



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

Mateus dos Santos Vasconcelos Mota

**Análise da expressão gênica da via de NOTCH em linhagens de
leucemia com o fenótipo MDR e em pacientes com Leucemia
Mielóide Aguda**

Orientador: Prof. Dr. Miguel Ângelo Martins Moreira

**RIO DE JANEIRO
Março, 2015**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

Mateus dos Santos Vasconcelos Mota

**Análise da expressão gênica da via de NOTCH em linhagens de
leucemia com o fenótipo MDR e em pacientes com Leucemia
Mielóide Aguda**

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

Orientador: Prof. Dr. Miguel Ângelo Martins Moreira

**RIO DE JANEIRO
Março, 2015**

M917e Mota, Mateus dos Santos Vasconcelos.

Análise da expressão gênica da via de NOTCH em linhagens de leucemia com o fenótipo MDR e em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda. / Mateus dos Santos Vasconcelos Mota. – Rio de Janeiro, 2015.

xii, 73 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Oncologia)– Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2015.

Orientador: Miguel Ângelo Martins Moreira.

1. Resistência a Múltiplos Medicamentos - genética. 2. Leucemia Mielóide Aguda. 3. Expressão Gênica. 4. Receptores Notch. I. Moreira, Miguel Ângelo Martins. (orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.9041



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

Mateus dos Santos Vasconcelos Mota

**Análise da expressão gênica da via de NOTCH em linhagens de
leucemia com o fenótipo MDR e em pacientes com Leucemia
Mielóide Aguda**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Miguel Ângelo Martins Moreira

Aprovado em: 27/03/2015

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Raquel Ciuvalshi Maia
Prof. Dr. André Luiz Mencialha
Prof. Dr. Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek
Prof. Dr. Mariana Emerenciano Cavalcanti de Sá – Suplente I
Prof. Dr. Carlos Augusto Gomes Soares – Suplente II

**RIO DE JANEIRO
Março, 2015**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

AGRADECIMENTOS

Em 2011 decidi que queria seguir minha vida acadêmica na área da Oncologia e minha participação no IV Curso de Verão em 2012 foi o passaporte para o meu acesso ao melhor lugar em que eu poderia ter acesso a essa área aqui no Brasil: o INCA. Nesses três anos de INCA pude aprender vários aspectos sobre o câncer e ter a certeza de qual caminho eu pretendo seguir na pesquisa. Por isso, gostaria de agradecer a instituição e principalmente a Divisão de Genética por terem me proporcionado conhecimento e estrutura nessa etapa da minha formação.

Mas sem dúvidas, na instituição, não poderia deixar de citar especialmente o meu orientador Dr. Miguel Moreira pela orientação e dedicação. Acredito que para o crescimento do aluno é fundamental a troca de conhecimento com o orientador e, com o Dr. Miguel, foi construído uma relação de confiança e liberdade para argumentação de ambos os lados. Muito obrigado pelos ensinamentos e por ter me estimulado, talvez mesmo sem perceber, a pensar cientificamente.

Queria agradecer em especial também a Dra. Rose Filgueiras. Apesar do pouco e rápido contato, nossas conversas sobre leucemias e visitas aos hospitais foram fundamentais pra me mostrar ainda mais a importância de se fazer pesquisas em oncologia no intuito de desenvolver novas estratégias de tratamento.

Não posso esquecer também da convivência com amigos e colegas no laboratório. Trabalhar com pesquisa é um trabalho árduo e se não tivermos esses companheiros pra não só trocar conhecimento científico mas também angústias, vitórias, dúvidas e conselhos, as coisas com certeza ficariam ainda mais difíceis. Por isso, gostaria de agradecer a cada membro da Genética pela convivência diária.

Mas por trás disso tudo queria agradecer imensamente a Cristina, Ednilson, Bruno e Artur, pessoas que são os melhores exemplos do conceito de família e que me fazem lembrar todos os dias que não estou sozinho nessa jornada. Estes não me ajudaram cientificamente, mas foram e são fundamentais na pessoa que sou hoje e que, pelo menos pra mim, é mais importante do que qualquer título ou nomeação.

Enfim, acho que é isso. Até a próxima!

Mateus Mota



RESUMO

A análise de microarranjo da linhagem celular K562 obtida de paciente com leucemia mielóide crônica em crise blástica e suas derivadas com o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR), Lucena 1 e FEPS, selecionadas pelas drogas vincristina e daunorrubicina, respectivamente, apresentou diferença de expressão em genes da via de sinalização de NOTCH. Esta via está associada a funções celulares como proliferação, diferenciação e apoptose, mecanismos que as linhagens MDR modularam para manter o fenótipo. Além disso, a daunorrubicina, droga de seleção para FEPS, é uma das drogas usadas no tratamento de Leucemia Mielóide Aguda (LMA). Desse modo, é possível que a análise de expressão de genes da via de NOTCH auxilie na determinação do prognóstico de pacientes diagnosticados com LMA associado à sobrevida global. Assim, os objetivos do estudo foram validar os resultados de microarranjo sobre a expressão heterogênea dos genes da via de NOTCH nas linhagens MDR e K562 e analisar o potencial desses genes como indicador de prognóstico por meio da avaliação da sobrevida global de pacientes diagnosticados com LMA. Essas análises foram conduzidas pela técnica de PCR quantitativo. Foram validadas a maior expressão dos genes *NOTCH 2* e *HEY 1* em Lucena 1 e FEPS, e a menor expressão do gene *HES 1* em FEPS, em comparação com K562. Foram também observadas diferenças não identificadas pela análise de microarranjo, como maior expressão do *NOTCH 3* em Lucena 1 e maior expressão de *JAGGED 2* em FEPS, quando comparadas com a K562. Foi observado que a densidade celular em cultura influencia na expressão dos genes *HEY 1* e *HES 1* da via de NOTCH nas linhagens MDR. Além disso, o padrão de expressão dos genes da via de NOTCH foi independente da presença ou ausência de drogas no meio de cultura. Em relação às amostras de pacientes, foi observado que pacientes que possuíram maior expressão dos genes *NOTCH 2* e *HES 1* apresentaram uma menor sobrevida global do que pacientes com menor expressão desses genes ($p= 0,0024$ e $p= 0,0403$, respectivamente). Além disso, não houve diferença na sobrevida global entre pacientes com maior e menor expressão do transportador *ABCB 1*. Assim, é sugerido que pacientes com alta expressão dos genes *NOTCH 2* e *HES 1* apresentam pior prognóstico. Em conclusão, esses dados mostram diferenças a nível transcricional e validam a expressão de alguns genes da via de NOTCH nas linhagens Lucena 1 e FEPS em comparação com a K562, o que pode estar contribuindo para o fenótipo MDR. Em paralelo, a expressão de genes da via de NOTCH parece indicar um pior prognóstico em LMA.

Palavras-chave: 1. Fenótipo MDR 2. Via de NOTCH. 3. Leucemia. 4. Expressão gênica



ABSTRACT

Microarray analysis of the K562 cell line derived from a chronic myeloid leukemia patient in blast crisis and its derivative cells carrying the multidrug resistance (MDR) phenotype, Lucena 1 and FEPS selected by vincristine and daunorubicin, respectively, showed differential gene expression of the NOTCH signaling pathway. This signaling pathway plays a role in cell proliferation, differentiation, and apoptosis, mechanisms that MDR cells modulated to maintain the phenotype. Besides that, daunorubicin, the FEPS-selection drug, is one of the drugs used in the treatment of Acute Myeloid Leukemia (AML). Therefore, it is possible that the analysis of gene expression of the NOTCH pathway may help on the determination of AML-diagnosed patient's prognosis associated to overall survival. Therefore, the goal were to validate the microarray data of the heterogeneous gene expression of the NOCTH pathway between the MDR cell lines and K562 and to analyze the potential of these genes as an indicator of prognosis by evaluating the overall survival of patients diagnosed with AML. Those analyzes were conducted by quantitative PCR technique. It was validated the overexpression of *NOTCH 2* and *HEY 1* in Lucena 1 and FEPS and downregulation of *HES 1* in FEPS in comparison to K562. It was also observed differences not identified by microarray analyzes, like the overexpression of *NOTCH 3* in Lucena 1 and overexpression of *JAGGED 2* in FEPS in comparison to K562. In addition, it was observed that cell density in culture influence the expression of *HEY 1* and *HES 1* genes of the NOTCH pathway in the MDR cell lines. Besides that the pattern of gene expression of the pathway was independent to the presence or absence of drug during culture. Regarding the patient's samples, it was observed that patients with higher expression of *NOTCH 2* and *HES 1* showed lower overall survival than patients with lower expression of these genes ($p= 0,0024$ e $p= 0,0403$, respectively). Besides that, it wasn't seen differences on the overall survival between patients with higher and lower expression of the *ABCB 1* transporter gene. Thus, it is suggested that patients with higher expression of *NOTCH 2* and *HES 1* genes display a worse prognosis. In conclusion, these data show differences at the transcriptional level and validate the expression of some genes of the NOTCH pathway in the cell lines Lucena 1 and FEPS in comparison to K562, which might be contributing to the MDR phenotype. In parallel, the gene expression of the NOTCH pathway seems to indicate a worse prognosis in AML.

Keywords: 1. MDR phenotype 2. NOTCH pathway 3. Leukemia 4. Gene expression

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
ÍNDICE	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
1.0 INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer	1
1.2 Tratamento quimioterápico.....	2
1.3 Resistência a drogas	4
1.4 Modelo MDR <i>in vitro</i> : Leucemia Mielóide Crônica	7
1.4.1 Características gerais da Leucemia Mielóide Crônica.....	7
1.4.2 Linhagens K562, Lucena 1 e FEPS.....	8
1.4.3 Análises de microarranjo	9
1.5 Via de sinalização de NOTCH	10
1.5.1 Descrição da via de NOTCH	10
1.5.2 Funções da via de NOTCH	12
1.5.3 A via de NOTCH nas leucemias.....	14
1.5.4 A via de NOTCH como alvo terapêutico	15
1.6 Relação modelo MDR <i>in vitro</i> e pacientes com LMA.....	17
1.6.1 Características gerais da LMA.....	17
1.6.2 Comparação entre linhagens MDR e amostras de pacientes com LMA ...	18
1.7 Justificativa do trabalho	19
2.0 OBJETIVOS	21
3.0 MATERIAIS & MÉTODOS	22
3.1 Linhagens celulares K562, Lucena 1 e FEPS	22
3.2 Pacientes com LMA	23
3.3 Isolamento de RNA	24
3.4 Síntese de DNA complementar.....	24
3.5 Confeção dos <i>primers</i>	25
3.6 PCR quantitativo em tempo real	26
3.6.1 Padronização <i>primers</i> : quantificação absoluta	26
3.6.2 Análise de expressão em linhagens	27

3.6.3	Análise de expressão em amostras de pacientes com LMA	28
3.7	Análises estatísticas.....	29
4.0	RESULTADOS.....	30
4.1	Validação da expressão dos genes da via de NOTCH em linhagens MDR...30	
4.1.1	Análise inicial dos genes da via de NOTCH	30
4.1.2	Análise dos genes <i>NOTCH 2</i> , <i>NOTCH 3</i> , <i>HEY 1</i> e <i>HES 1</i>	33
4.1.3	Influência da droga na expressão dos genes da via de NOTCH.....	36
4.2	Análise da via de NOTCH em pacientes com LMA	37
5.0	DISCUSSÃO	41
6.0	CONCLUSÕES.....	50
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	61
	ANEXO 2 - Parecer Comitê de Ética	65
	ANEXO 3 - Dados dos pacientes incluídos no estudo.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Sequências de bases dos primers	25
Tabela 4.1 - Informações sobre os pacientes com LMA incluídos, classificação FAB da LMA e tratamento a que foram submetidos	37
Tabela 4.2 - Coeficiente de correlação de <i>Spearman</i> para os genes <i>NOTCH 2</i> , <i>NOTCH 3</i> , <i>HEY 1</i> , <i>HES 1</i> e <i>ABCB 1</i> em pacientes com LMA (*p < 0,05).....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Características-chaves para o desenvolvimento do tumor e terapias alvo	4
Figura 1.2 - Principais mecanismos MDR no câncer	5
Figura 1.3 - Via de sinalização de NOTCH.....	12
Figura 1.4 - Potenciais intervenções terapêuticas com alvo na via de sinalização de Notch.....	17
Figura 3.1 - Protocolo de cultura de célula inicial	22
Figura 3.2 - Protocolo de cultura de célula revisado	23
Figura 3.3 - Representação do método $\Delta\Delta Cq$ de LIVAK <i>et al.</i> , 2001	27
Figura 3.4 - Representação do método $\Delta\Delta Cq$ de PFAFFL <i>et al.</i> , 2001	28
Figura 4.1 - Análise da expressão relativa de genes da via de NOTCH entre Lucena 1 e K562	31
Figura 4.2 - Análise da expressão relativa de genes da via de NOTCH entre FEPS e K562	32
Figura 4.3 - Resumo da expressão relativa dos genes da via de NOTCH entre as linhagens MDR e K562	32
Figura 4.4 - Análise dos genes <i>NOTCH 2</i> , <i>NOTCH 3</i> , <i>HEY 1</i> e <i>HES 1</i> entre as linhagens Lucena 1 e K562	34
Figura 4.5 - Análise dos genes <i>NOTCH 2</i> , <i>NOTCH 3</i> , <i>HEY 1</i> e <i>HES 1</i> entre as linhagens FEPS e K562.....	35
Figura 4.6 - Análise dos genes <i>NOTCH 2</i> , <i>NOTCH 3</i> , <i>HEY 1</i> e <i>HES 1</i> nas linhagens Lucena 1 e FEPS sem adição de droga	36
Figura 4.7 - Representação da distribuição de pacientes diagnosticados com LMA.....	38
Figura 4.8 - Representação da correlação positiva para os genes <i>NOTCH 2</i> , <i>HEY 1</i> e <i>HES 1</i>	39
Figura 4.9 - Análise de sobrevida global dos pacientes diagnosticados com LMA.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

3'-UTR: Região não traduzível 3'
β2M: Beta-2 microglobulina
ABC: do inglês *ATP Binding Cassette*
ABCB 1: do inglês, *ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1*
ABCC 1: do inglês, *ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP)*
ABCG 2: do inglês, *ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2*
ACTβ: Beta actina
Ang 2: Angiopietina 2
ATP: Adenosina trifosfato
ATRA: Ácido all-trans-retinóico
Asf 1: do inglês *Anti-silencing function 1*
BCRP: do inglês, *Breast Cancer Resistance Protein*
BCR-ABL: do inglês, *Breakpoint cluster region-Abelson murine leukemia viral oncogene*
BCL-2: Leucemia linfocítica crônica de células B
CD13: do inglês, *Cluster differentiation 13*
CD33: do inglês, *Cluster differentiation 33*
CD95: do inglês, *Cluster differentiation 95*
CD117: do inglês, *Cluster differentiation 117*
cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar
céls./ml: células por mililitro
c-MYC: do inglês, *myelocytomatosis oncogene*
CoR: proteínas co-repressoras
CSC: Células-tronco tumorais
CSL: do inglês, *CBF1, suppressor of hairless and lag-1*
DAPT: inibidor de gamma secretase *N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)- L -alanyl]-S-phenylglycine t-butyl Ester*
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DNase: enzima que degrada DNA
DLL 1: gene *DELTA -LIKE 1*
DLL 3: gene *DELTA-LIKE 3*
DLL 4: gene *DELTA-LIKE 4*
EGF-L: do inglês, *Epidermal growth factor-like*
FAB: classificação *French-American-British*
FEPS: linhagem de leucemia mielóide crônica em crise blástica selecionada por daunorrubicina
GSI: Inibidor de gamma-secretase
GSI-XII: Inibidor de γ-secretase XII
HES: fator de transcrição *hairy and enhancer of split-1*
HEY: do inglês, *Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1*
IL-6: Interleucina 6
JAG 1: gene *JAGGED 1*
JAG 2: gene *JAGGED 2*
K562: Linhagem de leucemia mielóide crônica em fase blástica
LMA: Leucemia Mielóide Aguda
LMC: Leucemia Mielóide Crônica
LNCAP: linhagem de célula de adenocarcinoma de próstata
MAM: *proteínas co-ativadoras MasterMind*
DN-MAML1: dominantes negativos derivados de proteínas co-ativadoras MAM
MCF 7: linhagem de câncer de mama *Michigan Cancer Foundation-7*

MDR: do inglês, *MultiDrug Resistance*
MDR 1: Proteína de resistência a múltiplas drogas 1
MHC: Complexo principal de histocompatibilidade
miRNA: Micro ácido ribonucléico
MRK-003: inibidor de γ -secretase MRK-003
mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro
MRP 1: Proteína de resistência a múltiplas drogas 1
NCCSC: Centro de Serviço Nacional de Quimioterapia do Câncer
NOTCH-IC: Porção intracelular do NOTCH
p21: proteína 21
p53: proteína 53
p16/ARF: do inglês *protein 16/alternate reading frame*
p300: proteína 300
PCR: do inglês, *Polymerase Chain Reaction*
PEST: sequência rica em prolina, ácido glutâmico, serina e treonina
PgP: Glicoproteína P
Ph+: Cromossomo *Philadelphia*
qPCR: Reação de cadeia em polimerase quantitativo
RNA: Ácido ribonucleico
shRNA: do inglês, *small hairpin RNA*
TNF α : do inglês, *Tumor Necrosis Factor- α*
TACE: do inglês, *TNF- α converting enzyme*
TP53: do inglês, *Tumor protein p53*
T-ALL: Leucemia linfocítica aguda de célula T
VEGF: do inglês, *Vascular endothelial growth factor*
WHO: Organização Mundial da Saúde
YO01027: inibidor de gamma secretase dibenzazepina

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Câncer

Câncer é uma denominação geral a um grupo de doenças caracterizadas por crescimento e proliferação anormal das células que compõem um determinado órgão, sendo também denominado de neoplasias. Esses processos são acompanhados por desdiferenciação celular e geralmente formam aglomerados de células denominadas de tumor, exceto nos cânceres hematológicos, que compromete as funções fisiológicas do órgão e prejudica a saúde do indivíduo. As células cancerígenas podem também invadir tecidos adjacentes ao seu local de origem ou entrar na corrente sanguínea e linfática, sendo transportadas para outros órgãos e iniciando um novo processo de tumorigênese, a metástase (ACS, 2014; NCI, 2014; WHO, 2014).

No ano de 2012, 8,2 milhões de pessoas morreram de câncer no mundo, sendo os cânceres de pulmão, fígado, estômago, colo-retal e mama os mais frequentes. Entretanto, cerca de 30% dos casos de câncer podem ser evitados, uma vez que estão associados a hábitos de vida como dieta de risco, alto índice de massa corporal, baixa ingestão de frutas e vegetais, falta de exercício físico, tabagismo e etilismo (WHO, 2014).

A sintomatologia dos pacientes com câncer depende de qual órgão esteja sendo acometido pela doença, onde o indivíduo apresentará deficiências na sua função. Assim, em algumas ocasiões, o diagnóstico não é tão simples pois há confundimento com outras patologias que acometem o órgão. Além disso, algumas neoplasias apresentam uma evolução assintomática e o paciente é diagnosticado num estadiamento avançado da doença, comprometendo as chances de cura. O plano de tratamento depende do tipo de câncer e estadiamento do paciente e consiste na eliminação das células cancerígenas, por meio de quimioterapia, radioterapia ou cirurgia (ACS, 2014; NCI, 2014).

1.2 - Tratamento quimioterápico

A manipulação de drogas quimioterápicas contra o câncer foi desenvolvida com base em relatos que indicavam a possibilidade do uso de drogas no combate a determinada disfunção no corpo. Inicialmente, a ação da radioterapia na erradicação do câncer, em forma de radiação ionizante, indicou que drogas poderiam ser desenvolvidas no intuito de causar um efeito terapêutico ao tecido afetado assim como a radiação. Posteriormente, essa ideia foi ainda mais explorada com a descoberta de que o crescimento de tumor de mama poderia ser impedido com a remoção dos ovários. Isso levou a constatação de que o crescimento de tumores é passível de ser influenciado por fatores externos ao tecido. Por fim, em 1898, foi observado que a administração de extrato de bactérias induziu a regressão de linfoma e sarcoma de pacientes, sugerindo que o corpo do indivíduo poderia ativar mecanismos de defesa capazes de montar uma estratégia para eliminação das células cancerígenas. Assim, no início do século XX, começou-se a trabalhar com a hipótese de que drogas com baixo peso molecular poderiam ser usadas no manejo do câncer e outras doenças (BAGULEY, 2002).

A primeira intervenção quimioterápica a pacientes com câncer foi a aplicação do gás mostarda a indivíduos com linfoma não-Hodgkin, causando mielossupressão (KOHNO, 1996). Esse novo advento mostrou que drogas administradas a pacientes com câncer poderiam ter um efeito sistêmico e controlar o crescimento do tumor (CHABNER & ROBERTS, 2005). Posteriormente, foi desenvolvido análogos do ácido fólico, a aminopterinina e o metotrexato, que foram utilizados no tratamento de leucemias agudas em crianças (FARBER *et al.*, 1948).

Em 1953, a elucidação da estrutura de dupla-hélice do DNA por James Watson e Francis Crick revolucionou o desenvolvimento de drogas anticâncer, uma vez que várias estratégias terapêuticas que afetavam a conformação estrutural do DNA, importante para a manutenção celular, foram desenvolvidas (BAGULEY, 2002). Além disso, com o desenvolvimento da cromatografia e química analítica na primeira metade do século XX, vários compostos começaram a ser isolados de plantas, animais e microorganismos. Todo esse processo gerou uma série de agentes com potencial terapêutico e marcou o início do desenvolvimento de modelos experimentais para testes, como linhagens de camundongos isogênicos e linhagens celulares (BAGULEY, 2002).

Em 1955, foi criado o Centro de Serviço Nacional de Quimioterapia do Câncer (NCCSC, do inglês *National Cancer Chemotherapy Service Center*) pelo Congresso dos Estados Unidos para estimular a descoberta de novos quimioterápicos. Durante esse período de grande foco no desenvolvimento de novas drogas, várias informações sobre a cinética do crescimento tumoral e quantificação de citotoxicidade foram adquiridas. Foi observado que algumas drogas utilizadas no tratamento possuíam melhor eficácia na eliminação da célula se aplicada num estágio específico do ciclo celular. Por exemplo, inibidores da síntese de DNA, como a citarabina e o metotrexato, são mais eficientes contra células em rápida divisão. Já drogas que causam dano físico ao DNA, como os agentes alquilantes, eliminam células em todas as fases do ciclo celular (CHABNER & ROBERTS JR., 2005).

Entretanto, no início dos anos 80, os esforços para o desenvolvimento de novas drogas não obtiveram muito sucesso. As estratégias eram baseadas em modelos murinos de leucemia e tumores sólidos que não representavam uma boa predição dos resultados clínicos, além da continuação de rastreamento aleatório de compostos químicos e produtos naturais que pudessem apresentar efeito anticâncer (CHABNER & ROBERTS JR., 2005).

Já no final dos anos 80, com a aplicação de abordagens moleculares e genéticas, foi alcançado um melhor entendimento da biologia celular e descoberta de vias de sinalização que regulavam a fisiologia da célula. Assim, foram identificadas várias vias de sinalização alteradas em células cancerígenas, e a estratégia terapêutica passou a focar nesses sistemas celulares defeituosos, caracterizando a terapia alvo (CHABNER & ROBERTS JR, 2005). HANAHAN & WEINBERG (2011) apresentaram as características que são necessárias para a formação e manutenção do câncer resultantes das diversas alterações das vias celulares. Com o melhor conhecimento desses mecanismos, as drogas passaram a ser direcionadas a um alvo específico na célula com o objetivo de acometer funções importantes na promoção do câncer (Fig. 1.1).

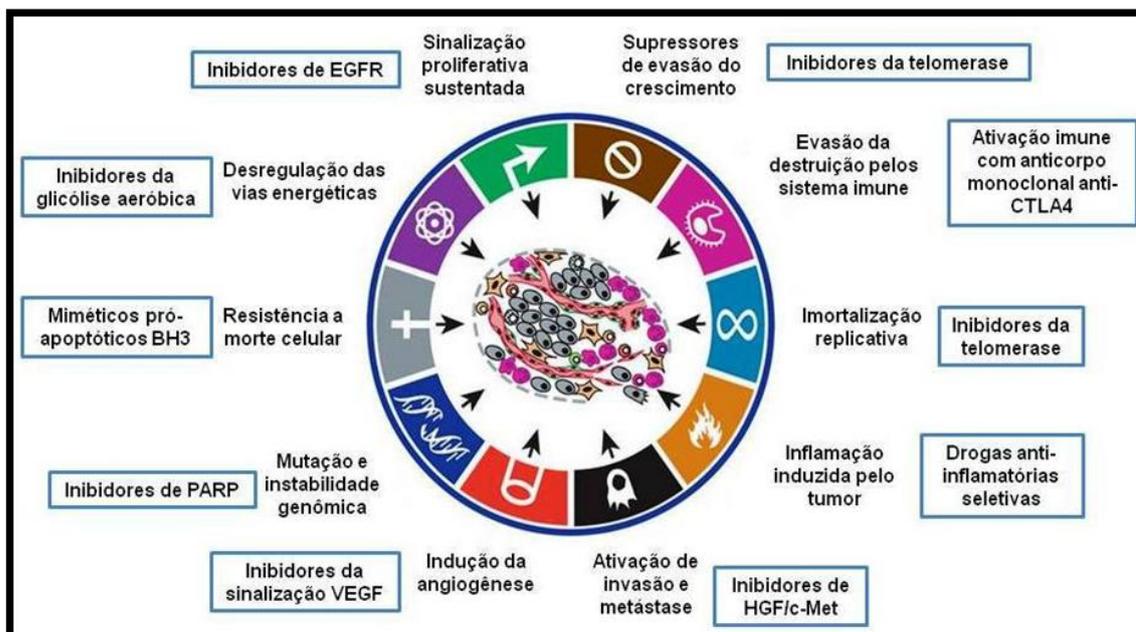


Figura 1.1: Características-chaves para o desenvolvimento do tumor e terapias alvo- O conhecimento da biologia celular e molecular possibilitou a descoberta e elucidação de alterações em diversas vias de sinalização celular nas células cancerígenas. Essas modificações resultam na aquisição de dez fenótipos que são considerados clássicos e essenciais na formação e sobrevivência da massa tumoral. Assim, o desenvolvimento de novas drogas quimioterápicas contra câncer tem focado em ações que inibam ou eliminem essas funções. No retângulo azul estão as medidas anticâncer que interferem nesses mecanismos que promovem a tumorigênese. Algumas dessas estratégias terapêuticas estão em fase de teste, enquanto outras já foram aprovadas e são aplicadas na clínica. (Modificado de HANAHAN & WEINBERG, 2011).

1.3 - Resistência a drogas

Nas últimas décadas têm ocorrido grande avanço na prevenção, detecção e tratamento do câncer. Entretanto, muitos pacientes que respondiam favoravelmente a determinado quimioterápico, apresentam uma redução da resposta em tempos mais tardios do tratamento, resultando na volta do crescimento do tumor (LUQMANI, 2005). Isso ocorre porque embora os tratamentos quimioterápicos tenham apresentado grande eficiência e contribuído para maior chance de cura e melhor qualidade de vida ao paciente, ainda há limitações devido à resistência à drogas, levando o paciente à recidiva e a efeitos colaterais em células normais (SARKADI & MULLER, 1997; ZAHREDDINE & BORDEN, 2013). O problema da resistência à drogas afeta pacientes com diversos tipos de cânceres hematológicos e com tumores sólidos, como mama, ovário, pulmão e trato gastrointestinal (PERSIDIS, 1999; ZAHREDDINE & BORDEN, 2013; SARASWATHY & GONG, 2013).

Alguns tumores apresentam resistência intrínseca, quando as células tumorais já apresentam resistência prévia ao tratamento quimioterápico, ou adquirida, quando o tumor responde inicialmente ao tratamento mas desenvolve resistência ao longo do período de exposição à droga (TSURUO *et al.*, 2003; SARASWATHY & GONG, 2013). Assim, a falha de alguns fármacos comumente

usados na quimioterapia contra o câncer ainda é um grande obstáculo no tratamento de pacientes e requer estudos que possibilitem melhor entendimento dos mecanismos de resistência à drogas pelas células cancerígenas (TSURUO *et al.*, 2003; YAN *et al.*, 2010).

Os mecanismos celulares de resistência têm sido estudados através de modelos experimentais *in vitro*. Células tumorais em cultura podem se tornar resistentes a uma droga ou a uma classe de droga utilizada no tratamento do paciente com câncer. Entretanto, em alguns casos, após a seleção por uma única droga, pode ocorrer também resistência cruzada a outras drogas que não são quimicamente ou estruturalmente relacionadas e possuem alvos celulares distintos. Esse comportamento de sobrevivência a diversos agentes quimioterápicos não associados é denominado de fenótipo de resistência a múltiplas drogas, também denominado de MDR (do inglês *MultiDrug Resistance*) (KOHNO *et al.*, 1988, GOTTESMAN *et al.*, 2002; OZBEN, 2006).

Os três mecanismos MDR principais são: (1) diminuição da absorção de drogas hidrofílicas que necessitam de transportadores para entrada na célula; (2) mudanças na fisiologia celular que afetam a capacidade citotóxica da droga, como ativação de sistemas de detoxificação e alterações em vias do ciclo celular, apoptose e de reparo ao DNA; e (3) aumento do efluxo ativo de drogas hidrofóbicas que entram na célula por difusão através da membrana plasmática (Fig. 1.2) (GOTTESMAN *et al.*, 2002; SZAKÁCS *et al.*, 2006).

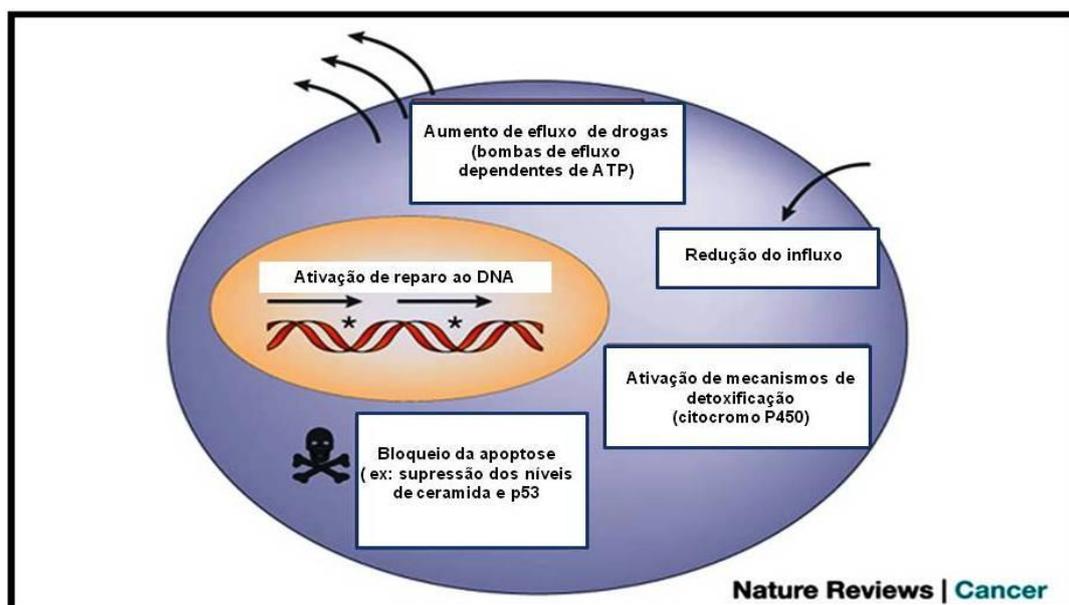


Figura 1.2: Principais mecanismos MDR no câncer- Células cancerígenas podem adquirir uma ou mais características que as conferem resistência a diferentes classes de drogas quimioterápicas, caracterizando o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR). Assim, as células são capacitadas a aumentar o efluxo de drogas através dos transportadores dependentes de ATP ou a reduzir o influxo de drogas, resultando numa menor concentração do quimioterápico no interior da célula e falha na eficiência. Além disso, a célula ainda pode ativar mecanismos de detoxificação (como expressão da proteína citocromo P450), reparar danos ao DNA induzidos pela droga e bloquear vias de sinalização que levam a apoptose (como supressão da p53 e níveis de ceramida). (Modificado de GOTTESMAN *et al.*, 2002).

É importante salientar que o tumor é geneticamente heterogêneo e as células cancerígenas ao serem expostas a droga serão selecionadas de acordo com sua habilidade de sobreviver e proliferar no meio citotóxico. Assim, em uma população de células tumorais sob tratamento com determinado agente quimioterápico, mais de um mecanismo MDR pode estar presente, caracterizando o fenótipo MDR como multifatorial (RUMJANEK, 2001; GOTTESMAN *et al.*, 2002).

O efluxo de drogas, que compromete a concentração ideal do quimioterápico no interior da célula, é um processo comumente estudado em laboratório. Esse mecanismo é mediado pela superexpressão de famílias de transportadores dependentes de energia, conhecidos como transportadores ABC (do inglês, *ATP-Binding Cassette Transporters*), que funcionam como transportadores de solutos através da membrana celular (HIGGINS, 1992; SZAKÁCS *et al.*, 2006). O primeiro transportador ABC estudado foi a proteína Pgp (do inglês, *P-glycoprotein*) ou MDR 1 (do inglês, *MultiDrug Resistance 1*) codificada pelo gene *ABCB 1* (do inglês, *ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1*) (JULIANO, R. L. & LING, V., 1976; CHEN *et al.*, 1986). Posteriormente, foram descobertos outros transportadores como a proteína MRP 1 (do inglês, *Multidrug Resistance Protein 1*) codificada pelo gene *ABCC 1* (do inglês, *ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1*) (COLE *et al.*, 1992), a proteína BCRP (do inglês, *Breast Cancer Resistance Protein*) codificada pelo gene *ABCG 2* (do inglês, *ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2*) (DOYLE *et al.*, 1998), entre outros.

Entender o fenótipo MDR de células tumorais é fundamental na busca de estratégias de tratamento alternativas que consigam reverter à resistência da célula ao efeito quimioterápico da droga. Um dos modos de se estudar tais mecanismos é por meio da comparação de linhagens celulares sensíveis e resistentes.

Alguns estudos utilizam um tipo celular conhecidamente sensível e outro tipo celular resistente a determinado agente quimioterápico (GYÖRFFY *et al.*, 2006; MORI-IWAMOTO *et al.*, 2008). Embora esses trabalhos analisem mecanismos que possam estar conferindo o fenótipo MDR à célula resistente em detrimento da sensível, é importante lembrar que são linhagens celulares distintas. Assim, não

refletem o processo de aquisição de resistência ao longo do tempo de exposição ao tratamento, uma vez que as células sensíveis e resistentes apresentam tais características pré-definidas.

No intuito de obter um modelo *in vitro* que reflita o processo de aquisição de resistência ao quimioterápico que ocorre em pacientes com câncer, se torna mais adequado estudar a aquisição do fenótipo MDR em células tumorais inicialmente sensíveis a determinado composto quimioterápico e que desenvolveram resistência sistemática. KARS *et al.* (2006), por exemplo, com o intuito de estudar possíveis mecanismos de resistência a drogas em células de carcinoma mamário humano, desenvolveram quatro diferentes sublinhagens com o fenótipo MDR a partir da linhagem celular sensível MCF-7. A seleção se deu através da exposição da MCF-7 as drogas paclitaxel, docetaxel, doxorrubicina e vincristina onde as sublinhagens passaram a expressar o transportador MDR 1. Vale ressaltar que essas sublinhagens também apresentaram resistência cruzada a outras drogas antitumorais.

1.4 - Modelo MDR *in vitro*: Leucemia Mieloide Crônica

1.4.1 - Características gerais da Leucemia Mieloide

Crônica

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma malignidade hematopoiética que resulta na expansão de células-tronco da medula óssea (MELO *et al.*, 2003). A LMC é caracterizada por grande proliferação de blastos indiferenciados, exceto na leucemia promielocítica, que possuem a translocação cromossômica t(9;22). Um dos efeitos dessa alteração é a presença do cromossomo *Philadelphia* (Ph+), caracterizado pela fusão gênica BCR-ABL (ROWLEY, 1973), resultando na proteína quimérica BCR-ABL que possui atividade tirosina quinase desregulada e tem papel central na patogênese da LMC (MELO *et al.*, 2003).

O tratamento da LMC se baseia na inibição dos receptores tirosina quinase por meio da elaboração de agentes sintéticos que se liguem ao sítio de ligação da ATP ou de substratos, impedindo a fosforilação e ativação da atividade da proteína quinase (MELO *et al.*, 2003). O Gleevec (Imatinibe) foi o primeiro inibidor de tirosina quinase aprovada para o tratamento da LMC (DRUKEL *et al.*, 2001), mas já são observados mecanismos celulares que conferem resistência a esse inibidor como,

por exemplo, a superexpressão de transportadores MDR 1 (MAHON *et. al.*, 2003). Além disso, já foi relatado também aquisição de resistência aos inibidores de segunda geração, como o nilotinibe (MAHON *et. al.*, 2008; TIWARI *et. al.*, 2009) e o dasatinibe (CHEN *et. al.*, 2009; HIWASE *et. al.*, 2008).

1.4.2 - Linhagens K562, Lucena 1 e FEPS

A K562 é uma linhagem celular imortalizada de LMC em crise blástica obtida de um paciente em fase terminal com grande capacidade proliferativa em cultura (LOZZIO & LOZZIO, 1975). A LMC em crise blástica, altamente agressiva e que leva a morte do paciente (FADERL *et. al.*, 1999), é caracterizada pela aquisição de novas alterações cromossômicas e moleculares, como duplicação do cromossomo Ph+, trissomia do cromossomo 8 e mutações em p53 e p16/ARF (CALABRETTA & PERROTTI, 2004). O tratamento do paciente em crise blástica consiste em uma série de medidas no intuito de retornar a fase crônica e realização de transplante. Por sua agressividade, há casos em que tratamentos quimioterápicos de indução aplicados à leucemia mielóide aguda (LMA), como uso de antraciclinas e citarabina, é uma opção de quimioterapia (HEHLMANN & SAUSSELE, 2008; NCCN, 2015).

Assim, no desenvolvimento do modelo de resistência com a linhagem parental sensível K562 foram utilizadas drogas do tratamento de leucemias agudas, como a vincristina e a daunorrubicina. Baseado na técnica *in vitro* de estabelecimento de resistência a múltiplas drogas (TSURUO *et al.*, 1983), RUMJANEK *et al.*, 1994 e PINTO-SILVA, 2007 desenvolveram duas linhagens com o fenótipo MDR, denominadas Lucena 1 e FEPS, respectivamente, a partir da K562.

A Lucena 1 foi selecionada a partir da linhagem K562 cultivada em meio com aumento gradual da concentração de vincristina, adquirindo resistência a 60nM da droga (RUMJANEK *et al.*, 1994). A vincristina pertence ao grupo de quimioterápicos derivado do alcaloide da vinca e atua inibindo a polimerização da tubulina e conseqüentemente do fuso mitótico. Assim, há desregulação da divisão celular na metáfase e de outros processos celulares (HIMES *et. al.*, 1976; JORDAN *et. al.*, 1991). Em comparação com a K562, a linhagem Lucena 1 apresenta cinco vezes mais cópias do gene *ABCB 1* e resistência a outros quimioterápicos não relacionados quimicamente (RUMJANEK *et al.* 2001).

A FEPS, também originada da K562, foi selecionada em meio de cultura com aumento gradual da concentração de daunorrubicina, adquirindo resistência a

466nM da droga (DAFLON-YUNES *et al.*, 2013). A daunorrubicina pertence à classe de drogas denominadas de antraciclinas, derivada da bactéria *Streptomyces*. O mecanismo de ação da droga consiste primariamente na inibição da enzima topoisomerase II, que causa dano à integridade do DNA (HORTOBÁGYI, 1997). A FEPS apresenta resistência também à droga vincristina e é parcialmente resistente ao imatinibe. Além disso, quando comparada com sua linhagem parental K562, apresenta menor taxa de replicação, menor expressão da proteína associada à morte celular CD95 e maior expressão dos transportadores MDR 1 e MRP 1 (DAFLON-YUNES *et al.*, 2013).

1.4.3 - Análises de microarranjo

Uma vez que as linhagens Lucena 1 e FEPS são derivadas da linhagem K562, analisar o perfil de expressão gênica dessas células pode elucidar mecanismos pelos quais a linhagem parental sensível adquiriu o fenótipo de resistência sob pressão dos quimioterápicos de seleção. Dados de microarranjo de RNA mostraram alterações na expressão gênica das linhagens derivadas MDR quando comparadas com a linhagem parental. Essas alterações influenciam em diversas funções celulares como ciclo, morte, sinalização, desenvolvimento, manutenção, metabolismo de droga, entre outros. Assim, essas mudanças no perfil genético e alterações de funções biológicas podem elucidar processos que resultaram na aquisição do fenótipo MDR (MOREIRA *et al.*, 2014).

Na comparação entre K562 e Lucena 1 foram identificados 130 genes diferentemente expressos, onde 65 foram mais expressos na linhagem MDR e 65 mais expressos na linhagem sensível; na comparação entre K562 e FEPS foram identificados 932 genes diferentemente expressos, onde 288 foram mais expressos na linhagem MDR e 644 mais expressos na linhagem sensível; e na comparação entre Lucena 1 e FEPS foram identificados 1.211 genes diferentemente expressos, onde 459 foram mais expressos na FEPS e 752 mais expressos na Lucena 1 (MOREIRA *et al.*, 2014).

Esse perfil genético corresponde a alterações em 20 vias de funções biológicas ao comparar as diferenças de expressão entre Lucena 1 com K562, cinco entre FEPS e K562 e sete entre Lucena 1 e FEPS. Um grupo de genes identificado com alterações no padrão de expressão compõe a via de sinalização de NOTCH. De acordo com os dados do microarranjo da relação entre a linhagem K562 e Lucena 1, o gene *NOTCH 2* e o gene *HEY 1* foram 6,7 vezes e 5,7 vezes mais expressos na

linhagem Lucena 1, respectivamente; o gene *JAGGED 1*, foi 5,7 vezes menos expresso na linhagem Lucena 1 e para os outros genes não foi observado diferença de expressão. Em relação à linhagem K562 e FEPS, os genes *NOTCH 2* e *HEY 1* foram 8,3 vezes e 283,3 vezes mais expressos na linhagem FEPS, respectivamente; os genes *PRESENILINA 1*, *DELTA-LIKE 1*, *JAGGED 1* e *HES 1* foram: 2,4 vezes, ≈ 2 vezes, 2,5 vezes e 7,3 vezes menos expressos na linhagem FEPS, respectivamente. Para os outros genes não foi observado diferença de expressão (MOREIRA *et al.*, 2014).

A via de NOTCH está associada a funções cruciais na manutenção da célula como proliferação, diferenciação e apoptose de maneira positiva ou negativa a depender do contexto celular, refletindo sua complexidade (CHIARAMONTE *et al.*, 2005; SCHWANBECKET *et al.*, 2011). Uma vez que as células passaram a sobreviver à exposição a drogas, houve modulação de mecanismos de proliferação, diferenciação e apoptose. Como a via de NOTCH está associada a tais mecanismos celulares e alterações dos genes dessa via foram observadas nos dados de microarranjo quando comparada a linhagem sensível com suas derivadas resistentes, é possível que a alteração da via de NOTCH esteja contribuindo para a aquisição do fenótipo MDR.

1.5 - Via de sinalização de NOTCH

1.5.1 - Descrição da via de NOTCH

A primeira descrição dos genes *NOTCH* foi feita por Morgan em 1917, a partir de mutantes de *Drosophila* que apresentavam como fenótipo a presença de pequenos cortes nas asas em forma de "V", daí a denominação do gene *NOTCH*, (do inglês corte ou retalho). Os genes dessa via apresentam uma distribuição ubíqua em animais, participando de vários mecanismos celulares (BORGGREFE & OSWALD, 2009).

A via de NOTCH é composta por receptores, ligantes e genes-alvo (Fig. 1.3). Quatro genes (*NOTCH 1*, *NOTCH 2*, *NOTCH 3* e *NOTCH 4*) codificam os receptores transmembrana que possuem domínios extracelular, intermembrana e intracelular (LEONG & KARSAN, 2006). A porção extracelular dos receptores NOTCH apresenta sequências de aminoácidos semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor like* - EGF-L) que são os locais de ligação dos ligantes de NOTCH (REBAY *et al.*, 1991). As repetições EGF-L são um dos critérios de

diferenciação das quatro isoformas de NOTCH em mamíferos; NOTCH 1 e NOTCH 2 possuem 36 repetições EGFs, enquanto NOTCH 3 possui 34 e NOTCH 4 possui 29. Outra diferença é a presença de domínio de transativação nos NOTCH 1 e 2 e sua ausência em NOTCH 3 e 4 (RADTKE & RAJ, 2003).

Os ligantes de NOTCH consistem em proteínas transmembrana e, nos mamíferos, é composta por cinco membros: JAGGED 1 (JAG 1), JAGGED 2 (JAG 2), DELTA-LIKE 1 (DLL 1), DELTA-LIKE 3 (DLL 3) e DELTA-LIKE 4 (DLL 4) (LEONG & KARSAN, 2006). Os ligantes também possuem repetições EGF-L e diferem entre si no número e espaçamento dessas repetições na região extracelular, além do fato da família JAG possuir domínios ricos em cisteína (RADTKE & RAJ, 2003).

Para ativação da via de NOTCH é necessário que haja interação física entre as porções extracelulares dos receptores e ligantes, fazendo com que o receptor NOTCH passe por clivagens proteolíticas (clivagens S2 e S3) (BRAY, 2006). Em vertebrados, a clivagem S2 é mediada pela metaloprotease enzima de conversão do TNF- α (TACE, do inglês, *TNF- α converting enzyme*), que libera grande parte do domínio extracelular, resultando num receptor truncado. O NOTCH truncado serve de substrato para um complexo de proteínas denominado de γ -secretases (PRESENILINA, NICASTRINA, APH1 e PEN2) que medeiam a clivagem S3, resultando na liberação do domínio intracelular de NOTCH (NOTCH-IC) no citoplasma.

O NOTCH-IC ao ser liberado no citoplasma migra para o núcleo, onde remove o complexo de proteínas co-repressoras (CoR) do fator de transcrição de ligação do DNA denominado CSL (do inglês, *CBF1, suppressor of hairless and lag-1*), se ligando a ele. Posteriormente, o complexo formado entre o NOTCH-IC e o CSL recruta proteínas co-ativadoras MasterMind (MAM) e esse complexo ternário funciona como um ativador transcricional (KOPAN & LLHAGAN, 2009). Vale ressaltar que ocorre também o recrutamento da proteína p300 histona-acetiltransferase que acetila histonas, tornando a conformação da cromatina favorável à ativação de genes alvos como os da família *HES* (do inglês, *hairy and enhancer of split-1*) e *HEY* (do inglês, *Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1*) (LEONG & KARSAN, 2006).

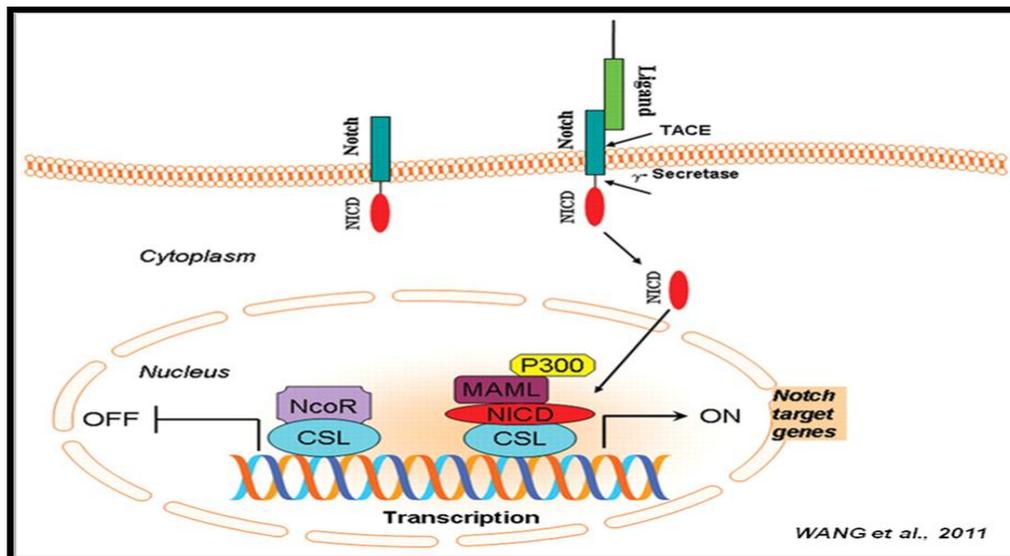


Figura 1.3: Via de sinalização de NOTCH- a via de NOTCH é composta pelos receptores e ligantes de NOTCH, enzimas de clivagem e genes alvos. Para a ativação da via há interação física entre o ligante e o receptor de NOTCH, ocorrendo duas clivagens proteolíticas, mediadas pelas enzimas TACE e γ -secretase, no receptor. Esse processo resulta na liberação do fragmento intracelular do receptor NOTCH (*NICD*, do inglês Notch Intracelular Domain) que migra para o núcleo. No núcleo, o NICD remove o complexo de proteínas co-repressoras (NcoR) do fator de transcrição de ligação do DNA, denominado CSL (do inglês, *CBF1*, *suppressor of hairless and lag-1*), se ligando a ele. Posteriormente, há o recrutamento de proteínas co-ativadoras MasterMind (MAML) e da proteína p300 histona-acetiltransferase, tornando a conformação da cromatina favorável à ativação de genes alvos. (Figura obtida de WANG *et al.*, 2011).

1.5.2 Funções da via de NOTCH

A via de sinalização de NOTCH é fundamental para a biologia do desenvolvimento, tendo papel na diferenciação, proliferação, sobrevivência celular e, conseqüentemente, está associada a diversos processos como neurogênese, angiogênese, hematopoiese, entre outros (PENTON *et al.*, 2012). A regulação da expressão gênica é a principal característica da via de sinalização de NOTCH e identificar a expressão dos receptores, ligantes e genes alvos em diferentes contextos celulares é fundamental para entender como sua via canônica controla funções celulares tão distintas (SCHWANBECK *et al.*, 2011). Os genes alvos desta via mais estudados são os da família *HES* e *HEY*, *c-Myc*, *p21*, *MHC* de classe I, *IL-6* e ciclina D1 (ISO *et al.*, 2003), que influenciam a proliferação e diferenciação celular e apoptose de maneira positiva ou negativa a depender do órgão.

A via de NOTCH pode induzir a autorenovação de células ou a diferenciação num tipo celular distinto. As células proneurais de *Drosophila* que podem se desenvolver em células neurais ou epidermais é um exemplo clássico de como a via de NOTCH está associada á manutenção de células indiferenciadas. Nesse caso, ocorre a inibição do desenvolvimento das células proneurais adjacentes a certo

grupo de células já diferenciado (inibição lateral), mantendo essas células como progenitoras neurais por meio de autorenovação. Essa restrição da diferenciação se dá pela repressão dos genes proneuronais pelos repressores *Helix-Loop-Helix* (produtos dos genes *HES*) (ISO *et al.*, 2003; SCHWANBECK *et al.*, 2011). Mas já em outras ocasiões, tais repressores podem restringir o número de células progenitoras, favorecendo a diferenciação, como no desenvolvimento do músculo esquelético, do coração e do intestino. Assim, a ativação de repressores *Helix-Loop-Helix* da família de genes *HES* e *HEY* pela via de NOTCH é um meio de controlar e prevenir células equipotentes de adotar um mesmo desenvolvimento celular ou de se diferenciar prematuramente (SCHWANBECK *et al.*, 2011).

A via de sinalização NOTCH também é responsável pela manutenção de células-tronco hematopoiéticas autorenováveis em humanos, como precursores linfóide, mielóide e eritróide. A via se encontra ativa nessas células-tronco hematopoiéticas e é reprimida quando ocorre a diferenciação desses progenitores num tipo celular sanguíneo específico (LEONG & KARSAN, 2006). A via de NOTCH contribui para a diferenciação não somente pela ação repressora das proteínas HES e HEY, mas também por outros mecanismos. No epitélio de mamíferos, por exemplo, a via de NOTCH aumenta a expressão do inibidor de ciclo celular p21, causando a suspensão do ciclo celular e início da diferenciação (SCHWANBECK *et al.*, 2011).

De forma contexto-dependente, a via de sinalização de NOTCH está envolvida na proliferação celular ou apoptose. Na transformação de células pela ativação de NOTCH é possível que envolva a desregulação do ciclo celular pela ativação direta de genes reguladores, como ciclina D1 (SCHWANBECK *et al.*, 2011). Em humanos, a desregulação da expressão dos receptores NOTCH, ligantes e alvos são observados em muitos casos de tumores sólidos e hematológicos. A primeira associação entre a via de NOTCH e malignidades humanas foi observada em raros casos de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda de Células T (*T-ALL*, do inglês, *T-cell acute lymphoblastic leukemia*) que apresentavam a alteração cromossomal t(7;9) e consequente produção de receptores NOTCH 1 truncados. Esses receptores truncados, caracterizados pela ausência da maior parte da subunidade extracelular, são ativados constitutivamente (ELLISEN *et al.*, 1991; NICKOLOFF *et al.*, 2003; LOBRY *et al.* 2011). Além disso, foram identificadas outras mutações de ativação do *NOTCH 1* em mais de 50% dos casos de T-ALL, sendo as mutações no domínio de heterodimerização, que induzem a ativação independente

de ligante, e a mutação no domínio carboxi-terminal PEST, que aumenta a estabilidade da porção intracelular ativadora, as alterações principais (WENG *et al.*, 2004; LOBRY *et al.* 2011).

Posteriormente, a via de sinalização de NOTCH foi associada a outros cânceres, apresentando amplificação do receptor *NOTCH 3* em carcinoma ovariano e redução dos níveis do antagonista de NOTCH, a proteína NUMB, em câncer de mama em humanos (YIN *et al.*, 2010). Entretanto, a via de NOTCH não é somente associada a sua função oncogênica, mas também apresenta um papel na supressão tumoral em alguns tipos de cânceres. Em estudos *in vitro* de carcinoma hepatocelular murino e humano foi observado que a ativação da via de NOTCH induziu o bloqueio da proliferação celular e apoptose (VIATOUR *et al.*, 2011). Um outro exemplo da função supressora tumoral da via de NOTCH foi observada em carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço, onde foi identificado mutações no gene *NOTCH 1*, resultando em receptores truncados e provável desregulação da diferenciação celular (AGRAWAL *et al.*, 2011).

1.5.3 A via de NOTCH nas leucemias

A via de NOTCH tem sido estudada em vários tipos de cânceres hematológicos como em leucemias mielóide e linfóide, linfomas e mieloma múltiplos (YIN *et al.*, 2010; TEJADA *et al.*, 2014). Entretanto a relação da patogênese da T-ALL e a via de NOTCH como oncogênica, onde o receptor NOTCH 1 apresenta ativação constitutiva, é a mais bem determinada. Para os outros tipos de cânceres hematológicos, há estudos que indicam que componentes da via de NOTCH exerçam uma função como oncogênico ou supressor tumoral, mas investigações mais detalhadas devem ser conduzidas no intuito de evitar resultados controversos e obter um entendimento mais robusto e conclusivo dos efeitos da via (LIU *et al.*, 2013; TEJADA *et al.*, 2014).

Na Leucemia Mielóide Aguda (LMA), por exemplo, o papel da via de sinalização de NOTCH ainda é controverso. A ativação da via pode ter consequências variadas no crescimento e sobrevivência das células leucêmicas a depender das características individuais da amostra do paciente (TOHDA *et al.*, 2005). Outros estudos, como XU *et al.* (2010), mostraram que a ativação da via de NOTCH em células da medula óssea indicam prognóstico desfavorável e,

particularmente, a expressão de *NOTCH 1*, *JAG 1* e *DLL 1* pode ser um relevante marcador prognóstico em LMA de risco intermediário.

Entretanto, KANNAN *et al.*, 2013 e LOBRY *et al.*, 2013 analisaram que a via de NOTCH está silenciada em LMA humana e sua ativação inibe o crescimento de células de LMA *in vitro* e *in vivo*. Foi observado maior expressão do RNA mensageiro do receptor *NOTCH 2* na maioria das amostras de LMA de pacientes quando comparado com células tronco hematopoiéticas derivadas de medula óssea normal. Em relação a apoptose, a via ativada por NOTCH-HES1 induziu apoptose mediada por caspase, supressão da expressão do gene Linfoma de Células B 2 (*BCL-2*, do inglês B cell lymphoma 2) e superexpressão de TP53. Além disso, foi também observado que a ativação da via de NOTCH induziu a diferenciação de células leucêmicas em macrófagos e células dendríticas, levando a regressão da doença. Assim, esses dados mostram que a ativação da via de NOTCH teria uma função supressora tumoral, representando um potencial alvo terapêutico.

1.5.4 A via de NOTCH como alvo terapêutico

O conhecimento da via canônica de NOTCH, composta por ligantes, receptores, enzimas de clivagem e genes alvo, possibilita estratégias terapêuticas que têm como alvo componentes específicos da via (Fig. 1.4) (YIN *et al.*, 2010). Em relação a intervenções na célula emissora de sinal, uma das alternativas de impedir a ativação da via consiste na elaboração de moléculas que se liguem aos ligantes, impedindo a interação física com seus receptores nas células adjacentes. RIDGWAY *et al.* (2006) observaram que o uso de anticorpos monoclonais contra o ligante DLL 4 causou desregulação da angiogênese e consequente inibição do crescimento tumoral.

As estratégias que tem como alvo o meio intracelular da célula receptora de sinal, como o silenciamento gênico, representa uma maneira de impedir a transcrição dos genes receptores de NOTCH ou genes alvo da via. Foi observado que micro RNAs (miRNAs) podem se ligar à região 3'-UTR do RNA mensageiro (mRNA) dos genes que codificam os receptores de NOTCH, regulando a via (YIN *et al.*, 2010). O miRNAs-34a, por exemplo, é desregulado em gliomas humanos e a indução da sua expressão inibiu o crescimento de tumor cerebral *in vivo* por meio do silenciamento de múltiplos oncogenes, como *c-MET*, *NOTCH 1* e *NOTCH 2* (LI *et al.*, 2009).

Outras estratégias de silenciamento se baseiam no uso de chaperonas de histonas, como a Asf1 (do inglês *Anti-silencing function 1*), que contribui para a repressão dos genes alvo da via de NOTCH (GOODFELLOW *et al.*, 2007). O tratamento com proteínas do grupo polycomb, que se ligam a região codificante dos genes da via, controlam a transcrição gênica, modulam a proliferação celular e causam supressão tumoral (YIN *et al.*, 2010). Foi observado também que peptídeos dominantes negativos derivados de proteínas co-ativadoras MAML1 (DN-MAML1), impedem o recrutamento dessas proteínas co-ativadoras ao complexo NOTCH-IC/CSL, bloqueando a ativação gênica dos alvos de NOTCH e proliferação celular em linhagens de T-ALL (WENG *et al.*, 2003).

Embora essas estratégias se mostrem bem promissoras, a inibição das enzimas de clivagem, TACE e principalmente das γ -secretases, por inibidores farmacológicos é a estratégia terapêutica que tem tido maior avanço (NAM *et al.*, 2002; NICKOLOFF *et al.*, 2003; SHIH & WANG, 2007; LIU *et al.*, 2012). Ao inibir a ação dessas proteínas de clivagem, o receptor NOTCH não é clivado e, conseqüentemente, não há liberação da porção intracelular e formação do complexo transcricional no núcleo, crucial para ativação da via canônica.

Os inibidores de γ -secretase (GSI, do inglês *gamma-secretase inhibitor*) possuem grande potencial na terapia alvo com foco na via de NOTCH. Foi observado que o tratamento de T-ALL com GSIs, como os compostos E, DAPT, MRK-003 e YO01027, induz a suspensão do ciclo celular e apoptose (YIN *et al.*, 2010). Em mieloma, GSI-XII induziu apoptose e maior sensibilidade das células a quimioterápicos, como doxorrubicina e melphalan, representando um mecanismo terapêutico (NEFEDOVA *et al.*, 2008). Outro estudo tem observado que o silenciamento gênico do *NOTCH 2* por siRNA (do inglês, *small-interfering RNA*) mais o uso de GSI promoveu a apoptose de células de Leucemia Linfocítica de Células B (B-CLL, do inglês *B-cell chronic lymphocytic leukemia*) (ROSATI *et al.*, 2009; HUBMANN *et al.*, 2013). Entretanto, vale ressaltar que a aplicação de GSI ainda é um desafio devido a sua citotoxicidade ao trato gastrointestinal (BARTEN *et al.*, 2006), resistência adquirida e devido ao fato de que os GSIs inibem a via de todos os quatro homólogos de NOTCH de forma indiscriminada e pode bloquear a via em tecidos em que a ativação exerce uma função supressora tumoral (O'NEIL *et al.*, 2007).

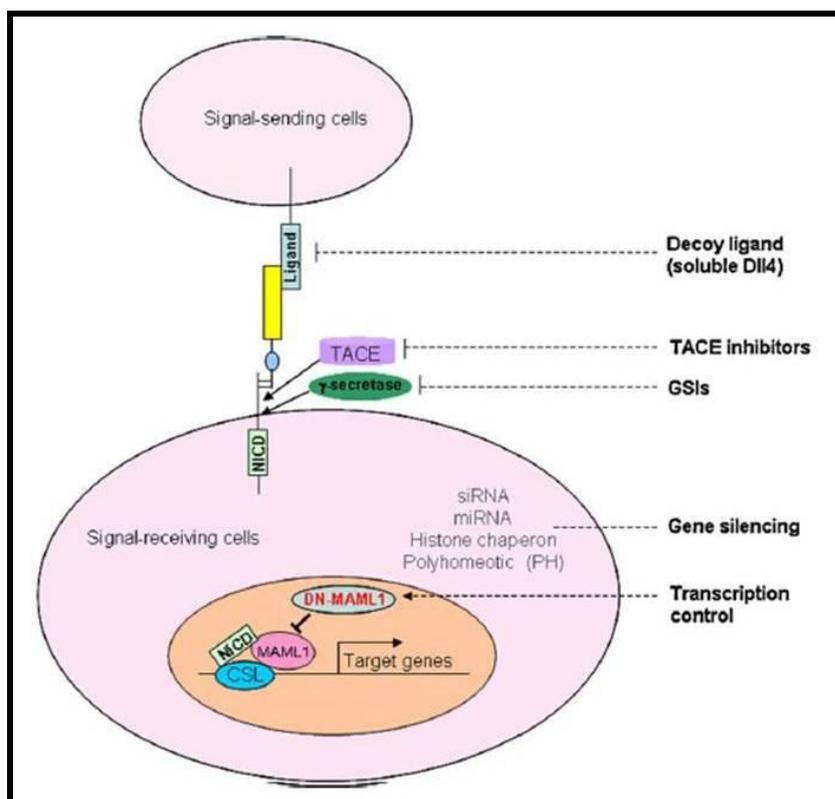


Figura 1.4: Potenciais intervenções terapêuticas com alvo na via de sinalização de Notch - para ativação da via de Notch há interação física entre o ligante, que se encontra na célula emissora de sinal, com o receptor, que se encontra na célula receptora de sinal, resultando em clivagens proteolíticas, formação do complexo de ativação transcricional e transcrição de genes alvo. Assim, há vários pontos da via que podem ser manejados como alvo terapêutico: (1) desenvolvimento de moléculas que sequestram ligantes de NOTCH, como DLL4 solúvel; (2) bloqueio das clivagens por inibidores de TACE e da atividade das γ -secretases; (3) silenciamento gênico por siRNAs, miRNAs, chaperonas de histonas, e (3) regulação da transcrição gênica. (Figura obtida de YIN *et al.*, 2010).

1.6 - Relação modelo MDR *in vitro* e pacientes com LMA

1.6.1 - Características gerais da LMA

A LMA é uma neoplasia mielóide agressiva com parada da maturação na mielopoiese, exceto na leucemia promielocítica, levando ao acúmulo de mieloblastos na medula óssea e no sangue. Os blastos mielóides podem ser caracterizados pela identificação de bastonetes de Auer, marcação de mieloperoxidase por citocímica e presença de marcadores como CD13, CD33, CD117 por citometria (HASSERJIAN, 2013).

O aspirado de medula óssea constitui o padrão-ouro no diagnóstico, onde deve ser obtida contagem de blastos mielóides em pelo menos 500 células da medula óssea (HASSERJIAN, 2013). Por ser uma neoplasia hematológica heterogênea, a classificação da LMA tem o intuito de direcionar o tratamento para atender a especificidade de cada tipo e obter informações sobre o prognóstico do

paciente que possam indicar resposta á quimioterapia e risco de recidiva. O primeiro sistema de classificação foi elaborado pelo grupo *French-American-British (FAB)* e é baseado em marcações citoquímicas e morfológicas, categorizando a doença de acordo com o grau de diferenciação dos blastos mielóides e monócitos (LMA M0 - M7). Pela FAB, o diagnóstico da LMA é confirmado pela presença de pelo menos 30% de blastos mielóides na medula óssea.

A Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*) em 1997 modificou a classificação da FAB, incorporando informações citogenéticas e evidência de displasia (HARRIS *et al.*, 1999). Com essa classificação mais detalhada houve um maior refinamento dos subgrupos, permitindo um prognóstico mais acurado e possibilitando a aplicação de uma estratégia terapêutica mais eficaz. Pela classificação da WHO, a LMA é classificada como LMA com translocações citogenéticas recorrentes, LMA com características relacionadas à síndrome mielodisplásica, LMA inespecífica e LMA relacionada à terapia. Cada uma dessas categorias ainda é subclassificada de acordo com sua morfologia. Por essa nova classificação da WHO, o diagnóstico da LMA é confirmado com presença de pelo menos 20% de blastos mieloides na medula óssea.

1.6.2 - Comparação entre linhagens MDR e amostras de pacientes com LMA

Um dos quimioterápicos utilizados no tratamento da LMA é a antraciclina daunorrubicina, mesma droga de seleção da linhagem FEPS do modelo MDR *in vitro*. A ação desse quimioterápico na linhagem K562 induziu alterações na fisiologia da célula em relação ao fenótipo MDR mais intensas do que a vincristina. Foi observado superexpressão de dois transportadores ABC (*ABCB1* e *ABCC1*) na FEPS (DAFLON-YUNES *et al.*, 2013), enquanto que a Lucena 1 superexpressou apenas um transportador (*ABCB1*) (RUMJANEK *et al.*, 2001). Alguns estudos indicam a expressão e efeito dos transportadores ABC em pacientes com LMA. A proteínas MDR 1 e MRP 1, por exemplo, presentes em blastos de LMA tem sido relacionada a baixas taxas de remissão completa e curta sobrevida (PALLIS *et al.*, 2002; VAN DER POL *et al.*, 2003). Os transportadores MDR 1 e BCRP também podem está associado a mau prognóstico em pacientes com LMA (BENDERRA *et al.*, 2004). Esses estudos sugerem que a presença desses transportadores de membrana esteja contribuindo para o fenótipo MDR de pacientes e diminuindo a eficácia do tratamento.

Outra característica adquirida mais intensamente pela seleção por daunorrubicina do que por vincristina foi a expressão dos genes da via de NOTCH. Segundo os dados de microarranjo, o receptor *NOTCH 2* foi 8,26 vezes mais expresso e o gene alvo *HEY 1* foi 283,26 vezes mais expresso na FEPS em relação a K562, enquanto que na Lucena 1 em relação a K562, a superexpressão foi de 6,71 vezes e 5,70 vezes para os genes *NOTCH 2* e *HEY 1*, respectivamente (MOREIRA *et al.*, 2014). Esses dados sugerem que o uso da antraciclina daunorrubicina como droga de seleção induziu características que podem estar associada à aquisição de resistência mais definidas na célula FEPS, uma vez que mais transportadores ABC e componentes da via de NOTCH foram expressos.

Assim, a FEPS, linhagem resistente a daunorrubicina, apresenta superexpressão de transportadores ABC e genes da via de NOTCH e analisar essas características em amostras de pacientes coletadas ao diagnóstico de LMA pode indicar o prognóstico da doença por meio da análise da sobrevida global dos pacientes.

1.7 - Justificativa do trabalho

A resistência a quimioterapia por pacientes com câncer ainda é um desafio no tratamento, exigindo estudos que consigam elucidar mecanismos para desenvolver novas estratégias de intervenção terapêutica e promover uma melhor taxa de sobrevida ao paciente. Dados de microarranjo das linhagem K562 e suas derivadas com o fenótipo MDR Lucena 1 e FEPS mostraram alterações na via de sinalização de NOTCH. Esta via está relacionada a funções cruciais na célula, como apoptose e proliferação celular, que as sublinhagens resistentes passaram a modular. Assim, a validação e interpretação da alteração da expressão dos genes que compõem a via de NOTCH pode elucidar novos mecanismos que contribuem para aquisição do fenótipo MDR e determinar possíveis alvos terapêuticos.

Vale ressaltar que o uso da daunorrubicina como droga de seleção da FEPS induziu mais características que contribuem para o fenótipo MDR do que com o uso da vincristina na seleção da Lucena 1. Entre essas características estão a maior superexpressão de transportadores ABC e genes da via de sinalização de NOTCH. A daunorrubicina é um quimioterápico usado no tratamento de pacientes com LMA e é possível que efeitos da droga na linhagem possam dar indícios da resposta do pacientes ao tratamento na clínica. De fato, assim como na linhagem FEPS,

pacientes com LMA podem adquirir resistência a esse quimioterápico devido a superexpressão de transportadores ABC. Além disso, a via de NOTCH não está bem elucidada na LMA, onde há resultados controversos sobre sua ação oncogênica ou supressora tumoral. Assim, o presente trabalho propõe também analisar o transportador *ABCB 1* e genes da via de NOTCH em amostras de pacientes diagnosticados com LMA. A análise desta via pode auxiliar no melhor entendimento biológico da doença, elucidando formas alternativas de tratamento e indicando fatores prognósticos como resposta ao tratamento.

2.0 - OBJETIVOS

Geral

Analisar a expressão dos genes que compõem a via de sinalização celular de NOTCH em linhagens leucêmicas com o fenótipo MDR e em células de medula óssea de pacientes diagnosticados com LMA.

Específicos

- Validar quantitativamente os dados do microarranjo em relação aos genes da via de NOTCH das linhagens K562, Lucena 1 e FEPS;
- Interpretar como a heterogeneidade de expressão dos genes da via de NOTCH pode estar relacionada com o fenótipo MDR;
- Caracterizar a intensidade de expressão dos genes selecionados da via de NOTCH e do gene *ABCB 1* em células de pacientes diagnosticados com LMA antes do tratamento
- Avaliar se há alguma relação entre a via de NOTCH e a expressão do gene *ABCB 1* na sobrevida global dos pacientes

3.0 - MATERIAIS & MÉTODOS

3.1 - Linhagens celulares K562, Lucena 1 e FEPS

Células da linhagem de LMC em crise blástica K562 e suas derivadas com o fenótipo MDR Lucena 1 (desenvolvida por RUMJANEK *et al.*, 1994) e FEPS (desenvolvida por PINTO-SILVA, 2007), selecionadas para resistência contra os quimioterápicos vincristina e daunorrubicina, respectivamente, foram cedidas pela Dr. Vivian Rumjanek, chefe do Laboratório de Imunologia Tumoral do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio RPMI (RPMI 1640 Medium - SIGMA®) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Soro Bovino Fetal- GIBCO®), a 37° C com 5% de CO₂, na presença ou ausência das drogas de seleção. A droga Tecnocris® Sulfato de Vincristina 1mg/ml (ZODIAC) (concentração final de 60nM) foi adicionada a cultura da Lucena 1 e a droga Daunocin- Cloridrato de Daunorrubicina 20 mg (MEIZLER Biopharma S/A) (concentração final de 466nM) a FEPS. Vale ressaltar que, de acordo com o laboratório de onde as células foram cedidas, embora as linhagens MDR sejam derivadas da K562, não foi alcançada a sincronização entre as linhagens.

No protocolo de cultura inicial, os três tipos celulares foram descongelados ao mesmo tempo e colocados em cultura por 24h para recuperação das células. Após esse período, as células foram submetidas a quatro passagens até a extração de RNA. O período entre cada passagem e entre a quarta passagem e a extração de RNA foi de 72h e a adição da droga, quando adicionada, ocorreu a partir da terceira passagem. A cada passagem a concentração de células por ml (cél./ml) foi reduzida a concentrações variáveis de 5×10^3 células/ml a 2×10^4 células/ml conforme esquema (Fig. 3.1). A cultura foi realizada em garrafas de 75 cm³ a um total de 30 ml de meio de cultura/garrafa (incluindo a quantidade referente à concentração celular).

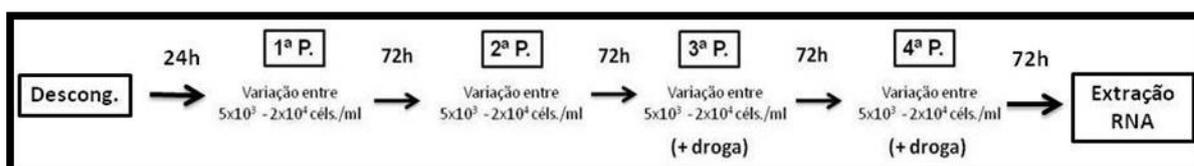


Figura 3.1: Protocolo de cultura de célula inicial - Protocolo inicial de cultura celular. As células foram descongeladas (Descong.) e recuperadas num período de 24h. Posteriormente, foram passadas por 4 passagens celulares (P.) a cada 72 horas de cultura sendo ajustada a concentrações celulares entre 5×10^3 células/ml a 2×10^4 células/ml. Na terceira e quarta passagens foram adicionadas as drogas (+ droga) vincristina e daunorrubicina para as linhagens Lucena 1 e FEPS, respectivamente. Após a quarta passagem e 72h de cultura, foi realizada a extração de RNA.

Foi também realizado um protocolo de cultura com a intenção de avaliar a influência da densidade celular da cultura sobre a expressão dos genes analisados, a fim de testar essa hipótese surgida durante as primeiras análises da expressão gênica. Para esse protocolo revisado, após o período de 24h de recuperação do descongelamento, os tipos celulares foram divididos em quatro grupos e ajustados a concentrações definidas de $2,5 \times 10^3$ céls./ml, 5×10^3 céls./ml, 1×10^4 céls./ml e 2×10^4 céls./ml a cada passagem conforme esquema (Fig. 3.2). Além disso, as culturas foram realizadas em garrafas de 25 cm^3 a um total de 10 ml de meio de cultura/garrafa (incluindo a quantidade referente à concentração celular).

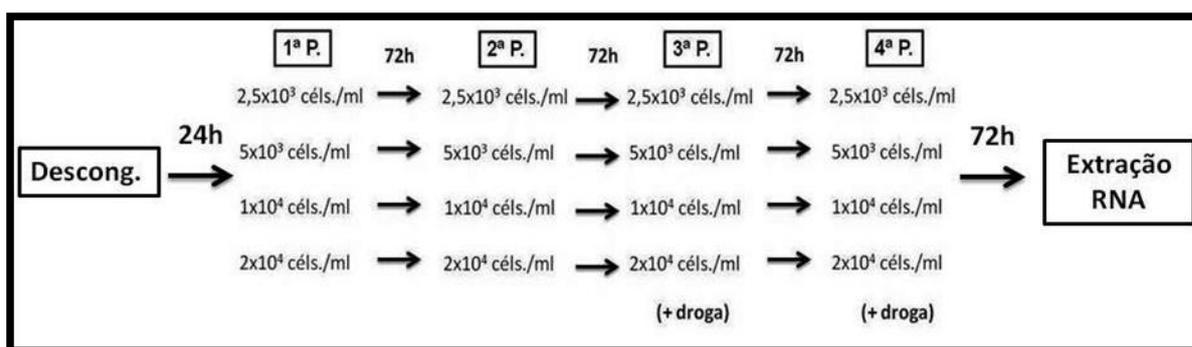


Figura 3.2: Protocolo de cultura de célula revisado - As células foram descongeladas (Descong.) e recuperadas num período de 24h. Posteriormente, cada linhagem foi dividida em quatro grupos correspondentes as concentrações celulares de $2,5 \times 10^3$ céls./ml, 5×10^3 céls./ml, 1×10^4 céls./ml e 2×10^4 céls./ml ajustadas a cada passagem. Foi realizado 4 passagens celulares (P.) a cada 72 horas de cultura, sendo que na terceira e quarta passagens foram adicionadas as drogas (+ droga) vincristina e daunorrubina para as linhagens Lucena 1 e FEPS, respectivamente. Após a quarta passagem e 72h de cultura, foi realizada a extração de RNA.

3.2 - Pacientes com LMA

Os 32 pacientes do estudo são residentes do estado do Rio de Janeiro, maiores de 18 anos e diagnosticados com LMA *de novo*. Todos os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1.0) e foram recrutados de instituições situadas na cidade do Rio de Janeiro nos anos de 2013 e 2014, sendo 23 pacientes do Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti - HEMORIO (Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) nº 296/12), sete pacientes do Hospital Federal da Lagoa, dois pacientes do Hospital Pedro Ernesto - UERJ (CEP nº 38155) e um paciente do Instituto Nacional de Câncer - INCA (CEP nº 27920). Esse projeto foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética: 00646612.1.00005274 e nº do Parecer: 64461 (Anexo 2.0).

As amostras foram obtidas ao diagnóstico a partir da punção da medula óssea dos pacientes nas respectivas instituições realizadas por profissionais

médicos capacitados. As células das amostras de medula foram separadas por gradiente de Ficoll-Paque™ PREMIUM 1.073 (GE Healthcare), sendo coletada a camada de células mononucleares. Essas células foram lisadas com Trizol® Reagent (Life Technologies) e armazenadas a -80 °C até o uso.

Dados sobre o histórico clínico dos pacientes, como classificação da LMA, resposta ao tratamento de indução e ocorrência de óbito até a data estabelecida de 31 de Dezembro de 2014, foram obtidos através de consulta aos prontuários nas instituições (Anexo 3.0). O protocolo de tratamento em todas as instituições consistiu na aplicação intravenosa de citarabina (100-200 mg/m² por dia) durante sete dias por infusão contínua em combinação com a aplicação de daunorrubicina (60-90 mg/m² por dia) ou idarrubicina (12 mg/m² por dia) nos três primeiros dias do tratamento. Esse regime de tratamento, também conhecido como "7+3", só não foi aplicado nos casos de LMA promielocítica (LMA M3), na qual o tratamento consistiu na aplicação do ácido all-trans-retinóico (ATRA; 45 mg/m² por dia) até remissão completa da medula óssea.

3.3 - Isolamento de RNA

O RNA das linhagens celulares K562, Lucena 1 e FEPS foram isolados com o kit RNeasy® MiniKit (Qiagen) e o de células da medula óssea com o protocolo Trizol® Reagent (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante; as amostras de RNA foram corridas num gel de agarose para análise da integridade e quantificadas no espectrofotômetro (NanoDrop 1000- Thermo Scientific). Para eliminar qualquer contaminação por DNA, o RNA foi tratado com enzimas de degradação de DNA, DNase I (kit RQ1 RNase-Free DNase - Promega), cuja reação foi interrompida com adição de solução de parada conforme o protocolo do fabricante.

3.4 - Síntese de DNA complementar

A partir do RNA tratado com DNase, foi realizado a síntese do DNA complementar (cDNA) com o uso do kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Life Technologies). Para confirmação da eficiência da síntese de cDNA, foi feita uma PCR a partir do cDNA sintetizado para amplificação do gene actina beta (*ACT-β*) (Tabela 3.1). As condições da ciclagem da PCR foram: (1) 1 ciclo de desnaturação

inicial à 95°C por cinco minutos; (2) 35 ciclos contendo as etapas de desnaturação à 95°C por um minuto, anelamento à 60°C por um minuto e extensão à 72°C por um minuto; e (3) 1 ciclo de extensão final à 72°C por 15 minutos.

3.5. Confeção dos *primers*

Os genes selecionados estão em diferentes posições na via de NOTCH: os receptores (*NOTCH 1, 2, 3 e 4*), ligantes (*JAGGED 1 e 2 e DELTA-LIKE 1 e 4*), enzimas envolvidas nas clivagens dos receptores (*TACE* e as gama-secretases *PRESENILINA 1 e 2 e NICASTRINA*) e os genes alvos primários (*HES 1 e HEY1*). O gene do transportador *ABCB 1* foi selecionado apenas para análise em amostras de pacientes. Os genes de referência foram o beta-2-microglobulina (β 2M) e *ACT- β* . Os *primers* foram desenhados com o auxílio do software Primer 3 (v.0.4.0) e dos programas *Ensemble* e *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST-NCBI)*. Os *primers* adquiridos foram padronizados por PCR com cDNA da K562. Foram gerados produtos de tamanho esperado e sem a produção de produtos de PCR secundários ou dímeros de *primers*, exceto para o gene *NOTCH 4* que, mesmo após a elaboração de novos pares de *primers*, não gerou produtos de PCR e foi descartado do estudo (Tabela 3.1)

Tabela 3.1- Sequências de bases dos *primers*

	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
<i>Primers</i>	SEQUÊNCIA 5' - 3'	SEQUÊNCIA 5' - 3'
<i>NOTCH 1</i>	TGGACAAGATCAATGAGTTCCA	CACACTCGTCCACATCGTACTG
<i>NOTCH 2</i>	ATTGGAGGCTTCAATGTCTGT	ACACAAAGGTTGCTCTGACATT
<i>NOTCH 3</i>	ATCAACCGCTACGACTGTGTCT	TGGAAAGCACTCATTGATCTC
<i>TACE</i>	AGAGTTGCTCCAAAAGGGTTA	ACACGTGTTCTTCATGGGATCT
<i>PSEN 1</i>	GTCA GCTTTTATA CCGGAA GG	AGAATTGAGTGCA GGGCTCTCT
<i>PSEN 2</i>	TCAAGTACCTCCCA GAGTGGTC	GGCAGTTTCTACCA GCATTCTC
<i>NICAST.</i>	AAACATCTCTGGCGTTGTTCTG	CCATTCGGGATAGCTCACATTA
<i>DLL 1</i>	CTACTCCGGCTTCAACTGTGAG	ATCACCGAGGTCCACACACTT
<i>DLL 4</i>	ACTGCGAGAA GAAAGTGGACAG	GACGTGGAGTTCACAGTAGGTG
<i>JAG 1</i>	GGGGCAA CACCTTCAACCTC	CCAGGCGAAACTGAAAGG
<i>JAG 2</i>	GGACTGGGACAA CGATACCAC	TGGCGCTGTAGTGTCTCGTC
<i>HES 1</i>	AGTGAAGCACCTCCGGAAC	TCACCTCGTTCATGCACTC
<i>HEY 1</i>	CTGGTACCCA GTGCTTTTGA GAA GC	GGGCGTGCGGTCAAAGTAA
<i>ABCB1</i>	GCTGGATGTTTCCGGTTTGGAGCC	AGCAAATGAACTGACTTGCCCCACG
<i>ACT-β</i>	CGCCAACA CAGTGTCTGTCT	CACGGAGTACTTGCGCTCAG
β -2M	ATGAGTATGCCTGCCGTGTGA	CGGCATCTCAAACCTCCATG

3.6 - PCR quantitativo em tempo real

3.6.1 - Padronização: quantificação absoluta

A quantificação da expressão gênica foi realizada por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) usando o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) e o equipamento Eco Real-Time PCR System (Illumina). Inicialmente foram padronizados os pares de *primers* para obtenção da eficiência de amplificação. A eficiência de amplificação ideal esperada é de 100%, no qual há duplicação da região de interesse a cada ciclo da PCR. Entretanto, é importante verificar se realmente a eficiência de amplificação está de acordo com o esperado para não superestimar ou subestimar a reação. Assim, foi realizada diluição seriada para cada par de *primers* usando cDNA da linhagem K562. A amostra de cDNA foi diluída à 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , gerando uma curva de amplificação. O espaçamento entre cada ponto de diluição da curva numa amplificação com 100% de eficiência é de 3,32 ciclos, uma vez que levam 3,32 ciclos para uma amplificação da PCR 100% eficiente aumentar em 10x o número de moléculas molde de uma amostra.

Entretanto, para alguns pares de *primers* não foi alcançado 100% de amplificação, variando entre 70-100%. Além disso, não foi possível a análise da eficiência de amplificação dos pares de *primers* para os genes *JAG 1* e *DLL1*, pois não foi obtida amplificação nas amostras mais diluídas ou a eficiência de amplificação ficou abaixo de 50%, impedindo a formação da curva de amplificação e assim esses genes foram descartados do estudo.

Após o período de padronização de cada par de *primers*, ficou estabelecido o mix de reação composto por 5 μ l do mix GoTaq® qPCR Master Mix 2x, 1 μ l de *primers* total em concentrações que variaram de 1-3 μ M para o *forward* e 1-3 μ M para o *reverse* e 1-3 μ l de amostra de cDNA a depender do par de *primers* (cDNA obtido da transcrição reversa de 1,0 μ g de RNA), e complemento com água livre de nuclease para volume final de 10 μ l. As condições gerais de ciclagem consistiram na ativação da polimerase à 95 °C por dois minutos e 40 ciclos contendo as etapas de desnaturação à 95 °C por 15 segundos e anelamento/extensão à 60 °C por um minuto. Posteriormente, foi realizada a curva de dissociação (ou curva de *melting*), no qual com o aumento de temperatura, o cDNA é desnaturado em fitas simples, a molécula fluorescente é dissociada e, conseqüentemente, ocorre diminuição da fluorescência. No aparelho de qPCR utilizado, a quantificação da fluorescência é registrada a cada aumento de 0,3 °C. A realização da curva de dissociação é

importante para analisar a especificidade dos *primers* correspondentes aos genes em análise. Após a padronização, todas as reações apresentaram apenas um pico, indicando amplificação do fragmento esperado e ausência de contaminação ou produtos de amplificação secundários.

3.6.2 - Análise de expressão em linhagens

Com a obtenção da porcentagem de eficiência de amplificação para cada par de *primers*, foi realizada a quantificação relativa dos genes da via de NOTCH, denominados de genes em análise, entre as amostras alvo (as linhagens derivadas MDR Lucena 1 e FEPS) e a amostra controle (a linhagem parental sensível K562). Os genes $\beta 2M$ e $ACT\beta$ foram usados como genes de referência e normalizadores. Por meio do método de quantificação relativa de LIVAK *et al.*, (2001), a expressão relativa de um gene em análise entre uma amostra alvo e amostra controle é dado pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Inicialmente foi calculado o ΔCq de cada amostra (Cq gene em análise - Cq gene referência), onde o Cq (*quantification cycle*) representa o número de ciclos que o amplificado leva para atingir o nível limiar do sinal de fluorescência. Posteriormente foi calculado o $\Delta\Delta Cq$ que é igual ao ΔCq amostra alvo - ΔCq amostra controle). Assim, foi achada a expressão relativa dos genes selecionados da via de NOTCH colocando o valor do $\Delta\Delta Cq$ para cada gene na fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$; a base 2 representa a mudança do número de amplicons que duplica a cada ciclo (Fig. 3.3).

<p>1º Passo</p> $\Delta Cq \text{ K562} = Cq_{\text{gene via NOTCH}} - Cq_{\beta 2M \text{ ou } ACT\beta}$ $\Delta Cq \text{ Linhagem MDR} = Cq_{\text{gene via NOTCH}} - Cq_{\beta 2M \text{ ou } ACT\beta}$ <p>2º Passo</p> $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq \text{ Linhagem MDR} - \Delta Cq \text{ K562}$ <p>3º Passo</p> $\text{Quantificação relativa} = 2^{-\Delta\Delta Cq}$

Figura 3.3 - Representação do método $\Delta\Delta Cq$ de LIVAK *et al.*, 2001 - ilustração do método de quantificação relativa de LIVAK *et al.*, (2001). A amostra controle é a linhagem parental K562 e as amostras alvo são as linhagens com o fenótipo MDR Lucena 1 ou FEPS. Os genes de referência são a $ACT\beta$ ou $\beta 2M$ e os genes em análise são os genes da via de NOTCH. Cq (do inglês, *quantification cycle*) representa o ciclo no qual o amplificado atingiu o nível limiar do sinal de fluorescência.

Entretanto, para os pares de *primers* que não obtiveram 100% de eficiência de amplificação foi aplicado o método de correção de Pfaffl (PFAFFL, 2001) que utiliza as porcentagens de eficiência de amplificação dos genes alvo e de referência para correção. Inicialmente é calculado o ΔCq gene em análise (Cq gene em análise na amostra controle - Cq gene em análise na amostra alvo) e posteriormente a quantificação corrigida, dada pela fórmula $E^{\Delta Cq \text{ gene em análise}}$, onde E = eficiência de amplificação. Processo similar é realizado para o gene de referência e o cálculo da quantificação relativa é o obtido dividindo o valor de correção do gene em análise pelo valor de correção do gene de referência (Fig. 3.4).

<p>1º Passo</p> $\Delta Cq_{\text{gene via NOTCH}} = Cq_{\text{gene via NOTCH K562}} - Cq_{\text{gene via NOTCH linhagem MDR}}$ $\text{Quantificação corrigida} = E^{\Delta Cq \text{ gene via NOTCH}}$ <p>2º Passo</p> $\Delta Cq_{\beta 2M \text{ ou } ACT\beta} = Cq_{\beta 2M \text{ ou } ACT\beta K562} - Cq_{\beta 2M \text{ ou } ACT\beta \text{ linhagem MDR}}$ $\text{Quantificação corrigida} = E^{\Delta Cq_{\beta 2M \text{ ou } ACT\beta}}$ <p>3º Passo</p> $\text{Quantificação relativa} = \frac{\text{Quantificação corrigida gene via NOTCH}}{\text{Quantificação corrigida } \beta 2M \text{ ou } ACT\beta}$

Figura 3.4 - Representação do método $\Delta\Delta Cq$ de PFAFFL *et al.*, 2001 - ilustração do método de quantificação relativa de PFAFFL *et al.*, (2001). A amostra controle é a linhagem parental K562 e as amostras alvo são as linhagens com o fenótipo MDR Lucena 1 ou FEPS. Os genes de referência são a *ACT β* ou *β 2M* e os genes em análise são os genes da via de NOTCH. *Cq* (do inglês, *quantification cycle*) representa o ciclo no qual o amplificado atingiu o nível limiar do sinal de fluorescência e E = eficiência de amplificação

3.6.3 - Análise de expressão em amostras de pacientes com LMA

Para a análise da via de sinalização de NOTCH em amostra de pacientes por qPCR foram selecionados os genes dos receptores *NOTCH 2* e *NOTCH 3*, e os genes-alvo *HES 1* e *HEY 1*, além do gene *ABCB 1*. As mesmas condições da montagem do mix de reação e da ciclagem de amplificação empregadas para as linhagens celulares foram aplicadas na análise das amostras de pacientes. A análise da intensidade de expressão desses genes foi calculada pela fórmula $1/2^{\Delta Cq} \times 1.000$, onde o $\Delta Cq = Cq$ gene em análise - Cq gene referência. O gene de referência *β 2M* foi utilizado como normalizador.

Foi realizada uma análise de correlação entre os padrões de expressão dos genes *NOTCH 2* e *NOTCH 3* com os genes alvos (*HEY 1* e *HES 1*) e o gene *ABCB1*, e também entre os genes *HEY 1*, *HES 1* e *ABCB1*. Além disso, foram elaboradas curvas de sobrevida global (*Kaplan-Meier*) para cada gene no qual foram comparados pacientes que tiveram valor de intensidade de expressão do gene menor que a mediana com pacientes com valor maior que a mediana de expressão. O período analisado foi do dia do diagnóstico de LMA e inclusão no estudo até o dia 31 de Dezembro de 2014.

3.7 - Análises estatísticas

Para estudo estatístico dos resultados da densidade celular foi realizado o teste de análise de variância *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn* para comparação das diferenças. A análise de variância *Kruskal-Wallis* é um teste não paramétrico, ou seja, não é assumido que a variável de interesse tem distribuição normal, que compara três ou mais grupos independentes. O pós-teste de *Dunn* é um procedimento complementar e é utilizado para testar todas as combinações dois a dois. Foram realizados três experimentos independentes e foram considerados resultados estatisticamente significativos para valores de $p < 0,05$.

Para análise de correlação entre as intensidades de expressão dos genes *NOTCH 2*, *NOTCH 3*, *HEY 1*, *ABCB 1* e *HES 1* foi utilizado o coeficiente de correlação não paramétrica de *Spearman* (ρ), onde foi considerado correlação significativa entre pares de genes quando $p < 0,05$

Para a análise estatística das curvas de sobrevida de *Kaplan-Meier*, foi utilizado o teste de *Log-rank* (Mantel Cox), curvas de sobrevida entre os grupos foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Todas as análises foram conduzidas com o auxílio do programa *GraphPad Prism® Version 4.0*.

4.0 - RESULTADOS

4.1 - Validação da expressão dos genes da via de NOTCH em linhagens MDR

4.1.1 - Análise inicial dos genes da via de NOTCH

Com a finalidade de validar os resultados de microarranjo para os genes que compõem a via de NOTCH (*MOREIRA et al., 2014*) nas linhagens Lucena 1 e FEPS em relação a K562 (Fig. 4.1 A e Fig. 4.2 A, respectivamente), foi realizado PCR quantitativo (qPCR) de cDNA sintetizados a partir de RNA isolados das linhagens. Foi analisado também genes que não apresentaram diferença de expressão no microarranjo como *NOTCH 1*, *NOTCH 3*, *TACE*, *PSEN 1*, *PSEN 2*, *NICAS.*, *DLL 4*, *JAG 2* e *HES 1* para relação entre Lucena 1 e K562 e os genes *NOTCH 1*, *NOTCH 3*, *TACE*, *PSEN 2*, *NICAS.* e *DLL 4* para a relação FEPS e K562. Os genes de referência *β2M* e *ACTB* foram utilizados para normalização dos dados. Nessas primeiras análises, as células foram cultivadas seguindo o protocolo de cultura celular inicial, onde a cada passagem a densidade celular em cultura era reduzida a concentrações variáveis de 5×10^3 a 2×10^4 de céls./ml.

Na comparação entre a Lucena 1 e K562, utilizando o gene de referência *β2M*, foi observado que os genes *NOTCH 2* e *NOTCH 3* foram 3,2 vezes e ≈ 4 vezes mais expressos em Lucena 1, respectivamente; os genes *NOTCH 1*, *TACE*, *PSEN 2*, *NICASTRINA* e *HEY 1*, foram 2,9 vezes, ≈ 2 vezes, 4,2 vezes, ≈ 2 vezes e 8 vezes, menos expressos em Lucena 1, respectivamente. Os genes *PSEN 1*, *DLL 4*, *JAG 2* e *HES 1* apresentaram diferenças de expressão inferior a 2 vezes, para mais ou para menos, em Lucena 1 (Fig. 4.1 B). Já utilizando o gene de referência *ACTβ*, foi observado que os genes *NOTCH 2*, *NOTCH 3*, *TACE*, *PSEN1*, *NICASTRINA*, *DLL 4*, *JAG 2*, e *HES 1* foram 12,8 vezes, 14,5 vezes, 2,1 vezes, 3 vezes, ≈ 2 vezes, 2,61 vezes, 5,4 vezes e 2,5 vezes, mais expressos em Lucena 1, respectivamente. O gene *HEY 1* foi ≈ 2 vezes menos expresso em Lucena 1 e os genes *NOTCH 1* e *PSEN 2* apresentaram diferença de expressão inferior a 2 vezes, para mais ou para menos em Lucena 1 (Fig. 4.1 C).

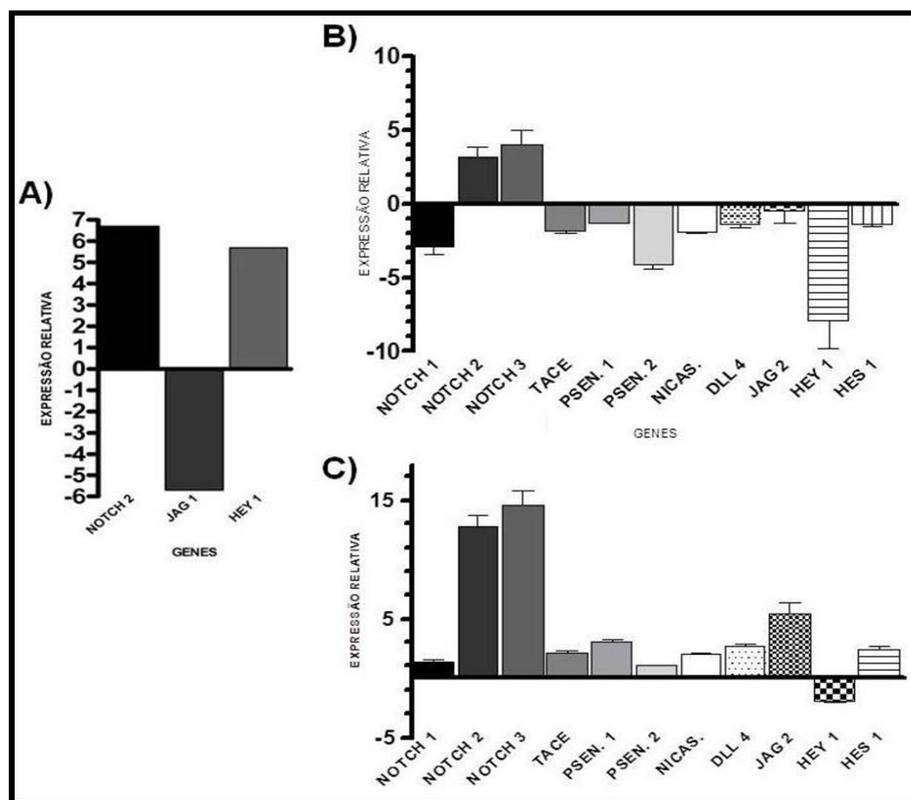


Figura 4.1: Análise da expressão relativa de genes da via de NOTCH entre Lucena 1 e K562 - Comparação da expressão dos genes da via de NOTCH entre a linhagem celular MDR Lucena 1 e a linhagem controle sensível K562. Dados do microarranjo para os genes *NOTCH 2*, *JAG 1* e *HEY 1* obtidos de MOREIRA *et al.*, (2014) (A) e expressão relativa linear entre os genes da via de NOTCH por qPCR, utilizando o gene de referência $\beta 2M$ (B) e $ACT\beta$ (C) como normalizadores. Resultados obtidos de três análises independentes de um mesmo experimento. As barras direcionadas para cima representam maior expressão na linhagem MDR e as barras direcionadas para baixo representam menor expressão na linhagem MDR.

Na comparação entre a FEPS e K562, utilizando o gene de referência $\beta 2M$, foi observado que os genes *NOTCH 1*, *NOTCH 2*, *PSEN1*, *NICASTRINA*, *DLL 4*, *JAG 2*, e *HEY 1* foram 2 vezes, 12,2 vezes, ≈ 2 vezes, ≈ 2 vezes, 2,51 vezes, 5,32 vezes e 6,6 vezes mais expressos em FEPS, respectivamente. Os genes *PSEN 2* e *HES 1* foram ≈ 2 vezes menos expressos em FEPS e os genes *NOTCH 3* e *TACE* apresentaram diferença de expressão inferior a 2 vezes, para mais ou para menos em FEPS (Fig. 4.2 A). Com o gene de referência $ACT\beta$, foi observado que os genes *NOTCH 2*, *JAG 2* e *HEY 1* foram 5,4 vezes, 3,5 vezes e 3,3 vezes mais expressos em FEPS, respectivamente. Os genes *NOTCH 3*, *TACE*, *PSEN 2*, *NICASTRINA* e *HES 1* foram 2,1 vezes, 2,2 vezes, 3,8 vezes, ≈ 2 vezes e 2,8 vezes menos expressos em FEPS, respectivamente. Os genes *NOTCH 1*, *PSEN 1* e *DLL 4* apresentaram diferenças de expressão inferior a 2 vezes, para mais ou para menos, em FEPS (Fig. 4.2 B).

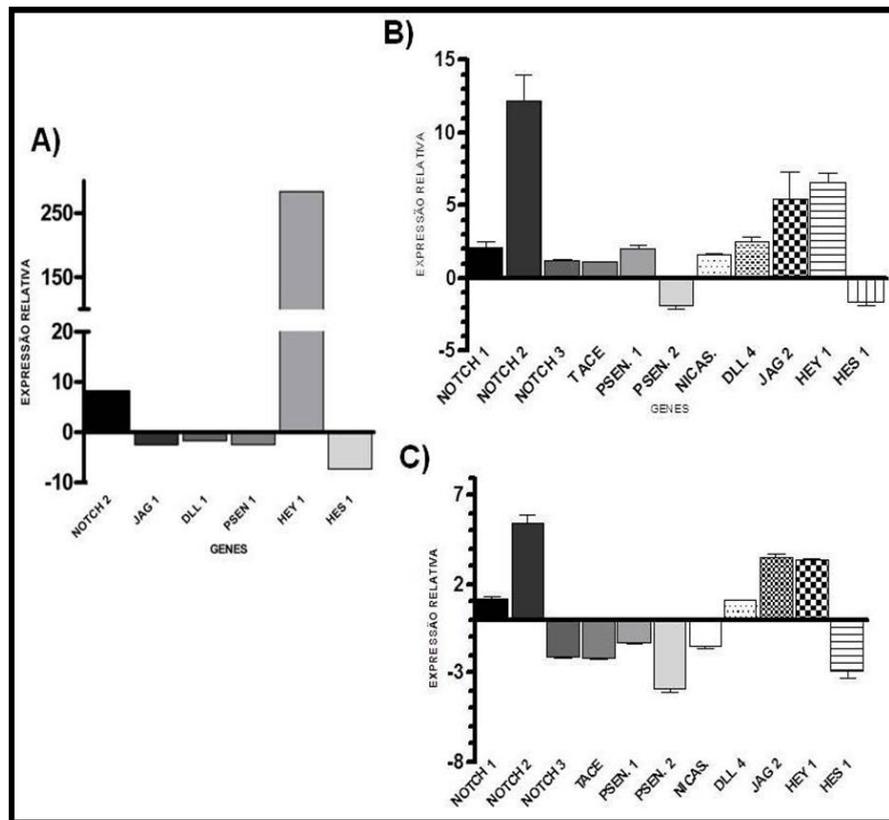


Figura 4.2: Análise da expressão relativa de genes da via de NOTCH entre FEPS e K562 - Comparação da expressão dos genes da via de NOTCH entre a linhagem celular MDR FEPS e a linhagem controle sensível K562. Dados do microarranjo para os genes *NOTCH 2*, *JAG 1*, *DLL1*, *PSEN 1*, *HEY 1* e *HES 1* obtidos de MOREIRA et al., (2014) (A) e expressão relativa linear entre os genes da via de NOTCH por qPCR, utilizando o gene de referência $\beta 2M$ (B) e $ACT\beta$ (C) como normalizadores. Resultados obtidos de três análises independentes de um mês no experimento. As barras direcionadas para cima representam maior expressão na linhagem MDR e as barras direcionadas para baixo representam menor expressão na linhagem MDR.

Assim, comparando os resultados do PCR quantitativo com os dados do microarranjo, foi validada a superexpressão do gene *NOTCH 2* em Lucena 1, a superexpressão dos genes *NOTCH 2* e *HEY 1* em FEPS e a diminuição da expressão do gene *HES 1* em FEPS, quando comparados com a K562, utilizando ambos os genes de referência $\beta 2M$ e $ACT\beta$. Entretanto o gene *HEY 1*, na comparação entre Lucena 1 e K562, apresentou resultado discordante com os dados do microarranjo, sendo menos expresso em Lucena 1 com base em ambos genes de referência. Já o gene *PSEN 1*, na comparação entre FEPS e K562, apresentou resultados controversos, sendo mais expresso na FEPS pela normalização com o gene $\beta 2M$ ou apresentando ausência de diferença de expressão pela normalização com o gene $ACT\beta$. Além disso, foi observado padrões de expressão não identificados pelo microarranjo, como maior expressão dos genes *NOTCH 3* e *JAG 2* em Lucena 1 e FEPS, respectivamente, em comparação com a K562 por ambos genes de referência (Fig. 4.3). Vale ressaltar que foi descartada a análise dos genes *JAG 1* e *DLL 1* devido a problemas com a confecção ou padronização dos primers.

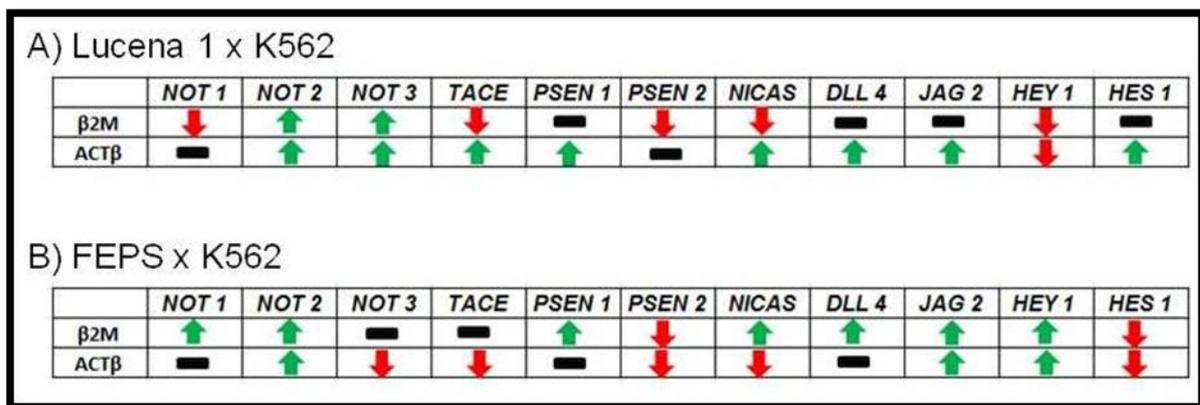


Figura 4.3: Resumo da expressão relativa dos genes da via de NOTCH entre as linhagens MDR e K562 - Comparação da expressão dos genes da via de NOTCH entre a linhagem celular MDR (A) Lucena 1 e (B) FEPS e a linhagem controle sensível K562. As setas verdes posicionadas para cima indicam que o gene foi mais expresso na linhagem MDR, as setas vermelhas posicionadas para baixo indicam que o gene foi menos expresso na linhagem MDR e a barra preta na horizontal indica que não houve diferença de expressão relativa entre as linhagens MDR e a K562

4.1.2 - Análise dos genes *NOTCH 2*, *NOTCH 3*, *HEY 1* e *HES 1*

Após a análise inicial dos genes da via canônica de NOTCH comparando as linhagens Lucena 1 e FEPS com a K562, foi selecionado genes do início da via, receptores *NOTCH 2* e *NOTCH 3*, e genes alvo, *HEY 1* e *HES 1*, para análise em experimentos de cultura celular independentes. Entretanto, não foi obtido reprodutibilidade entre os experimentos. Uma observação feita foi que no protocolo inicial, não houve garantia de que a densidade celular ajustada das linhagens era relativamente próxima entre as passagens, podendo ter ocorrido passagens em que a cultura de célula foi reduzida a 5×10^3 céls./ml ou a 1×10^4 céls./ml, por exemplo. Assim, foi gerada a hipótese de que o nível de ativação da via de NOTCH estaria associado à densidade de células em cultura, justificando a falta de reprodutibilidade entre os experimentos uma vez que as células estariam submetidas a diferentes condições.

Deste modo, foi aplicado um protocolo de cultura revisado onde os experimentos foram divididos em quatro grupos de cultura celular correspondentes a diferentes densidades ajustadas a $2,5 \times 10^3$ céls./ml; 5×10^3 céls./ml; 1×10^4 céls./ml ou 2×10^4 céls./ml a cada passagem até a extração de RNA. Com isso, foi obtido um maior controle da densidade celular ajustada a cada passagem além de poder comparar linhagens que foram passadas com a mesma concentração em cultura.

Na comparação entre as linhagens Lucena 1 e K562, observamos um aumento da expressão relativa de *NOTCH 2* em Lucena 1 entre as densidades de $2,5 \times 10^3$ cels./mL e 5×10^3 céls./ml (de 13,3 vezes para 21,9 vezes), seguido de uma diminuição nas densidades de 1×10^4 céls./mL e 2×10^4 céls./mL (de 21,9 vezes para

18,1 vezes e 12,3 vezes, respectivamente) (Fig. 4.4 A). Para o gene *NOTCH 3* foi observado um aumento de expressão relativa em Lucena 1 nas densidades de $2,5 \times 10^3$ céls./ml, 5×10^3 céls./ml e 1×10^4 céls./ml de 19,7 vezes para 20,8 vezes e para 22,5 vezes, respectivamente; seguido de uma diminuição na concentração de 2×10^4 céls./ml para 12,3 vezes. (Fig. 4.4 B).

Em relação aos genes alvo de NOTCH, para o gene *HEY 1* os valores de expressão relativa diminuíram com o aumento da densidade de células e foram de 6,3 vezes para 4,2 vezes, 4,4 vezes e 3,5 vezes mais expresso em Lucena 1 nas densidades de $2,5 \times 10^3$ céls./ml, 5×10^3 céls./ml, 1×10^4 céls./ml e 2×10^4 céls./ml, respectivamente. Embora as diferenças de expressão não sejam estatisticamente significativas, foi notada uma tendência decrescente da relação de maior expressão do gene *HEY 1* entre a Lucena 1 e K562 com o aumento da densidade celular na cultura (Fig. 4.4 C). O outro gene alvo da via de NOTCH, *HES 1*, foi 2,41 vezes menos expresso em Lucena 1 na concentração de $2,5 \times 10^3$ céls./mL mas, com o aumento da densidade celular, houve um discreto aumento chegando a 2,56 vezes mais expresso em Lucena 1 na densidade de 2×10^4 céls./mL (Fig. 4.4 D).

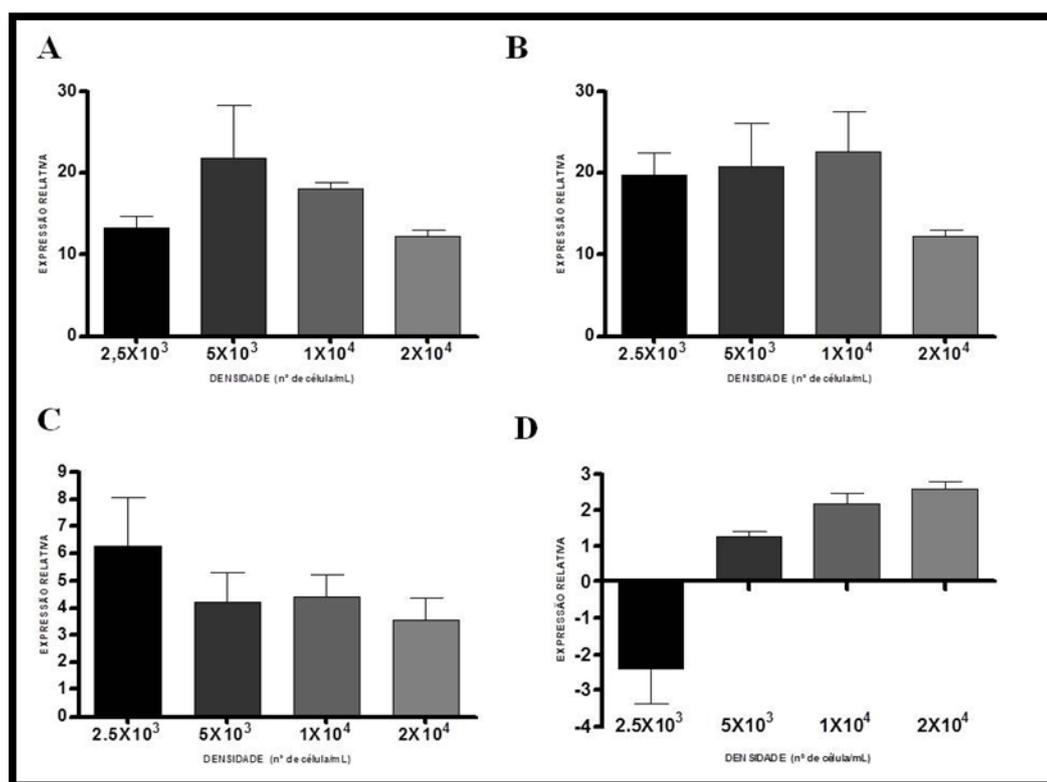


Figura 4.4: Análise dos genes *NOTCH 2*, *NOTCH 3*, *HEY 1* e *HES 1* entre as linhagens Lucena 1 e K562- Comparação da expressão dos genes *NOTCH 2*, *NOTCH 3*, *HEY 1* e *HES 1* entre as linhagens celulares Lucena 1 e K562 realizada por PCR quantitativo. O gene $\beta 2M$ foi usado como referência. As barras direcionadas para cima representam maior expressão na linhagem MDR e as barras direcionadas para baixo representam menor expressão na linhagem MDR. É observado a expressão relativa linear em diferentes densidades celulares dos genes (A) *NOTCH 2*; (B) *NOTCH 3*; (C) *HEY 1* e (D) *HES 1*. Resultados obtidos de experimentos de cultura de célula em triplicata. As análises estatísticas foram conduzidas pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn (* $p < 0.05$).

Na comparação entre as linhagens FEPS e K562, para o gene *NOTCH 2* houve um aumento de expressão relativa entre as densidades de $2,5 \times 10^3$ e 5×10^3 céls./ml (de 12,4 vezes para 18,1 vezes), seguida de uma leve queda nas densidades de 1×10^4 céls./ml e 2×10^4 céls./ml (16,5 vezes e 15,4 vezes mais expresso em FEPS, respectivamente) (Fig. 4.5 A). O gene *NOTCH 3* apresentou alteração da expressão relativa mais sutil, não chegando a um aumento maior que 1,5 vezes em FEPS. (Fig. 4.5 B).

Em relação aos genes alvo da via, na comparação entre FEPS e K562 para o gene *HEY 1*, houve um decréscimo da expressão relativa com o aumento da densidade celular indo de 174,7 vezes mais expresso em FEPS na concentração $2,5 \times 10^3$ cél./mL a 30,6 vezes mais expresso na FEPS na densidade de 2×10^4 céls./ml. Além disso, foi observada diferença estatisticamente significativa dos valores de expressão relativa entre as densidades celulares $2,5 \times 10^3$ cél./mL e 2×10^4 cél./mL (Fig. 4.5 C). Para o gene *HES 1* foi observada uma variação discreta entre as diferentes concentrações celulares, todas apresentando uma menor expressão em FEPS quando comparada a K562 (Fig. 4.5 D).

Com a aplicação do novo protocolo de cultura foi alcançado uma melhor reprodutibilidade dos experimentos e valores mais condizentes com os dados do microarranjo, como a validação do valor da superexpressão do gene *HEY 1* em Lucena 1.

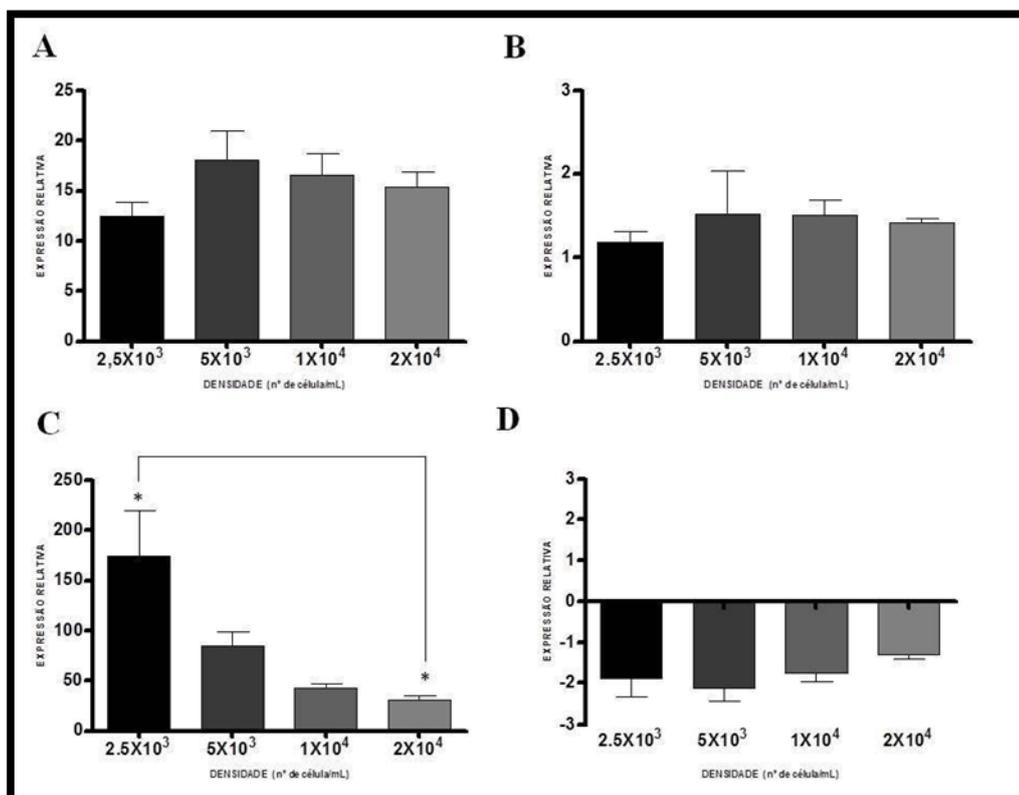


Figura 4.5: Análise dos genes *NOTCH 2*, *NOTCH 3*, *HEY 1* e *HES 1* entre as linhagens FEPS e K562- Comparação da expressão dos genes *NOTCH 2*, *NOTCH 3*, *HEY 1* e *HES 1* entre as linhagens celulares FEPS e K562 realizada por PCR quantitativo. O gene $\beta 2M$ foi usado como referência. As barras direcionadas para cima representam maior expressão na linhagem MDR e as barras direcionadas para baixo representam menor expressão na linhagem MDR. É observado a expressão relativa linear em diferentes densidades celulares dos genes (A) *NOTCH 2*; (B) *NOTCH 3*; (C) *HEY 1* e (D) *HES 1*. Resultados obtidos de experimentos de cultura de célula em triplicata. As análises estatísticas foram conduzidas pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn (* $p < 0.05$).

4.1.3 - Influencia da presença de drogas na expressão dos genes da via de NOTCH

Por fim, foi avaliado se a presença ou ausência das drogas utilizadas para a seleção das linhagens MDR causava algum efeito na expressão gênica das linhagens MDR para os genes da via de NOTCH, utilizando o gene $\beta 2M$ como referência e densidade celular à 2×10^4 céls./mL. Na comparação entre as linhagens Lucena 1 cultivada sem vincristina e K562, os genes *NOTCH 2*, *NOTCH 3*, *HEY 1* e *HES 1* foram 13,3 vezes; 10,4 vezes; 1,9 vezes e 2,75 vezes mais expressos em Lucena 1, respectivamente (Fig. 4.6 A).

Na comparação entre as linhagens FEPS cultivada sem daunorrubicina e K562, os genes *NOTCH 2* e *HEY* foram 16,5 vezes e 22,6 vezes mais expressos na FEPS, respectivamente. Já o gene *NOTCH 3* mostrou uma diferença de expressão de 1,54 vezes mais expresso em FEPS. O gene *HES 1* não mostrou nenhuma diferença de expressão entre as linhagens (Fig. 4.6 B). Comparando os resultados da expressão relativa com adição de drogas à cultura das linhagens MDR (Fig. 4.4 e Fig. 4.5), com as mesmas linhagens cultivadas sem adição de drogas, não foi observada diferença na expressão relativa entre as duas condições de cultura.

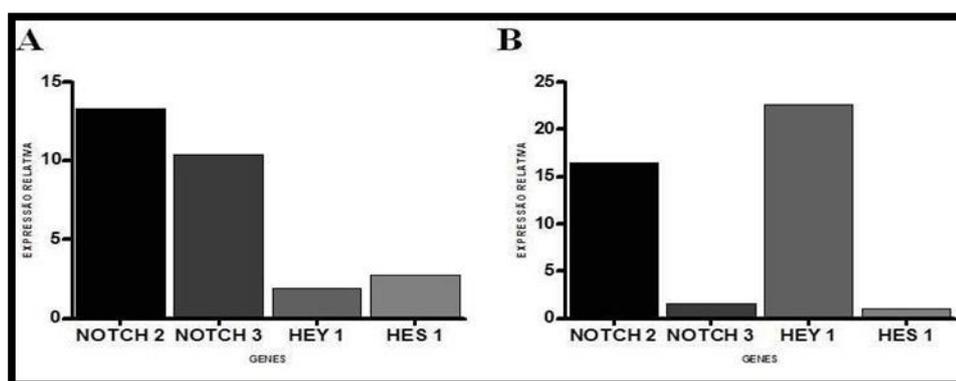


Figura 4.6: Análise dos genes *NOTCH 2*, *NOTCH 3*, *HEY 1* e *HES 1* nas linhagens Lucena 1 e FEPS sem adição de droga - Comparação da expressão dos genes *NOTCH 2*, *NOTCH 3*, *HEY 1* e *HES 1* entre as linhagens celulares Lucena 1 (A) e FEPS (B) cultivadas sem as drogas de seleção vincristina e daunorrubicina, respectivamente. O gene $\beta 2M$ foi usado como referência. É observada a expressão relativa dos genes na densidade celular de 2×10^4 céls./mL. Resultados obtidos de um experimento de cultura de célula.

4.2 - Análise de genes da via de NOTCH em amostras de pacientes com LMA

A linhagem FEPS, selecionada pela droga daunorrubicina, apresenta maior expressão de transportadores ABC e genes da via de NOTCH do que a linhagem Lucena 1, selecionada com a droga vincristina. A daunorrubicina é um dos quimioterápicos comumente usados no tratamento de pacientes com LMA, sugerindo que a análise prévia da via de NOTCH e transportadores ABC em amostras de pacientes pode indicar fatores prognósticos associados ao desenvolvimento de resistência. Assim, foi avaliada a expressão de genes da via de NOTCH (*NOTCH2*, *NOTCH3*, *HEY1* e *HES1*) e do transportador *ABCB 1* por qPCR em 32 pacientes diagnosticados com LMA. Na Tabela 4.3, estão descritas as características dos pacientes, o tratamento empregado e a classificação da LMA de acordo com os critérios FAB. Dos 32 pacientes, sete foram diagnosticados com LMA M3. Dos demais 25 pacientes, 7 pacientes não foram tratados ou receberam tratamento paliativo devido a *performance status* baixa. Os outros 18 pacientes foram submetidos ao tratamento "7+3". Desses pacientes, 6 responderam a terapia de indução e 12 não responderam (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Informações sobre os pacientes com LMA incluídos, classificação FAB da LMA e tratamento a que foram submetidos.

Gênero	Classificação LMA	
Feminino	11	M0 6
Masculino	21	M1 8
		M2 2
		M3 7
		M4 5
		M5 3
		*LMA 1
Idade ao diagnóstico	Mediana (anos) 53	
Óbitos	Sim 21	
	Não 11	
Tratamento pacientes (exceto LMA M3)	Total 25	
	Não tratou ou paliativo 7	
	Tratou ("7+3") 18	
	Responderam ao "tratamento 7+3" 6	
	Não responderam ao "tratamento 7+3" 12	
		Total de pacientes 32

* LMA secundária à síndrome mielodisplásica

As amostras de medula óssea foram obtidas ao diagnóstico, a partir das quais foram obtidas as células mononucleadas. Foi realizada qPCR dos genes selecionados nessas amostras, e na Fig. 4.7 são apresentados a distribuição dos pacientes para os valores de intensidade de expressão obtidos para os genes *NOTCH 2*, *NOTCH 3*, *HEY 1*, *ABCB 1* e *HES 1*.

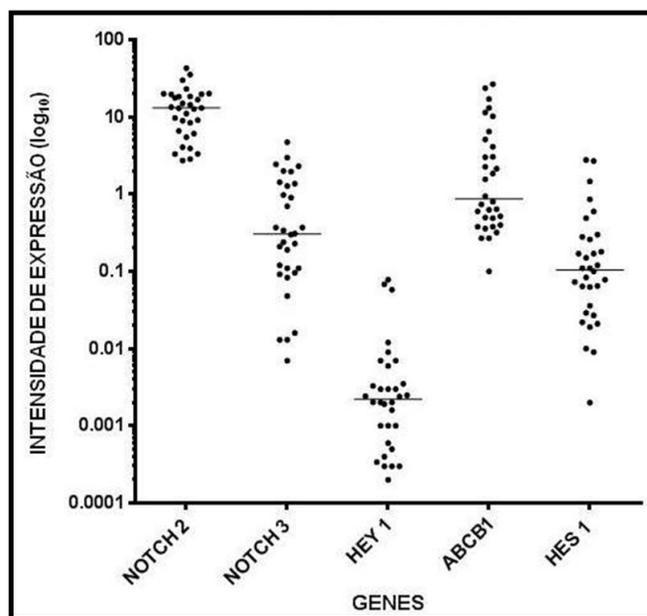


Figura 4.7: Representação da distribuição de pacientes diagnosticados com LMA - Intensidade de expressão dos genes *NOTCH 2*, *NOTCH 3*, *HEY 1*, *ABCB 1* e *HES 1* de células mononucleares de sangue periférico coletadas de medula óssea de pacientes diagnosticados com LMA. O gene $\beta 2M$ foi utilizado como referência. A intensidade de expressão foi calculada através da fórmula $1/2^{\Delta Cq} \times 1.000$, onde $\Delta Cq = Cq \text{ gene alvo} - Cq \text{ gene referência}$. Os valores de intensidade de expressão estão apresentados em formato antilog numa escala em \log_{10} . Cada ponto representa um paciente e as barras horizontais representam a mediana da distribuição.

Posteriormente, foi feita uma análise de correlação entre as intensidades de expressão dos genes em pacientes por meio do coeficiente de correlação de Spearman (ρ). Foi observada correlação positiva fraca entre os pares de genes *NOTCH 2/HEY 1* ($\rho = 0,39$) e moderada entre os pares de genes *HEY 1/HES 1* ($\rho = 0,50$), ambas correlações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) (Tabela 4.2 e Figura 4.8). Embora não sejam estatisticamente significativas, foi observada fraca tendência de correlação positiva entre os pares de genes *NOTCH 2/HES 1*, *NOTCH 2/ABCB 1* e *NOTCH 3/ABCB 1*. Já para os pares de genes *NOTCH 2/NOTCH 3*, *NOTCH 3/HEY 1*, *NOTCH 3/HES 1*, *HEY 1/ABCB 1* e *HES 1/ABCB 1* o valor de correlação foi baixo e sem significância estatística (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Coeficiente de correlação de Spearman para os genes *NOTCH 2*, *NOTCH 3*, *HEY 1*, *HES 1* e *MDR 1* em pacientes com LMA. (* $p < 0.05$)

Genes	Spearman (ρ)	valor p
<i>NOTCH 2</i> vs. <i>NOTCH 3</i>	-0,15	0,4190
<i>NOTCH 2</i> vs. <i>HEY 1</i>	0,39	0,0284*
<i>NOTCH 2</i> vs. <i>HES 1</i>	0,30	0,0988
<i>NOTCH 2</i> vs. <i>ABCB 1</i>	0,26	0,1514
<i>NOTCH 3</i> vs. <i>HEY 1</i>	-0,096	0,6019
<i>NOTCH 3</i> vs. <i>HES 1</i>	-0,034	0,8542
<i>NOTCH 3</i> vs. <i>ABCB 1</i>	0,23	0,1956
<i>HEY 1</i> vs. <i>ABCB 1</i>	0,13	0,4778
<i>HES 1</i> vs. <i>ABCB 1</i>	0,21	0,2417
<i>HEY 1</i> vs. <i>HES 1</i>	0,50	0,0037*

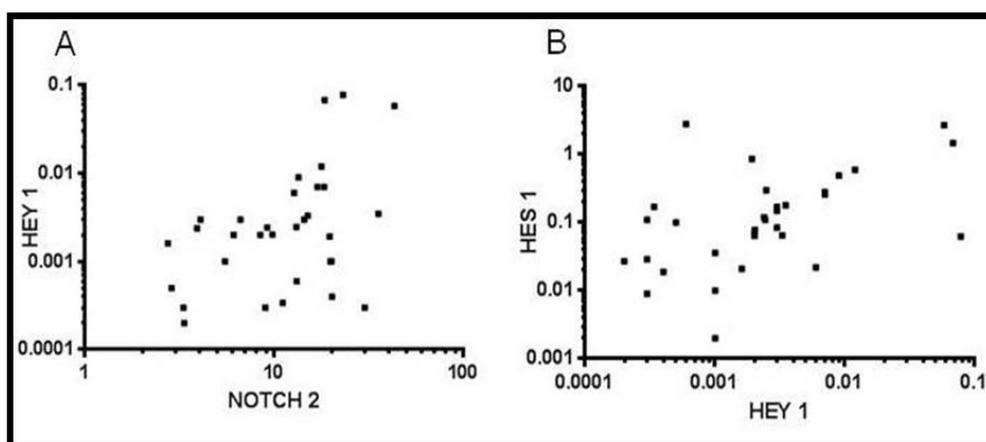


Figura 4.8: Representação da correlação positiva para os genes *NOTCH 2*, *HEY 1* e *HES 1* - Gráfico da correlação da intensidade de expressão entre os pares de genes (A) *NOTCH 2* e *HEY 1* e (B) *HEY 1* e *HES 1*. A intensidade de expressão foi calculada através da fórmula $1/2^{\Delta Cq} \times 1.000$, onde $\Delta Cq = Cq$ gene alvo - Cq gene referência. Os valores de intensidade de expressão estão apresentados em formato antilog numa escala em \log_{10} . Cada ponto representa um paciente.

Por meio da curva de sobrevida de *Kaplan-Meier*, foi analisada a sobrevida global dos pacientes a partir do dia em que foram diagnosticados com LMA (Anexo 3.0) até a data limite estabelecida em 31 de Dezembro de 2014. Com os dados da distribuição dos valores de intensidade de expressão de cada gene (Fig. 4.7), os pacientes foram divididos em dois grupos de comparação (valores de intensidade de expressão menor e maior que a mediana) e foram traçadas curvas de sobrevida para os cinco genes em análise (*NOTCH 2*, *NOTCH 3*, *HEY 1*, *HES 1* e *ABCB 1*).

Pelo teste estatístico de *log-rank*, que compara a curva de sobrevida dos grupos em análise, foi identificado com significância estatística entre os dois grupos de comparação para os genes *NOTCH 2* ($p = 0.0024$; Fig. 4.9 A) e *HES 1* ($p = 0,0403$; Fig. 4.9 E), nos quais pacientes com valores de intensidade de expressão menores que a mediana apresentaram um maior percentual de sobrevida em comparação com pacientes que possuíam valores de intensidade de expressão maiores que a mediana. Para os genes *HEY 1* (Fig. 4.9 B), *ABCB1* (Fig. 4.9 C) e *NOTCH 3* (Fig. 4.9 D) não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

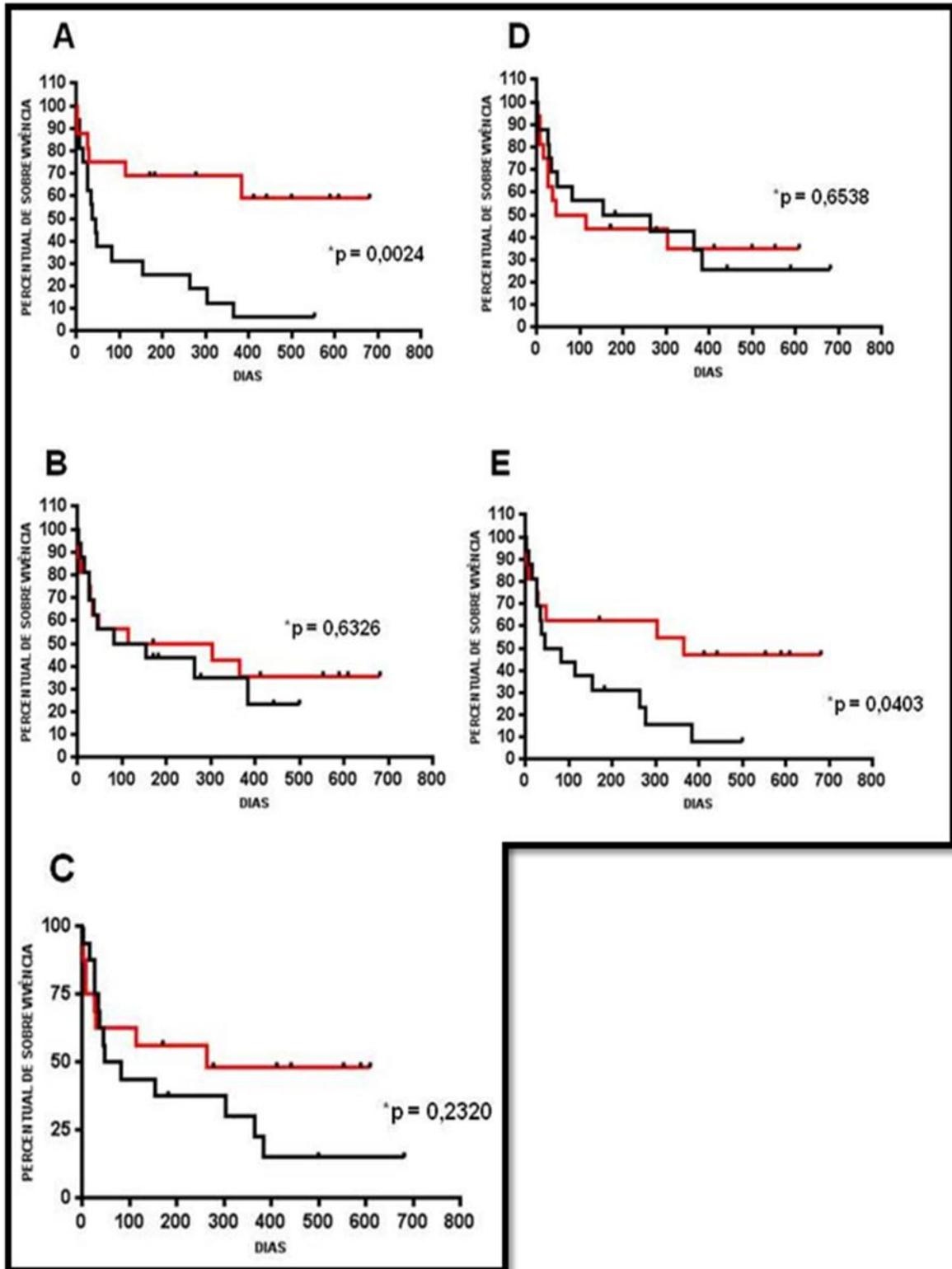


Figura 4.9: Análise de sobrevida global dos pacientes diagnosticados com LMA - curva de sobrevida dos pacientes com base nos valores de intensidade de expressão dos genes (A) *NOTCH 2*, (B) *HEY 1*, (C) *ABCB 1*, (D) *NOTCH 3* e (E) *HES 1* no período entre o diagnóstico da doença até o dia 31 de Dezembro de 2014. Os pacientes foram divididos em dois grupos, valores menores que a mediana (curva em vermelho) e valores maiores que a mediana (curva em preto). Os pontos pretos na curva representam dado censurado, ou seja, pacientes que se encontraram vivos ao final do estudo ou que houve perda de segmento por qualquer outro fator, exceto morte. As comparações foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

5.0 - DISCUSSÃO

Nos últimos anos, pacientes diagnosticados com câncer têm se beneficiado com o desenvolvimento de drogas quimioterápicas cada vez mais alvo-específicas que têm aumentado a sobrevida e chances de cura. Entretanto, ainda há casos de resistência à quimioterapia, onde o paciente não apresenta resposta imediata à droga ou adquire resistência no decorrer do tratamento, entrando em recidiva (SARKADI & MULLER, 1997; TSURUO *et al.*, 2003; SARASWATHY & GONG, 2013; ZAHREDDINE & BORDEN, 2013). Assim, são necessários mais estudos que busquem um melhor entendimento do perfil de resistência ao tratamento quimioterápico.

Os experimentos *in vitro* representam uma importante ferramenta na aquisição de conhecimento e desenvolvimento de estratégias terapêuticas que burlam a resistência à drogas, possibilitando a identificação de mecanismos celulares e moleculares que possam estar envolvidos no perfil de quimiorresistência (TSURUO *et al.*, 2003; YAN *et al.*, 2010). O modelo *in vitro* de resistência à drogas utilizado no presente trabalho foi a linhagem celular de LMC em crise blástica K562 e suas derivadas com o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (ou *MDR*), Lucena 1, selecionada com vincristina (RUMJANEK *et al.*, 1994), e a FEPS, selecionada com daunorrubicina (PINTO-SILVA, 2007). Essas linhagens *MDR*, embora tenham o mesmo *background* genético, passaram por diferentes pressões seletivas exercidas pelas drogas, se tornando linhagens com características distintas. A Lucena 1, por exemplo, possui apenas superexpressão do transportador *MDR 1* enquanto a FEPS apresenta superexpressão dos transportadores *MDR 1* e *MRP 1*, quando comparadas a linhagem parental; além disso, a taxa de crescimento da Lucena 1 é maior do que a da FEPS (DAFLON-YUNES *et al.*, 2013).

A análise comparativa do perfil genético, por meio da técnica de microarranjo de mRNA, entre as linhagens derivadas *MDR* e a parental sensível, revelou que um grupo de genes diferentemente expresso compõem a via de sinalização de NOTCH (MOREIRA *et al.*, 2014). A via de NOTCH é composta por ligantes, que se encontram na célula emissora de sinal, e receptores e genes alvos, que se encontram na célula receptora de sinal. Esta via está associada a diversas funções celulares como apoptose, proliferação, diferenciação, e autorrenovação (ARTAVANIS-TSAKONAS *et al.*, 1999; SCHWANBECKET *et al.*, 2011), funções celulares que as linhagens *MDR* passaram a modular para garantir sua

sobrevivência à droga. Assim, a via de NOTCH representa um potencial alvo para estudo e pode contribuir para um melhor entendimento da aquisição de resistência e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

A confirmação da expressão relativa dos genes da via de NOTCH nas linhagens Lucena 1 e FEPS em comparação com a K562 foi validada por qPCR. A cada reação de qPCR é mais fidedigno usar múltiplos genes de referência para normalização dos valores de expressão relativa, onde é calculado uma média geométrica dos genes de referência utilizados para determinar o fator de normalização (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Entretanto, por esse método, é obtido um valor de expressão relativa único como resultado. Assim, com o intuito de analisar como é a expressão relativa dos genes da via para cada gene de referência normalizador isoladamente, foram realizadas análises com os genes $\beta 2M$ e $ACT\beta$.

A validação, a partir do cDNA sintetizado de RNA extraído de células cultivadas no protocolo sem levar em conta a densidade celular, confirmou a maior expressão do receptor *NOTCH 2* em Lucena 1 com relação a K562, e a maior expressão dos genes *NOTCH 2* e *HEY 1* e menor expressão do gene *HES 1* em FEPS com relação a K562. Esses resultados foram obtidos pela normalização por ambos os genes de referência, embora os valores numéricos de expressão relativa sejam diferentes. Essa diferença numérica pode ser justificada pelo fato de que $\beta 2M$ e $ACT\beta$, embora sejam genes que apresentam expressão mais estável em diferentes condições, possuem níveis de expressão diferentes na célula. Portanto, é esperado que a normalização e, conseqüentemente, os valores de expressão gênica, variem.

Vale ressaltar que, com este protocolo de cultura celular, não foi confirmado pela validação por qPCR a maior expressão do gene *HEY 1* em Lucena 1 com relação a K562, por ambos os genes de referência. Já a menor expressão do gene *PSEN 1* em FEPS com relação a K562, além de não ter sido confirmado pela validação por qPCR, foram encontrados resultados discordantes por cada gene de referência. A normalização pelo gene $\beta 2M$ indicou maior expressão do gene em FEPS (≈ 2 vezes), já a normalização com $ACT\beta$ não apresentou diferença de expressão. Nesses casos, como a diferença de expressão do gene é pequena entre as linhagens, é possível que a quantificação da expressão com os dois genes de referência que, já possuem diferentes padrões de expressão entre si, gere resultados discordantes.

Por meio do qPCR foi também observada diferença na expressão em outros genes da via de NOTCH que não foram identificados por microarranjo. Por exemplo, o gene do receptor *NOTCH 3* e do ligante *JAG 2* estavam mais expressos nas linhagens Lucena 1 e FEPS em comparação A K562, respectivamente, utilizando ambos os genes de referência.

Durante a validação por qPCR, a partir de cDNA sintetizado do RNA extraído de um novo experimento de cultura celular, foram selecionados os genes receptores *NOTCH 2* e *NOTCH 3* e os genes-alvo *HEY 1* e *HES1*. Nessa nova análise, entretanto, não foi alcançada reprodutibilidade em relação às análises iniciais. Sabe-se que a via de NOTCH é uma via de sinalização justácrina, onde para ativação é necessário o contato célula-célula e interação física entre ligantes e receptores (BORGGREF & OSWALDO, 2009). Assim, a proximidade entre células adjacentes, o que remete a concentração celular em cultura, parecer ser um fator importante nos experimentos de cultura de célula. No protocolo de cultura inicial, a cada passagem, a cultura era ajustada a uma densidade variável de 5×10^3 céls./ml a 2×10^4 céls./ml. Por isso, foi levantada a hipótese de que a densidade celular na cultura associada à proximidade entre às células, influencia a ativação da via e, conseqüentemente, leva a resultados diferentes na análise da expressão relativa dos genes entre as linhagens.

Assim, foi aplicado um protocolo de cultura celular revisado no qual a cada passagem a cultura foi reduzida a uma densidade fixa de 2×10^4 céls./ml. Além disso, para verificar se há diferença na expressão relativa dos genes entre diferentes condições fixas de densidade celular, grupos de células de cada linhagem foram também ajustados às concentrações celulares de 1×10^4 céls./ml, 5×10^3 céls./ml e $2,5 \times 10^3$ céls./ml a cada passagem em paralelo.

Nesse esquema revisado do protocolo foi alcançado reprodutibilidade das análises de expressão relativa em cada condição de densidade celular isolada em experimentos independentes. Em relação à comparação dos resultados nas diferentes densidades celulares, não houve diferença significativa na expressão relativa dos genes *NOTCH 2*, *NOTCH 3* e *HEY 1* entre a Lucena 1 e K562. Entretanto, foi validado de acordo com o microarranjo, a maior expressão do gene *HEY 1* na Lucena 1 em comparação com a K562, em todas as densidades celulares analisadas. Para o gene *HES 1*, embora também não estatisticamente significativo, foi observada uma tendência associada à influência da densidade celular e a expressão relativa. O gene *HES 1* foi 2,41 vezes menos expresso em Lucena 1 com

relação a K562 na concentração celular de $2,5 \times 10^3$ céls./ml, entretanto, com o aumento da densidade celular na cultura, passou a ser 2,18 vezes e 2,56 vezes mais expresso em Lucena 1 nas densidades celulares de 1×10^4 céls./ml e 2×10^4 céls./ml, sugerindo maior expressão desse gene alvo como resultado da maior ativação da via.

Em relação a FEPS e K562, foi observado que as diferentes densidades celulares não parecem influenciar na expressão relativa dos genes *NOTCH 2*, *NOTCH 3* e *HES 1*. Entretanto, foi visto que a concentração celular em cultura tende a influenciar de forma significativa na expressão relativa do gene *HEY 1*, onde foi observado que a sua expressão em FEPS decresceu com o aumento da densidade celular. Além disso, a superexpressão do gene *HEY 1* que, pelo microarranjo, foi cerca de 280 vezes mais expresso na FEPS do que na K562, alcançou valores maiores em densidades menores, chegando a ser 174 vezes mais expresso na densidade de $2,5 \times 10^3$ céls./ml, quando comparado a K562 na mesma densidade.

As condições de cultura, como densidade celular e número de passagens, são fatores que podem influenciar nas características da linhagem e, conseqüentemente, no que se esteja analisando. Por exemplo, foi observado que a linhagem de adenocarcinoma de próstata LNCaP, a depender do número de passagens em cultura, apresenta respostas distintas a exposição de andrógenos e taxas de crescimento opostas ao tratamento com ATRA. Além disso, as células que passaram por poucas passagens em cultura apresentaram camada irregular de células emaranhadas, já em altas passagens apresentaram monocamada de células individuais. É plausível que essas diferenças no padrão de crescimento e organização das células possam influenciar análises em que se esteja trabalhando com respostas que dependam da densidade celular e inibição por contato (ESQUENET *et al.*, 1997).

Assim, o uso do protocolo de cultura inicial, onde a densidade celular não era levada em consideração, a cada passagem as células provavelmente foram submetidas a condições heterogêneas em cultura, que não foram reproduzidas nos experimentos de cultura de células posteriores. Com a aplicação do protocolo revisado, onde foi estabelecida densidade celular fixa a cada passagem, esse problema foi resolvido e houve reprodutibilidade nos experimentos posteriores. Entretanto, ao comparar a expressão relativa entre grupos de células que passaram por diferentes densidades celulares ($2,5 \times 10^3$ céls./ml, 5×10^3 céls./ml, 1×10^4 céls./ml e 2×10^4 céls./ml), parece que apenas os genes-alvo de *NOTCH HES 1*, na

comparação Lucena 1/K562 e *HEY 1* na comparação FEPS/K562 foram sensíveis as diferentes condições de concentração celular.

A via de NOTCH, assim como a via de WNT e a de HedgeHog, é fundamental no desenvolvimento embrionário e na organogênese. Como os mecanismos de tumorigênese são comumente associados à embriogênese, muitas dessas vias, inclusive a de NOTCH, são ativadas na manutenção de células cancerígenas (YIN *et al.*, 2010). Além disso, muitos estudos trabalham com a hipótese de que as células-tronco normais do tecido passam por alterações que levam ao desenvolvimento de células-tronco cancerígenas (CSCs, do inglês *Cancer-Stem Cells*) (TAN *et al.*, 2006; BUZZEO *et al.*, 2007). Por esse modelo, as CSCs apresentam características similares às células-tronco normais, como autorrenovação ilimitada, divisão celular assimétrica, e resistência a agentes tóxicos, representando as células iniciadoras da tumorigênese (LIU *et al.*, 2013).

Os receptores e ligantes de NOTCH são expressos em células-tronco hematopoiéticas normais, induzindo a autorrenovação e manutenção do estado indiferenciado. No momento de maturação, a via é reprimida, levando à diferenciação desses progenitores num tipo celular sanguíneo específico (LEONG & KARSAN, 2006; YIN *et al.*, 2009). Entretanto, a desregulação desse processo é comumente observada em vários cânceres hematológicos (YIN *et al.*, 2010), resultando em células-tronco leucêmicas e blastos indiferenciados, o que caracteriza as leucemias (TAN *et al.*, 2006). Assim, uma vez que a K562, Lucena 1 e FEPS são blastos indiferenciados de LMC em crise blástica, é esperada a expressão de genes da via de NOTCH nessas linhagens.

Vale ressaltar que foi observado heterogeneidade da expressão gênica da via no modelo, onde alguns genes foram mais expressos, menos expressos ou não apresentaram diferença de expressão entre as linhagens MDR e a sensível. Os genes selecionados *NOTCH 2*, *NOTCH 3* e *HEY 1* foram mais expressos nas linhagens Lucena 1 e FEPS e outros como o *HES 1* foi mais expresso na Lucena 1 e menos expresso na FEPS, em comparação com a K562. A superexpressão de vias associadas à manutenção de células-tronco, como a de NOTCH, pode aumentar a malignidade de células cancerígenas (CAPPACIONE & PINE, 2013). Além disso, WANG *et al.* (2010) sugeriram que a via de NOTCH contribui para o perfil de resistência a drogas, favorecendo a manutenção das CSCs e a transição epitélio-mesênquima (EMT, do inglês *Epithelial-mesenchymal transition*) em tumores sólidos, por exemplo.

Ao encontro dessas sugestões, FARNIER & CLARKE (2007) observaram alta expressão da porção intracelular do NOTCH 1 em mamoesferas (células com características de células-tronco) de carcinoma ductal *in situ*, onde a capacidade de autorenovação foi maior do que de tecido de mama sadio. Além disso, a aplicação do inibidor de γ -secretase DAPT ou a utilização de anticorpos que inibem NOTCH-4 reduziram a formação de mamoesferas. WANG *et al.*, (2009) também observaram que células de câncer pancreático resistente a gencitabina e com o fenótipo invasor (EMT) superexpressam *NOTCH 2* e *JAG 1*, e a inibição de *NOTCH* com shRNA causou reversão parcial da capacidade invasora.

Assim, a maior ativação dos genes *NOTCH 2*, *NOTCH 3* e *HEY 1* pode ser um dos fatores que estejam favorecendo o fenótipo MDR adquirido pelas linhagens Lucena 1 e FEPS, justificando a maior expressão desses genes nessas linhagens em comparação com a K562. Outros trabalhos como NEFEDOVA *et al.* (2008) mostraram que a inibição da via de NOTCH por inibidores de γ -secretases impede a resistência a drogas mediada pelo estroma da medula óssea á células de mieloma múltiplo, levando estas a apoptose e maior sensibilidade a quimioterápicos. Já em células de B-CLL, os receptores *NOTCH 1* e *NOTCH 2* e os ligantes *JAG 1* e *JAG 2* são constitutivamente expressos e tem papel fundamental na sobrevivência e resistência a apoptose, representando um potencial alvo terapêutico (ROSATI *et al.*, 2009). Em tumores sólidos, foi observado que células-tronco de câncer de ovário regulam sua manutenção e induzem a resistência do tumor à quimioterapia baseada em platina por meio da superexpressão do *NOTCH 3* e o tratamento com inibidores de γ -secretases causou a reversão desse fenótipo (McAULIFFE *et al.*, 2012).

Outra observação importante é que as linhagens Lucena 1 e FEPS também apresentam superexpressão dos genes *ABCB 1* e *ABCC 1*, este último só a FEPS (DAFLON-YUNES *et al.*, 2013). O trabalho de CHO *et al.* (2011) propõe uma interação entre a via de NOTCH e o fenótipo MDR, associado a superexpressão do transportador *ABCC1*. Nesse estudo, foi observado alta expressão e atividade da porção intracelular do receptor NOTCH 1 e da enzima PSEN 1 na linhagem MDR de câncer de mama MCF-7 selecionada para resistência à droga etoposido em comparação com a MCF-7 parental sensível. A inibição de *NOTCH 1* na MCF-7 resistente com inibidores de γ -secretases ou shRNA, resultou na diminuição da expressão de *ABCC1*. Já a indução da expressão da porção intracelular do NOTCH 1 em MCF-7 sensível resultou no aumento da expressão de *ABCC1* e aquisição de resistência a droga (CHO *et al.* 2011). Assim, é possível que nas linhagens Lucena 1

e FEPS, a superexpressão da via de NOTCH seja um mecanismo associado à superexpressão de transportadores ABC, contribuindo para o fenótipo MDR.

Outro ponto importante é que a seleção de K562 para aquisição do fenótipo MDR (gerando as linhagens Lucena 1 e FEPS) é um processo irreversível e não dependente de estímulos posteriores para manutenção do perfil de resistência (DAFLON-YUNES *et al.*, 2013). Indo ao encontro desses achados, os dados aqui apresentados mostraram que as células MDR apresentaram o mesmo padrão de expressão relativa dos genes *NOTCH 2*, *NOTCH 3*, *HEY 1* e *HES 1* independentemente da presença de drogas no meio.

A daunorrubicina, droga usada para a seleção da linhagem FEPS, é um dos quimioterápicos do "tratamento 7+3" aplicado a pacientes com LMA. Essa linhagem apresenta superexpressão dos transportadores MDR 1 e MRP 1 (DAFLON-YUNES *et al.*, 2013) e, pela validação por qPCR, foi confirmada a maior expressão dos genes *NOTCH 2* e *HEY 1* e menor expressão do gene *HES 1* em relação a K562. Além disso, embora não tenha-se encontrado diferença de expressão pela análise de microarranjo, foi identificada maior expressão do *JAG 2* na FEPS.

Muitos estudos sobre aquisição de resistência em câncer, inclusive na LMA, apontam os transportadores ABC como um marcador de mau prognóstico, uma vez que atuam como bombas de efluxo e impedem a concentração ideal para a eficácia da droga (PALLIS *et al.*, 2002; VAN DER POL *et al.*, 2003; BENDERRA *et al.*, 2004). Entretanto, a via de NOTCH ainda não tem um papel estabelecido, podendo ser oncogênico ou supressor tumoral a depender do tipo de câncer. Na LMA, por exemplo, alguns estudos apontam a via ativa como oncogênica (XU *et al.*, 2010), enquanto outros relatam uma função supressora tumoral (KANNAN *et al.*, 2013; LOBRY *et al.*, 2013), gerando resultados controversos sobre a via como bom ou mau prognóstico. Assim, a análise da expressão dos genes avaliados na linhagem FEPS por qPCR, *NOTCH 2*, *NOTCH 3*, *HEY 1*, *HES 1*, e do transportador *ABCB 1*, em amostras de pacientes coletadas ao diagnóstico de LMA pode fornecer informação sobre o potencial de predição da via de NOTCH com respeito à resistência ao tratamento ou não.

A expressão de genes da via de NOTCH tem sido observada em LMA, entretanto seu papel na progressão ou prognóstico ainda não é bem definido (TOHDA & NARA, 2001; XU *et al.*, 2010). No estudo de XU *et al.* (2010) foi identificada maior expressão do receptor *NOTCH 1* e dos ligantes *JAG 1* e *DLL 1* em amostras de células mononucleares da medula óssea de pacientes com LMA em

relação a controles saudáveis. Além disso, pacientes com altos níveis de expressão desses genes apresentaram sobrevida livre de doença e sobrevida global menor do que pacientes com baixa expressão (XU *et al.*, 2010).

Além da manutenção de características relacionadas a células-tronco, a via de NOTCH também é associada a outros fatores do microambiente tumoral. Alguns indícios sugerem que a LMA é uma neoplasia dependente de angiogênese e assim contribui para a formação de vasos sanguíneos no microambiente da medula óssea (LEE *et al.*, 2007; ZHANG *et al.* 2012). Foi observada maior expressão dos genes *NOTCH 1* e *DLL 4*, além dos genes reguladores da angiogênese *VEGF* e *Ang 2*, em amostras de pacientes com LMA prévio ao tratamento em comparação com amostras de doadores saudáveis (ZHANG *et al.* 2012). Em cânceres hematológicos, como a LMA, é sugerido que a vascularização da medula óssea, reforçada pela angiogênese, influencie na progressão e quimiossensibilidade (TRUJILLO *et al.*, 2012). No estudo de ZHANG *et al.* (2012), foi observado que de fato pacientes com maior expressão dos genes *NOTCH 1*, *DLL 4*, *VEGF* e *Ang 2* apresentaram sobrevida menor do que pacientes com baixa expressão.

Assim como nos estudos citados, foi observado que alguns componentes da via de NOTCH estão associados significativamente com a sobrevida global dos pacientes. Os pacientes com expressão para os genes *NOTCH 2* e *HES 1* acima da mediana, apresentaram menor sobrevida global em comparação com pacientes em que tais valores foram menor do que a mediana. Entretanto, na FEPS houve menor expressão do gene *HES 1*, enquanto que o gene *HEY 1*, que não influenciou na sobrevida global dos pacientes, foi superexpresso. Essas observações apontam e exemplificam a via de NOTCH como oncogênica, indicando que pacientes que tenham maior expressão de genes da via tendem a apresentar menor sobrevida ao tratamento quimioterápico.

Entretanto alguns autores mostram que a via de NOTCH é reprimida na LMA e, quando ativada, exerce um papel supressor tumoral, podendo ser interpretado como um bom prognóstico. LOBRY *et al.* (2013) observaram que a via de NOTCH é silenciada em amostras de pacientes com LMA e em modelo animal. Por meio da ativação em modelos *in vitro* e *in vivo* foi observada rápida parada do ciclo celular, diferenciação e apoptose em células iniciadoras da doença. Outro estudo mostrou que amostras de pacientes com LMA possuem alta expressão de receptores NOTCH, como o *NOTCH 2*, em comparação com células-tronco hematopoiéticas derivadas de medula óssea normal mas baixa ativação da via. Além disso, a indução

da via pela ativação direta dos receptores ou pelo gene-alvo *HES 1* levou células da LMA ao processo de apoptose dependente de caspase (KANNAN *et al.*, 2013).

Esses dados controversos sobre a via de NOTCH como oncogênica ou supressora tumoral e, conseqüentemente, com o bom ou mau prognóstico pode ser justificada pela via ser contexto-dependente e pela aplicação de diferentes métodos experimentais em diferentes artigos científicos, levando a resultados divergentes (LIU *et al.*, 2013). Por exemplo, os efeitos *in vitro* e *in vivo* da ativação da via de NOTCH podem ser diferentes pelo fato de não ser similar à expressão natural dos ligantes nas células leucêmicas e estromais (TOHDA *et al.*, 2014).

Em relação aos transportadores ABC, o transportador MDR 1 é responsável pelo efluxo de várias drogas quimioterápicas do tratamento da LMA, evitando a concentração ideal do quimioterápico no interior da célula. Entretanto, foi proposto que o transportador MDR 1 possui mecanismos que não são relacionados ao efluxo de drogas, como modulação do efluxo de citocinas e regulação da distribuição de lipídios e do pH intracelular, mas que também favorecem a resistência por meio da inibição da apoptose das células leucêmicas (PALLIS *et al.*, 2002). Assim, a superexpressão de transportadores ABC é uma característica que contribui para o fenótipo de resistência à quimioterapia, e um indicador de mau prognóstico (PALLIS *et al.*, 2002; BENDERRA *et al.*, 2004). Entretanto, na análise do gene *ABCB 1*, não foi encontrada diferença significativa na sobrevida global entre pacientes com maior e menor expressão, ao contrário do que seria esperado de acordo com os dados de PALLIS *et al.* (2002) e BENDERRA *et al.* (2004).

Como perspectivas desse trabalho, é importante analisar a via de NOTCH a nível traducional tanto no modelo MDR *in vitro* como nas amostras de pacientes, principalmente para identificação da porção intracelular dos receptores NOTCH e dos repressores HEY 1 e HES 1, que confirmariam de fato a ativação da via. Além disso, é necessária a inclusão de mais pacientes no estudo no intuito de obter uma população maior e resultados estatísticos mais robustos da via de NOTCH como fator prognóstico.

6.0 - CONCLUSÕES

- Foi validado por qPCR o padrão de expressão dos genes *NOTCH 2*, *HEY 1* e *HES 1* em linhagens K562, Lucena 1 e FEPS. Foi identificada também a maior expressão do gene *NOTCH 3* em Lucena 1 e maior expressão do gene *JAG 2* em FEPS, tendo como genes de referência $\beta 2M$ e $ACT\beta$.
- A densidade celular em cultura influencia na expressão dos genes *HEY1* e *HES 1*, ambos a jusante na via de NOTCH.
- O padrão de expressão dos genes da via de NOTCH nas linhagens MDR é independente da presença de drogas no meio de cultura.
- A maior expressão dos genes *NOTCH 2* e *HES 1* está associado a uma menor sobrevida global em pacientes diagnosticados com LMA.

REFERÊNCIAS:

ACS (American Cancer Society). Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/index>>. Acesso em: 10 de Janeiro de 2014.

AGRAWAL, N. *et al.* Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1, v. 333, n. 6046, p. 1154-1157, 2011.

ARTAVANIS-TSAKONAS, S. *et al.* Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, v. 284, n. 5415, p. 770-776, 1999.

BAGULEY, B. A brief history of cancer chemotherapy. In *Anticancer Drug Development*. London: Academic Press, p. 1-9, 2002.

BARTEN, D. M. *et al.* Gamma-secretase inhibitors for Alzheimer's disease: balancing efficacy and toxicity. *Drugs R D.*, v. 07, i. 02, p. 87-97, 2006.

BENDERRA, Z. *et al.* Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias. *Clinical Cancer Research*, v. 10, n. 23, p. 7896-7902, 2004.

BORGGREFE, T. & OSWALD, F. The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 66, i. 10, p. 1631-1646, 2009.

BRAY, S. J. NOTCH signaling: a simple pathway becomes complex. *Nature Reviews- Molecular Cell Biology*, v. 7, p. 678-689, 2006.

BUZZEO, M. P. *et al.* The hunt for cancer-initiating cells: a history stemming from leukemia. *Leukemia*, v. 21, i. 08, p. 1619-1627, 2007.

CALABRETTA, B. & PERROTTI, D. The biology of CML blast crisis. *Blood*, v. 103, n. 11, p. 4010-22, 2004.

CAPACCIONE, K.M. & PINE, S.R. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. *Carcinogenesis*, v. 34, i. 07, p. 1420-1430, 2013.

CHABNER, B.A. & ROBERTS Jr, T. J. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Natural Reviews Cancer*, v. 05, i. 01, p. 65-72, 2005.

CHEN, C. J. *et al.* Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, v. 47, i. 03, p. 371-389, 1986.

CHEN, Y. *et al.* P-glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein Influence Brain Distribution of Dasatinib. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 330, n. 3, p. 956-963, 2009.

CHIARAMONTE, R. *et al.* A wide role for NOTCH1 signaling in acute leukemia. *Cancer Letters*, v. 219, i. 1, p. 113-120, 2005.

CHO, S. *et al.* Notch1 regulates the expression of the multidrug resistance gene *ABCC1/MRP1* in cultured cancer cells. *PNAS*, v. 108, n. 51, 2011.

COLE, S. P. *et al.* Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*. *Science*, v. 258, n. 5088, p. 1650-1654, 1992.

DAFLON-YUNES, N. *et al.* Characterization of a multidrug-resistant chronic myeloid leukemia cell line presenting multiple resistance mechanisms. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 383, i. 1-2, p. 123-135, 2013.

DOYLE, L. A. *et al.* A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *PNAS*, v. 95, i. 26, p. 1665-1670, 1998.

DRUKER B.J. *et al.* Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, v. 344, n. 14, p. 1031-1037, 2001.

ELLISEN, L.W. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*, v. 66, i. 04, p. 649-661, 1991.

ESQUENET, M. *et al.* LNCaP prostatic adenocarcinoma cells derived from low and high passage numbers display divergent responses not only to androgens but also to retinoids. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v. 62, i. 5-6, p. 391-399, 1997.

FADERL, S. *et al.* Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. *Annals of Internal Medicine*, v. 131, p. 207 - 219, 1999.

FARBER, S. & DIAMOND, L.K. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *New England Journal of Medicine*, p. 787-793, 1948.

FARNIE, G. & CLARKE, R.B. Mammary stem cells and breast cancer--role of Notch signalling. *Stem Cell Reviews*, v. 03, i. 02, p. 169-175, 2007.

GOODFELLOW, H. *et al.* Gene-specific targeting of the histone chaperone asf1 to mediate silencing. *Developmental Cell*, v. 13, i. 04, p. 593-600, 2007.

GOTTESMAN, M. M. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual Review of Medicine*, v. 53, p. 615-627, 2002.

GYÖRFFY, B. *et al.* Gene expression profiling of 30 cancer cell lines predicts resistance towards 11 anticancer drugs at clinically achieved concentrations. *International Journal of Cancer*, v. 118, i. 07, p. 1699-1712, 2006.

HANAHAN, D. & WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, i. 05, p. 646-674, 2011.

HARRIS, N. L. *et al.* World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *Journal of Clinical Oncology*, v. 17, n. 12, 1999.

HASSERJIAN, R.P. Acute myeloid leukemia: advances in diagnosis and classification. *International Journal of Laboratory Hematology*, v. 35, i. 03, p. 358-366, 2013.

HEHLMANN, R. & SAUSSELE, S. Treatment Of Chronic Myeloid Leukemia In Blast Crisis. *Haematologica*, v. 93, i. 12, 2008.

HIGGINS, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Reviews of Cell Biol*, v. 08, p. 67-113, 1992.

HIMES, R. H. *et al.* Action of the Vinca Alkaloids Vincristine, Vinblastine, and Desacetyl Vinblastine Amide on Microtubules in Vitro. *Cancer Research*, v. 36, p. 3798-3801, 1976.

HWASE, D. K. *et al.* Dasatinib Cellular Uptake and Efflux in Chronic Myeloid Leukemia Cells: Therapeutic Implications. *Cancer Therapy: Clinical*, v. 14, n. 12, p. 3881-3888, 2008.

HORTOBÁGYI, G. N. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs*, v. 54, s. 4, p. 1-7, 1997.

HUBMANN, R. *et al.* Gliotoxin is a potent NOTCH2 transactivation inhibitor and efficiently induces apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) cells. *British Journal of Haematology*, v. 160, i. 05, p. 618-629, 2013.

ISO, T.; KEDES, L.; HAMAMORI, Y. HES and HERP Families: Multiple Effectors of the Notch Signaling Pathway. *Journal of cellular physiology*, v.194, p. 237–255, 2003.

JORDAN, M. A.; Thrower, D.; Wilson, L. Mechanism of Inhibition of Cell Proliferation by Vinca Alkaloids. *Cancer Research*, v. 51, p. 2212-2222, 1991.

KANNAN, S. *et al.* Notch activation inhibits AML growth and survival: a potential therapeutic approach. *Journal of Experimental Medicine*, v. 210, n. 02, p. 321-337, 2013.

KARS, M. D. *et al.* Development of rational in vitro models for drug resistance in breast cancer and modulation of MDR by selected compounds. *Anticancer Research*, v. 26, n. 06B, p. 4559-4568, 2006.

KOHN, K.W. Beyond DNA cross-linking: history and prospects of DNA-targeted cancer treatment--fifteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Research*, v. 56, i. 24, p. 5533-46, 1996.

KOHNO, K. *et al.* Vincristine-resistant human cancer KB cell line and increased expression of multidrug-resistance gene. *Japanese Journal of Cancer Research*. (Gann), n. 79, p. 1238-1246, 1988.

KOPAN, R. & LLHAGAN, M. X. G.. The Canonical NOTCH Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell*, v. 137, i. 2, p. 216-233, 2009.

JULIANO, R. L. & LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 455, i. 01, p. 152-162, 1976.

LEE, C. Y. *et al.* Marrow angiogenesis-associated factors as prognostic biomarkers in patients with acute myelogenous leukaemia. *British Journal of Cancer*, 2007, v. 97, n. 07, p. 877-882, 2007.

LEONG, K. G. & KARSAN, A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood*, v. 107, n. 6, p. 2223-2233, 2006.

LI, Y. MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes. *Cancer Research*, v. 69, n. 19, p. 7569-7576, 2009.

LIU, Y-P. *et al.* Cisplatin selects for multidrug-resistant CD133+ cells in lung adenocarcinoma by activating Notch signaling. *Cancer Research*, Published Online First November 7, 2012.

LIU, N.; ZHANG, J.; JI, C. The emerging roles of Notch signaling in leukemia and stem cells. *Biomarker Research*, v. 01, n. 23, 2013.

LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*, v. 25, i. 04, p. 402-408, 2001.

LOBRY, C.; OH, P.; AIFANTIS, I. Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 208, n. 10, p. 1931-1935, 2011.

LOBRY, C. *et al.* Notch pathway activation targets AML-initiating cell homeostasis and differentiation. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 210, n. 02, p. 301-319, 2013.

LOZZIO, C.B. & LOZZIO, B.B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, v. 45, n. 03, p. 321-334, 1975.

LUQMANI, Y.A. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Medical Principles and Practice*, v. 14, s. 01, p. 35-48, 2005.

MAHON, F-X. *et al.* MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood*, v. 101, n. 6, p. 2368 - 2373, 2003.

MAHON, F-X. *et al.* Evidence that Resistance to Nilotinib May Be Due to BCR-ABL, Pgp, or Src Kinase Overexpression. *Cancer Research*, v. 68, n. 23, p. 9809 - 9816, 2008.

McAULIFFE, S. M. *et al.* Targeting Notch, a key pathway for ovarian cancer stem cells, sensitizes tumors to platinum therapy. *PNAS*, v. 109, n. 43, p. E2938-E2948, 2012.

MELO, J. V.; HUGHES, T. P.; APPERLEY, J. F. Chronic Myeloid Leukemia. *American Society of Hematology*, v. 2003, p. 132-152, 2003.

MOREIRA, M. A. *et al.* Changes in gene expression profile in two multidrug resistant cell lines derived from a same drug sensitive cell line. *Leukemia Research*, v. 38, i. 08, p. 983-987, 2014.

MORI-IWAMOTO, S. *et al.* A proteomic profiling of gemcitabine resistance in pancreatic cancer cell lines. *Molecular Medicine Reports*, v. 01, i. 03, p. 429-434, 2008.

NAM, Y.; ASTER, J. C.; BLACKLOW, S. C. Notch signaling as a therapeutic target. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 6, i. 4, p. 501-509, 2002.

National Comprehensive Cancer Network (NCCN[®] Clinical Practice Guidelines in Oncology). Chronic Myelogenous Leukemia, v. 1. 2015 (http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cml.pdf).

NCI (National Cancer Institute at the National Institutes of Health). Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics>>. Acesso em: 10 de Janeiro de 2015.

NEFEDOVA, Y. *et al.* Inhibition of Notch signaling induces apoptosis of myeloma cells and enhances sensitivity to chemotherapy. *Blood*, v.111, n. 04, p. 2220-2229, 2008.

NICKOLOFF, B. J.; OSBORNE, B. A.; MIELE, L. Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene*, v. 22, p. 6598-6608, 2003.

O'NEIL, J. *et al.* FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *Journal of Experimental Medicine*, v. 204, n. 08, p. 1813-1824, 2007.

OZBEN, T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Letters*, n. 580, p. 2903-2909, 2006.

PALLIS, M. *et al.* P-glycoprotein in acute myeloidleukaemia: therapeutic implications of its association with both a multidrug-resistant and an apoptosis-resistant phenotype. *Leukemia and Lymphoma*, v. 43, n. 06, p. 1221-1228, 2002.

PENTON, A.L.; LEONARD, L. D.; SPINNER, N.B. Notch signaling in human development and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 23, i. 04, p. 450-457, 2012.

PERSIDIS, A. *Cancer multidrug resistance*. *Nature Biotechnology*, v. 17, p. 94 - 95 1999.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids*, v. 29, n. 09, 2001.

PINTO-SILVA, F. E. Seleção e caracterização de uma nova linhagem leucêmica humana MDR. IBqM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 108 p, 2007.

RADTKE, F. & RAJ, K. *The role of notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor?* *Natural Reviews Cancer*, v. 3, p. 756-767, 2003.

REBAY, I. *et al.* Specific EGF repeats of NOTCH mediate interactions with Delta and serrate: Implications for NOTCH as a multifunctional receptor. *Cell*, v. 67, i.4, p. 687-699, 1991.

RIDGWAY, J. *et al.* Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature*, v. 444, p. 1083-1087, 2006.

ROSATI, E. *et al.*. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood*, v. 113, n. 04, p. 856-865, 2009.

ROWLEY J. D. Letter: A new consistente chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorscence and Giemsa staining. *Nature*, v. 243, p. 290 -293, 1973.

RUMJANEK, V. M. *et al.* *Multidrug resistance in leukemias: the problem and some approaches to its circumvention. Ciência e Cultura*, v. 56, p. 63-69, 1994.

RUMJANEK, V. M. *et al.* *Multidrug resistance in tumour cells: characterisation of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 73, n. 01, p. 57-69, 2001.

SARASWATHY, M. & GONG, S. Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer. *Biotechnology Advances*, v. 31, i. 08, p. 1397-1407, 2013.

SARKADI, B. & MÜLLER, M. Search for specific inhibitors of multidrug resistance in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, v. 08, i. 03, p. 171-182, 1997.

SCHWANBECK, R.; MARTINI, S.; BERNOTH, K.; JUST, U. The Notch signaling pathway: Molecular basis of cell context dependency. *European Journal of Cell Biology*, v. 90, i. 6-7, p. 572-581, 2011.

SHIH I-M & WANG T-L. Notch signaling, gamma-secretase inhibitors, and cancer therapy. *Cancer Research*, v. 67, i. 5, p. 1879-1882, 2007.

SZAKÁCS, G. *et al.* Targeting multidrug resistance in cancer. *Natural Reviews Drug Discovery*, v. 05, i. 03, p. 219-234, 2006.

TAN, B.T. *et al.* The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Laboratory Investigation*, v. 86, i. 12, p. 1203-1207, 2006.

TEJADA, F. N. H.; SILVA, J. R. G.; ZWEIDLER-MCKAY, P.A. The challenge of targeting notch in hematologic malignancies. *Frontiers in Pediatrics*, v. 02, a. 54, 2014.

TOHDA, S. & NARA, N. Expression of Notch1 and Jagged1 proteins in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia & Lymphoma*, v. 42, n. 03, p. 467-72, 2001.

TIWARI *et al.* Nilotinib (AMN107, Tasigna1) reverses multidrug resistance by inhibiting the activity of the ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP/MXR transporters. *Biochemical Pharmacology*, v. 78, p. 153-161, 2009.

TOHDA, S. *et al.* Diverse effects of the Notch ligands Jagged1 and Delta1 on the growth and differentiation of primary acute myeloblastic leukemia cells. *Experimental Hematology*, v. 33, i. 05, p. 558-563, 2005.

TOHDA, S. NOTCH Signaling Roles in Acute Myeloid Leukemia cell Growth and Interaction with other Stemness-related Signals. *Anticancer Research*, v. 34, n. 11, p. 6259-6264, 2014.

TRUJILLO, A. *et al.* Angiogenesis in Acute Myeloid Leukemia and Opportunities for Novel Therapies. *Journal of Oncology*, v. 2012, Article ID 128608, p.1-9, 2012.

TSURUO, T. *et al.* Potentiation of vincristine and Adriamycin effects in human hemopoietic tumor cell lines by calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Research*, v. 43, n. 5, p.2267-72, 1983.

TSURUO, T. *et al.* Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Science*, v. 94, n. 01, p. 15-21, 2003.

VAN DER POL, M.A. *et al.* Function of the ABC transporters, P-glycoprotein, multidrug resistance protein and breast cancer resistance protein, in minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, v. 88, n. 02, p. 134-147, 2003.

VANDESOMPELE, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, v. 03, i. 07, p. 1-12, 2002.

VIATOUR, P. *et al.* Notch signaling inhibits hepatocellular carcinoma following inactivation of the RB pathway. *Journal of Experimental Medicine*, v. 208, n. 10, p. 1963-1976, 2011.

XU, X. *et al.* Activation of Notch signal pathway is associated with a poorer prognosis in acute myeloid leukemia. *Medical Oncology*, v. v. 28, s. 01, p. 483-489, 2010.

WANG, Z. *et al.* Emerging role of Notch in stem cells and cancer. *Cancer Letters*, v. 279, i. 01, p. 8-12, 2009.

WANG, Z. *et al.* Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway. *Cancer Research*, v. 69, i. 06, p. 2400-2407, 2009.

WANG, Z. *et al.* Targeting Notch signaling pathway to overcome drug resistance for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, v. 1806, i. 02, p. 258-267, 2010.

WANG *et al.* Targeting notch to eradicate pancreatic cancer stem cells for cancer therapy. *Anticancer Research*, v. 31, n. 04, 2011.

WENG, A. P. *et al.* Growth suppression of pre-T acute lymphoblastic leukemia cells by inhibition of notch signaling. *Molecular and Cellular Biology*, v. 23, n. 02, p. 655-665, 2003.

WENG, A. P. *et al.* Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*, v. 306, 2004.

WHO (World Health Organization). Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 10 de Janeiro de 2015.

YAN, S. *et al.* Expression profile of NOTCH-related genes in multidrug resistant K562/A02 cells compared with parental K562 cells. *International Journal of Laboratory Hematology*, v. 32, i. 2, p. 150-158, 2010.

YIN, D-D. *et al.* Notch signaling inhibits the growth of the human chronic myeloid leukemia cell line K562. *Leukemia Research*, v. 33, i. 01, p. 109-114, 2009,

YIN, L. *et al.* Notch signaling: Emerging molecular targets for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, v. 80, i. 5, p. 690-701, 2010.

ZAHREDDINE, H. & BORDEN, K.L. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Frontiers in Pharmacology*, v. 04, a. 28, p. 1-8, 2013.

ZHANG, J. *et al.* Prognostic impact of δ -like ligand 4 and Notch1 in acute myeloid leukemia. *Oncology Reports*, v. 28, i. 04, 2012.

ANEXO 1.0: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DIRIGIDO AO PACIENTE

PROJETO: EXPRESSÃO DA VIA DO GENE NOTCH EM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

Nome do Voluntário: _____

Você está sendo convidado(a) a participar de um projeto que pretende avaliar se a atividade de determinados genes em Leucemias (câncer no sangue) está relacionada a algumas características da doença. Para a realização desse projeto serão convidados pacientes com Leucemia Mielóide Aguda atendidos em quatro hospitais do Rio de Janeiro (Hospital Federal da Lagoa, HEMORIO, Hospital Universitário Pedro Ernesto e Instituto Nacional do Câncer).

Serão estudadas algumas características genéticas da leucemia a partir de exames feitos a partir da medula óssea. Esse material será coletado no momento da coleta de medula óssea necessária para o diagnóstico do tipo de leucemia que você tem. Além disso, serão realizados testes para verificar se existem alterações em genes nas células da leucemia, a partir do material genético isolado da medula óssea.

Os resultados deste projeto poderão trazer mais informações sobre a influência desses genes no tratamento de leucemias.

Para que você possa decidir se quer participar ou não deste projeto, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações, por isso é importante que você leia atentamente esse documento.

OBJETIVO DO PROJETO

O projeto quer saber a influência do gene *NOTCH* na Leucemia Mielóide Aguda de pacientes adultos.

PROCEDIMENTOS DO PROJETO

" Se você concordar em participar desse projeto serão coletados entre 5 mL a 10 mL (uma ou duas colheres de sopa, respectivamente) de sua medula óssea para analisar o material genético. O volume de medula óssea a ser retirado (até 10 mL) dependerá dos critérios de avaliação do médico responsável no momento do procedimento. A coleta de medula óssea é um procedimento necessário para o seu diagnóstico e tratamento, e a coleta do material para esse projeto de pesquisa ocorrerá ao mesmo tempo, não é necessário um outro procedimento. Será coletado um volume de medula além do volume que será coletado para saber o tipo de leucemia que você tem. Você também responderá a algumas perguntas sobre seus hábitos de vida e autorizará a consulta aos seus dados no prontuário médico."

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Sua participação nesse projeto é voluntária. Caso você não deseje participar deste projeto de pesquisa, basta que você não assine este Termo de Consentimento, e nenhuma amostra será colhida para esse fim. Não existem outros métodos ou formas para sua participação nesse projeto de pesquisa, se você não concordar com os procedimentos que serão realizados (coleta de medula óssea) para a execução desse projeto você é totalmente livre para não participar.

RISCOS

A coleta de sua medula para o projeto será feita durante a punção de medula óssea que é necessária para o seu diagnóstico e tratamento. As retiradas da medula óssea pode causar dor, manchas roxas e raramente infecção. A retirada do volume a mais de medula óssea para esse projeto pode causar um tempo maior de desconforto durante o procedimento.

BENEFÍCIOS

Os resultados desse projeto de pesquisa não trarão benefícios para o seu tratamento. Entretanto, os resultados desse projeto serão importantes para que possamos entender melhor como se comportam as leucemias mielóides agudas. Essas informações poderão nos ajudar acompanhar e tratar melhor as pessoas com este tipo de câncer do sangue.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além dos pesquisadores que participam desse projeto, os dados obtidos e seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HEMORIO e equipe de pesquisadores envolvidos. **Seu nome não será revelado** ainda que informações de seu registro médico e os dados gerados nesse projeto sejam utilizados para propósitos educativos ou de publicação científica, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste projeto.

CUSTOS

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para você pela sua participação no projeto.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste projeto é totalmente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais tem direito. Caso você decida interromper sua participação no projeto, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de dados será imediatamente interrompida e os resultados obtidos não serão utilizados na execução do projeto.

O médico responsável por sua internação no hospital em que você faz o tratamento pode interromper sua participação no projeto a qualquer momento, mesmo sem a sua autorização. Nesse caso, o motivo dessa interrupção será discutido com você.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Você e seus familiares podem fazer perguntas a qualquer momento durante a execução desse projeto. Neste caso, por favor, ligue para Miguel Ângelo Martins Moreira, telefone 21-3207-6586, ou para a Dra Rose Filgueiras, telefone 21-3111-5219. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do projeto, também pode contar com um terceiro contato imparcial, o Comitê de Ética em Pesquisa do HEMORIO, telefones 21 2332-8611 r: 2212, fax 21 2252-2969 ou pelo e-mail upc@hemorio.rj.gov.br.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Li as informações acima e entendi os propósitos deste projeto assim como seus benefícios e riscos potenciais da minha participação. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste documento, dou livremente meu consentimento para participar neste projeto.

Entendo que poderei ser submetido a exames adicionais aos necessários a meu tratamento e não receberei compensação monetária por minha participação neste projeto.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

_____ / ____ / ____
(Assinatura do Paciente) dia mês ano

(Nome do Paciente – letra de forma)

_____ / ____ / ____
(Assinatura de Testemunha, se necessário) dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste projeto ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

_____ / ____ / ____
(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento) dia mês ano

ANEXO 2.0: Parecer Comitê de Ética

CONEP

PROJETO DE PESQUISA

Título: EXPRESSÃO DA VIA DO GENE NOTCH EM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

Pesquisador: MIGUEL ANGELO MARTINS MOREIRA

Versão: 2

Instituição: Instituto Nacional de Câncer/ INCA/ RJ

CAAE: 00646612.1.0000.5274

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

Número do Parecer: 64461

Data da Relatoria: 27/06/2012

Apresentação do Projeto:

Conteúdo do projeto não avaliado pela CONEP.

Objetivo da Pesquisa:

Conteúdo do projeto não avaliado pela CONEP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conteúdo do projeto não avaliado pela CONEP.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não se aplica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Situação do Parecer:

Devolvido

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

Após análise da documentação encaminhada, a CONEP esclarece que essa pesquisa não se enquadra em nenhuma Área Temática Especial do Grupo I.

Nesse caso, a aprovação ética é delegada ao Comitê de Ética em Pesquisa da instituição, devendo ser seguido o procedimento para projetos que não são do Grupo I, conforme o fluxograma disponível no site: <http://conselho.saude.gov.br> e no Manual Operacional para CEP.

Diante do exposto, esta comissão delibera por devolver o protocolo em questão.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

31 de Julho de 2012

Assinado por:
Gyséle Saddi Tannous

PROJETO DE PESQUISA

Título: EXPRESSÃO DA VIA DO GENE NOTCH EM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

Pesquisador: MIGUEL ANGELO MARTINS MOREIRA

Versão: 2

Instituição: Instituto Nacional de Câncer/ INCA/ RJ

CAAE: 00646612.1.0000.5274

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP Elaborado pela Instituição Coparticipante

Número do Parecer: 38155

Data da Relatoria: 13/06/2012

Apresentação do Projeto:

O projeto foi bem elaborado e já foi aprovado por outro CEP

Objetivo da Pesquisa:

investigar se a via de sinalização de NOTCH em amostras de células leucêmicas de portadores de LMA apresenta diferença nos padrões de sinalização associados à evolução da doença, a partir da análise da expressão, por PCR em Tempo Real, de genes que atuam em diferentes fases dessa via

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

As análises serão feitas em material de medula óssea. Este procedimento é doloroso e pode deixar manchas roxas por algum tempo. No entanto, ele é necessário para a realização do transplante. Tanto os pacientes como os doadores assinarão TCLE próprios.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão incluídos 50 pacientes diagnosticados com Leucemia Mielóide Aguda de novo, maiores de 18 anos, e que concordarem em participar desse projeto de pesquisa assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (em Anexo). Esses pacientes serão recrutados nas seguintes instituições: Hospital Federal da Lagoa, HEMORIO, INCA e Hospital Pedro Ernesto (UERJ). Todas as instituições utilizam em seu protocolo de tratamento a indução com uma Antraciclina e Citarabina. Também será coletado material proveniente de medula de 10 indivíduos normais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos obrigatórios foram apresentados

Recomendações:

Manter o CEP do HUPE atualizado quanto ao andamento do projeto através de relatórios parciais.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

entendemos que não se trata de um protocolo da Área Temática Especial 'Genética humana' do Grupo I, pois não se enquadra em nenhuma das categorias da Resolução CNS 340/04, item VI.3. Portanto, de acordo com o fluxograma do Sistema CEP/CONEP, sua análise ética é delegada somente ao CEP.

Na data de emissão desse parecer estavam pendentes os pareceres de algumas co-participantes. As mesmas deverão ser apresentadas antes do início do projeto.

RIO DE JANEIRO, 18 de Junho de 2012

Assinado por:

WILLE OIGMAN

PROJETO DE PESQUISA

Título: EXPRESSÃO DA VIA DO GENE NOTCH EM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

Área Temática: Área 1. Genética Humana.;

Pesquisador: MIGUEL ANGELO MARTINS MOREIRA

Versão: 2

Instituição: Instituto Nacional de Câncer/ INCA/ RJ

CAAE: 00646612.1.0000.5274

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 27920

Data da Relatoria: 07/06/2012

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa prospectivo. Serão incluídos cerca de 50 pacientes diagnosticados com Leucemia Mielóide Aguda (LMA) de novo, maiores de 18 anos oriundos das seguintes instituições: Hospital Federal da Lagoa, HEMORIO, INCA e Hospital Pedro Ernesto (UERJ). Está previsto a coleta de medula óssea de 10 indivíduos normais. Métodos de biologia molecular será utilizados para a extração de RNA e DNA a partir de amostras de medula óssea e sangue periférico de pacientes e indivíduos normais.

Marcadores moleculares associados ao prognóstico do paciente com LMA serão analisados por PCR a partir do DNA genômico ou cDNA visando detectar rearranjos cromossômicos [inv16, t(15:17), t(8,21)] ou mutações em genes específicos (DNMT3A, NPM1, IDH1 e TET2).

Genes associados à via de NOTCH (JAG1, DELTA1, NOTCH1, IL2R, HES1, HES5, DELTE X3L, HEY2, NFkB) serão analisados por PCR em Tempo Real (expressão quantitativa a partir de cDNA) e por amplificação de DNA tratado com bisulfito de sódio (análise de metilação a partir de DNA genômico).

Serão coletados dados antropométricos, citogenéticos, imunofenotipagem, laboratoriais, imagem, tratamento instituído e a evolução clínica ao longo do tratamento. Será realizada uma análise descritiva dos pacientes de acordo com suas características clínicas, bem análises comparativas entre grupos de pacientes com características clínicas, citogenéticas ou moleculares distintas, como: resposta ao tratamento, expressão gênica, tempo para a recaída, sobrevida global, idade, etc.

Objetivo da Pesquisa:

Principal:

- Investigar se a via de sinalização de NOTCH em amostras de células leucêmicas de portadores de LMA apresenta diferença nos padrões de sinalização associados à evolução da doença, a partir da análise da expressão, por PCR em Tempo Real, de genes que atuam em diferentes fases dessa via.

Específicos:

- Observar a relação entre o padrão de expressão dos diferentes genes da via de NOTCH nas células de LMA dos pacientes associando os resultados obtidos à remissão completa, sobrevida livre de doença, sobrevida global até 3 anos.

- Analisar o padrão de metilação em promotores dos genes alvo de NOTCH e se esse padrão se associa com os dados obtidos para remissão completa, sobrevida livre de doença, sobrevida global até 3 anos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos físicos dos sujeitos de pesquisa não foram devidamente ponderados.

O pesquisador propõe coletar 10 ml de medula óssea adicionais ao volume que é coletado normalmente dos pacientes com LMA destinado aos exames e testes moleculares da rotina diagnóstica.

Os sujeitos de pesquisa devem ser esclarecidos em relação à voluntariedade da participação nesse projeto e que esta participação não esta isenta de riscos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto em tela foi apresentado de forma clara e objetiva. Com uma profusa revisão da literatura.

A abordagem metodológica proposta é apropriada e coerente com os objetivos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os Termos em acordo com a Resolução CNS 196 e suas complementares.

Foram apresentados os TCLE em linguagem acessível ao sujeito da pesquisa, contemplando a análise

de riscos e benefícios, a confidencialidade e os demais itens pertinentes.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (CEP-INCA), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto. Ressalto o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo.

Na data de emissão desse parecer estavam pendentes os pareceres de algumas co-participantes. As mesmas deverão ser apresentadas antes do início do projeto.

O presente projeto, seguido nesta data para análise da CONEP, só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

RIO DE JANEIRO, 28 de Maio de 2012

Assinado por:

Carlos Henrique Debenedito Silva



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP HEMORIO

Rio de Janeiro, 28 de setembro de 2012.

ASSUNTO: Parecer consubstanciado de projeto de pesquisa avaliado pelo CEP HEMORIO

Prezada Pesquisadora,

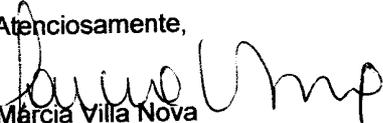
O projeto, “**Expressão do Gene Notch em LMA**”, cadastrado no CEP HEMORIO sob o nº 296/12, foi **APROVADO** pelo Comitê desta Instituição, conforme a Resolução CNS 196, de 10/outubro de 1996, após análise das respostas às pendências.

Ressaltamos abaixo, algumas orientações fundamentais, as quais o pesquisador deve estar muito atento:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado;
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeira ação imediata;
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificações ao CEP e à ANVISA, junto com seu posicionamento;
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente até **28/03/2013** e ao término do estudo.

Sendo assim, por favor, contate a Coordenação do CEP HEMORIO (Daniele Galindo, Márcia Villa Nova ou Thais Oliveira) pelo telefone 2332-8611, ramal 2212, a fim de estabelecermos o fluxo de sua pesquisa e tomarmos outras providências pertinentes.

Atenciosamente,


Márcia Villa Nova
Coordenadora do CEP HEMORIO

ANEXO 3.0: Dados dos pacientes incluídos no estudo

Tabela 4.3: Informações dos pacientes

Número da amostra	Data do diagnóstico (DD/MM/AAA)	Gênero (M = Masculino/ F = Feminino)	Idade (anos)	Classificação FAB (M0, M1, M2, M3, M4 ou M5)	Óbito (S = Sim/ N = Não)
1	07/05/2013	M	46	M0	N
2	14/07/2014	M	37	M4	N
3	18/06/2013	M	66	M1	S
4	14/07/2014	M	38	M3	N
5	17/03/2014	M	32	M4	S
6	15/05/2013	F	69	M4	S
7	18/02/2013	F	50	M3	S
8	17/10/2013	M	31	M3	N
9	24/07/2013	M	31	M0	S
10	07/02/2013	M	63	M1	S
11	20/09/2013	M	78	M4	S
12	05/11/2013	F	81	M1	S
13	08/08/2013	F	77	M3	S
14	25/07/2013	M	38	M5	S
15	27/11/2013	M	63	M5	S
16	21/08/2013	M	68	M1	N
17	16/07/2013	M	46	M1	S
18	27/03/2013	M	42	*LMA	S
19	03/07/2014	M	66	M1	N
20	19/02/2013	M	19	M0	N
21	02/04/2014	M	21	M3	N
22	17/12/2012	F	51	M0	S
23	14/07/2014	F	58	M4	S
24	19/05/2014	F	55	M0	S
25	18/11/2013	M	39	M2	N
26	18/11/2013	M	42	M3	S
27	22/07/2013	F	61	M1	S
28	17/03/2013	F	60	M0	S
29	20/06/2013	M	47	M3	N
30	14/10/2013	F	58	M2	S
31	08/02/2013	M	60	M1	S
32	28/06/2013	F	67	M5	N

* LMA secundária à síndrome mielodisplásica