0.001$, Teste ANOVA, seguido do pós-teste Bonferroni.

Para investigar se a morte induzida pela antraciclina e pelo Ara-c era mediante apoptose dependente de caspase 3, avaliamos a expressão de caspase 3 clivada por citometria de fluxo. As Figuras 6.13 e 6.14 mostram que, após o tratamento com concentrações crescentes de IDA, DNR e Ara-c por 24 horas, houve aumento da expressão de caspase-3 clivada em todas as linhagens de LMA, mas em menor proporção na linhagem Kasumi com todos os quimioterápicos, nas concentrações testadas. Devido ao fato das antraciclina serem fluorescentes, a concentração máxima que permitiu a utilização deste ensaio foi de 0.1 μ M. Esses resultados indicam que as antraciclina e o Ara-c induzem apoptose mediada por caspases em todas as linhagens celulares de LMA testadas.

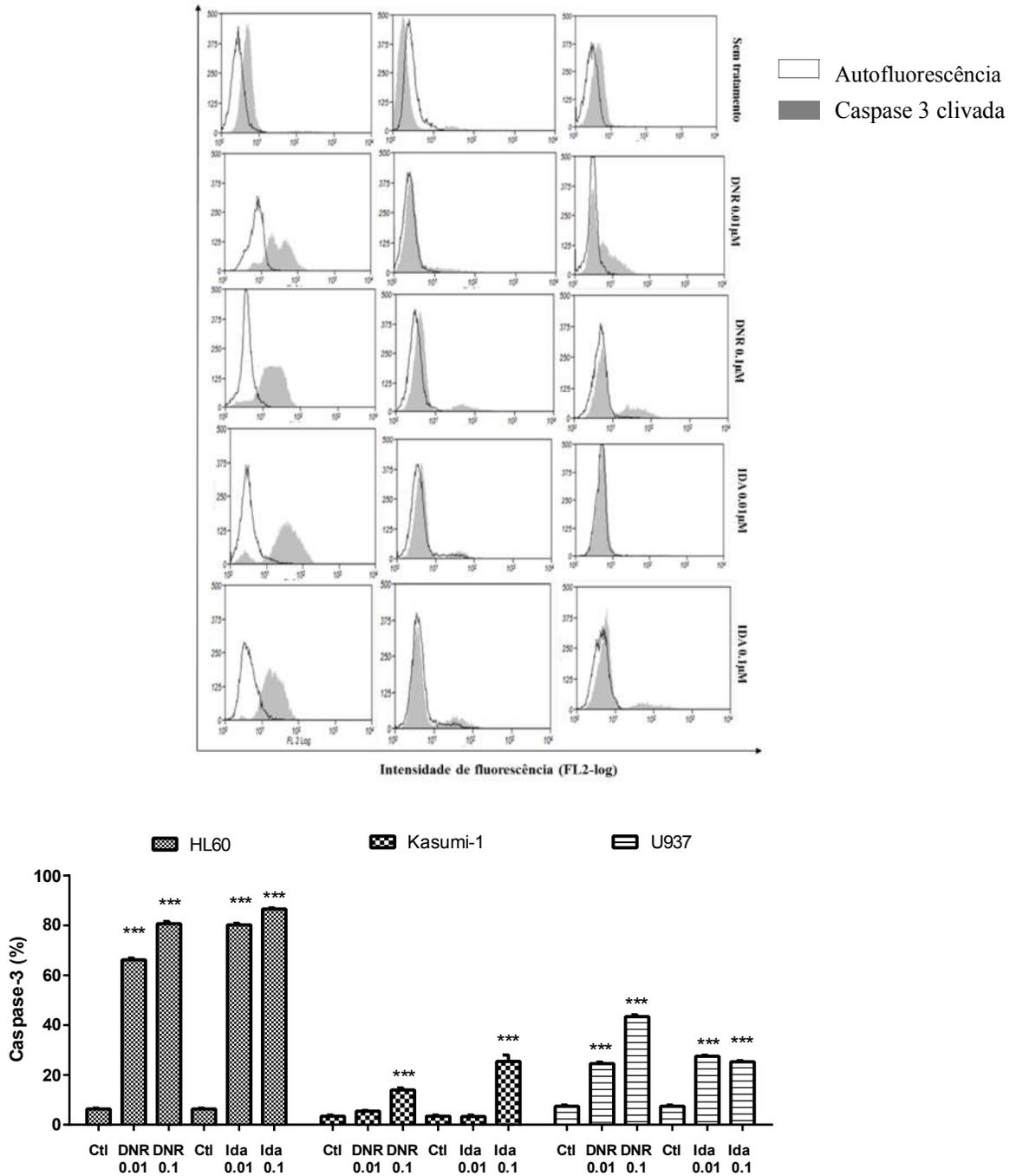


Figura 6.13: Indução de apoptose pelas antraciclinas pela avaliação dos níveis de caspase-3 clivada nas linhagens de leucemia miélóide aguda, por citometria de fluxo. As células foram expostas a duas concentrações de Idarrubicina (IDA) e Daunorrubicina (DNR) (0.01 e 0.1 μM) por 24h. Concentrações maiores de IDA ou DNR não foram testadas devido a fluorescência das drogas. As figuras são representativas de três experimentos independentes. *** $p < 0.001$, Teste ANOVA, seguido do pós-teste Bonferroni.

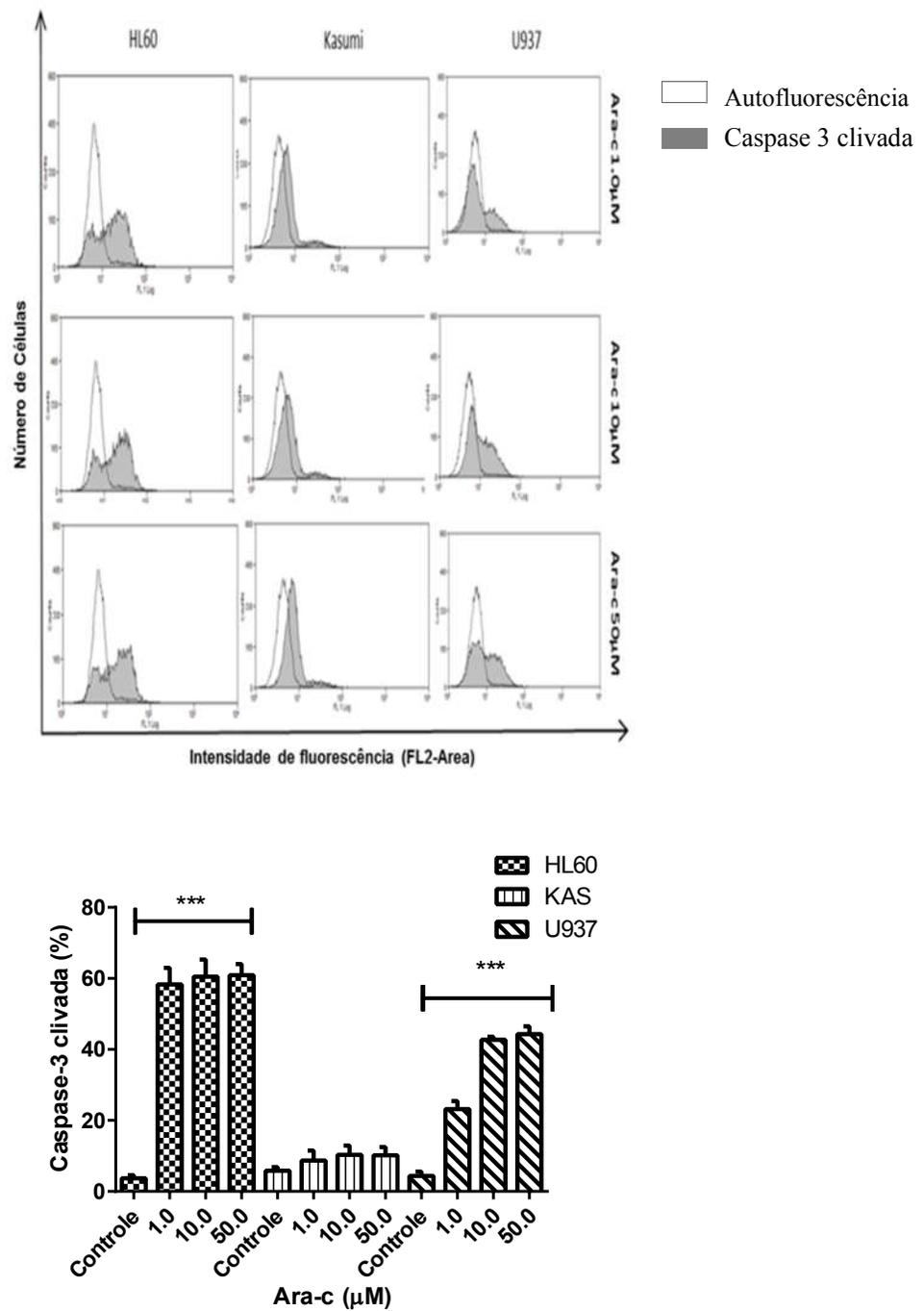


Figura 6.14: Indução de apoptose pelo Ara-c pela avaliação dos níveis de caspase-3 clivada nas linhagens de LMA, por citometria de fluxo. As células foram expostas a concentrações crescentes de Ara-c (1.0; 10.0 e 50 μM) por 24h. As figuras são representativas de três experimentos independentes. *** $p < 0.001$, Teste ANOVA, seguido do pós-teste Bonferroni.

6.8 A exposição das células as antraciclina aumenta a fosforilação de JNK e p38 em linhagens de LMA.

As MAPKs JNK e p38 são fosforiladas e conseqüentemente ativadas após a exposição das células a estímulos de estresse, como quimioterápicos e radiação ionizante (CARGNELLO; ROUX, 2011). Em leucemias agudas, estudos examinando as mudanças da atividade de JNK em linhagens de LMA mostraram uma associação temporal entre a apoptose induzida pelas antraciclina e a ativação de JNK (LAURENT; JAFFRÉZOU, 2001; MANSAT-DE MAS et al., 1999; ROSATO et al., 2012). Também foi observado que a diminuição da atividade de JNK está associada à resistência a quimioterapia na LMA (CRIPE et al., 2002). Em relação à p38, sua ativação reverte o fenótipo de resistência a DOX da linhagem AML-2/DX100 (CHOI et al., 2007). A partir destas evidências, verificamos se as antraciclina IDA e DNR induzem a fosforilação das MAPKs JNK e p38 nas linhagens de LMA (Figura 6.15 e 6.16). A IDA e a DNR induziram a fosforilação e conseqüentemente a ativação de JNK e p38 nas linhagens de LMA, como descrito na literatura; no entanto em tempos diferentes. Observamos que a IDA e a DNR induziram a fosforilação de JNK a partir de 5 minutos de incubação com os quimioterápicos na linhagem HL60 e a partir de 30 e 60 minutos para a linhagem U937, respectivamente (Figura 6.15). Em relação a p38, a IDA e a DNR induziram a fosforilação de p38 a partir de 5 e 15 minutos na linhagem HL60, 30 minutos na linhagem Kasumi para ambos os quimioterápicos e 60 e 15 minutos para a linhagem U937, respectivamente (Figura 6.16).

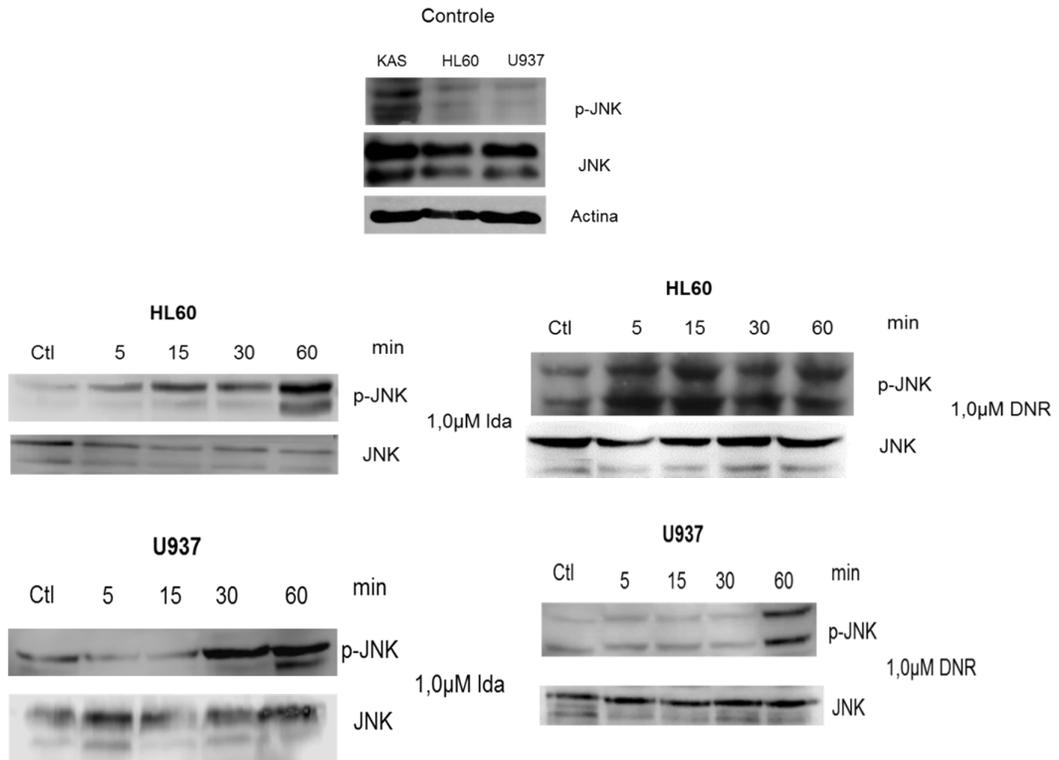


Figura 6.15: Cinética de indução de fosforilação de JNK pelas antraciclinas em linhagens de leucemia mielóide aguda, por Western blotting Os blots mostram a indução de fosforilação de JNK após o tratamento com as antraciclinas IDA e DNR nas linhagens HL60 e U937. As células foram expostas a maior concentração equivalente a utilizada na clínica ($1.0\mu\text{M}$) tanto para a IDA quanto para a DNR por 5, 15, 30 e 60 minutos. As figuras são representativas de três experimentos independentes. p-JNK: JNK fosforilado e JNK: JNK total.

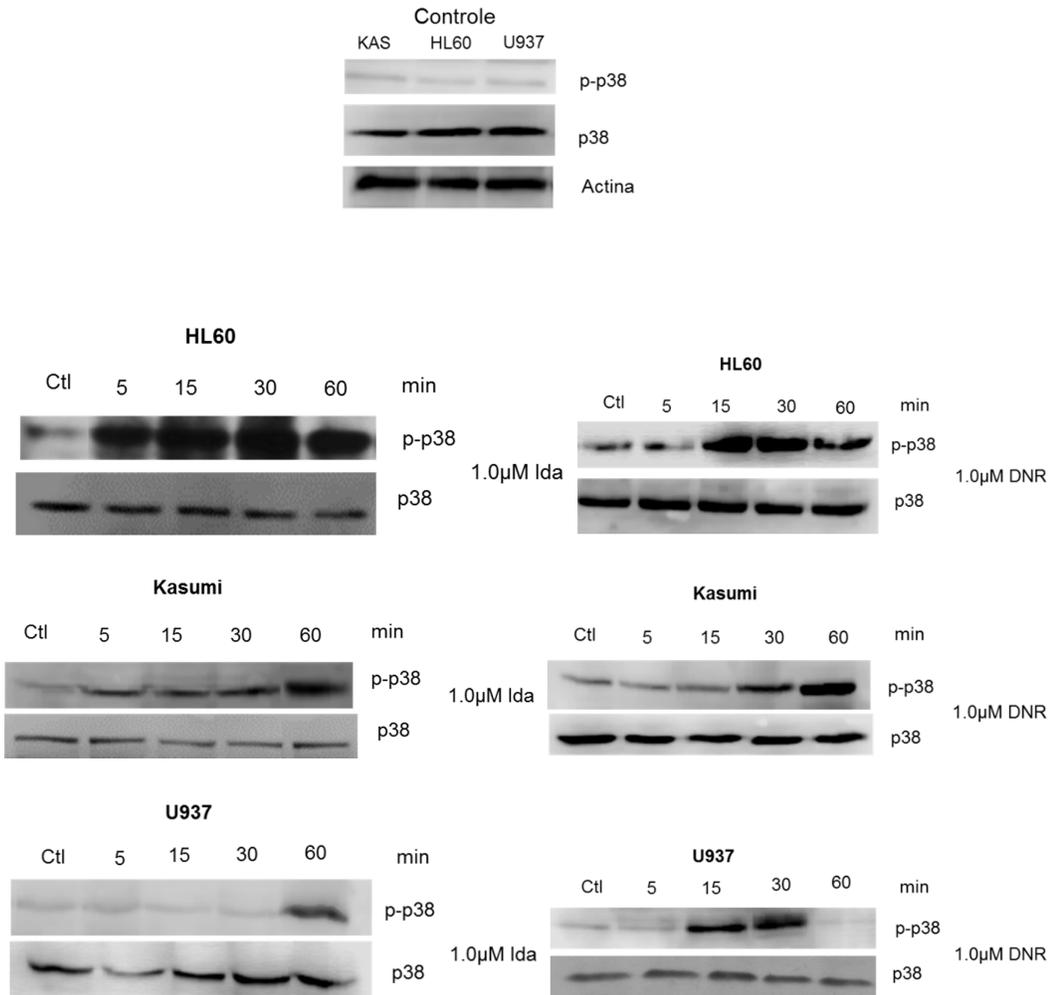


Figura 6.16: Cinética de indução de fosforilação de p38 pelas antraciclinas em linhagens de LMA por Western blotting. Os blots mostram a indução de fosforilação de JNK após o tratamento com as antraciclinas IDA e DNR nas linhagens HL60 e U937. As células foram expostas a maior concentração equivalente a utilizada na clínica (1.0 μ M) tanto para a IDA quanto para a DNR por 5, 15, 30 e 60 minutos. As figuras são representativas de três experimentos independentes. p-JNK: JNK fosforilado e JNK: JNK total.

6.9 A exposição das células ao Ara-c aumenta a fosforilação de JNK e p38 em linhagens de LMA.

Sampath e colaboradores em 2006, após a análise das amostras de pacientes com LMA no primeiro dia de tratamento com Ara-c encontraram uma associação entre a ativação de JNK e a resposta ao tratamento (SAMPATH et al., 2006). Além disso, este estudo sugeriu um provável papel da ativação de JNK como um indicador de resposta à quimioterapia em pacientes com LMA, não sendo, portanto, restrita as antraciclinas. Outro estudo também relatou que o Ara-c induziu a fosforilação tanto de JNK quanto de p38 e mostrou que a inibição de p38 reduziu a fragmentação do DNA e os níveis de caspase 3 clivada induzidos pelo tratamento com o Ara-c (STADHEIM; SALUTA; KUCERA, 2000). A partir desses relatos, analisamos se o Ara-c também induziria a ativação por fosforilação das MAPKs JNK e p38 nas linhagens de LMA. Verificamos que o Ara-c induziu a fosforilação de JNK e p38 a partir de 5 minutos e 15 minutos na linhagem HL60, respectivamente, e a partir de 60 minutos na linhagem U937 tanto para JNK quanto para p38. Na linhagem Kasumi a fosforilação de p38 inicia-se a partir de 60 minutos (Figura 6.17).

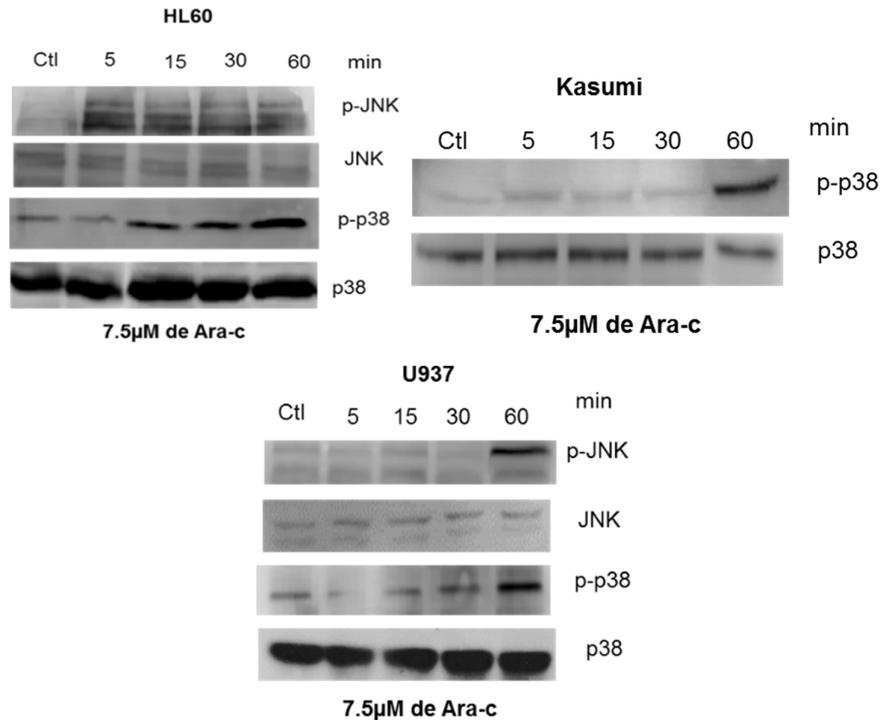


Figura 6.17: Cinética de indução de fosforilação de JNK e p38 pela citarabina (Ara-c) em linhagens de leucemia mieloide aguda, por Western blotting. Os blots mostram a indução de fosforilação de JNK e p38 após o tratamento com o Ara-c nas linhagens HL60, Kasumi e U937. As células foram expostas a maior concentração equivalente a utilizadas na clínica ($7.5\mu\text{M}$) para o Ara-c por 5, 15, 30 e 60 minutos. As figuras são representativas de três experimentos independentes.

6.10 A DNR e o Ara-c não induzem a fosforilação de JNK e p38 nas linhagens de LMA resistentes nos tempos e concentrações testadas.

Em seguida, analisamos se os quimioterápicos DNR e Ara-c induzem fosforilação de JNK e p38 nas linhagens resistentes HL60R e U937R, uma vez que o *array* de proteínas fosforiladas evidenciou a diminuição da fosforilação destas proteínas na linhagem HL60R (resultado no próximo tópico). Estudos mostraram que fibroblastos de camundongos *knockout* para JNK são resistentes a apoptose induzida por vários estímulos, sugerindo que a ativação de JNK é essencial para a apoptose induzida por estresse (TOURNIER et al., 2000). Linhagens celulares e camundongos *knockout* para p38 apresentaram aumento da

transformação celular (BULAVIN; FORNACE, 2004). Nossos resultados mostraram que tanto a DNR quanto o Ara-c não induzem a fosforilação de JNK e p38 nas linhagens de LMA resistentes, nos mesmos tempos de incubação os quais foi verificado para as linhagens HL60 e U937 sensíveis, e tampouco em tempos tardios (Figura 6.18).

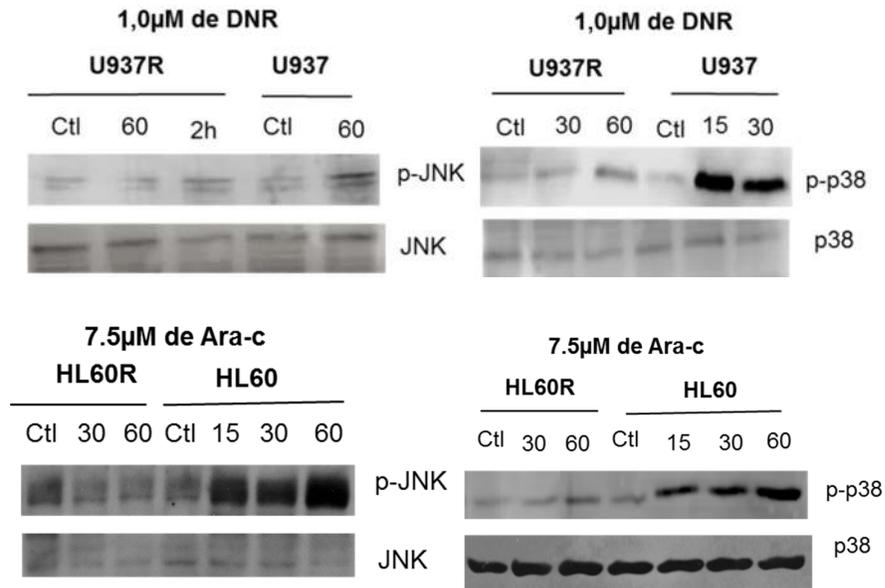


Figura 6.18: Cinética de indução de fosforilação de JNK e p38 pela Daunorrubicina (DNR) e pela citarabina (Ara-c) nas linhagens de LMA resistentes, por Western blotting. Os blots mostram a indução de fosforilação de JNK e p38 após o tratamento com o Ara-c na linhagem HL60R e com DNR na linhagem U937R. As células foram expostas a maior concentração equivalente a utilizadas na clínica (1.0 μM) para DNR e (7.5 μM) para o Ara-c por 15, 30, 60 minutos e 2 horas. As células foram incubadas por 30 ou 60 minutos a mais do tempo utilizado para obtenção do mesmo resultado com as linhagens HL60 e U937. As figuras são representativas de três experimentos independentes.

6.11 Alterações no perfil de expressão de diversas proteínas fosforiladas na linhagem resistente ao Ara-c.

De modo a investigar as bases moleculares da resistência ao Ara-c em LMA, comparamos as linhagens HL60 e HL60R em um painel com 45 proteínas fosforiladas, que representam importantes vias de sinalização envolvidas no processo de proliferação celular e

evasão da apoptose. O perfil de fosforilação de quinases obtido comparando as linhagens HL60 e HL60R é apresentado na Figura 6.19. Os níveis de fosforilação basal das MAPKs JNK e p38 encontravam-se diminuídos na HL60R em relação a HL60, corroborando os dados encontrados com a cinética de indução de fosforilação (Figura 6.20).

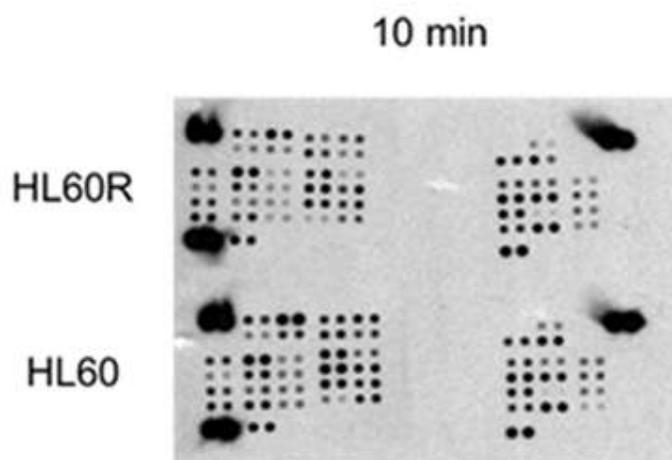


Figura 6.19: Perfil de fosforilação de quinases das linhagens de leucemia mielóide aguda. Da esquerda para a direita é mostrado o perfil de fosforilação das quinases obtido a partir das células HL60 e HL60R sem tratamento após 10 minutos de exposição utilizando o Human phospho-kinase array.

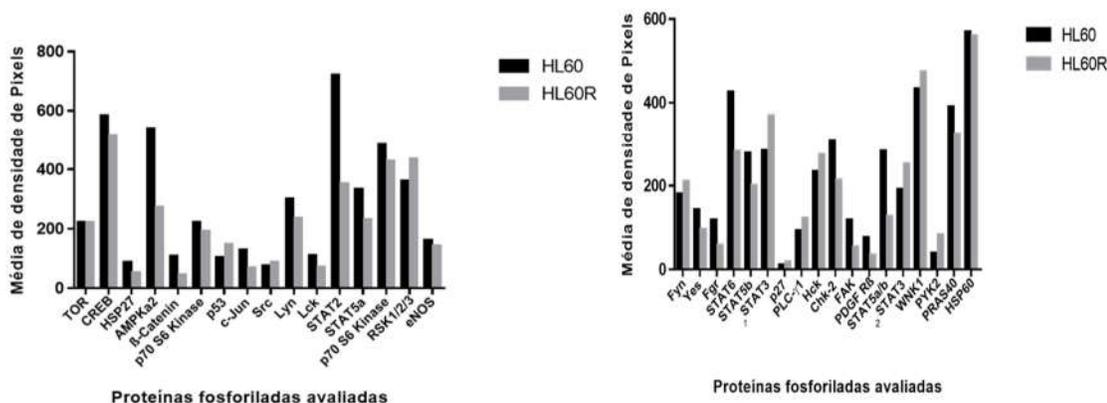
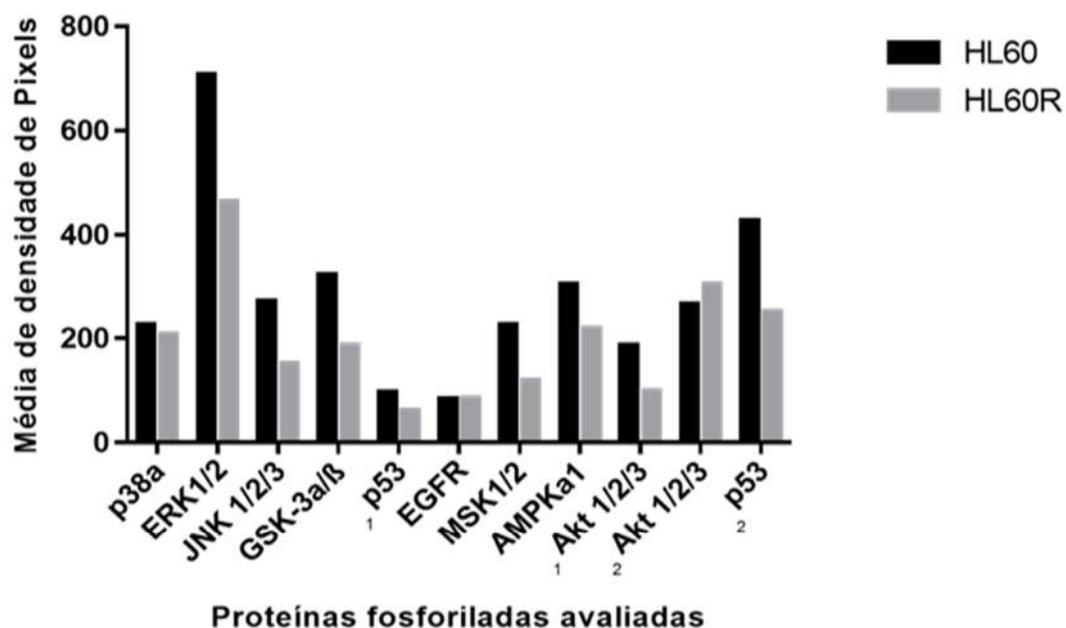


Figura 6.20: Resultados do perfil de fosforilação das quinases comparando as linhagens de leucemia mieloide aguda, HL60 e HL60R. Os valores são mostrados em unidades de acordo com a densidade dos pixels. Akt1 fosforilação na S473, Akt2 fosforilação na T308, p531 fosforilação na S392, p532 fosforilação na S46, p533 fosforilação na S15, STAT31 fosforilação na Y705 e STAT32 fosforilação na S727.

6.12 O silenciamento da expressão de JNK e p38, por siRNA, aumenta a resistência à morte celular induzida pelas antraciclinas e pelo Ara-c

A despeito das evidências científicas da participação de JNK e/ou p38 no processo do desenvolvimento da resistência aos quimioterápicos, ainda permanece controverso se a ativação dessas moléculas se constitui em uma etapa importante para a apoptose induzida pelas antraciclinas e pela citarabina na LMA e o seu papel na resistência. Desta forma, nosso próximo objetivo foi verificar se a expressão de JNK ou p38 poderia ser relacionada com a resistência ao tratamento com as antraciclinas IDA, DNR ou com o Ara-c.

Inicialmente, nós realizamos uma cinética a partir de 48h (de acordo com o protocolo do fabricante) a fim de avaliar a eficiência do silenciamento da expressão de JNK e p38 utilizando o reagente Lipofectamina 2000. A observação dos blots (Figura 6.21 e 6.22) permite afirmar que a expressão de JNK ou p38 foi silenciada parcialmente nas células da linhagem U937 e Kasumi, apenas após 72h de transfecção.

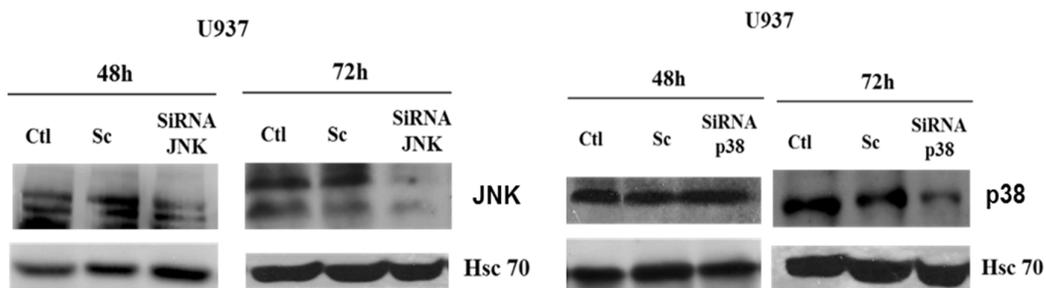


Figura 6.21: Cinética do silenciamento da expressão de JNK e p38 nas células U937 utilizando o RNA de interferência. As células foram transfectadas com o siRNA controle (*Scramble*; Sc) e com o siRNA para JNK ou p38, utilizando o reagente Lipofectamina 2000. Os níveis de Hsc 70 foram utilizados como controle. Ctl: Células não transfectadas; Sc: Células transfectadas com o *scramble*. As figuras são representativas de três experimentos independentes.

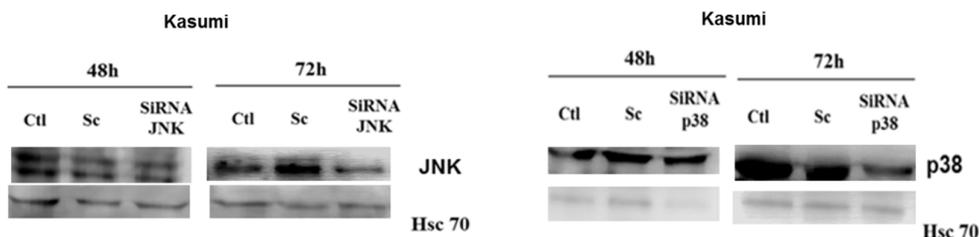
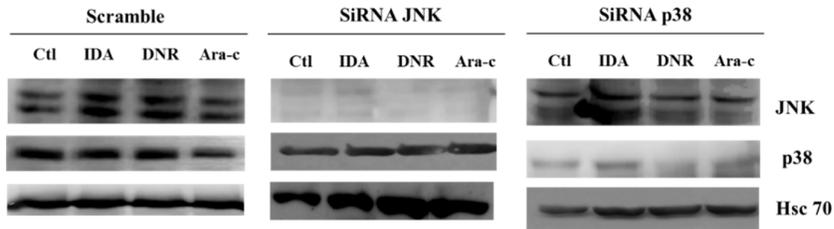


Figura 6.22: Cinética do silenciamento da expressão de JNK e p38 nas células Kasumi utilizando o RNA de interferência. As células foram transfectadas com o siRNA controle (Scramble; Sc) e com o siRNA para JNK ou p38, utilizando o reagente Lipofectamina 2000. Os níveis de Hsc 70 foram utilizados como controle. Ctl: Células não transfectadas; Sc: Células transfectadas com o scramble. As figuras são representativas de três experimentos independentes.

Após avaliação da eficiência de silenciamento da expressão das proteínas JNK e p38, nós tratamos as células transfectadas com o *scramble* (controle), com o siRNA para JNK ou p38 com as antraciclínas IDA, DNR ou Ara-c nas concentrações semelhantes as utilizadas na clínica para IDA (1.0 μ M), DNR (1.0 μ M) ou Ara-c (7.5 μ M) por 24h. Em seguida, comparamos seus perfis de sensibilidade à morte celular induzida pelos quimioterápicos. Mediante o silenciamento da expressão de JNK e p38, observado em até 96h (Figura 6.23A e 6.24A), observamos que houve diferença na sensibilidade às antraciclínas IDA, DNR e Ara-c entre as células transfectadas com o *scramble* e com os siRNAs para JNK e p38 para as linhagens U937 e Kasumi. Os valores percentuais referentes à indução de fragmentação de DNA podem ser visualizados nas Figuras 6.23B e 6.24B. Esses achados indicam que a inibição de JNK e p38 diminui a indução de fragmentação nas linhagens Kasumi e U937 com o tratamento com IDA e DNR e sugerem que a expressão dessas proteínas desempenha um papel na resistência aos quimioterápicos (Figura 6.25). A linhagem HL60 apresentou baixa eficiência de silenciamento de JNK e p38 e conseqüentemente nenhuma alteração nas taxas de indução de morte celular.

A



B

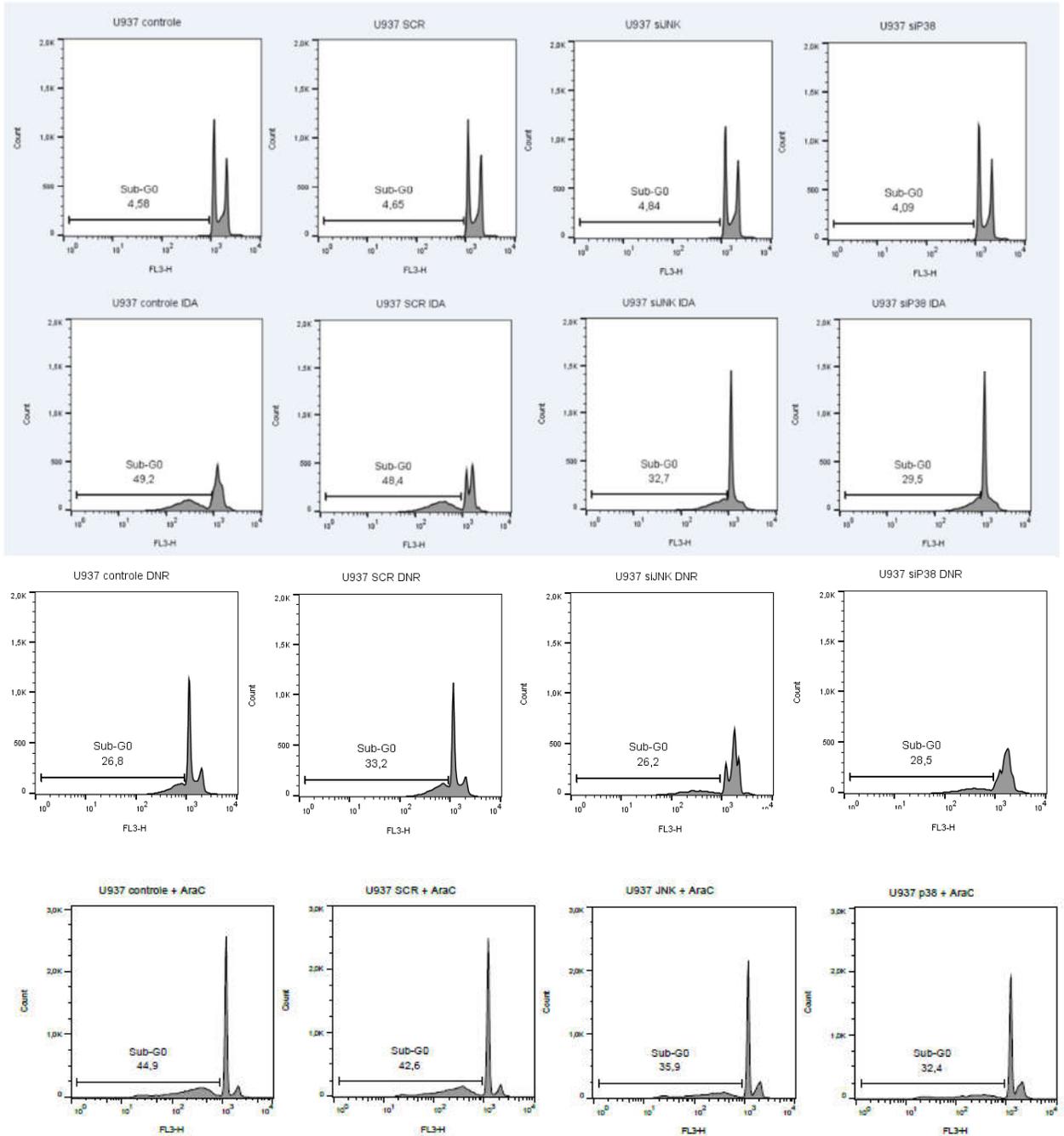
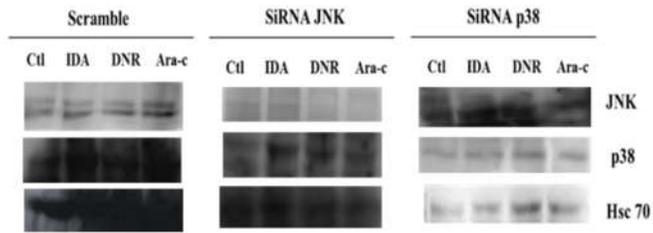


Figura 6.23: Efeito do silenciamento da expressão de JNK ou p38 na indução de resistência ao tratamento com Idarrubicina (IDA), Daunorrubicina (DNR) ou citarabina (Ara-c), na linhagem U937. As células foram transfectadas com o *scramble* ou com o siRNA para JNK ou p38, utilizando o reagente Lipofectamina 2000 e expostas à IDA, DNR ou Ara-c por 24h. A inibição de JNK ou p38 foi avaliada por Western blotting (A) e a indução de resistência foi verificada pela análise da fragmentação do DNA após o tratamento com os quimioterápicos (B). As figuras são representativas de três experimentos independentes.

A



B

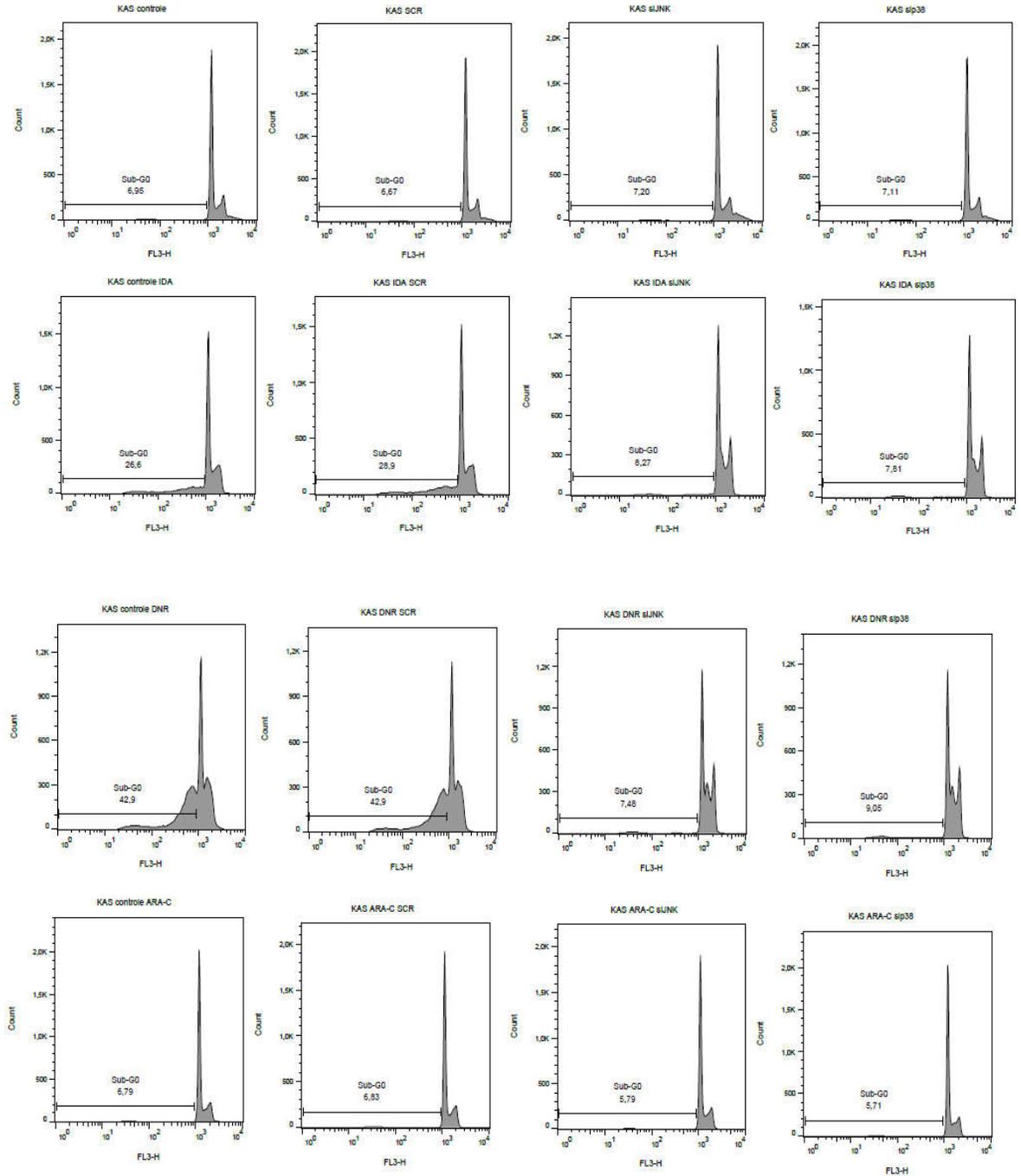
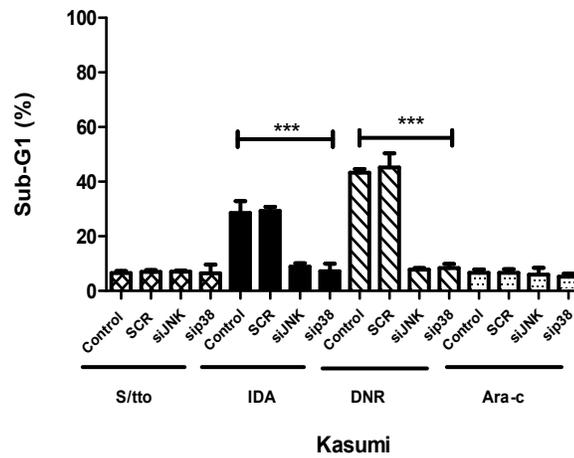


Figura 6.24: Efeito do silenciamento da expressão de JNK ou p38 na indução de resistência ao tratamento com Idarrubicina (IDA), Daunorrubicina (DNR) ou citarabina (Ara-c), na linhagem Kasumi. As células foram transfectadas com o scramble ou com o siRNA para JNK ou p38, utilizando o reagente Lipofectamina 2000 e expostas à IDA, DNR ou Ara-c por 24h. A inibição de JNK ou p38 foi avaliada por Western blotting (A) e a indução de resistência foi verificada pela análise da fragmentação do DNA após o tratamento com os quimioterápicos (B). As figuras são representativas de três experimentos independentes.

A



B

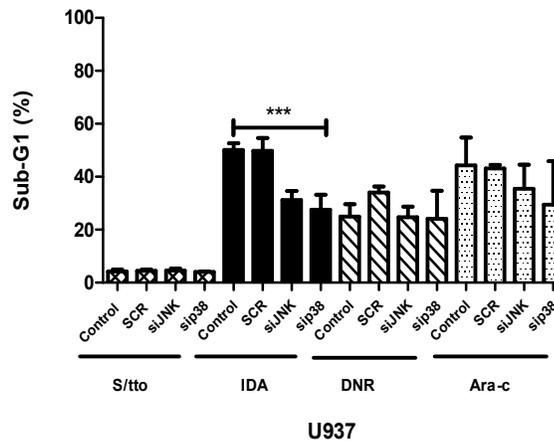


Figura 6.25: Indução de morte celular pelas antraciclinas e o Ara-c nas linhagens celulares Kasumi (A) e U937 (B) silenciadas para JNK e p38 pela análise da população em sub-G0/G1, por citometria de fluxo. As células foram transfectadas com o scramble ou com o siRNA para JNK ou p38, utilizando o reagente Lipofectamina 2000 por 72 horas e

expostas à IDA (1.0 μ M), DNR (1.0 μ M) ou Ara-c (7.5 μ M) por mais 24h e tiveram seus conteúdos de DNA avaliados para análise da população em sub-G0/G1. Os histogramas são representativos de três experimentos independentes. ***p<0.001, Teste Anova, seguido do pós-teste Bonferroni.

6.13 O silenciamento da expressão de JNK e p38, por siRNA, aumenta da expressão da Pgp nas linhagens Kasumi e U937

Vários estudos relataram uma possível associação entre JNK, p38 e a Pgp, uma vez que estas proteínas estão envolvidas em diversos processos celulares relacionados a proliferação ou apoptose (COTTIER et al., 2004). Wagner e colaboradores em 2009, mostraram que a ativação de p38 reduziu a expressão do RNAm de MDR1/Pgp e MRP1 em linhagens celulares de hepatocarcinoma BEL-7402/5-FU resistentes ao 5 fluorouracil (WAGNER; NEBREDA, 2009). Guo e colaboradores em 2008, também mostraram que a inibição de p38 reduziu a atividade de AP-1 e a expressão do gene MDR1/Pgp nas linhagens celulares de câncer gástrico (SGC7901/VCR) resistentes à vincristina (GUO et al., 2008). A via JNK também já foi relatada como envolvida na regulação do promotor do gene MDR1/Pgp (LIU et al., 2008). O PSC833, um análogo de ciclosporina, diminui a expressão do gene MDR1/Pgp ativando a via JNK/c-Jun/AP-1. Este estudo sugere a via JNK/c-Jun/AP-1 como um possível regulador negativo da expressão do gene MDR1/Pgp (BARK; CHOI, 2010). No entanto, alguns grupos demonstraram que AP-1 seria um ativador do gene MDR1/Pgp (CHEN; BIAN; ZENG, 2014; GUO et al., 2008). Até o momento, apenas um trabalho em leucemias mostrou que a inibição de p38 pelo inibidor farmacológico (SB202190) em linhagens de leucemia mieloide crônica (K562/DOX) resistentes a DOX resultava na diminuição da Pgp (níveis de RNAm) (CHEN; BIAN; ZENG, 2014). Em LMC, foi demonstrado que a inibição farmacológica de p38 diminui a expressão da Pgp e do RNAm

de MDR1 em linhagens K562 resistente a DOXO (CHEN et al., 2012). No entanto, não há relatos na literatura sobre a associação de JNK ou p38 e a Pgp em LMA. Com essas evidências, buscamos verificar se as células silenciadas para JNK ou p38 apresentavam variações na expressão da Pgp (proteína de membrana). Este dado foi coletado em dois momentos: Após 72h de transfecção (o mesmo tempo utilizado para o tratamento das linhagens com os quimioterápicos) e após 96h de transfecção (o mesmo tempo utilizado para a análise da fragmentação induzida pelos quimioterápicos) Figura 6.26. Podemos observar nas figuras 6.27 e 6.28, que o silenciamento da expressão de JNK e p38 resulta no aumento da expressão da Pgp em ambos os tempos na linhagem Kasumi, mas somente após 72h de transfecção na linhagem U937, este fenótipo é revertido após 96h de transfecção.

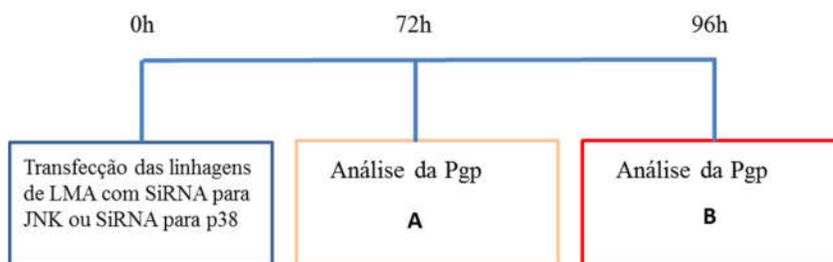


Figura 6.26: Esquema da transfecção por siRNA nas linhagens de leucemia mieloide aguda e análise da Pgp. As linhagens Kasumi e U937 foram transfectadas com o siRNA controle (scramble), siRNA para JNK ou siRNA para p38 e posterior avaliação da expressão da Pgp por citometria de fluxo.

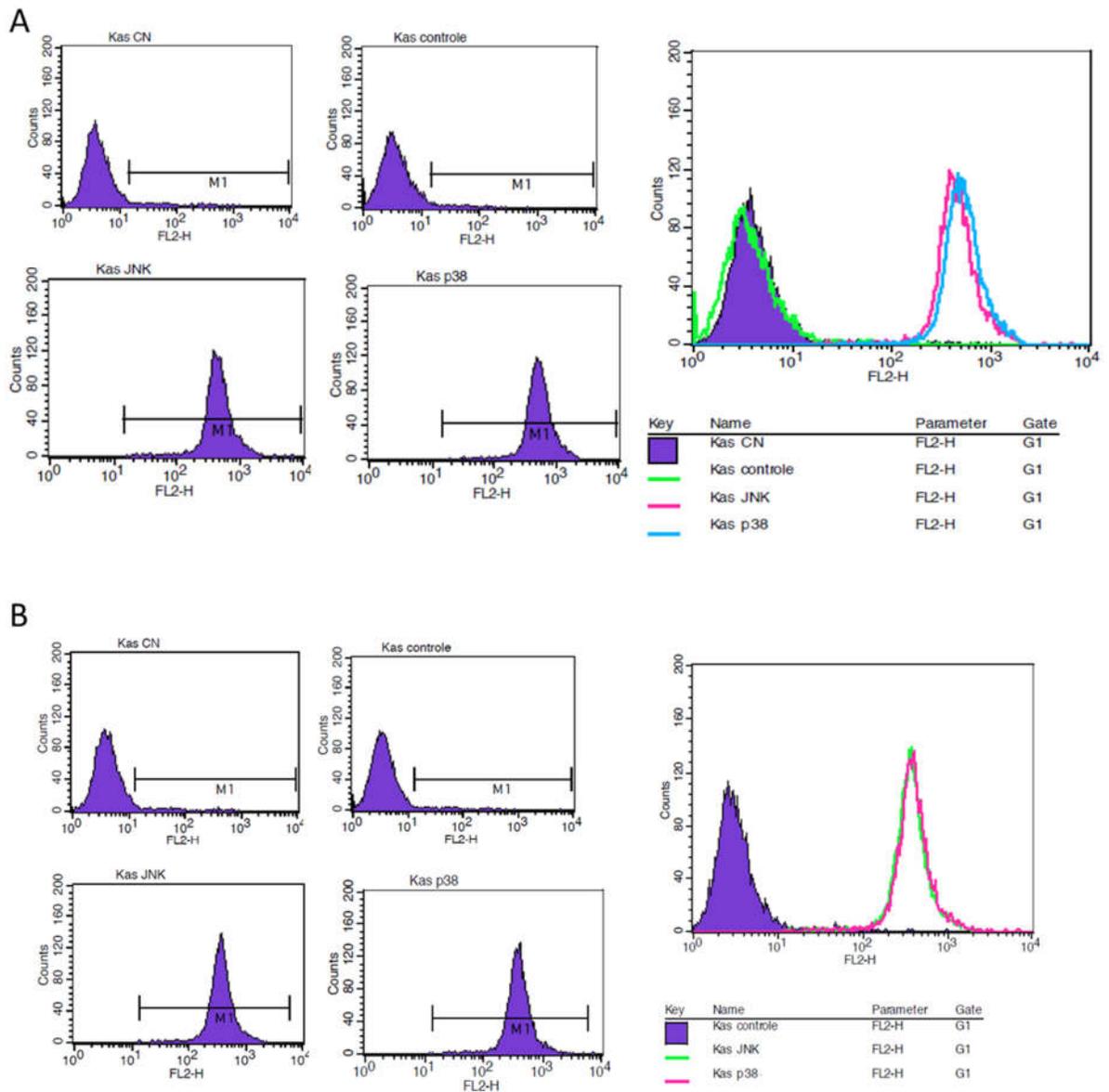


Figura 6.27: Expressão da glicoproteína P (Pgp) na linhagem Kasumi após silenciamento com siRNA para JNK ou para p38. Análise após 72h de transfecção com o siRNA para JNK ou para p38 (A) e Análise após 96h de transfecção com o siRNA para JNK ou para p38 (B). Todos os ensaios foram analisados por citometria de fluxo. Figura representativa de três experimentos independentes.

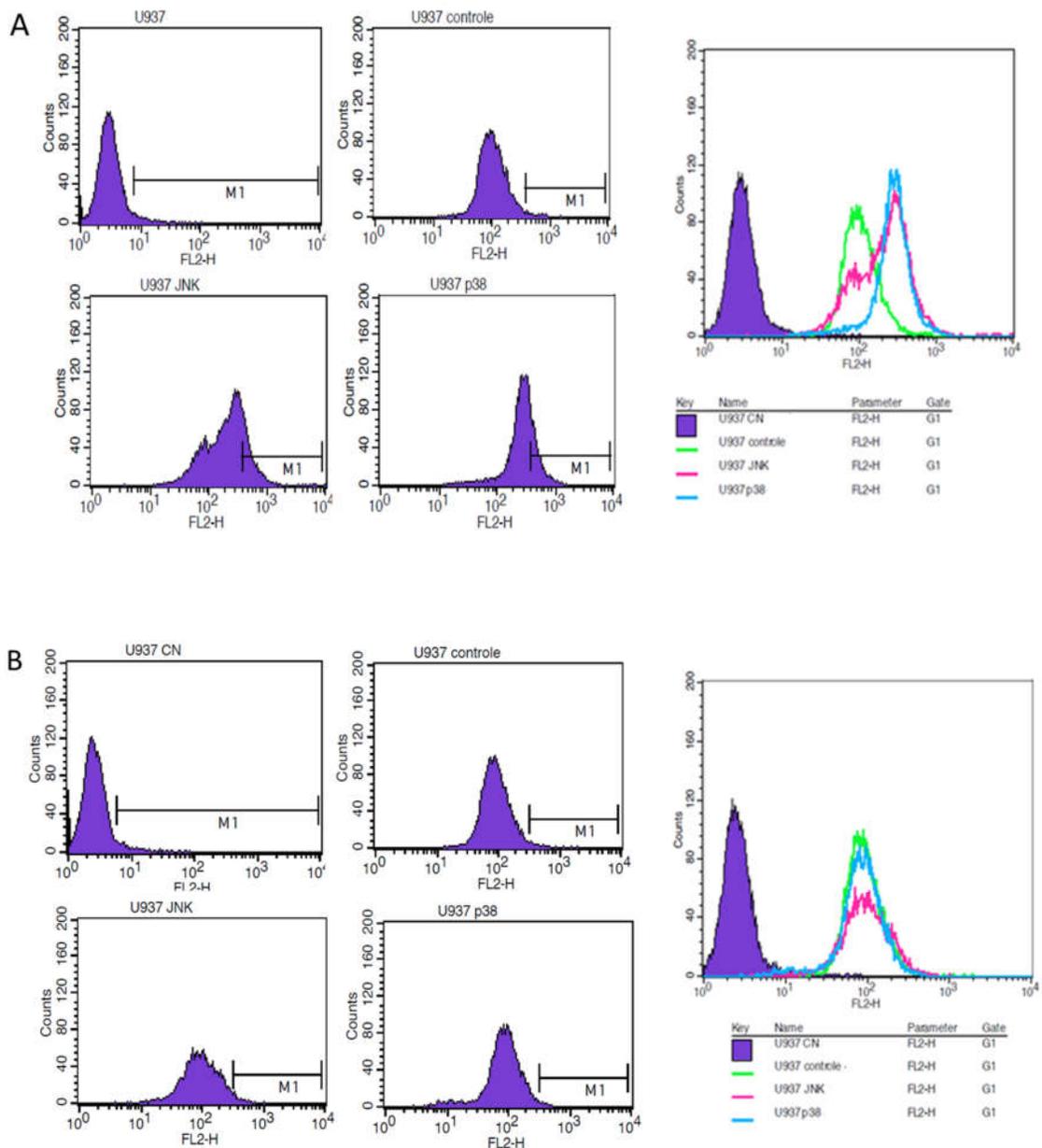


Figura 6.28: Expressão da glicoproteína P (Pgp) na linhagem U937 após silenciamento com siRNA para JNK ou para p38. Análise após 72h de transfecção com o siRNA para JNK e p38. B: Análise após 96h de transfecção com o siRNA para JNK e p38. Todos os ensaios foram analisados por citometria de fluxo, utilizando o anticorpo para Pgp (UIC2-PE). Figura representativa de três experimentos independentes.

6.14 O silenciamento da expressão de JNK e p38, por siRNA, aumenta a expressão do miR-27a nas linhagens Kasumi e U937

A superexpressão da Pgp é considerada como de prognóstico desfavorável na LMA uma vez que diminui a concentração intracelular dos quimioterápicos e consequentemente sua ação sobre seus alvos intracelulares (SHAFFER et al., 2012). Muitos grupos, se concentraram em compreender o mecanismo molecular que regula a Pgp e a relação entre a expressão da Pgp e prognóstico da LMA (FENG et al., 2011). Já foi relatado que o miR-27a estimula a expressão do gene MDR1/Pgp em linhagens celulares de tumores sólidos (FENG et al., 2011; LI et al., 2010; ZHU et al., 2008), mas poucos estudos abordaram o papel do miR-27a em leucemias.

Em leucemias, verificou-se que os níveis de expressão do miR-27a, em amostras de pacientes com LMA, era significativamente maior quando comparado com amostras de pacientes com LLA (MI et al., 2007). Em amostras de pacientes com LMC, a expressão do miR-27a encontrava-se significativamente aumentada nos pacientes resistentes ao mesilato de imatinibe (MI) em comparação com pacientes responsivos ao MI (JURKOVICOVA et al., 2015), mas a expressão do miR-27a foi inversamente correlacionada com a expressão de MDR1 em linhagens celulares de LMC (FENG et al., 2011). Além disso, um único estudo mostrou que o miR-27a pode alterar os níveis de fosforilação de JNK e p38 em células dendríticas na presença de LPS (MIN et al., 2012).

Uma vez que observamos o aumento da expressão da Pgp nas linhagens Kasumi e U937 silenciadas para JNK e para p38, avaliamos então os níveis de expressão do miR-27a, por PCR quantitativo, nas linhagens após silenciamento com siRNA para JNK. Os níveis de expressão do miR-27a estavam aumentados em ambas as linhagens em relação ao controle (scramble) (Figura 6.29). A expressão do miR-27a na linhagem Kasumi aumentou em relação ao controle (scramble), em aproximadamente 25 vezes nos 2 experimentos, após

silenciamento de JNK com o SiRNA. O mesmo foi observado para a linhagem U937, onde a expressão do miR-27a também se eleva após silenciamento de JNK com o SiRNA, em aproximadamente 35 vezes, em relação ao controle (scramble).

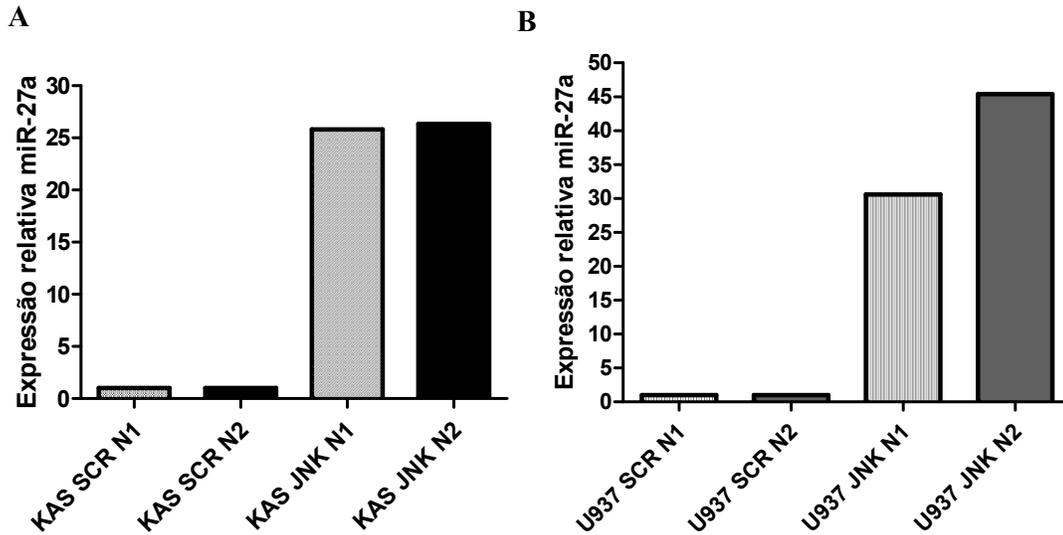


Figura 6.29: Padrão de expressão de miR-27a nas linhagens Kasumi (A) e U937 (B) após 72 horas de transfecção com SiRNA para JNK. A expressão dos miRNA foi normalizada utilizando o endógeno RNU6B. Foi utilizado como amostra de referência o scramble de cada linhagem. Os gráficos demonstram dois experimentos (N1 e N2) independentes por PCR em tempo real, para cada linhagem celular. SCR: scramble.

PARTE II: Amostras de pacientes com LMA

7. Caracterização clínica dos pacientes com LMA

O presente estudo foi realizado de forma retrospectiva e prospectiva (2007-2015). Dentre os critérios pré-estabelecidos, 50 amostras de células de medula óssea dos pacientes com LMA foram coletadas na ocasião do diagnóstico. As amostras são de LMA *de novo* (Tabela 7.1) e todos os pacientes estudados são provenientes do Instituto Nacional do Câncer (INCA). Foram excluídos da análise os pacientes com diagnóstico de LMA secundária e os

pacientes com diagnóstico de LMA *de novo* que não foram elegíveis para quimioterapia. Do total de pacientes analisados, treze são crianças (0-18 anos) e 37 são adultos (19-71 anos). A idade média dos pacientes foi de 37 anos, variando entre 1 a 71 anos. Dos 50 pacientes, 31 são do sexo masculino e 19 do sexo feminino.

Tabela 7.1: Características demográficas e clínicas dos pacientes com leucemia mielóide aguda.

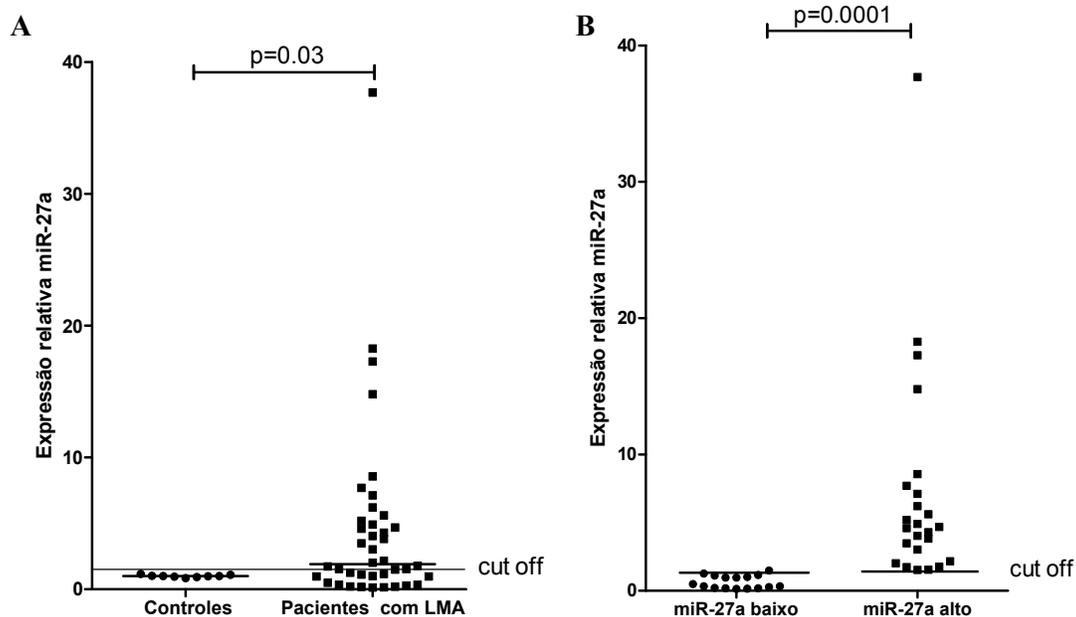
Características dos Pacientes	N° de pacientes (%)
Idade ao diagnóstico	
Crianças (0-18 anos)	13 (26%)
Adultos (19-59 anos)	37 (74%)
Gênero	
Feminino	27 (54%)
Masculino	23 (46%)
LMA	
M0	1 (2%)
M1	5 (10%)
M2	9 (18%)
M3	10 (20%)
M4	10 (20%)
M5	3 (6%)
M6	0 (0%)
M7	1 (2%)
Não determinado	11 (22%)
Alterações citogenéticas	
t(15;17)	6 (12%)
inv(16)	2 (4%)
t(8;21)	4 (8%)
Cariótipo normal	22 (44%)
Cariótipo complexo	3 (6%)
Outras alterações cromossômicas	13 (26%)

A análise citogenética dos pacientes com LMA mostrou a presença de alterações cromossômicas em 56% dos casos. O padrão cromossômico mais frequente foi o cariótipo

normal e a alteração cromossômica mais frequente foi a t(15;17). Em relação à classificação FAB, os subtipos mais frequentes foram o M3 e o M4.

7.1 Investigação dos níveis de expressão do miR-27a em amostras de pacientes com LMA

Tendo em vista que a expressão do miR-27a não foi previamente correlacionada em outros estudos, com a expressão da Pgp ou características clínicas em amostras de pacientes com LMA, nós avaliamos os níveis de expressão do miR-27a em 40 amostras de medula óssea, na ocasião do diagnóstico e em nove amostras de medula óssea de doadores saudáveis. Nós comparamos os níveis de expressão do miR-27a nas amostras de pacientes em relação a idade, citogenética, classificação FAB, expressão da Pgp, presença ou ausência de remissão ou recidiva. Foi atribuído um ponto de corte (*cut off*) de 1.5, de acordo com a expressão do miR-27a nos doadores saudáveis, a fim de considerar a expressão do miR-27a como alta ou baixa. A diferença de expressão relativa do miR-27a e os doadores saudáveis foi considerada significativa ($p=0,03$) (Figura 7.1).



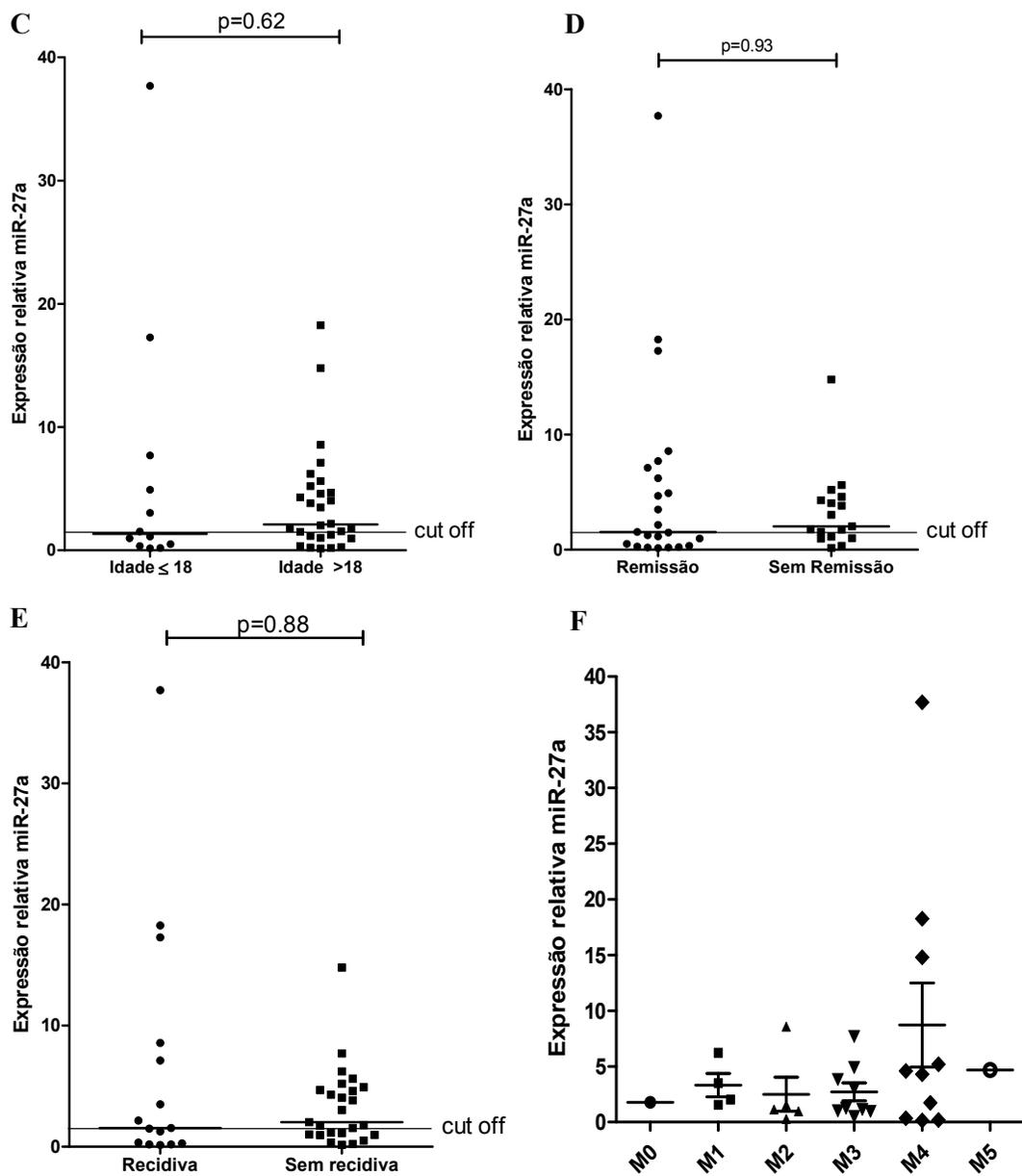


Figura 7.2: Comparação dos níveis de expressão do miR-27a nos pacientes com LMA com características clínicas e laboratoriais. Comparação em relação à expressão da Pgp (A). Foi considerado como positividade para a expressão de Pgp, os pacientes que apresentaram expressão maior que 1.1; Comparação em relação à análise citogenética (B). Foi considerado como de prognóstico favorável os pacientes com as seguintes alterações citogenéticas: t(8;21); t(15;17) e inv(16) ou t(16;16) e como de prognóstico desfavorável as demais alterações citogenéticas. Comparação entre crianças (0-18 anos) e adultos (19-71 anos) (C); Comparação entre os pacientes que apresentaram remissão após quimioterapia (D). Comparação entre os pacientes que apresentaram recidiva da doença até o momento (E).

Comparação em relação aos subtipos da classificação FAB (F). A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

7.2 Correlação entre os níveis de expressão do miR-27a e da Pgp em amostras de pacientes com LMA

Já foi demonstrado uma associação do miR-27a e a Pgp em diversos tumores, principalmente em estudos com linhagens celulares. No entanto, até o momento a existência ou não de uma correlação entre essas variáveis não foi descrita para amostras de pacientes com LMA. Com isso, baseado na diferença significativa em relação ao miR-27a e a expressão da Pgp ($p=0.049$), mostrado nas comparações feitas acima, nós investigamos uma possível correlação entre a expressão da Pgp e do miR-27a. Entretanto, encontramos uma correlação muito baixa (Figura 7.3).

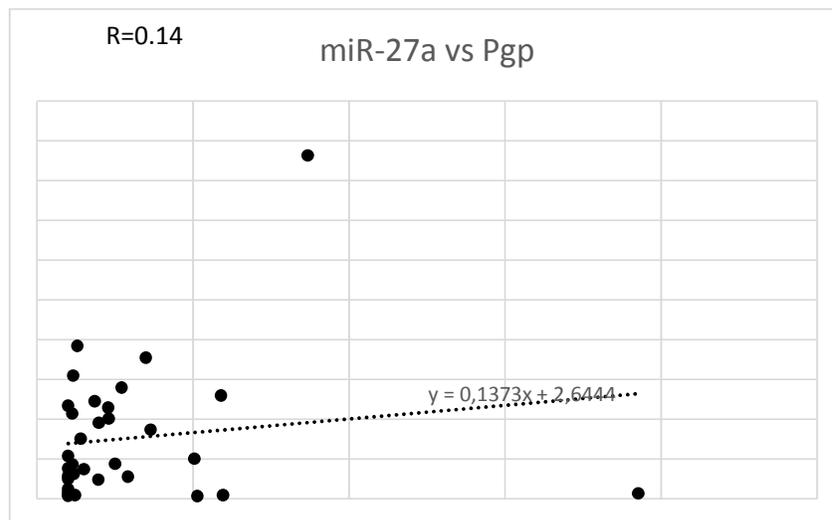


Figura 7.3: Análise de correlação entre os níveis de expressão do miR-27a com os níveis de expressão da Pgp nos pacientes com LMA. Coeficiente de correlação (R): 0,00 a 0,19 – correlação muito fraca; 0,20 a 0,39 – correlação fraca; 0,40 a 0,69 - correlação moderada; 0,70 a 0,89 - correlação forte; 0,90 a 1,00 - correlação muito forte.

7.3 Associação entre os níveis de expressão do miR-27a das amostras de pacientes com LMA com a sobrevida global e livre de doença

Por último, nós avaliamos a associação entre o nível de expressão do miR-27a em relação a sobrevida global e livre de doença. Nós dividimos os grupos em dois, de expressão baixa ou alto do miR-27a, de acordo com nosso ponto de corte e analisamos os pacientes em um tempo de acompanhamento de 12 meses e 8 anos. Como mostrado na figura 7.4, não houve diferença entre a expressão do miR-27a em relação a sobrevida global ou livre de doença em 8 anos. Essa diferença foi observada somente na sobrevida global em 12 meses (Figura 7.4).

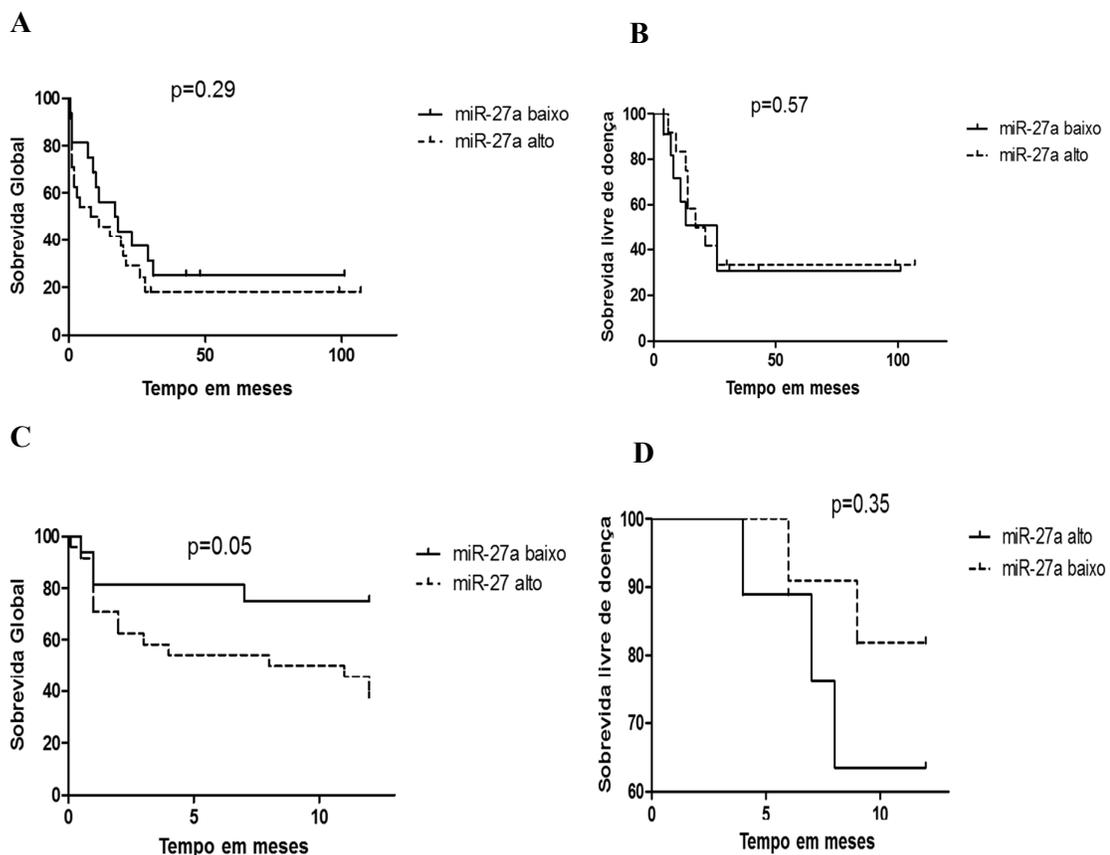


Figura 7.4: Análise dos níveis de expressão do miR-27a em relação a sobrevida global e livre de doença. Sobrevida global em 8 anos (A); Sobrevida livre de doença em 8 anos (B); Sobrevida global em 12 meses (C); Sobrevida livre de doença em 12 meses (D). A sobrevida

livre de doença foi calculada a partir do dia do início do tratamento até o óbito ou progressão da doença e a sobrevida global, a partir da data do diagnóstico até o óbito. Teste log rank.

7.4 Níveis de fosforilação da JNK e p38 em amostras de pacientes com LMA tratadas com as antraciclinas (em andamento)

Com o objetivo de verificar se os resultados encontrados com as linhagens celulares se reproduzem nas amostras de pacientes com LMA, nosso próximo passo será avaliar a indução de fosforilação das MAPKs JNK e p38, por Western blotting, em amostras de LMA ao diagnóstico e na recidiva. O nosso objetivo é correlacionar tais resultados com as características clínicas dos pacientes, resposta a terapia de indução de remissão, expressão da Pgp e do miR-27a. No momento, temos 50 amostras coletadas e tratadas com IDA ou DNR por 30 e 60 minutos. Na Figura 7.5, podemos visualizar os blots representativos da análise da amostra de dois pacientes, por Western blotting. As antraciclinas IDA e DNR induziram a fosforilação de ambas as MAPKs a partir de 30 ou 60 minutos na primeira amostra (Figura 7.5A). No entanto, não houve indução de fosforilação pelas antraciclinas na segunda amostra (Figura 7.5B).

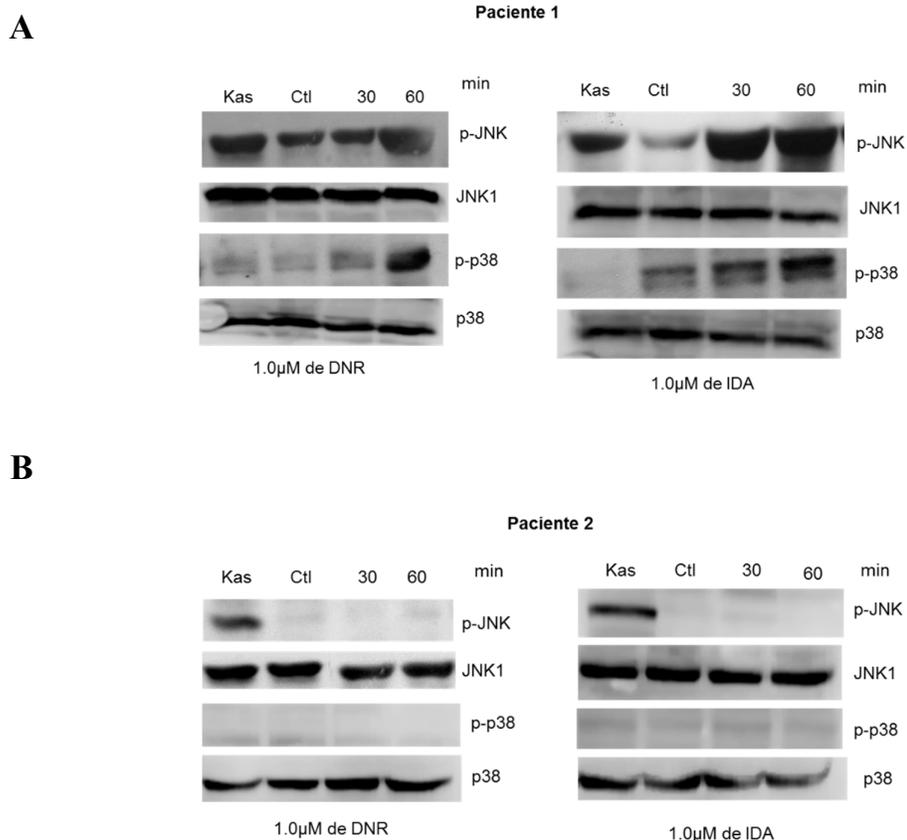


Figura 7.5: Análise da fosforilação de JNK e p38 em amostras de leucemia mieloide aguda, por Western blotting. As células foram expostas a concentração de 1.0µM de IDA ou DNR por 30 e 60 minutos. Paciente 1 (A) e Paciente 2 (B). A linhagem Kasumi (Kas) foi utilizada como controle positivo da fosforilação de JNK.

8. Discussão

A LMA é uma doença extremamente heterogênea, com uma sobrevida global para os pacientes adultos de aproximadamente 20% (BURNETT, 2012). A existência de vários subtipos da doença com diferentes variações genéticas, epigenéticas e resultados clínicos dificulta a compreensão dos mecanismos envolvidos na quimiorresistência e no desenvolvimento de novas terapias (VARGO-GOGOLA; ROSEN, 2007)

Os avanços no entendimento da biologia do câncer são atribuídos principalmente à disponibilidade de diferentes modelos experimentais que permitem o estudo de diferentes vias de sinalização e a identificação dos genes críticos envolvidos no desenvolvimento e manutenção do tumor (VARGO-GOGOLA; ROSEN, 2007). No entanto, uma caracterização detalhada da linhagem celular é fundamental antes da sua utilização. Esta caracterização fornece informações importantes sobre a complexidade do tumor e dos mecanismos biológicos envolvidos na doença, reforçando seu valor como modelo para o estudo (VARGO-GOGOLA; ROSEN, 2007). Além disso, a caracterização de linhagens tumorais é essencial para o desenvolvimento de novas drogas antitumorais, entendimento do mecanismo de ação e os padrões de resistência/sensibilidade aos quimioterápicos (VARGO-GOGOLA; ROSEN, 2007).

No entanto, apesar do papel essencial das linhagens celulares na pesquisa biomédica, há um debate na comunidade científica sobre o fato de serem ou não representativas do tumor original (LACROIX; LECLERCQ, 2004). Alguns autores concordam com a ideia de que existe uma alta, mas não perfeita, semelhança genômica entre o tumor original e a linhagem tumoral derivada a partir dele. As linhagens celulares mantêm as alterações cromossômicas específicas do tumor nas primeiras passagens, mostram as mesmas características morfológicas e moleculares do tumor primário e, em geral, mantêm a expressão dos “Hallmarks do câncer” (GAZDAR et al., 2010; KAO et al., 2009).

Porém, outros autores acreditam que apesar das linhagens de celulares tumorais manterem muitas características genéticas, epigenéticas e de expressão gênica, elas são geneticamente mais complexas do que o próprio tumor e apresentam extensos rearranjos cromossômicos, mutações oncogênicas, perda alélica e ampliações de genes, o que pode resultar na perda de suas propriedades fenotípicas, além de sofrerem mudanças moleculares

adicionais durante a cultura de células, incluindo modificações em algumas vias de sinalização (VAN STAVEREN et al., 2009).

A partir destas informações, o primeiro passo deste trabalho foi caracterizar o perfil de resistência das linhagens celulares de LMA, HL60, Kasumi e U937. Nós avaliamos primeiramente, diferentes características imunofenotípicas das linhagens celulares de LMA utilizando anticorpos monoclonais de origem mieloide, mielomonocítica e monocítica. Não há muitos relatos na literatura do perfil imunofenotípico dessas linhagens o que dificulta as comparações em relação as alterações no imunofenótipo. No entanto, todas as linhagens celulares de LMA foram positivas para os marcadores mielóides e a linhagem Kasumi também foi positiva para o receptor c-kit, corroborando estudos que relataram alterações no receptor c-kit, como mutações ou amplificação nesta linhagem (LARIZZA; MAGNANI; BEGHINI, 2005). O imunofenótipo da Kasumi foi semelhante ao encontrado por Inoue e colaboradores em 2014 (INOUE et al., 2014). As linhagens HL60 e U937 foram positivas para CD34, no entanto outro autor relatou resultados opostos para a linhagem HL60 (AHMED et al., 2001). Essa diferença na expressão de CD34 na linhagem HL60, pode ser explicada, pelos relatos de Kuranda e colaboradores em 2011. Os autores observaram que a linhagem HL60 também apresenta uma pequena subpopulação de células CD34+, um marcador de células progenitoras (KURANDA et al., 2011). O perfil imunofenotípico da linhagem HL60 com expressão CD34+ sugere que a subpopulação CD34+ previamente observada seja agora a população predominante da linhagem HL60.

O segundo passo do nosso trabalho foi avaliar o padrão cromossômico das linhagens celulares de LMA. Apesar das linhagens HL60, Kasumi e U937 terem sido previamente caracterizadas citogeneticamente (COTTIER et al., 2004), nós encontramos uma evolução clonal não descrita com diferentes populações coexistindo na mesma cultura. A análise

citogenética mostrou a presença de cariótipo complexo em todas as linhagens de LMA. Cariótipos complexos são marcadores de prognóstico desfavorável, e correlacionam-se com a resistência ao tratamento e baixa sobrevida para pacientes com LMA (STYCZYŃSKI; HAUS, 2006). As duas populações encontradas coexistindo nas linhagens HL60 e Kasumi, exibiram as mesmas alterações cromossômicas, diferindo apenas em relação aos cromossomos marcadores (cromossomos que não apresentam um padrão de bandas que possa ser identificado pelas técnicas de citogenética clássica, como o bandeamento GTG). Na linhagem HL60, foi encontrado um número cromossômico modal de 45 cromossomos, além da perda dos cromossomos X, 5, deleção no braço curto do cromossomo 10 e ausência da translocação (15;17) clássica do subtipo M3 da LMA, como descrito por outros estudos (DEMBITZ et al., 2015; VOLPI et al., 1996). No entanto, essa linhagem apresentou outras alterações não descritas como ins(4q),add(9)(p13),add(17)(p13) e monossomia do cromossomo 18.

A linhagem Kasumi, que exibe alterações do tipo CBF (*core-binding fator*), como a t(8;21) (LARIZZA; MAGNANI; BEGHINI, 2005) apresentou uma distribuição de populações clonais diferente da previamente descrita (SACCHI et al., 1995). Estes autores também encontraram outras populações coexistindo na mesma cultura, no entanto, com uma população representando 2%, outra representando 10% e a terceira com 88% do total. Nós encontramos uma distribuição diferente (40% versus 60%) apenas diferindo em cromossomos marcadores, com as mesmas alterações escritas neste estudo: -Y, add(9), -13,-15 e -16 e outras alterações ainda não descritas como +10, +12, add(17)(p13), +18, +22. Estas diferenças na análise por bandeamento G podem ser derivadas da instabilidade genética presente em linhagens celulares, resultando em ganho ou perda de cromossomos, deleções parciais ou totais de genes além de novos rearranjos cromossômicos (BIGNOLD; COGHLAN; JERSMANN, 2006).

A linhagem U937 apresentou apenas uma única população, com o número modal de 55 cromossomos, dentro da variação descrita na literatura que é de 49-69 cromossomos (LEE et al., 2002). Algumas alterações visualizadas já foram descritas, como a $-Y$, $+der(1)del(1)(p32)$, $+der(3)t(1;3)(q32;q28)$, $+7$, $add(10)(p15)$, $del(11)(q21)$, $+19$, entretanto, outras alterações encontradas ainda não foram descritas como $+2$, $del(5)(q21)$, $+9$, $+der(11)add(11)(p15)$, $+12$, $add(14)(p11)$, $add(15)(p11)$, -22 . Em nosso estudo também encontramos a região pericêntrica 1q, marcador de LMA subtipo M5 como descrito em outro estudo (LEE et al., 2002). A caracterização de alterações cromossômicas fornece valiosa informação sobre a patogênese da LMA e promove a descoberta de novos rearranjos cromossômicos que podem ter um papel importante na resistência a quimioterapia.

Sabendo que os transportadores de efluxo da família ABC extruem os quimioterápicos ativamente, sendo este o mecanismo mais bem caracterizado pelo qual as células leucêmicas desenvolvem MDR, principalmente depois de repetidos ciclos de quimioterapia (GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002). Nós verificamos o perfil de expressão e atividade da Pgp, expressão da MRP1 e atividade da BCRP nas linhagens celulares de LMA. Há controvérsias na literatura a respeito da expressão e atividade da Pgp na linhagem HL60. Alguns artigos relatam ausência de expressão da Pgp (DUPUIS et al., 2013; MINDERMAN et al., 2004), outros entretanto, relatam a expressão da Pgp como sendo positiva (DECLÈVES et al., 2006). O mesmo acontece em relação a presença de atividade da Pgp. Declèves e colaboradores em 2006 relataram a presença de atividade da Pgp na linhagem HL60, assim como o nosso estudo (DECLÈVES et al., 2006). Porém, outros estudos mostraram ausência de atividade (DUPUIS et al., 2013; MINDERMAN et al., 2004). Não foram encontradas informações na literatura sobre a expressão e/ou atividade da Pgp na linhagem Kasumi. É possível que anticorpos monoclonais distintos, utilizados para a determinação da expressão da Pgp, possam ser responsáveis pela variação nos resultados obtidos em diferentes laboratórios.

Além disso, uma série de estudos tem apontado à necessidade de autenticação adequada das linhagens celulares e caracterização precisa das mesmas como requisitos indispensáveis para utilizá-las como modelo de estudo, possibilitando assim a reprodutibilidade dos dados (DREXLER; MACLEOD, 2003).

A expressão da MRP1 foi observada nas três linhagens de LMA, sendo um pouco mais elevada na linhagem Kasumi (RFI=2.3) quando comparada com as demais linhagens HL60 (RFI=1.9) e U937 (RFI=1.73). A expressão da MRP1 na HL60 e U937 foi relatada em outro estudo (REBOWSKI et al., 2001). Contudo, não foram encontrados relatos na literatura sobre a expressão da MRP1 na linhagem Kasumi. A alta expressão da MRP1 tem sido correlacionada com a resistência ao Ara-c. Baran e colaboradores em 2007, demonstraram que a linhagem HL60/DOX, resistente a DOXO, apresentava um aumento na expressão de MRP1 e resistência cruzada ao Ara-c (BARAN et al., 2007). A linhagem Kasumi apresentou maior expressão de MRP1 quando comparada com as demais linhagens de LMA, o que pode explicar sua resistência a morte celular induzida pelo Ara-c.

Em nosso estudo, apenas a linhagem Kasumi apresentou atividade da BCRP. A expressão da BCRP, foi previamente associada a resistência as antraciclina, sendo a DNR substrato para a BCRP (SARGENT et al., 2001). Outro estudo correlacionou altos níveis de BCRP a um pior prognóstico em pacientes com LMA (STEINBACH et al., 2002). Benderra e colaboradores em 2004, relataram que altos níveis de BCRP estavam associados à resistência a quimioterapia em pacientes adultos com LMA (BENDERRA et al., 2004). Apesar de não termos avaliado a expressão da BCRP nas linhagens de LMA, Suvannasankha e colaboradores em 2004, relataram alta correlação entre expressão e atividade de BCRP em diversas linhagens, sensíveis ou resistentes, de leucemias ou tumores sólidos (SUVANNASANKHA et al., 2004). Este estudo mostrou, por exemplo, que a linhagem HL60

não apresenta expressão de BCRP e conseqüentemente não apresenta atividade, assim como observado em nosso estudo.

Os nossos resultados em relação à inibição da viabilidade e morte celular pela IDA ou DNR foram muito semelhantes nas linhagens Kasumi e U937, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre elas. A antraciclina IDA mostrou ser mais eficiente em reduzir a viabilidade celular e induzir morte celular na linhagem HL60 e o Ara-c para a linhagem U937.

A IDA é considerada um substrato fraco para a Pgp, sendo altamente lipofílica, com alto potencial citotóxico e com capacidade de ligação ao DNA superior quando comparada com a DNR (MA et al., 2009). Estudos randomizados concluíram que o regime de indução de remissão com a antraciclina IDA, alcançam melhores taxas de remissão completa e sobrevida global quando comparados a regimes que utilizavam a DNR (TEUFFEL et al., 2013). A incorporação de IDA na linhagem HL60 foi investigada e comparada com a incorporação de DNR por Nagasawa e colaboradores em 1997 (NAGASAWA; OHNISHI; YOKOYAMA, 1997). Estes autores relatam que a incorporação de IDA é maior do que a DNR na linhagem HL60 e em células mononucleares do sangue periférico. Lofti e colaboradores 2002, também compararam os resultados obtidos com a IDA e com a DNR nas linhagens MOLT-4, HL60, CEM e K562, e concluíram que a IDA é no mínimo duas vezes mais potente que a DNR em relação à incorporação intracelular e indução de apoptose (LOTFI; ZACKRISSON; PETERSON, 2002).

Kobune e colaboradores em 2009, também observaram que a linhagem Kasumi era resistente a morte celular induzida pelo Ara-c, como observado em nosso estudo (KOBUNE et al., 2009). Visani e colaboradores em 2004, reportaram que a incorporação do Ara-c ao DNA das células t(8;21) positivas era menor ou similar a incorporação por células derivadas

de pacientes com cariótipo desfavorável (VISANI et al., 2004). Além disso, a linhagem Kasumi apresenta mutação em c-kit, o que está relacionado a um aumento do potencial proliferativo e efeitos anti-apoptóticos (ADVANI, 2006; MPAKOU et al., 2013). Ademais, nossos resultados mostram diferenças na expressão de várias proteínas relacionadas com a morte celular. Defeitos nas vias de apoptose são conhecidos por serem responsáveis pela plasticidade em relação à resposta a drogas citotóxicas (HÜTTER et al., 2009). A HL60 foi a linhagem mais sensível aos quimioterápicos testados, seguida pela Kasumi e posteriormente pela linhagem U937. Esse resultado pode ser explicado pela alta expressão das proteínas pró-apoptóticas Bim e Bak na linhagem HL60 em comparação com as outras linhagens. Alguns estudos mostraram a expressão de Bim, como um regulador chave da apoptose induzida pela quimioterapia, onde a diminuição na expressão de Bim pode influenciar na resposta a quimioterapia dos pacientes com LMA (PIERCEALL et al., 2013; ZHANG et al., 2008). Considerando que a linhagem HL60 foi a única linhagem que apresentou altos níveis de Bim, esta hipótese pode explicar a melhor resposta dessa linhagem ao tratamento com as antraciclina e ao Ara-c quando comparada as linhagens Kasumi e U937.

A linhagem Kasumi apresentou um perfil intermediário de sensibilidade aos quimioterápicos testados, além de uma grande resistência a redução de viabilidade pelo Ara-c. Além das características relacionadas à resistência citadas anteriormente, esta é a única entre as três linhagens que apresenta p53 mutado (as linhagens HL60 e U937 são p53 null). Mutações no gene *TP53* levam a ganho de função sendo um forte marcador de resistência a quimioterápicos *in vitro* (NAHI et al., 2008).

A linhagem U937 demonstrou ser a mais resistente as antraciclina. Apesar da U937 não apresentar grandes desbalanços em relação aos níveis de expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas, esta exibiu um cariótipo extremamente complexo com diversas alterações

cromossômicas além de altos níveis de expressão da Pgp. A complexidade das alterações cromossômicas sugere defeitos no reparo do DNA e resultam em alterações na apoptose, quimiorresistência e prognóstico desfavorável em pacientes com LMA (SCHOCH et al., 2005). A alta expressão da Pgp associada a ausência de atividade é um resultado interessante no contexto da resistência as antraciclina. Pallis e colaboradores em 2002, relataram que a Pgp possui um papel na via apoptótica independentemente de sua atividade como proteína transportadora de efluxo (PALLIS et al., 2002). Vários autores descreveram a presença de uma influência direta da Pgp na função de proteínas envolvidas com a progressão da apoptose (tais como p53 e caspase-3) (BREIER et al., 2013; HE et al., 2010). É possível que esta seja a função da Pgp na linhagem U937.

A partir das evidências da importância da ativação das vias de JNK e p38 para indução de morte celular pelos quimioterápicos, nós buscamos verificar se as antraciclina e o Ara-c induzem a fosforilação das MAPKs JNK e p38 nas linhagens de LMA. A IDA, DNR e o Ara-c induziram a fosforilação e conseqüentemente a ativação de JNK e p38 nas linhagens de LMA, como descrito na literatura; no entanto em tempos diferentes. A linhagem Kasumi possui ativação constitutiva da via de JNK devido à presença da mutação em c-kit (LARIZZA; MAGNANI; BEGHINI, 2005) e por isso não foi avaliada para fosforilação desta proteína. A mutação no receptor de tirosina quinase, c-kit, resulta em sua atuação de forma constitutiva e conseqüente ativação da via de PI3K/AKT e de JNK, alvo descendente da via de PI3K/AKT, levando na proliferação celular (LARIZZA; MAGNANI; BEGHINI, 2005; YU et al., 2006). Sampath e colaboradores em 2006, encontraram uma associação entre a ativação de JNK e a resposta ao Ara-c. Além disso, este estudo sugeriu um provável papel da ativação de JNK como um indicador de resposta à quimioterapia em pacientes com LMA, não sendo, portanto, restrita as antraciclina (SAMPATH et al., 2006). Outro estudo também relatou que o Ara-c era capaz de induzir a fosforilação tanto de JNK quanto de p38 e mostrou

que a inibição de p38 reduziu a fragmentação do DNA e os níveis de caspase 3 clivada induzidos pelo tratamento com o Ara-c (STADHEIM; SALUTA; KUCERA, 2000).

Em seguida, utilizamos duas linhagens resistentes, a DNR (U937R) e ao Ara-c (HL60R) e avaliamos a ativação por fosforilação de JNK e p38 induzida pelos quimioterápicos DNR e Ara-c, respectivamente. Nossos resultados mostraram que tanto a DNR quanto o Ara-c não induzem a fosforilação de JNK e p38 nos mesmos tempos de incubação os quais foi verificado para as linhagens HL60 e U937, e tampouco em tempos tardios. Lagadinou e colaboradores em 2008, também visualizaram o mesmo efeito, quando trataram com DNR, a linhagem U937 resistente a doxorrubicina, por 60 minutos. Os autores mantiveram a cinética até 6h e não visualizaram indução de fosforilação (LAGADINOU et al., 2008). Este resultado sugere um possível papel da ativação de JNK e/ou p38 na apoptose induzida por quimioterápicos em linhagens de LMA.

Os níveis de fosforilação basal de diversas proteínas nas linhagens HL60 e HL60R foram analisados através de um array de proteínas fosforiladas. A fosforilação de algumas proteínas na linhagem HL60R encontravam-se aumentadas, como Fyn, RSK, Hck, PYK2, WNK e AKT, importantes para a proliferação celular, progressão tumoral, invasão e metástase (GALVIN et al., 2013; PARK; PARK; KIM, 2008; POH; O'DONOGHUE; ERNST, 2015; RICCIARDI et al., 2017; SINGH et al., 2012). Além de STAT3, importante para transformação maligna e efeitos antiapoptóticos (FORBES; MILNER; HADDAD, 2016). Outros níveis de fosforilação encontravam-se inibidos como as proteínas Lyn, p27, p38 MAPK e JNK MAPK importantes para o processo de indução de apoptose pelo Ara-c. Esses achados corroboram os resultados encontrados com a cinética de indução de fosforilação. Algumas das proteínas investigadas no array até o momento não foram

relacionadas com a resistência ao Ara-c. Os dados do array estão sendo validados em outro projeto do nosso laboratório.

Seguimos então, para o silenciamento da expressão proteica de JNK e p38, por siRNA, a fim de verificar seus efeitos na morte celular induzida pelas antraciclinas e pelo Ara-c. Realizamos o silenciamento apenas das linhagens Kasumi e U937. A linhagem HL60, além de ser muito sensível ao tratamento com os quimioterápicos, o que provavelmente não resultaria em uma expressiva alteração da morte celular modulando apenas uma única via de sinalização, também apresentou baixa redução dos níveis das proteínas JNK e p38 após silenciamento e por isso não foi utilizada para os experimentos posteriores. Verificamos que a inibição de JNK e p38 diminui a indução de fragmentação nas linhagens Kasumi e U937 pelo tratamento com IDA e DNR, sugerindo que a expressão dessas proteínas desempenha um papel na resistência aos quimioterápicos. Vários trabalhos já utilizaram siRNA para JNK com o objetivo de reverter a morte celular induzida por quimioterápicos. Peng e colaboradores em 2016, mostraram que o tratamento com o siRNA para JNK reverteu a morte celular induzida pelo Paclitaxel na linhagem U937 (PENG et al., 2016), o mesmo foi observado para as linhagens K562, HL60 e U937 utilizando novos compostos (GAO et al., 2009; WU et al., 2015). No entanto, apenas um artigo mostrou que a inibição de JNK, na linhagem U937, resultava em uma diminuição da morte celular induzida pelos quimioterápicos DNR e DOX (LAGADINOU et al., 2008). Em relação a p38, sua ativação foi demonstrada como importante fator para indução de morte celular pelo Dasatinibe, em pacientes com LMC (DUMKA et al., 2009) e por novos compostos (HUANG et al., 2014). No entanto, até o momento não há relatos na literatura mostrando que a inibição de p38 resultaria em uma indução de resistência aos quimioterápicos utilizados no tratamento da LMA.

Considerando uma possível associação entre JNK, p38 e a Pgp, demonstrada por diversos estudos (BARK; CHOI, 2010; CHEN; BIAN; ZENG, 2014; GUO et al., 2008; LIU et al., 2008; WAGNER; NEBRED, 2009) e a ausência de relatos na literatura sobre a associação de JNK, p38 e a Pgp na LMA. Nós verificamos se as células silenciadas para JNK ou p38 apresentavam variações na expressão da Pgp (proteína de membrana). Verificamos que o silenciamento de JNK e p38 resulta no aumento da expressão da Pgp na linhagem Kasumi e U937, mas após 96h de transfecção este fenótipo é revertido na linhagem U937. Kang e colaboradores em 2000, foram os primeiros a demonstrar, em linhagens de camundongo Pgp positivas, que estas apresentavam níveis significativamente menores de fosforilação basal de JNK mesmo quando estimulados por drogas que induziam aumento nos níveis de fosforilação dessa proteína (KANG et al., 2000). Bark e colaboradores em 2010, publicaram que o PSC833, um análogo na ciclosporina, diminuía a expressão do RNAm da Pgp (MDR1) ativando a via de JNK em linhagens de câncer de pulmão (BARK; CHOI, 2010). Em relação a p38, Chen e colaboradores em 2012 mostraram o contrário, que a inibição farmacológica de p38 resultava em uma diminuição da expressão da Pgp em uma linhagem de LMC resistente. (CHEN et al., 2012). No entanto, as proteínas envolvidas na regulação entre as MAPKs e a Pgp ainda não foram elucidadas.

Foi relatado que os níveis de expressão da Pgp em amostras de pacientes aumentam na recidiva quando comparados com as mesmas amostras ao diagnóstico (FENG et al., 2011). Sendo assim, muitos grupos se concentraram em compreender o mecanismo molecular que regula a Pgp e a relação entre expressão da Pgp e o prognóstico da LMA (FENG et al., 2011). No entanto, as tentativas de se modular a Pgp na LMA não demonstraram um claro benefício (KOLITZ et al., 2010). Já foi relatado que o miR-27a estimula a expressão do gene MDR1/Pgp em linhagens celulares de tumores sólidos (FENG et al., 2011; LI et al., 2010; ZHU et al., 2008). Li e colaboradores em 2010, demonstraram que a utilização de inibidores

para o miR-27a, diminuía a expressão da Pgp (níveis de RNAm e proteína) mediante aumento da expressão de HIPK2, em linhagens de câncer de ovário, mostrando uma possível regulação do miR-27a e a Pgp através de HIPK2 (LI et al., 2010). Além disso, Min e colaboradores em 2012, mostraram que o miR-27a pode alterar os níveis de fosforilação de JNK e p38 em células dendríticas na presença de LPS (MIN et al., 2012). Pan e colaboradores em 2014, também demonstraram que a MAP2K4 é alvo direto do miR-27a, sendo MAP3K4 um ativador da via de JNK (PAN et al., 2014, p. 201). Por isso, investigamos os níveis de expressão do miR-27a, por PCR quantitativo, nas linhagens de LMA após silenciamento com siRNA para JNK. Os níveis de expressão do miR-27a estavam aumentados em ambas as linhagens em relação ao controle (scramble). Como o miR-27a pode regular negativamente a via de JNK mediante MAP3K4, é possível que exista uma regulação oposta em LMA, onde a inibição da via de JNK e p38 induza o aumento dos níveis de miR-27a e consequentemente aumento da Pgp via HIPK2.

Há apenas, um relato na literatura sobre a relação entre a Pgp e o miR-27a em leucemias. No entanto, Feng e colaboradores em 2011, observaram o inverso. Eles mostraram que a expressão do miR-27a é inversamente correlacionada com a expressão da Pgp. Este foi o único estudo que analisou a expressão do miR-27a em amostras de pacientes com LMA, 11 amostras ao total, em 3 momentos diferentes: Ao diagnóstico, em remissão e na recidiva. Eles verificaram uma diminuição nos níveis do miR-27a em amostras de pacientes com remissão completa e também em amostras de pacientes em recidiva em comparação com a mesma amostra ao diagnóstico (FENG et al., 2011). Nós avaliamos os níveis de expressão do miR-27 em 40 amostras de pacientes ao diagnóstico e comparamos com outras características clínicas e laboratoriais destes pacientes. Nós verificamos um aumento nos níveis de expressão do miR-27a nos pacientes que apresentaram expressão da Pgp positiva ($p=0.049$), nos pacientes adultos, nos pacientes que não entraram em remissão após quimioterapia e no grupo de

pacientes com o subtipo M4 (Classificação FAB). Mas os níveis de expressão do miR-27 também foram maiores nos pacientes em remissão quando comparados com os pacientes em recidiva, como mostrado por Feng e colaboradores em 2011. No entanto, apesar dos achados em linhagens, verificamos uma baixa correlação entre a expressão do miR-27a e a expressão da Pgp ao diagnóstico e um impacto na sobrevida global apenas quando analisamos os pacientes após 12 meses de tratamento. Atribuímos a não visualização de diferenças na sobrevida global (durante todo o período) em relação aos níveis de expressão do miR-27a, a predominância de indivíduos adultos em nossa coorte (74%). O que quase certamente resultaria, após 8 anos de acompanhamento, em outros desfechos que podem ter influenciado a sobrevida global.

As tecnologias de edição do genoma permitem a modificação de qualquer parte do DNA humano com extrema precisão. Apenas recentemente, estas tecnologias foram consideradas como uma opção viável para o estudo da patogênese das neoplasias hematológicas e para fins terapêuticos, tendo o potencial incrementar os estudos na área da oncologia (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; PELLAGATTI et al., 2016). A tecnologia do CRISPR/Cas9 foi utilizada em leucemias, para silenciar o gene *C4BPB* na linhagem K562 (CHO et al., 2013), para induzir a translocação (8;21) em células tronco de origem mielóide CD34+ (TORRES et al., 2014), para editar o gene *MLL3* envolvido em eventos que promovem a leucemogênese em LMA com -7/del(7q) (CHEN et al., 2014), entre outros. Utilizamos, pela primeira vez a tecnologia do CRISPR para editar/silenciar os genes JNK e p38 nas linhagens de LMA, com o objetivo que verificar seu papel na resistência ao tratamento. Apenas as linhagens HL60 e U937 serão testadas para a presença de edição no gene de JNK ou de p38. A linhagem Kasumi, não retomou a proliferação celular após transfecção com os plasmídeos. É possível que a linhagem Kasumi necessite de outros métodos de eletroporação a fim de reduzir a taxa de morte celular. Além disso a quebra na

dupla fita de DNA também pode induzir senescência ou apoptose ao invés do reparo do DNA, o que pode inviabilizar a técnica do CRISPR (RAN et al., 2013).

9. Considerações finais

O conjunto dos nossos dados mostra que as linhagens celulares de LMA apresentam diferentes perfis de sensibilidade e resistência aos quimioterápicos empregados atualmente no tratamento da LMA, servindo como importante modelo de estudo de resistência. Alterações em proteínas que participam da via da apoptose parecem ser determinantes no processo de desenvolvimento de resistência aos quimioterápicos. Sendo assim, as vias de sinalização envolvendo a família das MAPKs podem estar relacionadas à resistência a drogas em neoplasias, uma vez que são importantes para apoptose induzida por estresse. Verificamos que as MAPKs JNK e p38 são fosforiladas em resposta ao tratamento com os quimioterápicos e diminuem a fosforilação nas linhagens resistentes. A modulação da expressão das MAPKs foi capaz de diminuir a sensibilidade aos quimioterápicos, aumentar a expressão da Pgp e do miR-27a. A utilização de amostras de pacientes no presente estudo, permitiu a verificação de uma possível associação entre o miR-27a, a Pgp e diferentes características clínicas. A aplicação *in vitro* de concentrações dos quimioterápicos compatíveis com aquelas empregadas clinicamente tem o potencial de auxiliar na transferência dos nossos resultados para o cenário clínico. A técnica do CRISPR visa identificar vulnerabilidades genéticas em células de LMA sendo de extrema importância para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Tendo em vista que a LMA é uma doença altamente heterogênea, resultados obtidos a partir de modelos *in vitro* baseados em três linhagens celulares e em amostras de pacientes buscam auxiliar no melhor entendimento da biologia da doença. Nossos dados experimentais podem

auxiliar na compreensão das alterações moleculares que levam ao desenvolvimento de resistência aos quimioterápicos.

10. Conclusões

- As linhagens de LMA, HL60, Kasumi e U937, apresentam uma evolução clonal quanto ao padrão cromossômico e um perfil imunofenotípico semelhante ao descrito na literatura para a linhagem Kasumi;
- As linhagens de LMA, HL60, Kasumi e U937 apresentam diferentes perfis de sensibilidade e resistência à morte celular após tratamento com os quimioterápicos utilizados atualmente na clínica, sendo a HL60 a linhagem mais sensível, seguida da Kasumi e U937, além disso apresentaram padrões diferentes de expressão de proteínas relacionada com a apoptose;
- As antraciclinas induzem fragmentação do DNA e apoptose dependente de caspase-3 nas linhagens de LMA, HL60, Kasumi e U937.
- O Ara-c induz fragmentação do DNA e apoptose dependente de caspase-3 nas linhagens de LMA, HL60 e U937, mas não na linhagem Kasumi.
- A exposição das células as antraciclinas e ao Ara-c aumenta a fosforilação de JNK e p38 em linhagens de LMA. No entanto, a DNR e o Ara-c não induzem a fosforilação de JNK e p38 nas linhagens de LMA resistentes;
- O array de fosforilação mostra alterações no perfil de fosforilação de diversas proteínas na linhagem resistente ao Ara-c, como JNK e p38, corroborando os resultados encontrados com a cinética de fosforilação;
- O silenciamento da expressão de JNK e p38, por siRNA, aumentou a resistência à morte celular induzida pelas antraciclinas na linhagem Kasumi e U937, a expressão da Pgp e do miR-27a;

- A análise dos níveis de expressão do miR-27a em amostras de pacientes com LMA apresentou correlação baixa com a expressão da Pgp e associação com a sobrevida global apenas em 12 meses;

11. Conclusão Geral

A modulação negativa da via de JNK e p38 aumenta a expressão da Pgp e do miR-27a em linhagens de LMA resultando em um fenótipo de resistência ao tratamento.

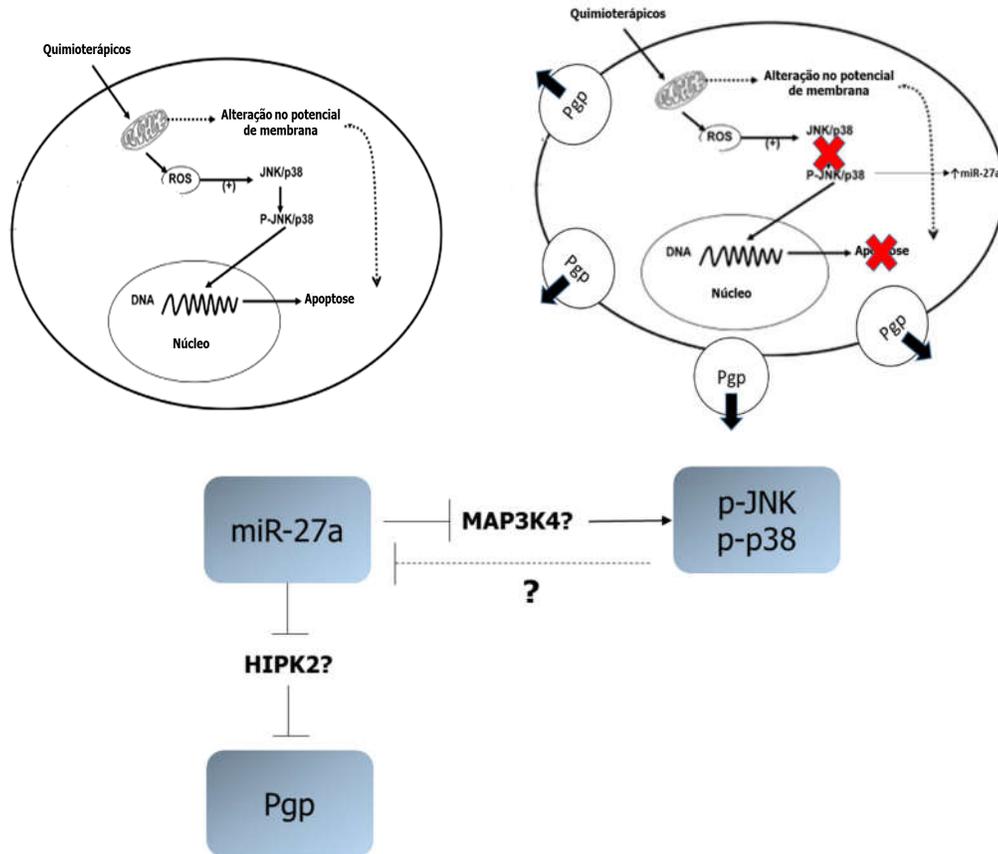


Figura 11.1: Esquema resumindo alguns resultados encontrados e possíveis alvos de regulação

12. Perspectivas

- Aumentar o número de amostras de medula óssea analisadas para expressão do miR-27a;
- Avaliar os níveis do miR-27a nas linhagens Kasumi e U937, silenciadas para JNK após 96h de transfecção, e silenciadas para p38 nos tempos de 72h e 96h após a transfecção;
- Analisar a fosforilação de JNK e p38 nas amostras de pacientes com LMA, correlacionando com as características clínicas, expressão da Pgp e resposta a terapia de indução de remissão;
- Avaliar a presença de edições genômicas, por clonagem e sequenciamento, nos genes de JNK e p38 pela metodologia do CRISPR.

13. Referências

- ABRAHAM, A. et al. RNA expression of genes involved in cytarabine metabolism and transport predicts cytarabine response in acute myeloid leukemia. **Pharmacogenomics**, v. 16, n. 8, p. 877–890, jul. 2015.
- ADVANI, A. S. Targeting the c-kit receptor in the treatment of acute myelogenous leukemia. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 1, n. 2, p. 101–107, jun. 2006.
- AHMED, N. et al. Ajoene, a garlic-derived natural compound, enhances chemotherapy-induced apoptosis in human myeloid leukaemia CD34-positive resistant cells. **Anticancer Research**, v. 21, n. 5, p. 3519–3523, out. 2001.
- ALLEN, C. et al. The importance of relative mutant level for evaluating impact on outcome of KIT, FLT3 and CBL mutations in core-binding factor acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 27, n. 9, p. 1891–1901, set. 2013.
- APPELBAUM, F. R. et al. Age and acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 107, n. 9, p. 3481–3485, 1 maio 2006.
- ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391–2405, 19 maio 2016.
- BARAN, Y. et al. Upregulation of multi drug resistance genes in doxorubicin resistant human acute myelogenous leukemia cells and reversal of the resistance. **Hematology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 12, n. 6, p. 511–517, dez. 2007.
- BARK, H. et al. P-glycoprotein down-regulates expression of breast cancer resistance protein in a drug-free state. **FEBS letters**, v. 582, n. 17, p. 2595–2600, 23 jul. 2008.
- BARK, H.; CHOI, C.-H. PSC833, cyclosporine analogue, downregulates MDR1 expression by activating JNK/c-Jun/AP-1 and suppressing NF-kappaB. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 65, n. 6, p. 1131–1136, maio 2010.
- BENDERRA, Z. et al. Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 10, n. 23, p. 7896–7902, 1 dez. 2004.
- BIGNOLD, L. P.; COGHLAN, B. L. D.; JERSMANN, H. P. A. Cancer morphology, carcinogenesis and genetic instability: a background. **EXS**, n. 96, p. 1–24, 2006.
- BLOOMFIELD, C. D. et al. Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1982: Clinical significance of chromosomal abnormalities in acute nonlymphoblastic leukemia. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 11, n. 3, p. 332–350, mar. 1984.
- BRABETZ, O. et al. RNA-Guided CRISPR-Cas9 System-Mediated Engineering of Acute Myeloid Leukemia Mutations. **Molecular Therapy. Nucleic Acids**, v. 6, p. 243–248, 17 mar. 2017.
- BRANCHO, D. et al. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. **Genes & Development**, v. 17, n. 16, p. 1969–1978, 15 ago. 2003.

- BREEMS, D. A. et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 26, n. 29, p. 4791–4797, 10 out. 2008.
- BREIER, A. et al. New insight into p-glycoprotein as a drug target. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 159–170, jan. 2013.
- BÜCHNER, T. et al. Age-related risk profile and chemotherapy dose response in acute myeloid leukemia: a study by the German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 27, n. 1, p. 61–69, 1 jan. 2009.
- BULAVIN, D. V.; FORNACE, A. J. p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. **Advances in Cancer Research**, v. 92, p. 95–118, 2004.
- BULLINGER, L.; FRÖHLING, S. Array-based cytogenetic approaches in acute myeloid leukemia: clinical impact and biological insights. **Seminars in Oncology**, v. 39, n. 1, p. 37–46, fev. 2012.
- BURNETT, A. K. et al. A comparison of low-dose cytarabine and hydroxyurea with or without all-trans retinoic acid for acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome in patients not considered fit for intensive treatment. **Cancer**, v. 109, n. 6, p. 1114–1124, 15 mar. 2007.
- BURNETT, A. K. et al. The impact on outcome of the addition of all-trans retinoic acid to intensive chemotherapy in younger patients with nonacute promyelocytic acute myeloid leukemia: overall results and results in genotypic subgroups defined by mutations in NPM1, FLT3, and CEBPA. **Blood**, v. 115, n. 5, p. 948–956, 4 fev. 2010.
- BURNETT, A. K. Treatment of acute myeloid leukemia: are we making progress? **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 2012, p. 1–6, 2012.
- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 22, p. 2059–2074, 30 2013.
- CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 75, n. 1, p. 50–83, mar. 2011.
- CHATTERJEE, N. et al. Lipid from infective *L. donovani* regulates acute myeloid cell growth via mitochondria dependent MAPK pathway. **PloS One**, v. 10, n. 3, p. e0120509, 2015.
- CHAUDHURY, S. S. et al. Insights into cell ontogeny, age, and acute myeloid leukemia. **Experimental Hematology**, v. 43, n. 9, p. 745–755, set. 2015.
- CHEN, C. et al. MLL3 is a haploinsufficient 7q tumor suppressor in acute myeloid leukemia. **Cancer Cell**, v. 25, n. 5, p. 652–665, 12 maio 2014.

- CHEN, Q.; BIAN, Y.; ZENG, S. Involvement of AP-1 and NF- κ B in the up-regulation of P-gp in vinblastine resistant Caco-2 cells. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 29, n. 2, p. 223–226, 2014.
- CHEN, Y. et al. Inhibition of p38 MAPK diminishes doxorubicin-induced drug resistance associated with P-glycoprotein in human leukemia K562 cells. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 18, n. 10, p. BR383-388, out. 2012.
- CHICAYBAM, L. et al. An Efficient Electroporation Protocol for the Genetic Modification of Mammalian Cells. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 4, p. 99, 2016.
- CHIU, S.-J. et al. Regulation of gamma-H2AX and securin contribute to apoptosis by oxaliplatin via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in human colorectal cancer cells. **Toxicology Letters**, v. 179, n. 2, p. 63–70, 30 jun. 2008.
- CHIU, Y.-C. et al. Prognostic significance of NPM1 mutation-modulated microRNA-mRNA regulation in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 30, n. 2, p. 274–284, fev. 2016.
- CHO, S. W. et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 230–232, mar. 2013.
- CHOI, C.-H. et al. Balance of NF-kappaB and p38 MAPK is a determinant of radiosensitivity of the AML-2 and its doxorubicin-resistant cell lines. **Leukemia Research**, v. 31, n. 9, p. 1267–1276, set. 2007.
- CLARKE, N. et al. TRAIL: at the center of drugable anti-tumor pathways. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 4, n. 7, p. 914–918, jul. 2005.
- COSTA, A. F. O. et al. Role of new Immunophenotypic Markers on Prognostic and Overall Survival of Acute Myeloid Leukemia: a Systematic Review and Meta-Analysis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4138, 23 jun. 2017.
- COTTIER, M. et al. Cytogenetic characterization of seven human cancer cell lines by combining G- and R-banding, M-FISH, CGH and chromosome- and locus-specific FISH. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 14, n. 4, p. 483–495, out. 2004.
- CREUTZIG, U. et al. Significance of age in acute myeloid leukemia patients younger than 30 years: a common analysis of the pediatric trials AML-BFM 93/98 and the adult trials AMLCG 92/99 and AMLSG HD93/98A. **Cancer**, v. 112, n. 3, p. 562–571, 1 fev. 2008.
- CRIFE, L. D. et al. Role for c-jun N-terminal kinase in treatment-refractory acute myeloid leukemia (AML): signaling to multidrug-efflux and hyperproliferation. **Leukemia**, v. 16, n. 5, p. 799–812, maio 2002.
- CRIFE, L. D. et al. Zosuquidar, a novel modulator of P-glycoprotein, does not improve the outcome of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a randomized, placebo-controlled trial of the Eastern Cooperative Oncology Group 3999. **Blood**, v. 116, n. 20, p. 4077–4085, 18 nov. 2010.

- CRIVELLARI, D. et al. New oral drugs in older patients: a review of idarubicin in elderly patients. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 49, n. 2, p. 153–163, fev. 2004.
- CUADRADO, A.; NEBREDA, A. R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. **The Biochemical Journal**, v. 429, n. 3, p. 403–417, 1 ago. 2010.
- CUENDA, A.; ROUSSEAU, S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1773, n. 8, p. 1358–1375, ago. 2007.
- DALMAY, T. Identification of genes targeted by microRNAs. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, n. Pt 6, p. 1194–1196, dez. 2008.
- DASH, A.; GILLILAND, D. G. Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. **Best Practice & Research. Clinical Haematology**, v. 14, n. 1, p. 49–64, mar. 2001.
- DAVISON, K. et al. JNK activation is a mediator of arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. **Blood**, v. 103, n. 9, p. 3496–3502, 1 maio 2004.
- DAWSON, J. M.; HEATLIE, P. L. Lowry method of protein quantification: evidence for photosensitivity. **Analytical Biochemistry**, v. 140, n. 2, p. 391–393, 1 ago. 1984.
- DEACON, K. et al. p38 Mitogen-activated protein kinase mediates cell death and p21-activated kinase mediates cell survival during chemotherapeutic drug-induced mitotic arrest. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, n. 5, p. 2071–2087, maio 2003.
- DECLÈVES, X. et al. Is P-glycoprotein (ABCB1) a phase 0 or a phase 3 colchicine transporter depending on colchicine exposure conditions? **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 217, n. 2, p. 153–160, 1 dez. 2006.
- DEL POETA, G. et al. Deregulation of the mitochondrial apoptotic machinery and development of molecular targeted drugs in acute myeloid leukemia. **Current Cancer Drug Targets**, v. 8, n. 3, p. 207–222, maio 2008.
- DEMBITZ, V. et al. The mechanism of synergistic effects of arsenic trioxide and rapamycin in acute myeloid leukemia cell lines lacking typical t(15;17) translocation. **International Journal of Hematology**, v. 102, n. 1, p. 12–24, jul. 2015.
- DOHNER, H. et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, v. 115, n. 3, p. 453–474, 21 jan. 2010.
- DOMBRET, H.; RAFFOUX, E.; GARDIN, C. Acute myeloid leukemia in the elderly. **Seminars in Oncology**, v. 35, n. 4, p. 430–438, ago. 2008.
- DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science (New York, N.Y.)**, v. 346, n. 6213, p. 1258096, 28 nov. 2014.
- DREXLER, H. G.; MACLEOD, R. A. F. Leukemia-lymphoma cell lines as model systems for hematopoietic research. **Annals of Medicine**, v. 35, n. 6, p. 404–412, 2003.

- DUMKA, D. et al. Activation of the p38 Map kinase pathway is essential for the antileukemic effects of dasatinib. **Leukemia & Lymphoma**, v. 50, n. 12, p. 2017–2029, dez. 2009.
- DUPUIS, M. L. et al. Raltegravir does not revert efflux activity of MDR1-P-glycoprotein in human MDR cells. **BMC pharmacology & toxicology**, v. 14, p. 47, 20 set. 2013.
- ESPOSITO, M. T.; SO, C. W. E. DNA damage accumulation and repair defects in acute myeloid leukemia: implications for pathogenesis, disease progression, and chemotherapy resistance. **Chromosoma**, v. 123, n. 6, p. 545–561, dez. 2014.
- ESTEY, E. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in older patients. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 25, n. 14, p. 1908–1915, 10 maio 2007.
- ESTEY, E. H. Acute myeloid leukemia: 2014 update on risk-stratification and management. **American Journal of Hematology**, v. 89, n. 11, p. 1063–1081, nov. 2014.
- ESVELT, K. M. et al. Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. **eLife**, v. 3, 17 jul. 2014.
- FARAZI, T. A. et al. MicroRNAs in human cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 774, p. 1–20, 2013.
- FAVALORO, B. et al. Role of apoptosis in disease. **Aging**, v. 4, n. 5, p. 330–349, maio 2012.
- FENG, D.-D. et al. Down-regulated miR-331-5p and miR-27a are associated with chemotherapy resistance and relapse in leukaemia. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 10, p. 2164–2175, out. 2011.
- FERRARA, F.; SCHIFFER, C. A. Acute myeloid leukaemia in adults. **Lancet (London, England)**, v. 381, n. 9865, p. 484–495, 9 fev. 2013.
- FORBES, L. R.; MILNER, J.; HADDAD, E. Signal transducer and activator of transcription 3: a year in review. **Current Opinion in Hematology**, v. 23, n. 1, p. 23–27, jan. 2016.
- GALLIPOLI, P.; GIOTOPOULOS, G.; HUNTLY, B. J. P. Epigenetic regulators as promising therapeutic targets in acute myeloid leukemia. **Therapeutic Advances in Hematology**, v. 6, n. 3, p. 103–119, jun. 2015.
- GALVIN, J. P. et al. Regulation of the kinase RSK1 by arsenic trioxide and generation of antileukemic responses. **Cancer Biology & Therapy**, v. 14, n. 5, p. 411–416, maio 2013.
- GAO, N. et al. Induction of Apoptosis in Human Leukemia Cells by Grape Seed Extract Occurs via Activation of c-Jun NH2-Terminal Kinase. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 1, p. 140–149, 1 jan. 2009.
- GAZDAR, A. F. et al. Lung cancer cell lines as tools for biomedical discovery and research. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, n. 17, p. 1310–1321, 8 set. 2010.
- GERLOFF, D. et al. NF-κB/STAT5/miR-155 network targets PU.1 in FLT3-ITD-driven acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 29, n. 3, p. 535–547, mar. 2015.

- GERSBACH, C. A.; PEREZ-PINERA, P. Activating human genes with zinc finger proteins, transcription activator-like effectors and CRISPR/Cas9 for gene therapy and regenerative medicine. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 18, n. 8, p. 835–839, ago. 2014.
- GILLILAND, D. G.; TALLMAN, M. S. Focus on acute leukemias. **Cancer Cell**, v. 1, n. 5, p. 417–420, jun. 2002.
- GOJO, I.; KARP, J. E. New strategies in acute myelogenous leukemia: leukemogenesis and personalized medicine. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 20, n. 24, p. 6233–6241, 15 dez. 2014.
- GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nature Reviews. Cancer**, v. 2, n. 1, p. 48–58, jan. 2002.
- GRIMWADE, D. et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. **Blood**, v. 116, n. 3, p. 354–365, 22 jul. 2010.
- GRUNDY, M. et al. P-glycoprotein and breast cancer resistance protein in acute myeloid leukaemia cells treated with the aurora-B kinase inhibitor barasertib-hQPA. **BMC cancer**, v. 11, p. 254, 16 jun. 2011.
- GUENOVA, M. L. et al. An anti-apoptotic pattern correlates with multidrug resistance in acute myeloid leukemia patients: a comparative study of active caspase-3, cleaved PARPs, Bcl-2, Survivin and MDR1 gene. **Hematology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 15, n. 3, p. 135–143, jun. 2010.
- GUO, X. et al. Increased p38-MAPK is responsible for chemotherapy resistance in human gastric cancer cells. **BMC cancer**, v. 8, p. 375, 18 dez. 2008.
- HAMPRAS, S. S. et al. Genetic polymorphisms of ATP-binding cassette (ABC) proteins, overall survival and drug toxicity in patients with Acute Myeloid Leukemia. **International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics**, v. 1, n. 3, p. 201–207, 2010.
- HATZL, S. et al. Increased Expression of miR-23a Mediates a Loss of Expression in the RAF Kinase Inhibitor Protein RKIP. **Cancer Research**, v. 76, n. 12, p. 3644–3654, 15 jun. 2016.
- HAYHOE, F. G. Classification of acute leukaemias. **Blood Reviews**, v. 2, n. 3, p. 186–193, set. 1988.
- HE, S. et al. P-Glycoprotein/MDR1 regulates pokemon gene transcription through p53 expression in human breast cancer cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 9, p. 3309–3051, 27 ago. 2010.
- HERMEKING, H. MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumour suppression. **Nature Reviews. Cancer**, v. 12, n. 9, p. 613–626, set. 2012.
- HIGUCHI, M. et al. Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia. **Cancer Cell**, v. 1, n. 1, p. 63–74, fev. 2002.

- HOLT, S. V. et al. Down-regulation of XIAP by AEG35156 in paediatric tumour cells induces apoptosis and sensitises cells to cytotoxic agents. **Oncology Reports**, v. 25, n. 4, p. 1177–1181, abr. 2011.
- HOMMES, D. W.; PEPPELENBOSCH, M. P.; VAN DEVENTER, S. J. H. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. **Gut**, v. 52, n. 1, p. 144–151, jan. 2003.
- HONG, W.-J.; MEDEIROS, B. C. Unfavorable-risk cytogenetics in acute myeloid leukemia. **Expert Review of Hematology**, v. 4, n. 2, p. 173–184, abr. 2011.
- HOU, Z. et al. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 39, p. 15644–15649, 24 set. 2013.
- HOWLADER, N. et al. Providing clinicians and patients with actual prognosis: cancer in the context of competing causes of death. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, v. 2014, n. 49, p. 255–264, nov. 2014.
- HU, Y. et al. A very early induction of major vault protein accompanied by increased drug resistance in U-937 cells. **International Journal of Cancer**, v. 97, n. 2, p. 149–156, 10 jan. 2002.
- HUANG, H.-L. et al. Glabridin mediate caspases activation and induces apoptosis through JNK1/2 and p38 MAPK pathway in human promyelocytic leukemia cells. **PloS One**, v. 9, n. 6, p. e98943, 2014.
- HUANG, H.-L. et al. Timosaponin AIII mediates caspase activation and induces apoptosis through JNK1/2 pathway in human promyelocytic leukemia cells. **Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 36, n. 5, p. 3489–3497, maio 2015.
- HUET, S. et al. Reference method for detection of Pgp mediated multidrug resistance in human hematological malignancies: a method validated by the laboratories of the French Drug Resistance Network. **Cytometry**, v. 34, n. 6, p. 248–256, 15 dez. 1998.
- HUNGERFORD, D. A. Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl. **Stain Technology**, v. 40, n. 6, p. 333–338, nov. 1965.
- HÜTTER, G. et al. High correlation of the proteome patterns in bone marrow and peripheral blood blast cells in patients with acute myeloid leukemia. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, p. 7, 15 jan. 2009.
- INOUE, T. et al. Multicolor analysis of cell surface marker of human leukemia cell lines using flow cytometry. **Anticancer Research**, v. 34, n. 8, p. 4539–4550, ago. 2014.
- JAWAD, M. et al. Targeting of CD34+CD38- cells using Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in combination with tipifarnib (Zarnestra) in Acute Myeloid Leukaemia. **BMC cancer**, v. 12, p. 431, 26 set. 2012.

- JINEK, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 17 ago. 2012.
- JOHNSON, G. L.; NAKAMURA, K. The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1773, n. 8, p. 1341–1348, ago. 2007.
- JONGEN-LAVRENCIC, M. et al. MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 5078–5085, 15 maio 2008.
- JULIUSSON, G. et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. **Blood**, v. 113, n. 18, p. 4179–4187, 30 abr. 2009.
- JURKOVICOVA, D. et al. microRNA expression profiling as supportive diagnostic and therapy prediction tool in chronic myeloid leukemia. **Neoplasma**, v. 62, n. 6, p. 949–958, 2015.
- KANG, C. D. et al. Downregulation of JNK/SAPK activity is associated with the cross-resistance to P-glycoprotein-unrelated drugs in multidrug-resistant FM3A/M cells overexpressing P-glycoprotein. **Experimental Cell Research**, v. 256, n. 1, p. 300–307, 10 abr. 2000.
- KAO, J. et al. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. **PLoS One**, v. 4, n. 7, p. e6146, 3 jul. 2009.
- KHAVARI, T. A.; RINN, J. Ras/Erk MAPK signaling in epidermal homeostasis and neoplasia. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 6, n. 23, p. 2928–2931, 1 dez. 2007.
- KIM, H.-S. et al. Induction of apoptosis by obovatol as a novel therapeutic strategy for acute myeloid leukemia. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 34, n. 6, p. 1675–1680, dez. 2014.
- KOBUNE, M. et al. Drug resistance is dramatically restored by hedgehog inhibitors in CD34+ leukemic cells. **Cancer Science**, v. 100, n. 5, p. 948–955, maio 2009.
- KOLITZ, J. E. et al. P-glycoprotein inhibition using valsopodar (PSC-833) does not improve outcomes for patients younger than age 60 years with newly diagnosed acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B study 19808. **Blood**, v. 116, n. 9, p. 1413–1421, 2 set. 2010.
- KRUG, U. et al. Complete remission and early death after intensive chemotherapy in patients aged 60 years or older with acute myeloid leukaemia: a web-based application for prediction of outcomes. **Lancet (London, England)**, v. 376, n. 9757, p. 2000–2008, 11 dez. 2010.
- KURANDA, K. et al. Expression of CD34 in hematopoietic cancer cell lines reflects tightly regulated stem/progenitor-like state. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 5, p. 1277–1285, maio 2011.

- KURATA, M. et al. Using genome-wide CRISPR library screening with library resistant DCK to find new sources of Ara-C drug resistance in AML. **Scientific Reports**, v. 6, p. 36199, 3 nov. 2016.
- LACROIX, M.; LECLERCQ, G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 83, n. 3, p. 249–289, fev. 2004.
- LAGADINOU, E. D. et al. c-Jun N-terminal kinase activation failure is a new mechanism of anthracycline resistance in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 22, n. 10, p. 1899–1908, out. 2008.
- LANCET, J. E.; KARP, J. E. Novel postremission strategies in adults with acute myeloid leukemia. **Current Opinion in Hematology**, v. 16, n. 2, p. 105–111, mar. 2009.
- LARIZZA, L.; MAGNANI, I.; BEGHINI, A. The Kasumi-1 cell line: a t(8;21)-kit mutant model for acute myeloid leukemia. **Leukemia & Lymphoma**, v. 46, n. 2, p. 247–255, fev. 2005.
- LAURENT, G.; JAFFRÉZOU, J. P. Signaling pathways activated by daunorubicin. **Blood**, v. 98, n. 4, p. 913–924, 15 ago. 2001.
- LEBEDEVA, I. V.; PANDE, P.; PATTON, W. F. Sensitive and specific fluorescent probes for functional analysis of the three major types of mammalian ABC transporters. **PloS One**, v. 6, n. 7, p. e22429, 2011.
- LEE, J.-Y. et al. Molecular cytogenetic analysis of the monoblastic cell line U937. karyotype clarification by G-banding, whole chromosome painting, microdissection and reverse painting, and comparative genomic hybridization. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 137, n. 2, p. 124–132, set. 2002.
- LI, Y. et al. Gene silencing of FANCF potentiates the sensitivity to mitoxantrone through activation of JNK and p38 signal pathways in breast cancer cells. **PloS One**, v. 7, n. 8, p. e44254, 2012.
- LI, Z. et al. MiR-27a modulates MDR1/P-glycoprotein expression by targeting HIPK2 in human ovarian cancer cells. **Gynecologic Oncology**, v. 119, n. 1, p. 125–130, out. 2010.
- LIERSCH, R. et al. Prognostic factors for acute myeloid leukaemia in adults--biological significance and clinical use. **British Journal of Haematology**, v. 165, n. 1, p. 17–38, abr. 2014.
- LING, S. et al. Decreased microRNA-206 and its function in cervical cancer. **European Journal of Gynaecological Oncology**, v. 36, n. 6, p. 716–721, 2015.
- LIU, M. et al. Modulation of multidrug resistance in cancer cells by the E3 ubiquitin ligase seven-in-absentia homologue 1. **The Journal of Pathology**, v. 214, n. 4, p. 508–514, mar. 2008.
- LIU YIN, J. A. et al. Comparison of “sequential” versus “standard” chemotherapy as re-induction treatment, with or without cyclosporine, in refractory/relapsed acute myeloid

- leukaemia (AML): results of the UK Medical Research Council AML-R trial. **British Journal of Haematology**, v. 113, n. 3, p. 713–726, jun. 2001.
- LO-COCO, F. et al. Biology and management of therapy-related acute promyelocytic leukemia. **Current Opinion in Oncology**, v. 25, n. 6, p. 695–700, nov. 2013.
- LOESCH, M.; CHEN, G. The p38 MAPK stress pathway as a tumor suppressor or more? **Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library**, v. 13, p. 3581–3593, 1 maio 2008.
- LOTFI, K.; ZACKRISSON, A. L.; PETERSON, C. Comparison of idarubicin and daunorubicin regarding intracellular uptake, induction of apoptosis, and resistance. **Cancer Letters**, v. 178, n. 2, p. 141–149, 25 abr. 2002.
- LU, F. et al. miR-181b increases drug sensitivity in acute myeloid leukemia via targeting HMGB1 and Mcl-1. **International Journal of Oncology**, v. 45, n. 1, p. 383–392, jul. 2014.
- LÜCK, S. C. et al. Deregulated apoptosis signaling in core-binding factor leukemia differentiates clinically relevant, molecular marker-independent subgroups. **Leukemia**, v. 25, n. 11, p. 1728–1738, nov. 2011.
- MA, P. et al. Development of idarubicin and doxorubicin solid lipid nanoparticles to overcome Pgp-mediated multiple drug resistance in leukemia. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, n. 2, p. 151–161, abr. 2009.
- MAK, P. Y. et al. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain modulates second mitochondrial-derived activator of caspases mimetic-induced cell death through BIRC2/MAP3K14 signalling in acute myeloid leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 167, n. 3, p. 376–384, nov. 2014.
- MALI, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6121, p. 823–826, 15 fev. 2013.
- MALILAS, W. et al. Cancer upregulated gene 2, a novel oncogene, confers resistance to oncolytic vesicular stomatitis virus through STAT1-OASL2 signaling. **Cancer Gene Therapy**, v. 20, n. 2, p. 125–132, fev. 2013.
- MANSAT-DE MAS, V. et al. Implication of radical oxygen species in ceramide generation, c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis induced by daunorubicin. **Molecular Pharmacology**, v. 56, n. 5, p. 867–874, nov. 1999.
- MANSOURI, A. et al. Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 19245–19256, 23 maio 2003.
- MEHTA, S. V.; SHUKLA, S. N.; VORA, H. H. Overexpression of Bcl2 protein predicts chemoresistance in acute myeloid leukemia: its correlation with FLT3. **Neoplasma**, v. 60, n. 6, p. 666–675, 2013.
- METZELER, K. H. et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 128, n. 5, p. 686–698, 4 ago. 2016.

- MI, S. et al. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 50, p. 19971–19976, 11 dez. 2007.
- MIN, S. et al. TGF- β -associated miR-27a inhibits dendritic cell-mediated differentiation of Th1 and Th17 cells by TAB3, p38 MAPK, MAP2K4 and MAP2K7. **Genes and Immunity**, v. 13, n. 8, p. 621–631, dez. 2012.
- MINDERMAN, H. et al. VX-710 (biricodar) increases drug retention and enhances chemosensitivity in resistant cells overexpressing P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 10, n. 5, p. 1826–1834, 1 mar. 2004.
- MOORE, A. S. et al. BIRC5 (survivin) splice variant expression correlates with refractory disease and poor outcome in pediatric acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology Group. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 61, n. 4, p. 647–652, abr. 2014.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.
- MPAKOU, V. E. et al. Dasatinib inhibits proliferation and induces apoptosis in the KASUMI-1 cell line bearing the t(8;21)(q22;q22) and the N822K c-kit mutation. **Leukemia Research**, v. 37, n. 2, p. 175–182, fev. 2013.
- NAGASAWA, K.; OHNISHI, N.; YOKOYAMA, T. Transport mechanisms of idarubicin, an anthracycline derivative, in human leukemia HL60 cells and mononuclear cells, and comparison with those of its analogs. **Japanese Journal of Cancer Research: Gann**, v. 88, n. 8, p. 750–759, ago. 1997.
- NAHI, H. et al. Mutated and non-mutated TP53 as targets in the treatment of leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 141, n. 4, p. 445–453, maio 2008.
- NESTAL DE MORAES, G. et al. The Interface between BCR-ABL-Dependent and -Independent Resistance Signaling Pathways in Chronic Myeloid Leukemia. **Leukemia Research and Treatment**, v. 2012, p. 671702, 2012.
- OLSON, J. M.; HALLAHAN, A. R. p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 10, n. 3, p. 125–129, mar. 2004.
- ONO, K.; HAN, J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. **Cellular Signalling**, v. 12, n. 1, p. 1–13, jan. 2000.
- PALLIS, M. et al. P-glycoprotein in acute myeloid leukaemia: therapeutic implications of its association with both a multidrug-resistant and an apoptosis-resistant phenotype. **Leukemia & Lymphoma**, v. 43, n. 6, p. 1221–1228, jun. 2002.
- PAN, W. et al. MicroRNA-27a promotes proliferation, migration and invasion by targeting MAP2K4 in human osteosarcoma cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**:

International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology, v. 33, n. 2, p. 402–412, 2014.

PANG, H. et al. Knockdown of osteopontin chemosensitizes MDA-MB-231 cells to cyclophosphamide by enhancing apoptosis through activating p38 MAPK pathway. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**, v. 26, n. 2, p. 165–173, abr. 2011.

PARDEE, T. S. Overexpression of MN1 confers resistance to chemotherapy, accelerates leukemia onset, and suppresses p53 and Bim induction. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43185, 2012.

PARK, M. H.; PARK, S. Y.; KIM, Y. Induction of proline-rich tyrosine kinase2 (Pyk2) through C/EBPbeta is involved in PMA-induced monocyte differentiation. **FEBS letters**, v. 582, n. 3, p. 415–422, 6 fev. 2008.

PASCHKA, P. et al. Secondary genetic lesions in acute myeloid leukemia with inv(16) or t(16;16): a study of the German-Austrian AML Study Group (AML5G). **Blood**, v. 121, n. 1, p. 170–177, 3 jan. 2013.

PELLAGATTI, A. et al. Application of genome editing technologies to the study and treatment of hematological disease. **Advances in Biological Regulation**, v. 60, p. 122–134, jan. 2016.

PENG, Z. G. et al. Paclitaxel induces apoptosis in leukemia cells through a JNK activation-dependent pathway. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 15, n. 1, p. 15013904, 11 mar. 2016.

PERRY, A. M.; ATTAR, E. C. New insights in AML biology from genomic analysis. **Seminars in Hematology**, v. 51, n. 4, p. 282–297, out. 2014.

PETERS, G. J. Novel developments in the use of antimetabolites. **Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids**, v. 33, n. 4–6, p. 358–374, 2014.

PETI, W.; PAGE, R. Molecular basis of MAP kinase regulation. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, v. 22, n. 12, p. 1698–1710, dez. 2013.

PICHLER, M.; CALIN, G. A. MicroRNAs in cancer: from developmental genes in worms to their clinical application in patients. **British Journal of Cancer**, v. 113, n. 4, p. 569–573, 11 ago. 2015.

PIERCEALL, W. E. et al. BH3 profiling discriminates response to cytarabine-based treatment of acute myelogenous leukemia. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 12, n. 12, p. 2940–2949, dez. 2013.

POH, A. R.; O'DONOGHUE, R. J. J.; ERNST, M. Hematopoietic cell kinase (HCK) as a therapeutic target in immune and cancer cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 18, p. 15752–15771, 30 jun. 2015.

POLLYEA, D. A.; KOHRT, H. E.; MEDEIROS, B. C. Acute myeloid leukaemia in the elderly: a review. **British Journal of Haematology**, v. 152, n. 5, p. 524–542, mar. 2011.

- PRINCIPE, P. et al. Flow cytometric monitoring of anthracycline accumulation after anti-neoplastic ether phospholipid treatment. **Anti-Cancer Drugs**, v. 5, n. 3, p. 329–335, jun. 1994.
- PYZOCHA, N. K. et al. RNA-guided genome editing of mammalian cells. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1114, p. 269–277, 2014.
- RAHDAR, M. et al. Synthetic CRISPR RNA-Cas9-guided genome editing in human cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 51, p. E7110-7117, 22 dez. 2015.
- RAN, F. A. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, v. 8, n. 11, p. 2281–2308, nov. 2013.
- REBOWSKI, G. et al. Antisense hairpin loop oligonucleotides as inhibitors of expression of multidrug resistance-associated protein 1: their stability in fetal calf serum and human plasma. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 4, p. 1061–1076, 2001.
- RICCIARDI, M. R. et al. Targeting the Akt, GSK-3, Bcl-2 axis in acute myeloid leukemia. **Advances in Biological Regulation**, 19 maio 2017.
- RISTIC, B. et al. Idarubicin induces mTOR-dependent cytotoxic autophagy in leukemic cells. **Experimental Cell Research**, v. 326, n. 1, p. 90–102, 1 ago. 2014.
- ROBEY, R. W. et al. ABC transporters: unvalidated therapeutic targets in cancer and the CNS. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 8, p. 625–633, 1 out. 2010.
- ROSATO, R. et al. LBH-589 (panobinostat) potentiates fludarabine anti-leukemic activity through a JNK- and XIAP-dependent mechanism. **Leukemia Research**, v. 36, n. 4, p. 491–498, abr. 2012.
- ROSENFELDT, M. T.; RYAN, K. M. The role of autophagy in tumour development and cancer therapy. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 11, p. e36, 2 dez. 2009.
- RUBNITZ, J. E.; GIBSON, B.; SMITH, F. O. Acute myeloid leukemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 24, n. 1, p. 35–63, fev. 2010.
- SACCHI, N. et al. Interphase cytogenetics of the t(8;21)(q22;q22) associated with acute myelogenous leukemia by two-color fluorescence in situ hybridization. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 79, n. 2, p. 97–103, fev. 1995.
- SAKAMOTO, K. M. et al. Targeting novel signaling pathways for resistant acute myeloid leukemia. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 114, n. 3, p. 397–402, mar. 2015.
- SAMPATH, D. et al. Pharmacodynamics of cytarabine alone and in combination with 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in AML blasts in vitro and during a clinical trial. **Blood**, v. 107, n. 6, p. 2517–2524, 15 mar. 2006.
- SAMPSON, T. R.; WEISS, D. S. Exploiting CRISPR/Cas systems for biotechnology. **BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology**, v. 36, n. 1, p. 34–38, jan. 2014.

- SARGENT, J. M. et al. Breast cancer resistance protein expression and resistance to daunorubicin in blast cells from patients with acute myeloid leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 115, n. 2, p. 257–262, nov. 2001.
- SAU, A. et al. Targeting GSTP1-1 induces JNK activation and leads to apoptosis in cisplatin-sensitive and -resistant human osteosarcoma cell lines. **Molecular bioSystems**, v. 8, n. 4, p. 994–1006, abr. 2012.
- SAVONA, M.; TALPAZ, M. Getting to the stem of chronic myeloid leukaemia. **Nature Reviews. Cancer**, v. 8, n. 5, p. 341–350, maio 2008.
- SAYERS, T. J. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. **Cancer immunology, immunotherapy: CII**, v. 60, n. 8, p. 1173–1180, ago. 2011.
- SCHAICH, M. et al. The prognostic value of Bcl-XL gene expression for remission induction is influenced by cytogenetics in adult acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 86, n. 5, p. 470–477, maio 2001.
- SCHIFFER, C. A. Optimal dose and schedule of consolidation in AML: is there a standard? **Best Practice & Research. Clinical Haematology**, v. 27, n. 3–4, p. 259–264, dez. 2014.
- SCHIMMER, A. D. et al. Receptor- and mitochondrial-mediated apoptosis in acute leukemia: a translational view. **Blood**, v. 98, n. 13, p. 3541–3553, 15 dez. 2001.
- SCHLENK, R. F. et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 18, p. 1909–1918, 1 maio 2008.
- SCHLENK, R. F.; DÖHNER, H. Genomic applications in the clinic: use in treatment paradigm of acute myeloid leukemia. **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 2013, p. 324–330, 2013.
- SCHOCH, C. et al. The influence of age on prognosis of de novo acute myeloid leukemia differs according to cytogenetic subgroups. **Haematologica**, v. 89, n. 9, p. 1082–1090, set. 2004.
- SCHOCH, C. et al. Acute myeloid leukemia with a complex aberrant karyotype is a distinct biological entity characterized by genomic imbalances and a specific gene expression profile. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 43, n. 3, p. 227–238, jul. 2005.
- SCHOTTE, D.; PIETERS, R.; DEN BOER, M. L. MicroRNAs in acute leukemia: from biological players to clinical contributors. **Leukemia**, v. 26, n. 1, p. 1–12, jan. 2012.
- SEABRIGHT, M. A rapid banding technique for human chromosomes. **Lancet (London, England)**, v. 2, n. 7731, p. 971–972, 30 out. 1971.
- SEEDHOUSE, C. H. et al. DNA repair contributes to the drug-resistant phenotype of primary acute myeloid leukaemia cells with FLT3 internal tandem duplications and is reversed by the FLT3 inhibitor PKC412. **Leukemia**, v. 20, n. 12, p. 2130–2136, dez. 2006.

- SHAFFER, B. C. et al. Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML. **Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy**, v. 15, n. 1–2, p. 62–69, abr. 2012.
- SHAH, M. V.; BAROCHIA, A.; LOUGHRAN, T. P. Impact of genetic targets on cancer therapy in acute myelogenous leukemia. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 779, p. 405–437, 2013.
- SHEN, Y. et al. Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 118, n. 20, p. 5593–5603, 17 nov. 2011.
- SHIPLEY, J. L.; BUTERA, J. N. Acute myelogenous leukemia. **Experimental Hematology**, v. 37, n. 6, p. 649–658, jun. 2009.
- SILVA, K. L. et al. CPT-11-induced cell death in leukemic cells is not affected by the MDR phenotype. **Leukemia Research**, v. 27, n. 3, p. 243–251, mar. 2003.
- SINGH, M. M. et al. Expression and activity of Fyn mediate proliferation and blastic features of chronic myelogenous leukemia. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e51611, 2012.
- SMITH, M. et al. Adult acute myeloid leukaemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 50, n. 3, p. 197–222, jun. 2004.
- SONG, I. S. et al. Inhibition of MKK7-JNK by the TOR signaling pathway regulator-like protein contributes to resistance of HCC cells to TRAIL-induced apoptosis. **Gastroenterology**, v. 143, n. 5, p. 1341–1351, nov. 2012.
- SONG, W. J. et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. **Nature Genetics**, v. 23, n. 2, p. 166–175, out. 1999.
- STADHEIM, T. A.; SALUTA, G. R.; KUCERA, G. L. Role of c-Jun N-terminal kinase/p38 stress signaling in 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-induced apoptosis. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, n. 4, p. 407–418, 15 fev. 2000.
- STEFFEN, B. et al. The molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 56, n. 2, p. 195–221, nov. 2005.
- STEIN, E. M.; TALLMAN, M. S. Acute promyelocytic leukemia in children and adolescents. **Acta Haematologica**, v. 132, n. 3–4, p. 307–312, 2014.
- STEINBACH, D. et al. BCRP gene expression is associated with a poor response to remission induction therapy in childhood acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 16, n. 8, p. 1443–1447, ago. 2002.
- STEVENS-KROEF, M. et al. Cytogenetic Nomenclature and Reporting. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1541, p. 303–309, 2017.
- STYCZYŃSKI, J.; HAUS, O. [Cytogenetics and in vitro drug resistance of acute leukemia in children and adults]. **Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)**, v. 60, p. 527–537, 2006.

- SUI, X. et al. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. **Cancer Letters**, v. 344, n. 2, p. 174–179, 28 mar. 2014.
- SUVANNASANKHA, A. et al. Breast cancer resistance protein (BCRP/MXR/ABCG2) in acute myeloid leukemia: discordance between expression and function. **Leukemia**, v. 18, n. 7, p. 1252–1257, jul. 2004.
- TANG, R.-X. et al. HBx activates FasL and mediates HepG2 cell apoptosis through MLK3-MKK7-JNKs signal module. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 13, p. 1485–1495, 7 abr. 2012.
- TAYLOR, D. W. et al. Structural biology. Structures of the CRISPR-Cmr complex reveal mode of RNA target positioning. **Science (New York, N.Y.)**, v. 348, n. 6234, p. 581–585, 1 maio 2015.
- TESTA, J. R. et al. Chromosomal alterations in acute leukemia patients studied with improved culture methods. **Cancer Research**, v. 45, n. 1, p. 430–434, jan. 1985.
- TEUFFEL, O. et al. Anthracyclines during induction therapy in acute myeloid leukaemia: a systematic review and meta-analysis. **British Journal of Haematology**, v. 161, n. 2, p. 192–203, abr. 2013.
- TORRES, R. et al. Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system. **Nature Communications**, v. 5, p. 3964, 3 jun. 2014.
- TOURNIER, C. et al. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. **Science (New York, N.Y.)**, v. 288, n. 5467, p. 870–874, 5 maio 2000.
- TZELEPIS, K. et al. A CRISPR Dropout Screen Identifies Genetic Vulnerabilities and Therapeutic Targets in Acute Myeloid Leukemia. **Cell Reports**, v. 17, n. 4, p. 1193–1205, 18 out. 2016.
- UPHOFF, C. C.; DREXLER, H. G. Detection of Mycoplasma contamination in cell cultures. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 106, p. 28.4.1-14, 14 abr. 2014.
- VALDEZ, B. C. et al. Altered gene expression in busulfan-resistant human myeloid leukemia. **Leukemia Research**, v. 32, n. 11, p. 1684–1697, nov. 2008.
- VAN STAVEREN, W. C. G. et al. Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1795, n. 2, p. 92–103, abr. 2009.
- VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J. M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews. Cancer**, v. 7, n. 9, p. 659–672, set. 2007.
- VASCONCELOS, F. C. et al. Phosphorylated Crkl reduction levels are associated with the lowest P-glycoprotein activity levels in cells from chronic myeloid leukemia patients. **Leukemia Research**, v. 37, n. 12, p. 1711–1718, dez. 2013.

- VERGEZ, F. et al. High levels of CD34+CD38low/-CD123+ blasts are predictive of an adverse outcome in acute myeloid leukemia: a Groupe Ouest-Est des Leucemies Aigues et Maladies du Sang (GOELAMS) study. **Haematologica**, v. 96, n. 12, p. 1792–1798, dez. 2011.
- VISANI, G. et al. No preferential sensitivity of t(8;21) acute myeloid leukemias to cytosine arabinoside in vitro: is intensity of therapy or high dose Ara-C crucial for response? **Leukemia & Lymphoma**, v. 45, n. 7, p. 1361–1364, jul. 2004.
- VOLPI, E. V. et al. More detailed characterization of some of the HL60 karyotypic features by fluorescence in situ hybridization. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 87, n. 2, p. 103–106, abr. 1996.
- WAGNER, E. F.; NEBREDA, A. R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. **Nature Reviews. Cancer**, v. 9, n. 8, p. 537–549, ago. 2009.
- WALTER, R. B. et al. Significance of FAB subclassification of “acute myeloid leukemia, NOS” in the 2008 WHO classification: analysis of 5848 newly diagnosed patients. **Blood**, v. 121, n. 13, p. 2424–2431, 28 mar. 2013.
- WIEMELS, J. L. et al. Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. **Blood**, v. 94, n. 3, p. 1057–1062, 1 ago. 1999.
- WLODKOWIC, D.; SKOMMER, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. **Experimental Oncology**, v. 34, n. 3, p. 255–262, out. 2012.
- WU, X. et al. Up-regulation of P21 inhibits TRAIL-mediated extrinsic apoptosis, contributing resistance to SAHA in acute myeloid leukemia cells. **Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 506–518, 2014.
- WU, X. et al. Resveratrol induces apoptosis of human chronic myelogenous leukemia cells in vitro through p38 and JNK-regulated H2AX phosphorylation. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 36, n. 3, p. 353–361, mar. 2015.
- YANG, L. et al. CRISPR/Cas9-Directed Genome Editing of Cultured Cells. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 107, p. 31.1.1-17, 1 jul. 2014.
- YANG, S.-H.; SHARROCKS, A. D.; WHITMARSH, A. J. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. **Gene**, v. 513, n. 1, p. 1–13, 15 jan. 2013.
- YU, M. et al. The scaffolding adapter Gab2, via Shp-2, regulates kit-evoked mast cell proliferation by activating the Rac/JNK pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 39, p. 28615–28626, 29 set. 2006.
- ZEBISCH, A. et al. Therapeutic Resistance in Acute Myeloid Leukemia: The Role of Non-Coding RNAs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, 10 dez. 2016.
- ZEISIG, B. B. et al. SnapShot: Acute myeloid leukemia. **Cancer Cell**, v. 22, n. 5, p. 698–698.e1, 13 nov. 2012.

ZHANG, W. et al. Sorafenib induces apoptosis of AML cells via Bim-mediated activation of the intrinsic apoptotic pathway. **Leukemia**, v. 22, n. 4, p. 808–818, abr. 2008.

ZHU, H. et al. Role of MicroRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 5, p. 582–588, 1 set. 2008.

14. Anexos

14.1 Manuscrito submetido durante o doutorado

Current research in translational medicine status: Em revisão

Revisiting acute myeloid leukemia cell lines: diversity of drug resistance profiles

Aline Rangel Pozzo^{1,2}, Thaís H. Pereira¹, Luciano Mazzoccoli^{1,2}, Luize Otero de Carvalho³, Claudia Diniz⁴, Flavia C. Vasconcelos¹, Raquel Ciuvalschi Maia^{1,5}

1 - Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular; Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro (RJ), Brazil.

2 - Programa de Pós-Graduação em Oncologia, INCA, RJ, Brazil.

3 - Laboratório de Citogenética, Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO), INCA, RJ, Brazil.

4 - Laboratório de Imunologia, CEMO, INCA, RJ, Brazil.

5 - Serviço de Hematologia, Hospital do Câncer I, INCA, RJ, Brazil.

Corresponding author: Raquel C. Maia, MD, PhD. Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Instituto Nacional de Câncer, Praça da Cruz Vermelha 23, 6º andar, Centro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil 20230-130, Telephone number: +55-21-32071198. E-mail address: rcmaia@inca.gov.br (R. C. Maia).

Abstract

Cell lines are important tools for understanding multidrug resistance (MDR) mechanisms in acute myeloid leukemia (AML). In this study we assess the MDR profiles and expression of proteins related to apoptotic pathways in HL60, U937 and Kasumi-1 AML cell lines. All AML cell lines exhibited a complex karyotype and different patterns of expression and/or activity of ABCC1/MRP1, ABCB1/P-glycoprotein/Pgp and ABCG2/BCRP proteins. They also had variable levels of cIAP2, Survivin, Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL, Bak, Bim and p53 apoptosis-related proteins, confirming that they display distinct resistance profiles. U937 cell line demonstrated to be more resistant to idarubicin and daunorubicin treatment when it was compared to Kasumi and HL60. Conversely, Kasumi-1 was the most resistant to Ara-c, followed by U937 and HL60. These findings might contribute to the understanding of heterogeneity and complexity of AML, pointing out the relevance of reassessing several parameters to assist researches in the context of multifactorial chemoresistance.

Key words: Acute myeloid leukemia cell lines, apoptosis pathways, multidrug resistance proteins, idarubicin, daunorubicin, Ara-c.

14.2 Manuscrito em preparo para submissão

miR-27a is associated with short overall survival but not with P-glycoprotein expression in acute myeloid leukemia patients

Aline R. Pozzo^{1,2}, Marcos Antonio Mauricio Scheiner¹, Yung Gonzaga³, Flavia C. Vasconcelos¹, Raquel C. Maia^{1,3}

1 - Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular; Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro (RJ), Brazil.

2 - Programa de Pós-Graduação em Oncologia, INCA, RJ, Brazil.

3 - Serviço de Hematologia, Hospital do Câncer I, INCA, RJ, Brazil.

Corresponding author: Raquel C. Maia, MD, PhD. Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Instituto Nacional de Câncer, Praça da Cruz Vermelha 23, 6º andar, Centro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil 20230-130, Telefone number: +55-21-32071198. E-mail address: rcmaia@inca.gov.br (R. C. Maia).

14.3 Manuscrito aceito para publicação durante do doutorado

CASE REPORT

DNA microarray expression profiling of a new t(8;13) AML case allows identification of possible leukemogenic transformation markers

Aline Rangel Pozzo¹, Fernanda Costas Casal de Faria¹, Luize Otero de Carvalho², Marcos Barcelos de Pinho³, Raquel Ciuvalschi Maia¹

1 - Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular; Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro (RJ); Brazil.

2 - Laboratório de Citogenética, Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO), INCA, RJ, Brazil.

3- Laboratório de Bioinformática e Biologia Computacional, INCA, RJ, Brazil.

Corresponding author: Raquel C. Maia, MD, PhD. Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Instituto Nacional de Câncer, Praça da Cruz Vermelha 23, 6º andar, Centro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil 20230-130, Telefone number: +55-21-32071198. E-mail address: rcmaia@inca.gov.br (R. C. Maia).