



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA

Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Oncologia

FERNANDA COSTAS CASAL DE FARIA

**INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO NOVO
COMPOSTO PTEROCARPANQUINONA LQB-118 EM
CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA**

Orientadora: Prof. Dra. Raquel Ciuvalechi Maia

RIO DE JANEIRO

2016



Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

Programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Oncologia

FERNANDA COSTAS CASAL DE FARIA

**INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO NOVO
COMPOSTO PTEROCARPANQUINONA LQB-118 EM CÉLULAS
DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA**

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

Orientadora: Prof. Dra. Raquel Ciuvalschi Maia

RIO DE JANEIRO

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

FARIA, Fernanda Costas Casal

INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO NOVO COMPOSTO PTEROCARPANQUINONA LQB-118 EM CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA /Fernanda Costas Casal de Faria; orientação Prof. Dra. Raquel Ciivalschi Maia. Rio de Janeiro, 2016.

131 fls.

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer – Coordenação de Pesquisa.



Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
Programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Oncologia

FERNANDA COSTAS CASAL DE FARIA

**INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO NOVO COMPOSTO
PTEROCARPANQUINONA LQB-118 EM CÉLULAS DE LEUCEMIA
MIELOIDE CRÔNICA**

Orientadora: Prof. Dra. Raquel Ciuvalschi Maia

Aprovada em: Rio de Janeiro, 13 de dezembro de 2016.

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto – Instituto Nacional do Câncer

Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz - Instituto Nacional do Câncer

Prof. Dr. André Luiz Mencialha – Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Claudio Akio Masuda - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Miguel Ângelo Martins Moreira - Instituto Nacional do Câncer

Prof. Dra. Katia Costa de Carvalho Sabino - Universidade do Estado do Rio de Janeiro

RIO DE JANEIRO

2016

Àquelas que me ensinaram, ensinam e me ensinarão sempre: Amélia (in memoriam) e Cinda

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Raquel Ciuvalschi Maia, por ter me recebido em seu laboratório e pelo constante incentivo ao meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal. O Prêmio Nobel é o limite!

Ao Dr. Marcos Barcelos de Pinho, por toda ajuda nas análises dos ensaios de microarranjo de DNA. Muito obrigada pela parceria científica, pelas discussões e pela troca de conhecimento desde o Serviço de Pesquisa Clínica.

À minha tia, Luiza, por sempre acreditar, incentivar e apoiar o meu crescimento. Muito obrigada por tudo que você fez e ainda faz por nós. Somos quem somos hoje por conta de seu carinho e dedicação, principalmente nos momentos mais difíceis.

À minha prima-irmã Cinthia, ao meu irmão Marcelo, por todo carinho e palavras de motivação. Que eu possa sempre dar motivos para se orgulharem.

Às minhas grandes amigas Dra. Paula Sabbo, Dra. Marcela Robaina e (futura Dra.) Michelle Xavier pelo apoio, ideias brilhantes, ajuda em experimentos, carinho e paciência em todos os momentos da nossa amizade.

À Maria Eduarda Leal por ter me escolhido para orientar sua monografia e por toda dedicação na condução dos experimentos envolvendo a combinação entre os compostos.

Às Dra. Roberta Faccion, Dra. Gabriela Nestal e Dra. Paloma Souza por toda ajuda nas discussões dos resultados e ideias que enriqueceram muito o trabalho.

À Dra. Flavia Vasconcelos e Luciano Mazzoccoli por toda ajuda com os experimentos com citometria e nas discussões dos resultados.

A todos os *hematoloucos* pelo apoio, pela ajuda nas discussões e pela diversão e amizade de todas as horas.

À Dra. Claudete Klumb, pelas discussões sempre muito proveitosas.

Ao Dr. Paulo Costa, pela parceria e por ceder o composto LQB-118 para o desenvolvimento deste trabalho.

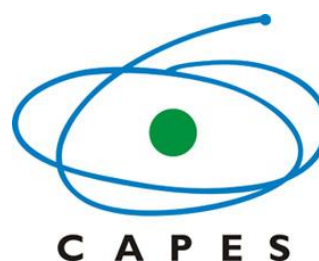
Ao INCA pela bolsa que me permitiu desenvolver esse trabalho.

Aos membros da banca por terem gentilmente aceitado o convite.

Aos meus amigos, primos e tios (de coração) que sempre me apoiaram e que torcem por mim.

Às agências de fomento, pelo apoio financeiro.

Este projeto teve o apoio das seguintes instituições:



“É do buscar e não do achar que nasce o que eu não conhecia”

Clarice Lispector

**INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO NOVO COMPOSTO
PTEROCARPANQUINONA LQB-118 EM CÉLULAS DE LEUCEMIA
MIELOIDE CRÔNICA**

Fernanda Costas Casal de Faria

RESUMO

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa caracterizada pela presença da oncoproteína BCR-ABL. O tratamento da LMC é baseado no uso de inibidores de tirosina quinase (do inglês, *TKI*), principalmente o imatinibe. Apesar do sucesso do imatinibe na clínica, cerca de 30% dos pacientes com LMC necessitam de terapia alternativa. Neste contexto, o desenvolvimento de compostos capazes de sobrepujar a resistência aos TKIs é fundamental. A pterocarpanquinona-LQB-118 é um novo composto com efeito antitumoral cujo mecanismo de ação vem sendo investigado. Neste trabalho, demonstramos que os tratamentos com LQB-118 e imatinibe alteraram a expressão de diversos genes em duas linhagens de LMC (K562, sensível e K562-Lucena, resistente), com destaque para o gene *TOB2*. Além disso, o composto LQB-118 modulou a localização subcelular de NFκB, inibiu parcialmente a atividade do proteossoma e alterou a expressão dos microRNAs -9 e -21. Ainda, o composto LQB-118 reduziu a expressão proteica de IGF-1R, AKT e mTOR, inibindo também a expressão dos mir-29b e -29c. O tratamento das linhagens com a combinação de imatinibe com LQB-118 potencializou a morte celular. Nossos dados demonstram que o composto LQB-118 modula a localização subcelular de NFκB, a expressão de membros da importante via IGF-1R/AKT/mTOR e a expressão de miR-9, -21 e -29a/b/c. Além disso, sugerimos que *TOB2* pode ser importante na resposta ao tratamento do imatinibe associado ao LQB-118 e que possa estar agindo na modulação da expressão proteica observada e que a combinação de imatinibe com LQB-118 se mostrou eficiente em células de LMC.

Palavras-chave: Leucemia mieloide crônica, pterocarpanquinona LQB-118, NFκB, miRNAs, imatinibe.

INVESTIGATIONAL STUDY OF LQB-118 MECHANISM OF ACTION IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA CELLS

Fernanda Costas Casal de Faria

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML), a myeloproliferative disorder characterized by the BCR-ABL oncoprotein, presents its treatment based on tyrosine kinase inhibitors (TKIs), mainly imatinib. However, despite its clinical success, almost 30% of all CML patients demand alternative therapy. In this context, the development of drugs capable of overcoming TKIs resistance is imperative. The pterocarpanquinone-LQB-118 is a novel compound with anti-tumour effect in in two CML cell lines (K562, sensitive and K562-Lucena resistant) whose mechanism of action is being elucidated. Here, we demonstrate by microarray analysis of CML cells treated with imatinib and LQB-118 several differentially expressed genes highlighting *TOB2*. LQB-118 modulates NFκB subcellular localization, apparently independently of the AKT and MAPK pathways, partially inhibits proteasome activity, and alters the expression of microRNAs -9 and -21. Also, IGF-1R, AKT and mTOR protein levels are decreased after LQB-118. LQB-118 alters the expression of all members of miR-29 family. Combined treatment of CML cell lines with imatinib and LQB-118 increased cell death. Taken together, we demonstrated that LQB-118 modulates NFκB subcellular localization, IGF-1R/AKT/mTOR pathway protein expressions and miR-9, -21 and -29a/b/c expressions. Furthermore, we suggest that *TOB2* may be important to imatinib and LQB-118, acting as a mRNA regulator, and that combination of imatinib and LQB-118 is efficient in CML cells.

Keywords: Chronic Myeloid Leukemia, pterocarpanquinone LQB-118, miRNAs, imatinib.

LISTA DE TABELAS

Tabela 6.1	1ª apresentação de comparações experimentais.	56
Tabela 6.2	2ª apresentação de comparações experimentais.	57
Tabela 6.3	Genes induzidos na K562 após tratamento com LQB-118, comparado a Lucena tratada com LQB-118.	58
Tabela 6.4	Genes reprimidos na K562 após tratamento com LQB-118, comparado a Lucena tratada com LQB-118.	58
Tabela 6.5	Genes induzidos na Lucena após tratamento com imatinibe, comparado a K562 tratada com imatinibe.	59
Tabela 6.6	Genes reprimidos na Lucena após tratamento com imatinibe, comparado a K562 tratada com imatinibe	64
Tabela 6.7	3ª apresentação de comparações experimentais.	78
Tabela 6.8	Genes induzidos na K562 após tratamento com LQB-118, comparado a K562 tratada com imatinibe.	79
Tabela 6.9	Genes reprimidos na K562 após tratamento com LQB-118, comparado a K562 tratada com imatinibe.	80
Tabela 6.10	Genes induzidos na Lucena após tratamento com LQB-118, comparado a Lucena tratada com imatinibe.	81
Tabela 6.11	Genes reprimidos na Lucena após tratamento com LQB-118, comparado a Lucena tratada com imatinibe.	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Incidência de LMC de acordo com o programa SEER de 2005 a 2012, em grupos separados pela idade.	22
Figura 1.2	Ilustração do cromossomo Philadelphia, originado a partir da translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22	24
Figura 1.3	Esquema simplificado das vias de sinalização ativadas por BCR-ABL.	25
Figura 1.4	Mecanismo de ação do imatinibe.	27
Figura 1.5	Esquema simplificado das vias de sinalização ativadas por IGF-1R	31
Figura 1.6	Representação esquemática das vias canônica e não-canônica de ativação de NF κ B.	36
Figura 1.7	Fórmula estrutural da pterocarpanquinona LQB-118.	43
Figura 4.1	Fluxograma ilustrando o desenho do estudo.	46
Figura 6.1	Esquema representativo dos genes diferencialmente expressos entre as linhagens tratadas com os mesmos compostos	57
Figura 6.2	Esquema representativo dos genes diferencialmente expressos entre os diferentes compostos na mesma linhagem de LMC.	78
Figura 6.3	Quantificação relativa dos níveis de RNAm de <i>TOB2</i> após exposição aos compostos LQB-118 e imatinibe	84
Figura 6.4	Imunofluorescência da proteína NF κ B após tratamento da linhagem K562 com LQB-118.	85
Figura 6.5	Imunofluorescência de NF κ B após tratamento da linhagem K562-Lucena com LQB-118.	86
Figura 6.6	Western blot para expressão da proteína NF κ B (p65) após	87

fracionamento celular nas linhagens de LMC.

Figura 6.7	Análise da atividade do proteassoma das linhagens de LMC, após exposição ao LQB-118.	88
Figura 6.8	Expressão das proteínas AKT, pAKT, ERK 1/2 e pERK 1/2, analisado por Western blot, após exposição ao LQB-118.	89
Figura 6.9	Padrão de expressão de miR-9 e miR-21 após 24h de exposição ao LQB-118 em células de LMC	91
Figura 6.10	Expressão de NFκB1 (p50) nas linhagens de LMC, após 24h de tratamento com LQB-118	92
Figura 6.11	Via de sinalização de mTOR da linhagem Lucena após tratamento com LQB-118	93
Figura 6.12	Via de sinalização de mTOR da linhagem K562 após tratamento com LQB-118	94
Figura 6.13	Expressão das proteínas AKT, IGF1R, p-mTOR e mTOR em K562 e Lucena após 24 h de tratamento com LQB-118	95
Figura 6.14	Padrão de expressão de miR-29a após 24h de exposição ao LQB-118	96
Figura 6.15	Padrão de expressão de miR-29b após 24h de exposição ao LQB-118	97
Figura 6.16	Padrão de expressão de miR-29c após 24h de exposição ao LQB-118	98
Figura 6.17	Viabilidade celular das linhagens de LMC após incubação com a combinação do LQB-118 e Imatinibe, por MTT.	100
Figura 6.18	Dot-plot representativo de morte celular e porcentagem de células anexina V ⁺ de K562 após a combinação dos compostos.	102

- Figura 6.19 Dot-plot representativo de morte celular e porcentagem de células anexina V⁺ de Lucena após combinação dos compostos. 103
- Figura 6.20 Porcentagem de células anexina V⁺ nas linhagens de LMC após combinação com a 3,0 μM de LQB-118. 104
- Figura 6.21 Figura 6.21: Esquema resumido das vias envolvidas no mecanismo de ação do LQB-118 nas linhagens de LMC. 112

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABL1	gene <i>v-abl Abelson murine Leukemia Viral 1</i>
APE 1	Endonuclease apurínica/apirimidínica 1
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
BAFF	<i>B-Cell Activating Factor</i>
BCR	<i>Breakpoint Cluster Region</i>
BSA	Albumina bovina sérica
CB	Crise blástica
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
C _T	Ciclo limite
CTRL	Controle (sem tratamento)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
dUTP	Deoxiuridina trifosfato
FA	Fase acelerada
FC	Fase crônica
FC	<i>Fold Change</i>
FDA	<i>Food and Administration Agency</i>
FOXO	<i>Forkhead Box</i>
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
IFN- α	interferon- α
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IGF-2	<i>Insulin-like growth factor 2</i>

IGF-1R	<i>Type I Insulin Growth Factor Receptor</i>
IKK	I κ B quinase
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IRS1	<i>insulin receptor substrate</i>
IVT	Transcrição <i>in vitro</i>
I κ B	Proteínas inibidoras de κ B
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
KD	<i>Kinase Domain</i>
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
LPS	Lipopolisacarídeo bacteriano
LQB	Laboratório de Química Bio-orgânica
LT- β	Linfotoxina β
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MDR	<i>Multidrug Resistance</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mL	Mililitro
MRP1	<i><u>M</u>ulti-<u>d</u>rug <u>R</u>sistance <u>P</u>rotein 1</i>
MTT	Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADPH	<i>Nicotinamde Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NF κ B	<i>Nuclear Factor κ B</i>
NIK	<i>NFκB inducing kinase</i>
IPPN	Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais
OCT-1	<i>Organic Cation Transporter-1</i>
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PDGFR α/β	<i>Platelet Derived Growth Factor Receptor-α -β</i>
Pgp	Glicoproteína P

Ph	cromossomo Philadelphia
PI3-K	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PKC	<i>Protein KinaseC</i>
RHD	Domínio N-terminal de homologia a Rel
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
ROS	Espécies reativas a oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>SDS-poliacrylamide gel electrophoresis</i>
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i>
ss-cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar fita simples
STAT	<i>Signal Transducer Activator of Transcription</i>
STR	Repetição curta em tandem
TBS	Salina tamponada com Tris
TBST	TBS com Tween-20
TdT	Deoxinucleotidil-transferase terminal
TKI	<i>Tyrosine Kinase Inhibitors</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TOB	<i>Transducer of ErbB-2</i>
UDG	Uracil-DNA-glicosilase
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UV	Ultravioleta
VER	Valor de expressão relativo
XIAP	<i>X-linked of inhibitor-of-apoptosis protein</i>
μL	Microlitro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO	21
1.1) Leucemia mieloide crônica	21
1.1.1) Aspectos epidemiológicos e patogênese	21
1.1.2) Identidade molecular	23
1.1.3) Tratamento	26
1.2) Resistência aos TKIs	29
1.3) Via de sinalização IGF1R/AKT/mTOR	30
1.4) NFκB	34
1.5) MicroRNAs	38
1.6) Novas abordagens terapêuticas	42
2) JUSTIFICATIVA	44
3) OBJETIVOS	45
4) DESENHO EXPERIMENTAL	46
5) MATERIAIS E MÉTODOS	47
5.1) Cultura de células e agentes farmacológicos	47
5.2) Extração de RNA, miRNA e síntese de cDNA	47
5.3) Análise da expressão protéica	48
5.4) Imunofluorescência	50
5.5) Fracionamento celular	50
5.6) Atividade do proteassoma	51
5.7) Microarranjo de cDNA	51
5.8) Avaliação da expressão gênica e de miRNAs	51
5.9) Ensaio de viabilidade	52
5.10) Determinação de morte celular por Anexina V/PI	53
5.11) Análises estatísticas	54
6) RESULTADOS	55
6.1) Perfis de expressão gênica	55
6.3) LQB-118 modula a atividade do proteassoma	87
6.4) Modulação da expressão de miR-9 e -21 pelo LQB-118	89

6.5) Modulação da via IGF-1R/AKT/mTOR	92
6.6) Efeito da combinação do LQB-118 com Imatinibe	98
7) DISCUSSÃO	105
8) CONCLUSÕES	111
9) CONCLUSÃO GERAL	112
10) PERSPECTIVAS	113
11) REFERÊNCIAS	114
12) ANEXOS	132
12.1) Trabalho científico publicado, não relacionado à tese	132
12.2) Trabalho científico publicado, relacionado à tese	132

1. Introdução

As leucemias se originam a partir da expansão clonal de uma única célula tronco multipotente que adquiriu uma série progressiva de alterações citogenéticas e/ou moleculares (SMITH *et al.*, 2011). Estas alterações, que podem ser translocações, inversões e deleções de cromossomos, têm como principais consequências a expressão de proteínas oncogênicas ou a superexpressão ou inibição de genes que codificam moléculas críticas para o controle do crescimento celular e da apoptose (ODENIKE *et al.*, 2011). Dessa forma, as leucemias mieloides podem surgir a partir de uma célula precursora comum. Contudo, essas células apresentam níveis de maturação/diferenciação diferentes, sendo consideradas agudas ou crônicas de acordo com a etapa de maturação em que ocorre o desvio clonal.

1.1 Leucemia Mieloide Crônica (LMC)

1.1.1 Aspectos epidemiológicos e patogênese

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o ano de 2014 foram estimados 5.050 novos casos de leucemia em homens e 4.320 novos casos em mulheres. A leucemia mieloide crônica (LMC) corresponde a aproximadamente 15% de todas as leucemias e embora ocorra em qualquer faixa etária, a incidência aumenta com a idade (Figura 1.1). Os únicos fatores de risco associados ao desenvolvimento da LMC conhecidos são as altas doses de radiação ionizante e a exposição ocupacional ao benzeno (REDAELLI *et al.*, 2004).

Classicamente, a LMC é caracterizada por um curso evolutivo dividido em três fases, sendo a maioria dos pacientes diagnosticados em uma fase inicial, chamada fase crônica (FC). A doença pode eventualmente progredir para uma fase mais avançada, chamada fase acelerada (FA), e culminar em uma crise blástica (CB), se assemelhando com uma leucemia aguda (SANTOS

et al., 2011). Essa progressão com curso clínico mais agressivo da doença ocorre em aproximadamente cinco anos após o diagnóstico, na ausência ou falha ao tratamento (REA *et al.*, 2012), mas pode se manifestar no início da doença.

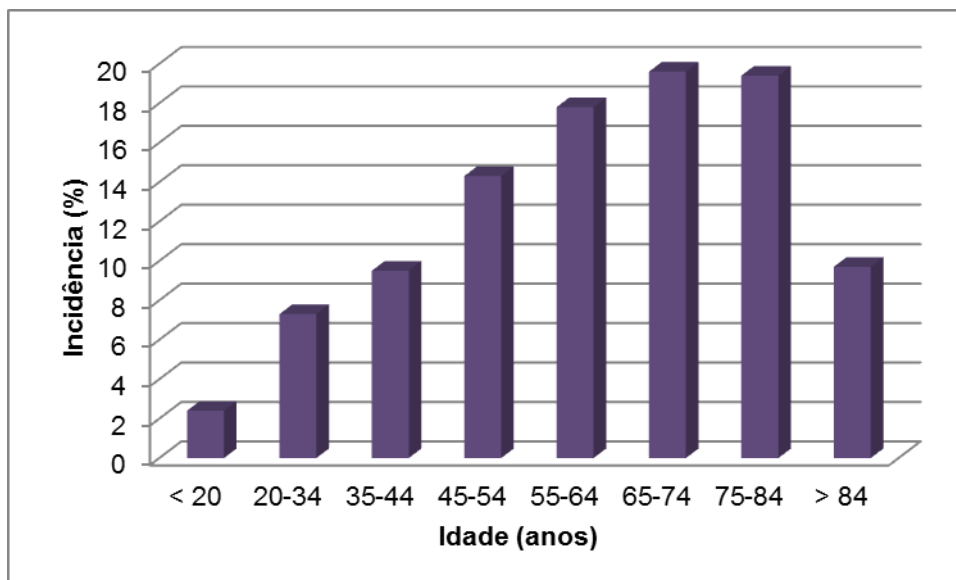


Figura 1.1: Incidência de LMC de acordo com o programa SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, US National Cancer Institute*) de 2005 a 2012, em grupos separados pela idade.

A FC é normalmente caracterizada por um início silencioso, caracterizado clinicamente principalmente por esplenomegalia, fadiga e perda de peso. Uma leucocitose proeminente também é observada, onde a contagem de blastos representa menos de 2% dos leucócitos totais (PERROTTI *et al.*, 2010; ERNST & HOCHAUS, 2012).

Tanto a FA quanto a CB são caracterizadas pela redução da diferenciação celular, com a presença de células imaturas no sangue periférico. Os critérios clínicos para definição da FA incluem basofilia e aumento das contagens de blastos e promielócitos no sangue periférico, sendo caracterizada por esplenomegalia e aumento da contagem de leucócitos totais, com 15 a

30% de blastos (BACCARANI *et al.*, 2006). De maneira geral, a evolução para a CB é de seis a nove meses após a FA, levando ao óbito em poucos meses. Os pacientes na CB apresentam manifestações clínico-laboratoriais mais severas, como trombocitopenia, anemia, esplenomegalia e contagem de blastos no sangue periférico e na medula óssea superior a 30%. Alguns pacientes podem evoluir da FC diretamente para a CB, sem percorrer a fase intermediária da doença (ERNST & HOCHAUS, 2012). Os mecanismos moleculares associados à transição da FC para CB são muito complexos, e parecem envolver a ativação de fatores oncogênicos, a inativação de supressores tumorais, instabilidade genômica, aberrações cromossômicas e mutações (SKORSKI, 2012; CHEREDA e MELO, 2015).

1.1.2 Identidade Molecular

A LMC é uma doença mieloproliferativa resultante da translocação recíproca entre o oncogene *ABL1* (gene homólogo ao *v-abl* *Abelson murine Leukemia Viral 1*), localizado no cromossomo 9, com o gene *BCR* (do inglês, *Breakpoint Cluster Region*), localizado no cromossomo 22 [t9;22], levando a formação da oncoproteína BCR-ABL. O “novo” cromossomo 22 formado por esta translocação recebe o nome de cromossomo Philadelphia (Ph), devido à cidade na qual foi descoberto por Nowell e Hungerford (NOWELL & HUNGERFORD, 1960), sendo considerado até hoje o principal causador da LMC (Figura 1.2).

O local de quebra no cromossomo 22 é variável, porém a maior parte ocorre em posição mais central entre os éxons 12 e 16, em uma região denominada como região *major* de quebra (M-bcr – *major breakpoint cluster region*). Em um pequeno número de pacientes a quebra pode ocorrer em posição mais distal (entre os éxons 19 e 20), dando origem a uma quebra do tipo *minor* (m-bcr). As diferentes posições de quebra dão origem, após o evento de *splicing* alternativo, a três proteínas Bcr-Abl, com tamanhos variáveis (190, 210 e 230 kDa). A proteína menor (p190^{Bcr-Abl}) contém menor parte de Bcr que as maiores p210^{Bcr-Abl} e p230^{Bcr-Abl}. Como todas possuem a mesma quantidade

de Abl, é a partir dessa variação na contribuição do gene *Bcr* em cada proteína quimérica, que diferentes efeitos biológicos são obtidos, sendo cruciais para o fenótipo da doença (KURZROCK *et al.*, 2003). A posição do ponto de quebra de BCR tem sido correlacionada com prognóstico, contagem de plaquetas e resposta ao tratamento (CHEREDA e MELO, 2015).

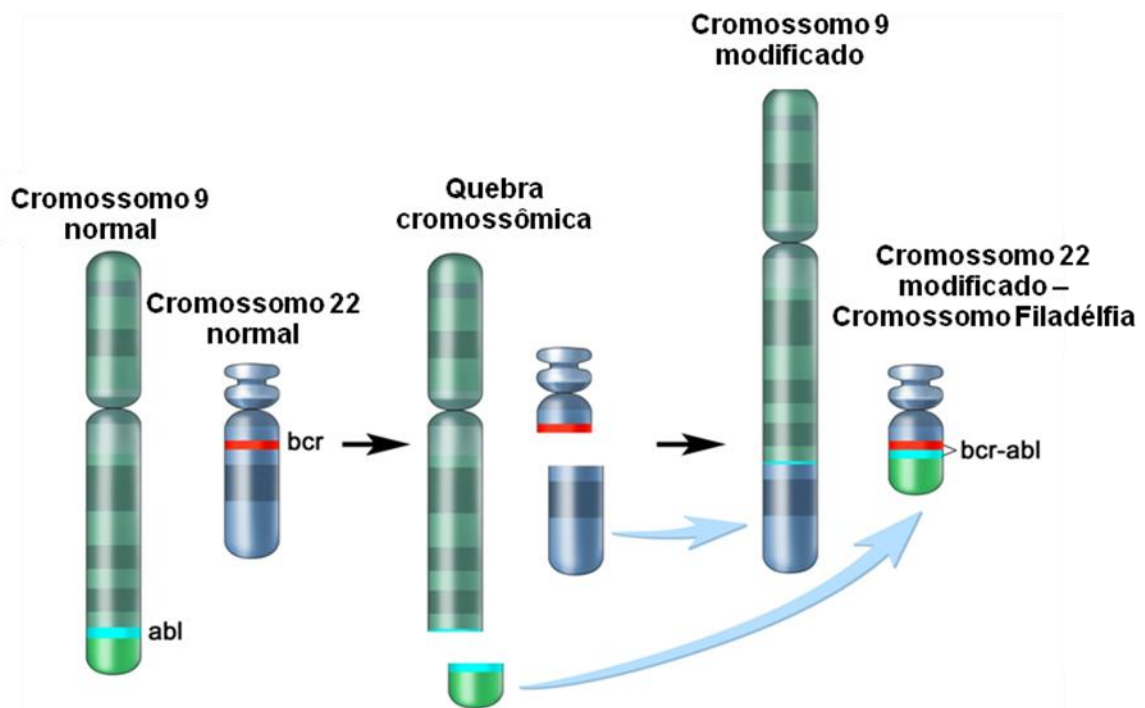


Figura 1.2: Ilustração do cromossomo Philadelphia, originado a partir da translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22, com a fusão entre os genes *BCR* e *ABL*. Adaptado de *The National Cancer Institute's Dictionary of Cancer Terms* (2007).

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

A alta atividade tirosina quinase da proteína p210^{Bcr-Abl} nas células da LMC resulta no aumento da instabilidade genômica, inibição dos genes supressores tumorais e ativação das vias que bloqueiam a diferenciação da linhagem mielóide (MELO & BARNES, 2007; PERROTI *et al.*, 2010). Sua localização predominantemente citoplasmática permite a formação de complexos multiproteicos fosforilados capazes de disparar diversas vias de sinalização intracelular, promovendo proliferação e instabilidade genética enquanto suprimem a apoptose e diminuem a adesão celular. As vias de sinalização conhecidas que são ativadas por BCR-ABL1 incluem Ras, MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), JNK (do inglês, *c-Jun N-terminal Kinase*), PI3-K (do inglês, *phosphatidylinositol 3-kinase*), NFκB (do inglês, *Nuclear Factor κ B*), STAT (do inglês, *Signal Transducer and Activator of Transcription*), *Src Kinases* e Myc, entre outras (Figura 1.3) (KANTARJIAN *et al.*, 2007; MELO e CHUAH, 2008; CHEREDA e MELO, 2015).

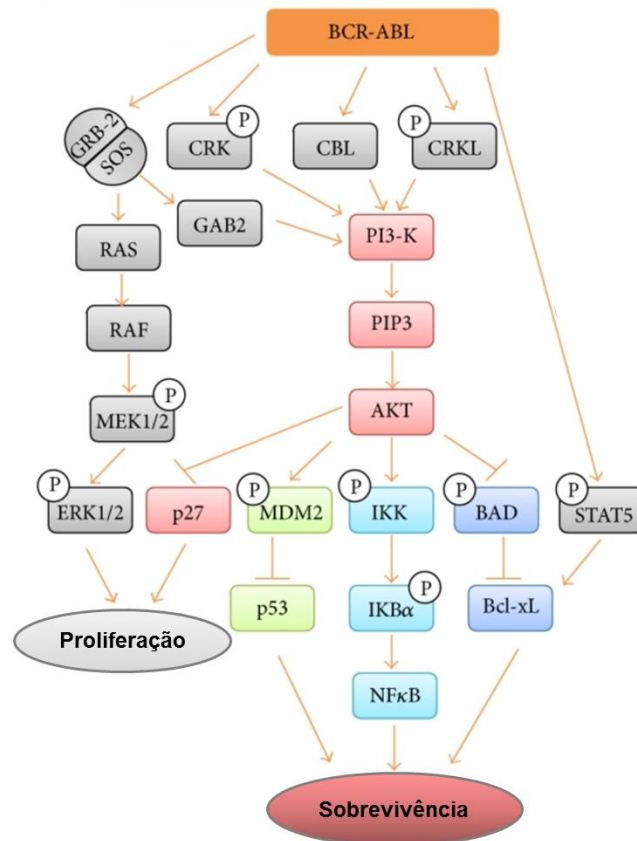


Figura 1.3: Esquema simplificado das vias de sinalização ativadas por BCR-ABL. Adaptado de Khajapeer e Baskaran, 2015.

1.1.3 Tratamento

O tratamento da LMC pode ser dividido, historicamente, nas eras pré-imatinibe e pós-imatinibe. Com o desenvolvimento da quimioterapia, os fármacos bussulfano e hidroxiuréia se tornaram as principais opções terapêuticas para LMC por algumas décadas, porém eram fármacos incapazes de erradicar o clone leucêmico ou alterar a progressão da doença (ALLAN, 1989). Nas décadas de 80 e 90 começou-se a usar o interferon- α recombinante (IFN- α) no tratamento da LMC, uma vez que este fármaco induz remissões hematológicas e citogenéticas, bem como proporciona melhora na sobrevida. Contudo, o IFN- α é pouco tolerado devido aos efeitos colaterais frequentes e severos. O uso de IFN- α trouxe pela primeira vez a possibilidade de eliminar os clones malignos (SANTOS *et al.*, 2011).

O transplante de medula óssea foi implantado em paralelo à quimioterapia, demonstrando ser uma terapia curativa para LMC, mas sua aplicabilidade se limita a uma fração de pacientes, onde a maioria é composta por jovens e com doador compatível, e está associado à considerável morbidade e mortalidade (BIGGS *et al.*, 1992, SAUBELE *et al.*, 2016).

O mesilato de imatinibe (STI-571; Novartis, Suíça) foi uma das primeiras moléculas desenvolvidas conhecidas como miméticos de ATP inibidores de quinases ou inibidores de tirosina quinase (do inglês, *Tyrosine Kinase Inhibitors*, TKI), onde compete com o ATP pelo sítio de ligação do ATP na quinase, inibindo dessa forma as fosforilações subsequentes dos substratos (Figura 1.4) (SCHINDLER *et al.*, 2000). Imatinibe foi o primeiro TKI a ser aprovado pelo *Food and Drug Administration Agency* (FDA) para tratamento de pacientes com LMC na FC da doença. Este fármaco é eficiente em inibir a autofosforilação de BCR-ABL, bem como a sinalização celular regulada por esta quinase, sendo também capaz de inibir a atividade de receptores tirosina quinase PDGFR α/β (do inglês, *Platelet Derived Growth Factor Receptor- α e $-\beta$*) e C-KIT (JABBOUR e KANTARJIAN, 2012; YANG e FU, 2015). Com a introdução do imatinibe nos protocolos terapêuticos da LMC, foi possível observar resposta citogenética nos pacientes, associada com aumento da

sobrevida e diminuição do risco de transformação para as fases mais agressivas da doença (FA e CB) (SANTOS *et al.*, 2011). Entretanto, apesar do êxito da terapia de primeira linha com imatinibe, cerca de 20 – 30% dos pacientes requerem terapia alternativa devido à intolerância a este fármaco, obtenção de resposta inferior desejada, resistência primária (resposta ao imatinibe nunca alcançada), resistência secundária (que surge após uma resposta inicial) ou progressão para a doença avançada ou crise blástica (ROYCHOWDHURY e TALPAZ, 2011; YANG e FU, 2015). Logo, o desenvolvimento de TKIs de segunda e terceira gerações se fez necessário para atender a esses pacientes inaptos a continuar com a terapia baseada em imatinibe.

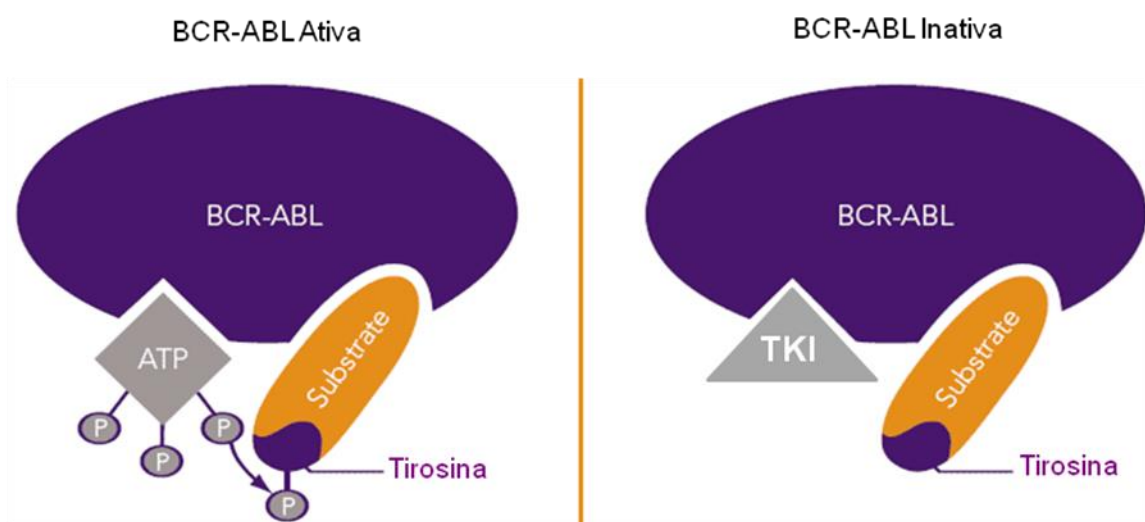


Figura 1.4: Mecanismo de ação do imatinibe. Adaptado de *Chronic Myeloid Leukemia Knowledge Centre* (<http://www.epgonline.org>).

Dasatinibe (*Bristol-Myers Squibb*) é um TKI oral, de segunda geração, capaz de se ligar à conformação ativa e inativa da BCR-ABL1. É 300 vezes mais potente que o imatinibe *in vitro*, contra BCR-ABL1 selvagem e têm atividade contra a maioria das mutações de BCR-ABL1, porém não possui atividade contra a mutação T315I. É capaz de inibir membros da família de quinases Src, bloqueando vias críticas da sinalização celular (SHAH *et al.*,

2004; TOKARSKI *et al.*, 2006). Além disso, estudos vêm demonstrando a eficiência de dasatinibe em promover a diferenciação de blastos mieloides através da ativação de STAT1 (FANG *et al.*, 2013).

Nilotinibe (*Novartis Pharmaceutical Corporation*) é um TKI oral, de segunda geração, análogo estrutural do imatinibe, porém com afinidade até 50 vezes maior pelo sítio de ligação do ATP na BCR-ABL1. Similar ao dasatinibe, nilotinibe também possui atividade contra a maioria das formas mutadas de BCR-ABL1, contudo, não é eficiente contra a mutação T315I (O'HARE *et al.*, 2005; WEISBERG *et al.*, 2005). Recentemente foi demonstrado que nilotinibe dispara o mecanismo de autofagia e induz apoptose como um processo alternativo de morte celular através de novos alvos moleculares, como as histonas deacetilases (HDACs), que acreditam estar envolvidos na citotoxicidade induzida por este TKI (SHAKER *et al.*, 2013). Tanto o dasatinibe quanto o nilotinibe já foram aprovados como tratamento de primeira linha para a LMC e para pacientes em FC ou FA que são intolerantes ou resistentes ao imatinibe (SANTOS *et al.*, 2011).

O bosutinibe (SKI-606, Pfizer), também um TKI de segunda geração recentemente aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration), como segunda linha de tratamento, é aproximadamente 10-30 vezes mais potente que o imatinibe (CORTES *et al.*, 2012).

Devido à frequência, embora pequena, da mutação T315I, os chamados TKIs de terceira geração vêm sendo desenvolvidos. Dentre eles, o ponatinibe (AP24534) é um TKI oral com potente atividade contra células de LMC com mutações em BCR-ABL, incluindo a mutação T315I (MILLER *et al.*, 2014). O mecanismo pelo qual ponatinibe é eficiente contra outras mutações parece estar relacionado à sua habilidade de fazer múltiplos pontos de contato na proteína, fazendo com que mutações pontuais tenham pouco efeito na afinidade geral de ligação da droga (O'HARE *et al.*, 2009).

1.2 Resistência aos TKIs

Enquanto a eficácia do imatinibe é inquestionável, a resistência aos TKIs se tornou um grande desafio no tratamento da LMC e pode ser definida baseada no momento de início da mesma. A resistência primária é a falha em atingir uma resposta citogenética significativa, enquanto que a resistência secundária ou adquirida é o reaparecimento progressivo do clone leucêmico, após uma resposta inicial ao fármaco (DIAMOND e MELO, 2011).

A resistência aos TKIs pode ser classificada em dependente ou independente de BCR-ABL. A resistência dependente de BCR-ABL é a melhor caracterizada e engloba clones leucêmicos com mutações no domínio tirosina quinase (KD – do inglês, *Kinase Domain*) e/ou superexpressão de BCR-ABL devido à amplificação do gene *BCR-ABL* (DIAMOND e MELO, 2011; CHEREDA e MELO, 2015). A resistência independente de BCR-ABL incluem defeitos nas bombas de efluxo e influxo de fármacos e ativação de vias BCR-ABL descendentes (DIAMOND e MELO, 2011; NESTAL DE MORAES *et al.*, 2012; CHEREDA e MELO, 2015).

O desenvolvimento de mutações nos KDs de ABL é o mecanismo mais frequente de resistência adquirida. Essas mutações podem ser categorizadas da seguinte maneira: 1) aquelas que impossibilitam diretamente a ligação do imatinibe; 2) aquelas que ocorrem no sítio de ligação do ATP; 3) aquelas na região de ativação da quinase, impossibilitando que a mesma esteja na conformação ideal para a ligação do imatinibe; e 4) aquelas que ocorrem no domínio catalítico da proteína (DIAMOND e MELO, 2011).

A substituição do aminoácido treonina por isoleucina na posição 315 da proteína ABL (T315I) foi à primeira mutação a ser detectada em pacientes resistentes (GORRE *et al.*, 2001). Mutações no domínio de ligação do ATP modificam a flexibilidade do domínio e desestabilizam a conformação necessária para a ligação do imatinibe. Esses tipos de mutações mais frequentes são as substituições G250, Q252, Y253 e E255. Algumas substituições no domínio catalítico também podem influenciar a ligação do imatinibe à proteína BCR-ABL (SHAH *et al.*, 2002).

A superexpressão da proteína BCR-ABL devido à amplificação do gene *BCR-ABL*, foi primeiramente descrita em linhagens celulares de LMC resistentes geradas após exposição gradual de doses crescentes de imatinibe. Este fenômeno leva ao aumento da quantidade de proteína alvo a qual deverá ser inibida pela dose terapêutica do fármaco (BARNES *et al.*, 2005).

Os mecanismos independentes de BCR-ABL ainda estão sendo elucidados, mas englobam a superexpressão de proteínas transportadoras de efluxo, como a glicoproteína P (Pgp), bem como a inibição de proteínas transportadoras de influxo, como oct-1 (do inglês, *Organic Cation Transporter-1*) e deficiência no mecanismo de reparo do DNA (YANG e FU, 2015). Além disso, a superexpressão de IAPs (do inglês, *Inhibitor of Apoptosis Protein*), como XIAP (do inglês, *X-linked of inhibitor-of-apoptosis protein*) e survivina, e de fatores de transcrição como membros da família FOXO (do inglês, *Forkhead box*) e NFκB também parecem influenciar a resistência aos TKIs observada (DIAMOND e MELO, 2011; NESTAL DE MORAES *et al.*, 2012).

1.3 Via de sinalização IGF1R/AKT/mTOR

A via de sinalização de *Insulin-like growth factor* (do inglês, *IGF*) desempenha papel crucial no crescimento e desenvolvimento normal. A família IGF compreende a insulina e dois fatores similares a insulina denominados *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1) e *Insulin-like growth factor 2* (IGF-2). Estes fatores regulam diretamente funções celulares a partir da interação com receptores de superfície e ativando diversas cascatas de sinalização intracelulares. As respostas celulares aos IGFs são principalmente mediadas pelo *Type I Insulin Growth Factor Receptor* (IGF-1R) (BRAHMKHATRI *et al.*, 2014). IGF-1R é um receptor transmembrana com atividade tirosina quinase, normalmente encontrado como um heterotetrâmero com duas subunidades α e duas β. Uma vez ativado, IGF-1R ativa numerosas vias intracelulares (IAMS e LOVLY, 2015). De forma a propagar estes sinais, IGF-1R ativado se liga a proteínas adaptadoras intracelulares, predominantemente com proteína *insulin receptor substrate 1* (IRS1), embora outras proteínas como SHC1, GAB, e

CRK, podem interagir com IGF-1R ativo. Essas proteínas adaptadoras são necessárias para transmissão dos sinais a partir das vias de PI3K–AKT–mTOR e MAPK (Figura 1.5) (BRAHMKHATRI *et al*, 2014; IAMS e LOVLY 2015).

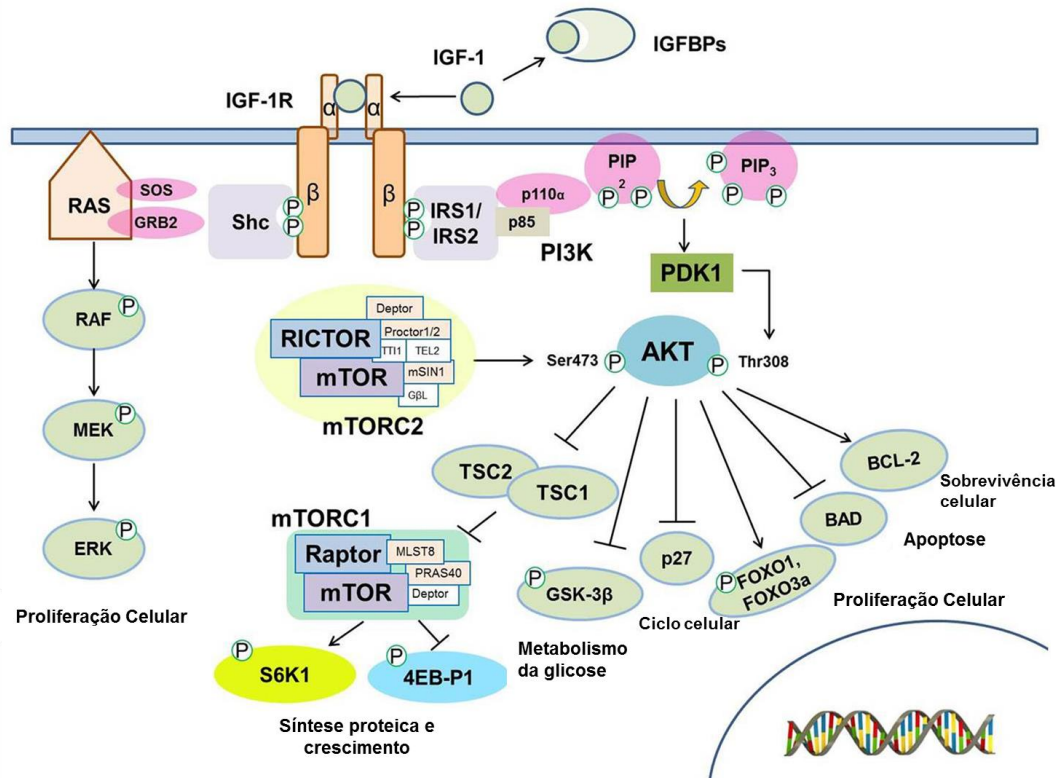


Figura 1.5: Esquema simplificado das vias de sinalização ativadas por IGF-1R. Adaptado de Jung e Suh, 2015.

Uma vez ativado pelo ligante, IGF-1R se liga a IRS1, que por sua vez se liga a PI3K, transmitindo a sinalização para AKT e mTOR. A ativação da via PI3K–AKT–mTOR resulta em efeitos que modulam a proliferação e o crescimento celular. Em paralelo, IGF-1R se liga a SHC, que interage com *growth factor receptor-bound-2* (GRB2)/*son-of-sevenless* (SOS) para ativar a via de MAPK (IAMS e LOVLY, 2015).

O envolvimento de IGF-1R parece ser importante na carcinogênese, uma vez que IGF-1 e seu receptor estão superexpressos em diversos tumores, incluindo pulmão, mama, cólon e pâncreas (MACHADO-NETO *et al*, 2011; RHO *et al*, 2011). Tem sido demonstrado *in vitro* que o aumento da sinalização

por IGF-1R leva à progressão do ciclo celular e proteção contra diferentes estímulos apoptóticos (RHO *et al*, 2011). Embora tenha sido demonstrado previamente que IGF-1R está expresso em células hematopoiéticas e que a sinalização por IGF-1R promove a proliferação e sobrevivência dessas células, poucos estudos exploraram o papel do mesmo nas neoplasias hematológicas (SHI *et al*, 2010). Na LMC, a expressão da proteína IGF-1R é maior em células de pacientes na crise blástica do que nas fases crônica e acelerada da doença, bem como o bloqueio dessa via é capaz de induzir morte celular em células resistentes ao imatinibe, uma vez que IGF-1R regula as vias proliferativas de AKT/mTOR e MAPK (SHI *et al*, 2010; MACHADO-NETO *et al*, 2011). Dessa forma, a sinalização aberrante de IGF-1 parece ser um importante evento na transformação da crise blástica, e as sinalizações moleculares envolvidas ainda precisam ser elucidadas.

A via PI3K–AKT possui um papel importante nas funções fisiológicas e sua atividade está comumente aumentada em células neoplásicas. Uma vez ativada, PI3K é translocada da membrana plasmática, resultando na fosforilação de PIP2 para PIP3. Ao ser fosforilada, PIP3 ativa então PDK1 que fosforila AKT, dando sequência à cascata de sinalização. Ao ser ativado, AKT fosforila substratos levando a ativação de mTORC1, induzindo a síntese proteica e o crescimento celular via 4E-BP1 e S6K1. Ao ser fosforilado, S6K1 inibe IRS1, reduzindo a sinalização por PI3K, resultando em um feedback negativo (GAO *et al*, 2016). AKT, também conhecido como *protein kinase B*, é uma quinase com três isoformas principais, AKT1, AKT2 e AKT3 e todas elas já foram descritas como super expressas em diferentes tipos de neoplasias (GAO *et al*, 2016).

A via de sinalização PI3K/Akt/mTOR vem sendo descrita como frequentemente desregulada em neoplasias hematológicas e associada a um prognóstico desfavorável (GAO *et al*, 2016). AKT 1 e AKT2 estão expressos em altos níveis em células tronco hematopoiéticas e a via PI3k/Akt/ mTOR é uma importante via de sinalização ativada por BCR-ABL em células de LMC (BERTACCHINI *et al*, 2015).

AKT é um importante eixo de sinalização com muitos substratos alvos, afetando o metabolismo celular, crescimento, sobrevivência e proliferação. Por exemplo, AKT promove progressão no ciclo celular via regulação de *glycogen synthase kinase-3* (GSK-3). Como mencionado anteriormente, AKT também promove o crescimento a partir da regulação da síntese proteica a partir da ativação da sinalização de mTORC1. AKT contribui para o bloqueio da apoptose e a progressão do ciclo celular através da inibição de Bad e caspase 9, bem como a partir da fosforilação de Mdm2, levando a ubiquitinação de p53 (STEELMAN *et al*, 2004, BRIEST e GRABOWSKI, *et al* 2014; MUNDI *et al*, 2016).

Além dos efeitos de sinalização em proteínas, AKT também ativa e inativa diversos fatores de transcrição, resultando em efeitos mais prolongados do fenótipo celular. AKT fosforila, por exemplo, diversos membros da família *forkhead* (FOXO) e possui um importante papel na regulação da transcrição gênica mediada pelo fator de transcrição nuclear factor κ B (NF κ B) (GAO *et al*, 2016).

mTOR é uma serina/treonina-quinase que desempenha papéis fundamentais como a regulação da tradução do mRNA, crescimento, proliferação e sobrevivência celular (MA *et al.*, 2009), além de ser uma via efetora do processo de entrada celular de diversos estímulos, incluindo mitógenos e fatores de crescimento, como citocinas inibidoras do crescimento e possui a função de sinalização de componentes essenciais para a regulação celular de nutrientes e energia (REDIG *et al.*, 2011).

A proteína m-TOR forma dois complexos funcionalmente distintos, TORC1 e TORC2. O TORC1 consiste em mTOR e proteínas adaptadoras (Raptor, DEPTOR, PRAS40 e GBL) e atua principalmente sobre o nível de tradução através da regulação de 4eBP (proteína 4E-binding) e S6K1 (p70 ribossomal proteína S6 quinase). Ambas, quando fosforilada por TORC1, promovem a tradução de mRNA para o crescimento celular. A Rapamicina, macrólido natural, enfraquece a interação Raptor-mTOR em TORC1 e suprime a sua atividade. A função de TORC2, ainda está sendo investigada

(STOKLOSA *et al.*, 2013). Foi demonstrado que TORC2, fosforila e ativa AKT, promovendo, dessa maneira, a proliferação e sobrevivência celular (MANNING *et al.*, 2007). Antes se acreditava que TORC2 seria insensível a Rapamicina, porém, foi demonstrado ser sensível à administração prolongada deste inibidor (SARBASSOV *et al.*, 2006). A inibição da via PI3K/Akt/mTOR é conhecida por evitar o crescimento de células tumorais e esta inibição é aumentada quando utilizados inibidores duais de PI3K/mTOR (ARONSON *et al.*, 2013). Estudos demonstram também, que a sinalização da proteína BCR-ABL pelas vias PI3K/Akt/mTOR é um mecanismo fundamental para a sobrevivência celular e resistência do Imatinibe em células leucemicas (BURCHERT *et al.*, 2005).

1.4 NF κ B

Nuclear Factor κ B (NF κ B) é o nome genérico para uma família de fatores de transcrição diméricos que se ligam e ativam diversos promotores. Descoberto por Baltimore e colaboradores em 1986, recebeu este nome, pois foi identificado como um fator no núcleo de linfócitos B, capaz de se ligar a cadeia leve κ da imunoglobulina (SEM e BALTIMORE, 1986). Esta família é composta por cinco proteínas estruturalmente relacionadas: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105/50 (NF κ B1) e p100/p52 (NF κ B2), onde todas possuem um domínio N-terminal de homologia a Rel (RHD) que media as dimerizações, a localização nuclear e a ligação ao DNA (LIU e CHEN, 2011). Tanto p105 quanto p100 são proteínas precursoras que são processadas nas proteínas menores e ativas p50 e p52. O heterodímero p65/p50 é a forma mais abundante da proteína NF κ B seguido pelos homodímeros p50/p50 e p65/p65 (MANKAN *et al.*, 2009). Quando no núcleo celular, NF κ B regula a expressão de diversos genes, que codificam moléculas de adesão celular, como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina, citocinas, como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e TNF- α , fatores de crescimento, reguladores do ciclo celular, como ciclina D1, componentes do sistema imune e genes anti-apoptóticos como FLIP, cIAPs, XIAP, survivina, Bcl-2 e Bcl-XL (TURCO *et al.*, 2004; CILLONI *et al.*, 2007; OKAMOTO *et al.*, 2010; UMEZAWA, 2006).

NF κ B está expresso no citoplasma em praticamente todos os tipos celulares, onde sua atividade é controlada por proteínas reguladoras da família Rel, chamadas inibidoras de κ B (I κ Bs) estrutural e funcionalmente distintas, cujos membros incluem: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B ζ , Bcl-3, p100 e p105. Quando não há estímulo, NF κ B se encontra retido no citoplasma, em um complexo com I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ em seu domínio RHD, impedindo, dessa forma, a ligação ao DNA e ativação transcricional (MANKAN *et al.*, 2009; SHIH *et al.*, 2011). Enquanto a maioria das I κ Bs age como inibidores de NF κ B, as isoformas I κ B ζ e Bcl-3 potencializam a transativação de NF κ B no núcleo (KITAMURA *et al.*, 2000).

Frente a diferentes estímulos, incluindo estresse oxidativo, citocinas inflamatórias, radiação e componentes derivados de patógenos, como o lipopolisacarídeo bacteriano (LPS), a via de sinalização de NF κ B é ativada. Essa ativação requer a degradação das proteínas I κ B ou o processamento dos precursores de NF κ B nas subunidades maduras (LIU e CHEN, 2011). Existem duas vias de sinalização de NF κ B conhecidas como canônica e não canônica, que possuem papéis biológicos distintos (Figura 1.6).

Na via canônica, citocinas proinflamatórias como TNF- α ou IL1 β , ou LPS disparam a rápida translocação de NF κ B para o núcleo, desempenhando um importante papel em muitos processos fisiológicos como a imunidade inata e a sobrevivência celular. Todos esses estímulos convergem para a ativação do complexo I κ B quinase (IKK) que é composto pelas subunidades catalíticas IKK α e IKK β e pela subunidade regulatória IKK γ (também conhecida como NEMO). IKK α e IKK β se heterodimerizam e se associam a IKK γ para formar o complexo IKK. A ativação do complexo IKK depende da fosforilação da subunidade IKK β para que ocorra a fosforilação da proteína I κ B em dois resíduos de serina (Ser 32 e Ser 36) de seu domínio N-terminal. Essa fosforilação leva à adição de uma ubiquitina em I κ B α por uma ubiquitina ligase. Múltiplas ligações de ubiquitina se seguem, formando uma cadeia de poliubiquitinas, que endereça a proteína para degradação via proteassoma 26S, permitindo que NF κ B entre no núcleo e ative seus genes-alvo (HARHAJ e

DIXIT, 2011; PANWALKAR *et al.*, 2004). Ao final dessa via, há um aumento na transcrição de genes que codificam citocinas e moléculas de adesão, perpetuando a resposta inflamatória e promovendo a sobrevivência celular.

NF κ B pode ser ativado através da via não canônica em resposta a estímulos mais específicos de citocinas da família TNF, como a linfotoxina β (LT- β), BAFF (do inglês, *B-Cell Activating Factor*) e CD40L, envolvendo o processamento, via proteassoma, da p100 na subunidade madura p52. Esta via envolve a quinase *NF κ B inducing kinase* (NIK), que ativa IKK α levando a fosforilação de p100. Esta fosforilação leva a poliubiquitinação de p100 pelo complexo BTrCP ubiquitina ligase. Neste caso, a ubiquitinação de p100 não leva a degradação completa da proteína, mas apenas da região C-terminal, deixando a região N-terminal (p52) intacta. A ativação desta via regula genes relacionados a resposta imune (LIU e CHEN, 2011, NISHIKORI, 2005).

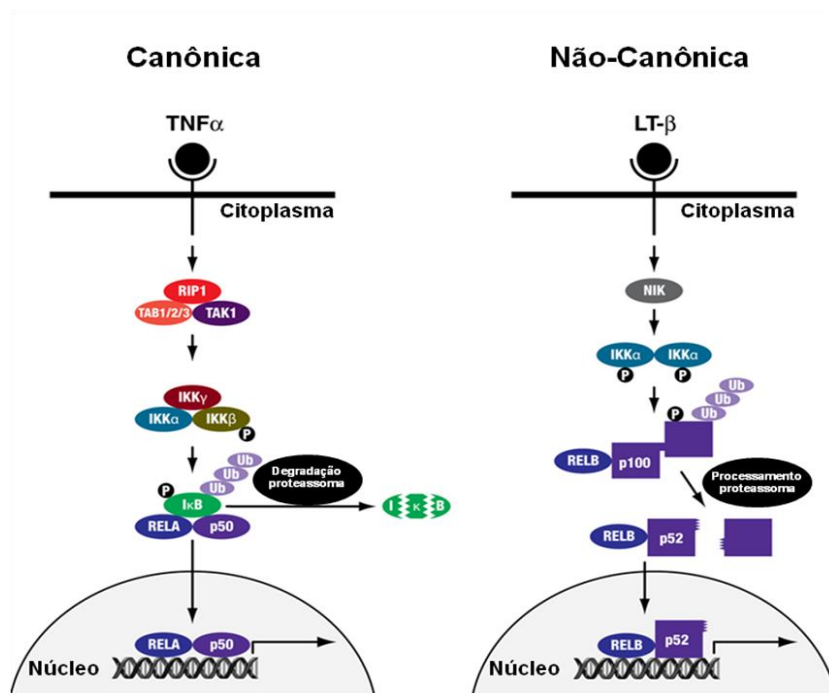


Figura 1.6: Representação esquemática das vias canônica e não-canônica de ativação de NF κ B. Adaptado de VAUGHAN e JAT, 2011.

Existe outra via de ativação de NF κ B, independente de IKK, que é disparada por danos ao DNA como radiação ultravioleta (UV) e doxorrubicina. A radiação UV ativa caseína quinase 2 (CK2), através da ativação de p38 MAPK, que fosforila I κ B α levando a sua degradação via proteassoma (OKAMOTO *et al.*, 2007).

A ativação de NF κ B é frequentemente observada em muitos tipos de câncer, tanto em tumores sólidos quanto em neoplasias hematológicas e a sua inibição limita a proliferação das células neoplásicas (LUQMAN e PEZZUTO, 2010). Recentes evidências têm estabelecido o papel patogênico da sinalização de NF κ B no câncer mediante ativação de genes envolvidos em sobrevivência celular, transformação e oncogênese. A perda da regulação normal de NF κ B tem aparecido como um grande contribuinte para a desregulação do crescimento celular, resistência a apoptose e a propensão à metástase observada em diversos tipos de tumores (STAUDT, 2010; LU e STARK, 2004). Esta perda na regulação pode ocorrer por defeitos na atividade de I κ B, ou por ativação constitutiva do complexo IKK, resultando na ativação de NF κ B. Neste contexto, muitos trabalhos têm proposto que I κ B α atua como um supressor tumoral para controlar a ativação oncogênica de NF κ B (PANWALKAR *et al.*, 2004).

NF κ B estimula a expressão de um painel de genes que codificam proteínas antiapoptóticas incluindo FLIP, cIAP1, survivina, Bcl-2 e Bcl-XL. NF κ B também aumenta a expressão do gene *ABCB1*, que codifica a glicoproteína-P (Pgp), um transportador de membrana mediador da quimioresistência a partir da indução do efluxo de moléculas quimioterapêuticas, entre outras atividades, explicando seu amplo impacto, não apenas na transformação oncogênica mas também na quimioresistência (GYRD-HANSEN e MEIER, 2010; BRAUN *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2008). Até mesmo a proteína supressora de tumor p53 tem algumas de suas funções inibidas por NF κ B, por indução de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-XL, restaurando o potencial de membrana da mitocôndria, estimulada para liberação de citocromo c por Bax e NOXA. Além disso, tanto p53 quanto NF κ B

estão envolvidos nos mecanismos de checagem do ciclo celular de maneira antagônica. Enquanto p53 ativa genes responsáveis pela parada no ciclo celular, como p21, e indução de apoptose, NFκB ativa genes envolvidos na progressão do ciclo celular e inibição da apoptose (OKAMOTO *et al.*, 2007). Neste contexto, o bloqueio de NFκB pode levar as células tumorais a cessarem a proliferação ou se tornarem mais sensíveis à ação de agentes antitumorais. Logo, NFκB é objeto de muitos estudos uma vez que agentes capazes de inibir a ativação desta via tem potencial terapêutico de inibir a carcinogênese (LUQMAN *et al.*, 2010).

A atividade tirosina quinase da BCR-ABL leva à ativação da via de NFκB por causar a translocação nuclear de NFκB e por aumentar a função de transativação da subunidade RelA/p65. Esta ativação, que necessita parcialmente da proteína Ras, leva à regulação da transcrição de importantes genes, tal como c-myc, necessários para a transformação das células BCR-ABL⁺, conferindo vantagem ao crescimento celular (FUCHS *et al.*, 2010; CILLONI *et al.*, 2006; CILLONI *et al.*, 2007). Diversos estudos demonstraram que a transformação de células primárias na medula óssea mediada por BCR-ABL requerem NFκB e que células BCR-ABL⁺ possuem ativação constitutiva de NFκB. Além disso, o bloqueio de formação tumoral dependente de BCR-ABL em modelo murino foi relacionado à supressão da ativação de NFκB (CILLONI *et al.*, 2006; DUNCAN *et al.*, 2008; LOUNNAS *et al.*, 2009). Desta maneira, a inibição da via de NFκB pode sensibilizar as células tumorais a agentes antitumorais, levando a parada da proliferação (LUQMAN e PEZZUTO, 2010). Logo, compostos capazes de suprimir a ativação de NFκB possuem potencial terapêutico na inibição da carcinogênese.

1.5 MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes, possuem de 20-22 nucleotídeos, que inibem a expressão gênica no nível pós-transcricional. A inibição da expressão gênica dos RNAs mensageiros (mRNAs) alvos pelos miRNAs pode ocorrer de duas maneiras inibindo a sua

tradução O mesmo miRNA possui diversos mRNAs alvos, alterando a expressão de diversas proteínas, modulando vias de sinalização celular. Esses miRNAs estão envolvidos em diversos processos celulares como a regulação da apoptose, diferenciação e proliferação celular e encontram-se desregulados em processos patológicos como o câncer (DRAKAKI E ILIOPOULOS, 2009). Os miRNAs são considerados mecanismos epigenéticos, os quais constituem uma forma especial de regulação da expressão gênica que complementa a regulação associada à sequência do DNA. As modificações epigenéticas são consideradas reversíveis, por não alterarem a sequência de nucleotídeos no DNA, e herdáveis, por serem transmitidas de forma estável após sucessivos ciclos de divisão celular (USHIJIMA, 2005; RANDO, 2006). O termo epigenética inclui, além dos miRNAs, a metilação do DNA e as modificações das histonas. Atualmente, cerca de 1400 microRNAs foram identificados em humanos e acredita-se que mais de 60% dos mRNAs são regulados miRNAs, podendo ser a maior forma de regulação pós-transcricional (JANSSON E LUND; 2012). Entretanto, pouco é conhecido sobre a meia-vida e degradação desses RNAs.

Os genes que codificam os miRNAs são transcritos, principalmente, pela RNA polimerase II (DALMAY 2008). Entretanto, miRNAs codificados por longos *clusters* são transcritos pela RNA polimerase III (WINTER *et al.*, 2009). miRNAs estão localizados em regiões intrônicas, intergênicas ou, até mesmo, em exons e o transcrito primário é chamado pri-miRNA. Os pri-miRNAs são clivados ainda no núcleo pela endonuclease, RNase tipo III Drosha, e o produto da clivagem é um ou mais (em caso de *clusters*) miRNAs precursores (pre-miRNAs) (GREGORY E SHIEKHATTAR, 2005). A enzima Drosha forma um complexo nuclear com a proteína DGCR8 (*DiGeorge critical region 8*) que possui domínio de ligação ao RNA dupla fita e é essencial para o processamento dos miRNAs pela Drosha (IORIO E CROCE 2012). Os pre-miRNAs possuem a forma de um grampo e são exportados para o citoplasma pela exportina 5 (XPO5). No citoplasma, esses precursores são clivados por outra endonuclease, RNase III Dicer, dando origem a um miRNA fita dupla (duplex miRNA). O processamento citoplasmático pela Dicer é mediado por um complexo de proteínas chamado RLC (*RISC loading complex*) composto pela

própria Dicer, pela proteína de ligação ao RNA dupla fita TRBP, pela proteína PACT (protein activator of PKR), e pelo componente central, as proteínas argonauta (Ago), principalmente Ago2 (WINTER *et al.*, 2009). Após clivagem do pre-miRNA pela Dicer, o complexo se dissocia do miRNA maduro, agora fita dupla. A fita funcional do miRNA é incorporada no complexo protéico efetor chamado complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), guiando o complexo até o mRNA alvo. O miRNA maduro associado ao RISC se liga a mRNAs que possuem sequências complementares (sítio alvo do miRNA), predominantemente na região 3'UTR (do inglês, *untranslated region*). Se o miRNA for capaz de se anelar ao sítio alvo com pareamento completo, RISC irá promover a clivagem do mRNA alvo através da clivagem do CAP e/ou da calda poli-A (deadenilação). Se o pareamento for imperfeito ocorrerá apenas a inibição da tradução sem alterar os níveis de mRNA (DALMAY 2008; GREGORY E SHIEKHATTAR, 2005).

No estudo das neoplasias, os miRNAs assim como os genes têm sido classificados em supressores tumorais ou oncogênicos, os oncomiRs (ZHANG *et al.*, 2007). Estudos demonstraram que deleções em regiões gênicas que codificam miRNAs que regulam a expressão de oncogenes, de proteínas inibidoras da apoptose levam à redução da expressão desses miRNAs supressores tumorais. Por outro lado, ampliações em regiões que codificam miRNAs que regulam genes supressores tumorais, proteínas pró-apoptóticas, levam a superexpressão desses oncomiRs (CALDAS E BRENTON 2005; FARAZI *et al.*, 2011). Atualmente, estudos têm relacionado os miRNAs com a resistência ao tratamento em diversas neoplasias (WEIDHAAS *et al.*, 2007; VISIONE E CROCE 2009; POGRIBNY *et al.*, 2010). Diversos trabalhos têm demonstrado que miRNAs estão envolvidos na ocorrência, progressão e resistência a drogas em LMC, apontando os miRNAs como potenciais alvos para drogas anti-câncer (GOUNARIS-SHANNON e CHEVASSUT, 2013; ZHU *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2014).

O *cluster* miR-17-92 e miR-130a estão superexpressos em LMC e têm sua expressão diminuída após tratamento com imatinibe, assim como já foi descrito que a transcrição de Pri-miR-17-92 e miR-130a são diretamente reguladas por

BCR-ABL (VENTURINI *et al.*, 2007; SURESH *et al.*, 2011). Contudo, miR-19a, miR-203 e miR-150 possuem papel oposto, tendo suas expressões diminuídas em células de LMC. Essas miRNAs têm sua expressão aumentada após tratamento com TKIs, ou silenciamento de BCR-ABL (POLAKOVA e KOBLIHOVA, 2013) e parecem ser importantes, devido aos seus alvos. miR-150, tem o fator de transcrição MYB, responsável por induzir proliferação e sobrevivência de blastos leucêmicos, como alvo (MACHOVÁ POLÁKOVÁ *et al.*, 2011). Já miR-19a inibe a expressão de moléculas importantes para a proliferação das células tumorais, como PI3K, Ras, ERK e Ciclina D (MACHOVÁ POLÁKOVÁ *et al.*, 2011). Da mesma maneira, foi demonstrado que miR-203 inibe diretamente a expressão de BCR-ABL e que sua superexpressão é capaz de sensibilizar as células ao imatinibe (BUENO *et al.*, 2008; LI, 2013).

O emprego dos miRNAs como alvos terapêuticos é uma abordagem recente e resultados *in vitro* e *in vivo* sugerem que os miRNAs são eficientes para o tratamento do câncer, mas ainda existe uma grande lacuna entre as informações dos miRNAs da pesquisa básica e as suas aplicações clínicas (IORIO E CROCE, 2011).

Uma vez que o fator de transcrição NFκB está envolvido na regulação de numerosos processos, não é surpreendente saber que NFκB controle a expressão de determinados miRNAs. miRNAs têm como alvos genes pertencentes a rede de sinalização mediada por NFκB (BOLDIN e BALTIMORE, 2012; FERREIRA *et al.*, 2014). Em tumores, miR-9 pode tanto ser um oncomir ou um miRNA supressor tumoral, dependendo do tipo tumoral ou de tecido (ARORA *et al.*, 2011; FENGER *et al.*, 2014). Sua habilidade de supressor tumoral deve estar associada à sua capacidade de inibição de NFκB1, levando a inativação da via de NFκB (GUO *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2012). Estudos têm demonstrado que miR-21 age como um oncogene, onde sua superexpressão em linhagens celulares leva à proliferação celular e sobrevivência através da regulação de genes relacionados a ciclo celular e apoptose (HONG *et al.*, 2013). Contudo, o papel desses miRNAs na LMC ainda não é claro.

1.6 Novas Abordagens Terapêuticas

As pterocarpanoquinonas representam um novo grupo de produtos cuja estrutura química, inédita na natureza, foi planejada no Laboratório de Química Bio-orgânica, do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais (IPPN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob a coordenação do Prof. Paulo R. R. Costa. O novo composto denominado LQB-118 é um híbrido do lapachol e naftoquinonas (NETTO *et al.*, 2010) (Figura 1.7). Uma patente para o composto LQB-118 foi depositada no final de 2008 devido ao seu alto potencial como um agente antitumoral (pedido de patente WO2010054452-A1).

Acredita-se que o seu principal mecanismo de ação seja a indução de estresse oxidativo, gerando espécies alquilantes no meio intracelular. Essas espécies alquilantes ocasionariam danos irreversíveis ao DNA, gerando um efeito citotóxico seletivo em células com altos níveis de divisão celular, humanas e não humanas. Dessa maneira, o composto LQB-118 surge como um agente útil no tratamento de doenças e/ou disfunções relacionadas à proliferação celular exacerbada, tais como o câncer. Estudos mostraram que a substância LQB-118 foi capaz de disparar o mecanismo de apoptose não somente em linhagens leucêmicas, mas também em células leucêmicas derivadas de pacientes com LMC e também da leucemia mielóide aguda (LMA). Ao contrário, quando injetado *in vivo* em camundongos normais C57B1, não foi observada nenhuma toxicidade inaceitável, após o tratamento prolongado, como também não foi observado redução do número de células da medula óssea. Tais achados demonstram que a LQB-118 pode ser um agente seletivo para as células leucêmicas estudadas (SALUSTIANO *et al.*, 2010; MAIA *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2013).

Em estudos conduzidos pelo nosso grupo, foi possível observar o potente efeito antitumoral desta substância também em células leucêmicas de pacientes que exibiam diferentes mecanismos de resistência tais como mutações da p53 e a superexpressão das proteínas transportadoras Pgp e MRP1(do inglês, *Multi-drug Resistance Protein 1*) (MAIA *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2013). Estes achados indicam que o composto LQB-118 não é um

substrato para as proteínas transportadoras de efluxo de drogas e atinge concentrações intracelulares necessárias para causar o efeito citotóxico.

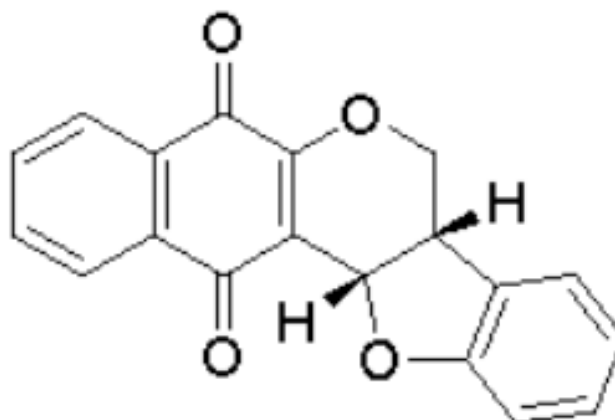


Figura 1.7: Fórmula estrutural da pterocarpanquinona LQB-118.

Altas taxas de apoptose foram observadas em células de pacientes com LMC e também de LMA (MAIA *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2013). Além disso, a substância reduziu o nível de expressão das proteínas inibidoras da apoptose survivina e XIAP nas linhagens derivadas da LMC, K562 sensível, e na K562-Lucena, resistente à vincristina (que superexpressa Pgp), bem como na linhagem de LMA Kasumi-1 (MAIA *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2013). Esses resultados sugerem que a inibição simultânea das IAPs e da Pgp pode ser um alvo molecular para o composto LQB-118. Este composto também regulou a expressão e localização de diversos fatores de transcrição como FOXO3a e FOXM1 e demonstrou não possuir efeito tóxico para células da medula óssea de camundongos tratados com o composto (NESTAL DE MORAIS *et al.*, 2014).

2. Justificativa

Atualmente, os TKIs são os agentes antitumorais que possibilitam uma maior sobrevida aos pacientes com LMC na fase crônica da doença. Entretanto, 20 - 30% dos pacientes não respondem ou são intolerantes a esta abordagem terapêutica (BIXBY e TALPAZ, 2011). Além disso, a eficácia dos TKIs em pacientes na fase blástica da doença é muito reduzida, restando poucas alternativas terapêuticas que aumentem a sobrevida desses pacientes (LEITNER e HEHLMANN, 2011). Nesse contexto, há necessidade do desenvolvimento de novos compostos capazes de ultrapassar os mecanismos de resistência aos TKIs, dependentes ou independentes da proteína BCR-ABL.

3. Objetivos

Geral

Investigar o mecanismo de ação do composto pterocarpanquinona LQB-118 nas linhagens de LMC K562 e K562-Lucena.

Específicos

- Verificar a regulação da via de NFκB pelo composto LQB-118 nas linhagens derivadas da LMC.
- Identificar e comparar diferenças no perfil de expressão gênica entre as duas linhagens de LMC quando submetidas ao efeito do composto LQB-118.
- Identificar e comparar diferenças no perfil de expressão gênica entre as duas linhagens de LMC quando submetidas ao efeito do TKI imatinibe.
- Quantificar e validar, através da técnica de PCR em Tempo Real, determinados genes classificados como diferencialmente expressos pela técnica de microarranjo de cDNA.
- Avaliar possíveis vias alteradas após o tratamento com o composto LQB-118.
- Avaliar a citotoxicidade e indução de morte celular na combinação do composto LQB-118 com o TKI imatinibe, nas linhagens celulares da LMC comparando com as células tratadas com cada composto isoladamente.

4. Desenho Experimental

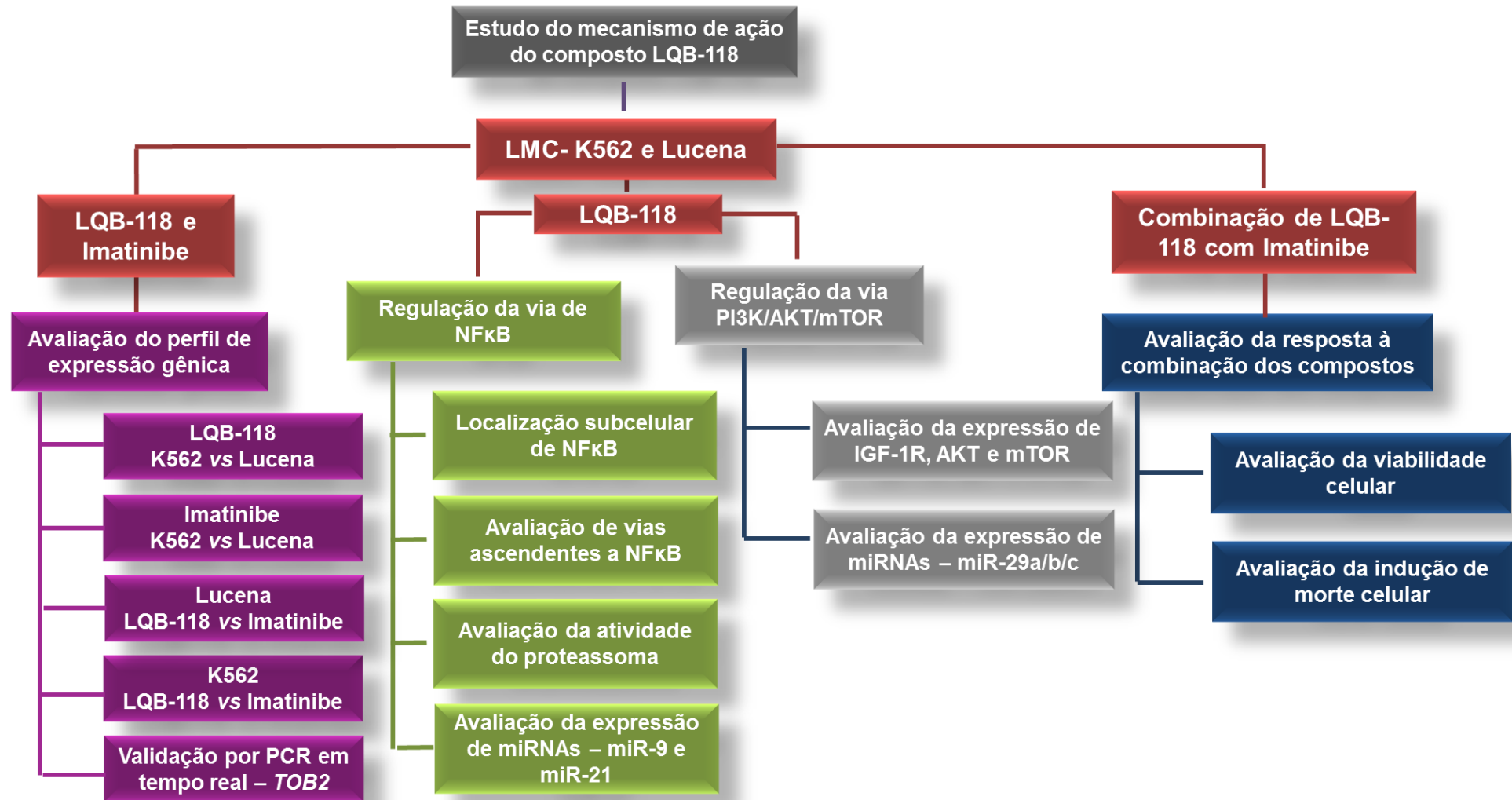


Figura 4.1: Fluxograma ilustrando o desenho do estudo.

5. Materiais e Métodos

5.1 Cultura de células e agentes farmacológicos

As linhagens celulares de LMC K562 e K562-Lucena, resistente a vincristina (RUMJANEK *et al.*, 2001) foram cultivadas em meio RPMI-1640 (GIBCO™, Invitrogen Corporation) e 10% de soro fetal bovino, obtidos da GIBCO™, em uma atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO₂. As linhagens passaram por processo de teste e confirmação fenotípica. Para tanto avaliamos o cariótipo e perfil STR da linhagem K562 e os comparamos com informações disponíveis em bancos de dados, como o do ATCC (*American Type Culture Collection*, <http://www.atcc.org>). A linhagem K562-Lucena foi desenvolvida a partir da exposição contínua de K562 a níveis crescentes de vincristina. Esta linhagem apresenta superexpressão de Pgp e é resistente a estresse oxidativo (RUMJANEK *et al.*, 2001; TRINDADE *et al.*, 1999), além de apresentar diversas alterações em seu perfil de expressão gênica (MOREIRA *et al.*, 2014).

A pterocarpanquinona LQB-118 foi sintetizada no Laboratório de Química Bio-orgânica, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais (IPPN), Universidade Federal do Rio de Janeiro. O mesilato de imatinibe foi fornecido por *Santa Cruz Biotechnology*. LQB-118 e imatinibe foram dissolvidos em DMSO (Sigma-Aldrich) e por isso todos os experimentos foram realizados usando células também incubadas apenas com DMSO como um controle. Os fármacos foram diluídos em meio de cultura RPMI-1640 antes do uso.

5.2 Extração de RNA, miRNA e síntese de cDNA

O RNA total das linhagens após o tratamento com os compostos LQB-118 ou Imatinibe foi extraído utilizando o método por Trizol (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

O ensaio de transcrição reversa, para obtenção do DNA complementar (cDNA) para expressão gênica, foi realizado utilizando o kit de síntese de cDNA

T-Primed First-Strand Ready-to-go (Amershan Bioscience), seguindo as instruções do fabricante, a partir de 2 µg de RNA.

O ensaio de transcrição reversa, para obtenção do DNA complementar (cDNA) para expressão dos miRNAs, foi realizado utilizando primers específicos para as sequências dos miRNAs avaliados utilizando *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante, a partir de 100 ng de RNA.

5.3 Análise da expressão protéica

Para a análise de expressão protéica, a extração de proteínas totais foi realizada utilizando o tampão *Cell Extraction Buffer* (Invitrogen) Foram adicionados ao pellet celular 60 µL de tampão seguindo as instruções do fabricante. O sobrenadante retirado foi armazenado a -20°C. As proteínas foram quantificadas utilizando o método de Lowry (BIO-RAD).

Foram utilizados 25 - 30 µg de proteína de cada amostra e acrescentados 15 µL de tampão de amostra contendo Tris-HCl 0,06 M, pH 6,8; SDS 2%, glicerol 10%, Azul de bromofenol 0,025% e β-mercaptoetanol 200 mM. As amostras foram submetidas à eletroforese unidimensional segundo protocolo de SDS-PAGE (do inglês, *sodium dodecyl sulfate-poliacrylamide gel electrophoresis*). Esse protocolo se baseia na utilização de um gel de poli-acrilamida de 12%, constituído por 3,35 mL de água destilada, 2,5 mL de Tris-HCl, pH 8,8, 1,5 M; 100 µL de SDS 10%; 4 ml de acrilamida/bisacrilamida (30%); 50 µL de persulfato de amônio 10% e 5 µL de TEMED (gel de resolução), separando as proteínas de acordo com o seu peso molecular. Sobre o gel de resolução, após polimerização, foi feito o gel de empilhamento (*stacking gel*), constituído de 6,1 mL de água destilada, 2,5 mL de Tris-HCl, pH 6,8, 0,5M; 1,3 mL da solução de acrilamida/bisacrilamida 30% e 100 µL de SDS 10%. Após completa polimerização (aproximadamente 30 minutos), foi acrescentado o tampão de eletroforese composto por Tris 0,025 M, glicina 0,0192 M, SDS 0,1% (p/v), pH 8,3. As amostras foram aplicadas de maneira que sempre havia no gel um poço preenchido pelo padrão de peso molecular

Rainbow (Amersham Biosystems/GE Healthcare). Ao término da aplicação das amostras, teve início à eletroforese das proteínas em gel a 110 V constantes por 1:30h.

Após eletroforese, as bandas proteicas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose *Hybond™ECL*, (Amersham Biosciences) utilizando-se tampão contendo Tris 25 mM, Glicina 193 mM e 20 % de metanol em uma cuba de transferência úmida a 100 V por 3 h. Após transferência, as membranas foram coradas com Vermelho de *Ponceau* (*Ponceau S* 50mg, Ácido Acético glacial 5%, água Milli-Q q.s.p. 50 mL), para verificar se a transferência foi eficiente.

Após lavagem com TBST (tampão TBS + Tween 20) a membrana foi incubada por 1 h com uma solução contendo TBST e 5% de leite em pó desnatado à temperatura ambiente sob agitação leve e depois lavada em tampão TBST por 1 minuto. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos: AKT (1:500, Cell Signaling), p-AKT (S473, 1:500, Cell Signaling), ERK 1/2 (1:1000, Cell Signaling), p-ERK 1/2 (T185/Y187, 1:1000, Invitrogen), HSC70 (1:500, Santa Cruz Biotechnology), NFκB (p65) (1:1000, Cell Signaling), NFκB1 (p50) (1:1000, Cell Signaling), Lamina B (1:500, Calbiochem), p-mTOR (1:1000, Invitrogen), IGF-1R (1:500, Cell Signaling) e β-actina (1:3000, Sigma-Aldrich), diluídos em TBST leite 5% overnight a 4°C. Após incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas três vezes por 5 minutos cada, em TBST sob agitação leve em temperatura ambiente e incubada com os respectivos anticorpos secundários diluídos em TBST 5% de leite por 1 h à temperatura ambiente, sob agitação suave, e seguida por três lavagens de 10 minutos cada em TBST. Os complexos proteína-anticorpo foram visualizados utilizando o kit ECL Prime Detection System (Amersham Biosciences), de acordo com as especificações do fabricante. As membranas foram então escaneadas utilizando C-Digit™ Blot Scanner e as imagens foram geradas utilizando Image Studio Lite software (Li-cor Biosciences).

5.4 Imunofluorescência

Para a localização subcelular de NF κ B (p65) e NF κ B1 (p50), 10⁵ células foram citocentrifugadas em lâminas a 350 rpm por 5 minutos utilizando uma centrífuga de *cytospin* (CitoSpin 2, Shandon). Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos e após três lavagens de 5 minutos cada com PBS pH 8,0, as células foram incubadas com solução de 10 mM de NH₄Cl por 10 minutos. Após outras três lavagens com PBS pH 8,0 por 5 minutos cada e permeabilização com Triton X-100 0,5% por 10 minutos, as células foram incubadas com 3% de BSA em PBS e 0,1% Tween-20 por 1 h. A incubação com os anticorpos primários anti-NF κ B p65 (1:50, Cell Signaling Technology) anti-NF κ B1 p50 (1:50, Cell Signaling Technology) ocorreu *overnight* a 4°C e após lavagem com PBS pH 8,0, as células foram incubadas com anticorpo secundário (Alexa Fluor 488 e 594 anti-rabbit 1:500, Invitrogen Molecular Probes) por 1 hora. Os anticorpos foram diluídos em PBS-BSA 1%. Por fim, as células foram incubadas com DAPI (1:5000; 4',6-diamidino-2-fenilindol) (Invitrogen Molecular Probes), para coloração nuclear, por 10 minutos, seguido de 3 lavagens com PBS pH 8,0. As lâminas foram montadas com lamínulas utilizando-se n-propil-galato 2M (Sigma-Aldrich) para retenção da fluorescência.

As imagens foram adquiridas no microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E200 usando o programa Nis Element F 2.30 (Nikon Instruments, Melville, NY, EUA), no aumento de 1000x.

5.5 Fracionamento celular

Os lisados das frações citoplasmática nuclear foram obtidos utilizando o kit de fracionamento *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (Thermo Fisher), seguindo as especificações do fabricante.

5.6 Atividade do Proteassoma

Ambas as linhagens celulares foram incubadas por 2 h com 3,0 μM e 6,0 μM de LQB-118. EM paralelo, as células foram incubadas com 10 nM de bortezomibe (Velcade®, Millennium Pharmaceuticals), um inibidor de atividade de proteassoma clássico, como controle positivo de inibição da atividade. A atividade do proteassoma foi avaliada utilizando o kit *Proteasome-Glo™ Chymotrypsin-Like Cell Based Assay* (Promega Inc), seguindo as especificações do fabricante. As reações foram feitas em placas de 96 poços brancos, e a luminescência foi monitorada (DTX800 *Multimode Detector Plate Reader*, Beckman Coulter).

5.7 Microarranjo de cDNA

Neste trabalho, analisamos os dados de expressão gênica, gerados a partir de microarranjo de DNA, realizado durante o trabalho de dissertação de mestrado. Para isso, foram utilizados 200 ng de RNA das linhagens K562 e K562- Lucena sem tratamento (controle) e tratadas com 1,5 μM de LQB-118 e 1,0 μM de imatinibe por 48 h em *chips GeneChip Human Gene 1.0 ST Array* (Affymetrix), de acordo com as instruções do fabricante. Para todas as reações, foi utilizado o termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf).

5.8 Avaliação da expressão gênica e de miRNAs

Para análise da expressão gênica de *TOB2* os níveis de RNAm foram avaliados por PCR em tempo real (*Real Time Polymerase Chain Reaction*). O presente trabalho utilizou a metodologia *TaqMan* descrita por (Holland *et al.*, 1991). As sondas utilizadas *β -actina* (Hs99999903_m1) e *Tob2* (Hs00967571_s1) foram sintetizadas pela *Applied Biosystems*. O controle endógeno escolhido foi a *β -actina*, utilizada como controle de expressão gênica basal. Para a expressão dos miRNAs, foram utilizadas as sondas hsa-miR-9,

hsa-miR-21, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-29c e RNU6b (TaqMan® MicroRNA Assay). Todas as sondas foram marcadas com o fluoróforo 6-FAM.

Empregou-se uma reação de volume final 20 µL no poço, contendo 1 µL de sonda (20X *TaqMan Gene Expression Assay*, Applied Biosystems), 10 µL de Master Mix (2X *TaqMan Universal Mix*), 3 µL de cDNA.

Após a distribuição dos reagentes na placa, a mesma foi fechada com tampas óticas (Applied Biosystems). A placa foi então levada para o termociclador *StepOne*, (Applied Biosystems) e a reação teve início com as seguintes condições: 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

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

5.9 Ensaio de viabilidade celular

As linhagens de LMC foram expostas a diferentes concentrações do novo composto LQB-118 ou imatinibe para avaliação da viabilidade celular por MTT. O MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio) é um sal de tetrazólio de coloração amarela, substrato da desidrogenase mitocondrial. Esta enzima reduz o sal formando cristais chamados cristais de formazana, os quais são dissolvidos em DMSO, exibindo uma coloração violeta, que é quantificada por espectrofotometria. Essa reação ocorre somente em células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983). As células foram plaqueadas (2×10^4) utilizando placa de 96 poços contendo 200 µL por poço e as células foram incubadas com imatinibe ou LQB-118 por 24, 48 e 72 h. As concentrações utilizadas foram 0,75 e 1,5 µM de LQB-118 e 0,2 e 0,4 µM de imatinibe. Quatro horas antes de terminar os tempos estabelecidos, foram adicionados 10 µg /mL de MTT. As placas foram mantidas na estufa pelas

quatro horas restantes. Para análise do ensaio, foram retirados 180 µL do sobrenadante e adicionados 150 µL de DMSO, solubilizando os cristais. A placa de 96 poços foi lida pelo espectrofotômetro (ELISA - Beckman Coulter DTX800 multimode detector) utilizando o comprimento de onda de 492 nm. Os resultados foram analisados através da seguinte fórmula: $[(\text{Absorbância das células tratadas} / \text{Absorbância das células não tratadas}) \times 100]$. As concentrações finais e tempos foram obtidos através da média de três experimentos independentes com quatro replicatas para cada concentração.

5.10 Determinação de morte celular através do ensaio de Anexina V/PI

A inversão da fosfatidil serina (FS) da face interna para a face externa da membrana plasmática é um dos eventos da apoptose. Existe uma família de proteínas que possui a propriedade de se ligar a fosfolipídios da membrana plasmática de forma dependente de cálcio chamada anexina. A anexina V é capaz de se ligar a FS, sugerindo morte celular por apoptose. A exposição de FS foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando anexina V ligada a um fluorocromo (Alexa 488) (Invitrogen™). O iodeto de propídeo (PI) é um marcador de ácidos nucleicos, utilizado para diferenciar a morte celular não apoptótica (anexinaV-, PI+). Desta forma, as células anexinaV+, PI- e anexinaV+, PI+ foram consideradas como células em apoptose. As células foram incubadas com os compostos LQB-118 e imatinibe por 48h, isolados e em combinação. Após os tempos de incubação, as células foram incubadas com uma solução de anexina V-Alexa 488 diluída 50 vezes em tampão de ligação (contendo cálcio) por 15 minutos ao abrigo da luz. No momento da leitura no citômetro de fluxo (Cyan ADP-DAKO) adicionou-se 10µL de PI. A leitura foi efetuada nos canais FL-1 (530nm) para a anexina V e FL-3 para o PI. Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra, sendo os dados analisados pelo programa Summit v4.3.

5.11 Análises Estatísticas

Os dados gerados pela leitura dos chips foram extraídos e processados com os pacotes de softwares gratuitos do Bioconductor Project (www.bioconductor.org, anexo – tabela suplementar 1). Os dados foram normalizados e sumarizados com o método *robust multi-average* (RMA) (IRIZARRY *et al.*, 2003a; BOLSTAD *et al.*, 2003; IRIZARRY *et al.*, 2003b) . Em seguida, com o objetivo de aumentar o poder estatístico da análise e reduzir a incidência de FDR (do inglês, *False Discovery Rate*) foi aplicado um processo de filtragem nos dados brutos utilizando o pacote genefilter (GENTLEMAN *et al.*, 2004). Dessa forma, foi possível remover os sinais emitidos pelas sondas controles e sinais emitidos por genes que exibissem baixa variância entre as amostras. Os genes diferencialmente expressos foram selecionados utilizando o pacote Limma (*Linear Models for Microarray Data*) (SMYTH, 2005). Os valores de corte utilizados na seleção final dos genes diferencialmente expressos foram: $\log_2 FC \geq 1$ e $p \leq 0,05$.

Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste ANOVA, seguido pelo pós-teste Bonferroni, através do programa GraphPad Prism 5.0. Os valores de p foram considerados estatisticamente significativos quando inferiores a 0,05. O valor de p referente ao veículo foi mostrado nos gráficos.

6. Resultados

Em um estudo anterior desenvolvido pelo nosso grupo, foi possível observar que o tratamento com o composto LQB-118 reduziu a viabilidade celular e induziu altos níveis de apoptose, tanto na linhagem K562, quanto na linhagem resistente a múltiplas drogas, K562-Lucena (MAIA *et al.*, 2011). Em acordo com esses dados, os níveis de pró-caspase 3 também foram reduzidos após 24 horas de incubação com LQB-118, bem como foi demonstrado aumento nos níveis da forma ativa da caspase 3. Mais recentemente, também demonstramos aumento da expressão de caspase 8, sugerindo o envolvimento da via extrínseca da apoptose na resposta observada ao composto LQB-118 (FARIA, *et al.*, 2015).

Baseado nessas observações, buscamos no presente estudo ampliar nossos conhecimentos sobre o mecanismo de ação do composto LQB-118 nas linhagens de LMC em experimentos subsequentes.

6.1 Perfis de Expressão gênica

Visando fornecer uma melhor compreensão do mecanismo de ação do composto LQB-118 e de outros mecanismos envolvidos na resposta ao imatinibe, avaliamos alterações no perfil de expressão gênica global. Experimentos de microarranjo de DNA foram realizados no decorrer do projeto de mestrado, a partir de RNA das linhagens K562 e Lucena, submetidas ao tratamento com 1,5 μM de LQB-118 e 1,0 μM de imatinibe por 48 horas. Os perfis de expressão gênica das linhagens foram comparados na presença e ausência dos compostos (Tabela 6.1). Em todas as comparações realizadas, os genes cujos resultados da diferença entre os valores de expressão foram superiores a duas vezes (valor de expressão relativo, VER) e $p \leq 0,05$ foram considerados diferencialmente expressos.

Tabela 6.1: 1ª apresentação de comparações experimentais.

Comparações
K562 LQB-118 vs K562 CTRL
Lucena LQB-118 vs Lucena CTRL
K562 Imatinibe vs K562 CTRL
Lucena Imatinibe vs Lucena CTRL

Quando comparamos os perfis de expressão gênica entre as linhagens de LMC tratadas com LQB-118 e as mesmas linhagens não tratadas, observamos que a linhagem K562 apresentou um total de 108 genes diferencialmente expressos após 48 horas de tratamento com 1,5 μ M de LQB-118. Desses, 27 genes estão induzidos e 81 genes estão reprimidos nas células K562 tratadas com LQB-118. O mesmo foi realizado com a linhagem resistente. A linhagem Lucena apresentou um total de 74 genes diferencialmente expressos após 48 horas de tratamento com 1,5 μ M de LQB-118. Desses, 39 genes estão induzidos e 35 genes estão reprimidos nas células Lucena tratadas com LQB-118 (Tabelas suplementares 2 e 3).

Após a comparação entre os perfis de expressão gênica entre as células de LMC tratadas com imatinibe e as não tratadas, observamos um total de 4894 genes diferencialmente expressos na linhagem K562 após 48h de tratamento com 1,0 μ M de imatinibe. Desses, 1451 genes estão induzidos e 3443 genes estão reprimidos. Para a linhagem Lucena, observamos um total de 863 genes diferencialmente expressos após tratamento com 1,0 μ M de imatinibe por 48h. Desses, 267 genes estão induzidos e 596 genes estão reprimidos nas células Lucena tratadas com imatinibe (Tabelas suplementares 4 e 5).

Além das comparações entre as células tratadas e não tratadas, também avaliamos os genes que estariam diferencialmente expressos após tratamento com os compostos entre as linhagens de LMC estudadas (Tabela 6.2 e Figura 6.1).

Tabela 6.2: 2ª apresentação de comparações experimentais.

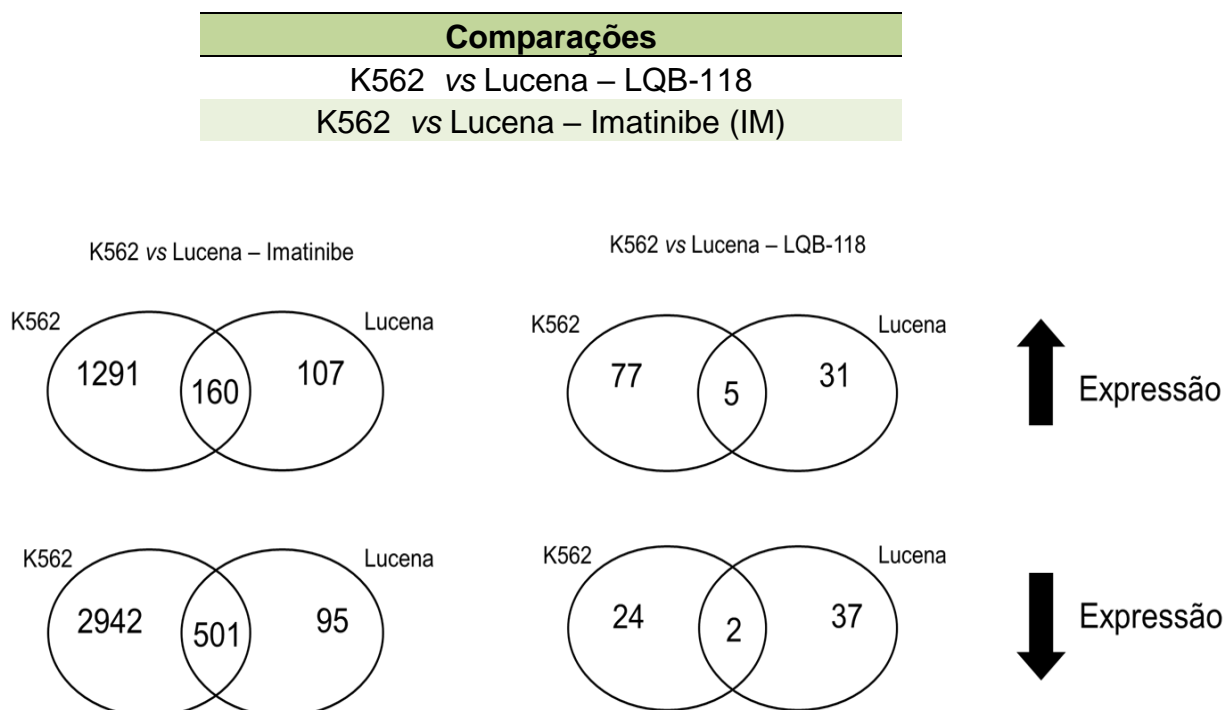


Figura 6.1: Esquema representativo dos genes diferencialmente expressos em comum entre as linhagens de LMC tratadas por 48h com os mesmos compostos (1,5 μ M de LQB-118 e 1,0 μ M de imatinibe).

Avaliando os perfis das células de LMC após o tratamento com LQB-118, cinco genes estão superexpressos em ambas as linhagens de LMC. Nesta comparação, observamos genes diferencialmente expressos em comum às duas linhagens, mas com relação inversa, ou seja, se apresentam superexpressos em uma linhagem e com expressão reduzida na outra (tabela 6.3).

Para os genes com expressão reduzidas das células de LMC após tratamento com LQB-118, apenas dois genes estão inibidos em ambas as linhagens de LMC. Nesta comparação, novamente, observamos genes diferencialmente expressos em comum às duas linhagens, mas com relação inversa, ou seja, se apresentam com expressão reduzida em uma linhagem e superexpressos na outra (tabela 6.4).

Tabela 6.3: Genes **induzidos** na linhagem K562 após 48h de tratamento com LQB-118, comparando com os genes igualmente diferencialmente expressos na linhagem Lucena após 48h de tratamento com LQB-118.

Símbolo	Nome do gene	VER K562	VER Lucena
<i>C2</i>	<i>complement component 2</i>	3,95	4,22
<i>TCEB3CL</i>	<i>transcription elongation factor B polypeptide 3C-like</i>	3,57	2,31
<i>CBWD3</i>	<i>COBW domain containing 3</i>	3,43	3,29*
<i>NCF1</i> ou <i>p47phox</i>	<i>neutrophil cytosolic factor 1</i>	2,80	2,86*
<i>KCNMB3</i>	<i>potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M beta member 3</i>	2,64	3,10*
<i>PLCXD1</i>	<i>phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 1</i>	2,63	2,39
<i>NME2</i>	<i>non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in</i>	2,48	3,18*
<i>UBD</i>	<i>ubiquitin D</i>	2,37	3,46*
<i>PCDHA7</i>	<i>protocadherin alpha 7</i>	2,30	2,10
<i>SNORD115-11</i>	<i>small nucleolar RNA, C/D box 115-11</i>	2,20	2,13
<i>ALPP</i>	<i>alkaline phosphatase, placental</i>	2,20	2,14*
<i>LRRC37A</i>	<i>leucine rich repeat containing 37A</i>	2,13	2,10*
<i>GOLGA6L1</i>	<i>golgin A6 family-like 1</i>	2,09	3,48*

*Genes com expressão reduzida na linhagem após tratamento com LQB-118. VER mostra os valores de expressão relativos à linhagem sem tratamento.

Tabela 6.4: Genes **inibidos** na linhagem K562 após 48h de tratamento com LQB-118, comparando com os genes igualmente diferencialmente expressos na linhagem Lucena após 48h de tratamento com LQB-118.

Símbolo	Nome do gene	VER K562	VER Lucena
<i>ZNF257</i>	<i>zinc finger protein 257</i>	2,23	2,50*
<i>IGLJ3</i>	<i>immunoglobulin lambda joining 3</i>	2,46	4,56*
<i>HLA-DRA</i>	<i>major histocompatibility complex, class II, DR alpha</i>	3,00	2,16
<i>CLIC1</i>	<i>chloride intracellular channel 1</i>	3,42	2,35
<i>IGHA1</i>	<i>immunoglobulin heavy constant alpha 1</i>	5,20	3,73*
<i>LRRC37A2</i>	<i>leucine rich repeat containing 37, member A2</i>	5,74	2,31*
<i>HSPC072</i>	<i>hypothetical LOC29075</i>	7,79	4,76*

*Genes superexpressos na linhagem após tratamento com LQB-118. VER mostra os valores de expressão relativos à linhagem sem tratamento.

Avaliando os perfis das células de LMC após tratamento com imatinibe, 160 genes estão superexpressos em ambas as linhagens de LMC. Dentre eles, encontram-se genes como *ciclina D3*, *TOB2*, *BTG2* e *ABCD1*. Novamente, observamos genes diferencialmente expressos em comum às duas linhagens, mas com relação inversa, ou seja, se apresentam superexpressos em uma linhagem e com expressão reduzida na outra (tabela 6.5).

Tabela 6.5: Genes **induzidos** na linhagem Lucena após 48h de tratamento com Imatinibe, comparando com os genes igualmente diferencialmente expressos na linhagem K562 após 48h de tratamento com Imatinibe.

Símbolo	Nome do Gene	VER Lucena	VER K562
SLC4A1	<i>solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group)</i>	53,31	22,47
PPT2	<i>palmitoyl-protein thioesterase 2</i>	35,95	3,20
SNORD115-26	<i>small nucleolar RNA, C/D box 115-26</i>	30,31	13,74
OR52K3P	<i>olfactory receptor, family 52, subfamily K, member 3 pseudogene</i>	18,46	2,11
SLC25A37	<i>solute carrier family 25, member 37</i>	15,42	7,52
FAM90A1	<i>family with sequence similarity 90, member A1</i>	12,93	18,77
TRIM73	<i>tripartite motif-containing 73</i>	11,98	11,79
ALAS2	<i>aminolevulinate, delta-, synthase 2</i>	11,81	4,14
MAPK8IP1	<i>mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1</i>	11,41	2,14
C5orf4	<i>chromosome 5 open reading frame 4</i>	11,31	3,10*
RGAG1	<i>retrotransposon gag domain containing 1</i>	9,50	4,11
INHHA	<i>inhibin, alpha</i>	9,35	3,68
PIGQ	<i>phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Q</i>	8,93	4,56
CHST2	<i>carbohydrate (N-acetylglucosamine-6-O) sulfotransferase 2</i>	8,46	2,73
CR1L	<i>complement component (3b/4b) receptor 1-like</i>	8,23	7,62
SLC22A4	<i>solute carrier family 22 (organic cation/ergothioneine transporter), member 4</i>	8,10	11,00
ADAMTSL4	<i>ADAMTS-like 4</i>	8,02	7,57
RHD	<i>Rh blood group, D antigen</i>	7,88	43,41
ST6GALNAC6	<i>ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 6</i>	7,80	7,21
FAIM2	<i>Fas apoptotic inhibitory molecule 2</i>	7,74	247,28

<i>RFC1</i>	<i>replication factor C (activator 1) 1, 145kDa</i>	7,40	36,50
<i>LOC349196</i>	<i>hypothetical LOC349196</i>	6,77	17,03
<i>OBSL1</i>	<i>obscurin-like 1</i>	6,65	3,07
<i>SLC6A8</i>	<i>solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8</i>	6,57	2,16
<i>AK1</i>	<i>adenylate kinase 1</i>	6,46	2,19
<i>SNORD115-11</i>	<i>small nucleolar RNA, C/D box 115-11</i>	6,45	19,03
<i>USP17L6P</i>	<i>ubiquitin specific peptidase 17-like 6 (pseudogene)</i>	6,38	81,01
<i>MFI2</i>	<i>antigen p97 (melanoma associated) identified by monoclonal antibodies 133.2 and 96.5</i>	5,99	4,08
<i>NDRG1</i>	<i>N-myc downstream regulated 1</i>	5,98	2,50
<i>REXO1L2P</i>	<i>REX1, RNA exonuclease 1 homolog (S. cerevisiae)-like 2 (pseudogene)</i>	5,83	9,00
<i>DRD5</i>	<i>dopamine receptor D5</i>	5,82	4,14
<i>PRY</i>	<i>PTPN13-like, Y-linked</i>	5,82	2,23
<i>SPDYE1</i>	<i>speedy homolog E1 (Xenopus laevis)</i>	5,80	10,13
<i>TMEM63B</i>	<i>transmembrane protein 63B</i>	5,79	3,43
<i>RING1</i>	<i>ring finger protein 1</i>	5,73	3,20
<i>LOC388022</i>	<i>hypothetical LOC388022</i>	5,64	2,87
<i>PKLR</i>	<i>pyruvate kinase, liver and RBC</i>	5,59	4,76
<i>RHCE</i>	<i>Rh blood group, CcEe antigens</i>	5,57	4,29
<i>TSPY1</i>	<i>testis specific protein, Y-linked 1</i>	5,55	2,58
<i>REXO1L1</i>	<i>REX1, RNA exonuclease 1 homolog (S. cerevisiae)-like 1</i>	5,52	7,57
<i>LOC100293539</i>	<i>similar to ribosomal protein 10</i>	5,49	15,56
<i>REEP6</i>	<i>receptor accessory protein 6</i>	5,47	2,81
<i>HBZ</i>	<i>hemoglobin, zeta</i>	5,39	5,62
<i>COL18A1</i>	<i>collagen, type XVIII, alpha 1</i>	5,30	2,91
<i>TMOD1</i>	<i>tropomodulin 1</i>	5,26	2,64
<i>TUBB1</i>	<i>tubulin, beta 1</i>	5,11	2,71
<i>MYL4</i>	<i>myosin, light chain 4, alkali; atrial, embryonic</i>	4,97	2,53
<i>TOR3A</i>	<i>torsin family 3, member A</i>	4,92	3,76
<i>LOC440570</i>	<i>hypothetical LOC440570</i>	4,74	6,36
<i>SNORD115-25</i>	<i>small nucleolar RNA, C/D box 115-25</i>	4,71	3,34
<i>TFR2</i>	<i>transferrin receptor 2</i>	4,69	2,35
<i>TAPBP</i>	<i>TAP binding protein (tapasin)</i>	4,69	2,55
<i>ESPN</i>	<i>Espin</i>	4,64	4,72
<i>SNORD115-44</i>	<i>small nucleolar RNA, C/D box 115-44</i>	4,63	5,90
<i>GOLGA6L1</i>	<i>golgin A6 family-like 1</i>	4,56	3,92
<i>CCND3</i>	<i>cyclin D3</i>	4,51	4,17
<i>POM121L1P</i>	<i>POM121 membrane glycoprotein-like 1, pseudogene</i>	4,43	4,66
<i>LTBP1</i>	<i>latent transforming growth factor beta binding</i>	4,42	2,41

	<i>protein 1</i>		
ASRGL1	<i>asparaginase like 1</i>	4,34	2,45
PPOX	<i>protoporphyrinogen oxidase</i>	4,30	2,13
CTSB	<i>cathepsin B</i>	4,30	2,99
RBP5	<i>retinol binding protein 5, cellular</i>	4,28	2,58
LOC100132147	<i>hypothetical LOC100132147</i>	4,23	3,81
ANKRD30BL	<i>ankyrin repeat domain 30B-like</i>	4,21	2,16
DUX4	<i>double homeobox 4</i>	4,17	3,41
C22orf25	<i>chromosome 22 open reading frame 25</i>	4,17	3,16
ATP1B2	<i>ATPase, Na⁺/K⁺ transporting, beta 2 polypeptide</i>	4,10	2,03
TF	<i>Transferrin</i>	4,09	2,27*
EPOR	<i>erythropoietin receptor</i>	4,04	2,10
LDB1	<i>LIM domain binding 1</i>	4,03	2,22
CLTCL1	<i>clathrin, heavy chain-like 1</i>	4,03	2,50
SH3BGRL2	<i>SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 2</i>	4,02	2,03
FAM48B1	<i>family with sequence similarity 48, member B1</i>	4,02	2,04
GCOM1	<i>GRINL1A complex locus</i>	4,02	2,08
PRAMEF4	<i>PRAME family member 4</i>	4,00	5,70
ACSS1	<i>acyl-CoA synthetase short-chain family member 1</i>	3,97	3,56
TSPAN32	<i>tetraspanin 32</i>	3,91	5,06
KEL	<i>Kell blood group, metallo-endopeptidase</i>	3,91	3,36
LOC400968	<i>hypothetical LOC400968</i>	3,91	4,79
KRTAP4-11	<i>keratin associated protein 4-11</i>	3,91	2,91
ACHE	<i>Acetylcholinesterase</i>	3,90	2,11
USP17L2	<i>ubiquitin specific peptidase 17-like 2</i>	3,87	11,63
STRC	<i>Stereocilin</i>	3,83	4,41
ITLN1	<i>intelectin 1 (galactofuranose binding)</i>	3,81	2,62
TNS1	<i>tensin 1</i>	3,80	2,60
ALOX12	<i>arachidonate 12-lipoxygenase</i>	3,79	3,97
ARVCF	<i>armadillo repeat gene deleted in velocardiofacial syndrome</i>	3,77	2,83
SNORD115-41	<i>small nucleolar RNA, C/D box 115-41</i>	3,74	3,81
GAS2L1	<i>growth arrest-specific 2 like 1</i>	3,71	2,22
LOC151009	<i>hypothetical LOC151009</i>	3,70	3,53
SPDYE8P	<i>speedy homolog E8 (Xenopus laevis), pseudogene</i>	3,70	9,85
SLC2A1	<i>solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1</i>	3,66	3,36
GOLGA6L5	<i>golgin A6 family-like 5 (pseudogene)</i>	3,66	3,10*
SORD	<i>sorbitol dehydrogenase</i>	3,63	4,35
FAM115A	<i>family with sequence similarity 115, member A</i>	3,63	2,13*
LOC136157	<i>SSU72 RNA polymerase II CTD phosphatase homolog pseudogene</i>	3,63	11,24

ARRDC4	arrestin domain containing 4	3,62	4,44*
VIPR2	vasoactive intestinal peptide receptor 2	3,60	6,59
FURIN	furin (paired basic amino acid cleaving enzyme)	3,60	3,16
LOC51152	melanoma antigen	3,60	3,46
A2ML1	alpha-2-macroglobulin-like 1	3,59	2,75
SEMA7A	semaphorin 7A, GPI membrane anchor (John Milton Hagen blood group)	3,58	3,29
C1orf126	chromosome 1 open reading frame 126	3,55	31,78
TOB2	transducer of ERBB2, 2	3,53	16,45
PDLIM7	PDZ and LIM domain 7 (enigma)	3,52	3,51
APOA4	apolipoprotein A-IV	3,49	2,57
WIPF3	WAS/WASL interacting protein family, member 3	3,47	2,43
LBH	limb bud and heart development homolog (mouse)	3,47	3,05
ANK1	ankyrin 1, erythrocytic	3,45	2,69
H19	H19, imprinted maternally expressed transcript (non-protein coding)	3,42	2,28
TESC	Tescalcin	3,40	3,81
GP1BB	glycoprotein Ib (platelet), beta polypeptide	3,37	14,83
RHBDF1	rhomoid 5 homolog 1 (Drosophila)	3,37	2,16
KRTAP5-8	keratin associated protein 5-8	3,35	8,51
RNU4-2	RNA, U4 small nuclear 2	3,34	5,78
FIBCD1	fibrinogen C domain containing 1	3,32	2,64
APOA1	apolipoprotein A-I	3,29	2,31
KRTAP5-7	keratin associated protein 5-7	3,29	5,21
HBG2	hemoglobin, gamma G	3,29	5,21
KRTAP4-9	keratin associated protein 4-9	3,27	3,34
LOC202181	hypothetical protein LOC202181	3,26	2,30
CALCOCO1	calcium binding and coiled-coil domain 1	3,25	2,27
SEC14L4	SEC14-like 4 (S. cerevisiae)	3,21	2,25
KIF27	kinesin family member 27	3,21	4,96
ABCD1	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 1	3,21	2,46
RSPH10B	radial spoke head 10 homolog B (Chlamydomonas)	3,21	2,35
TSPAN18	tetraspanin 18	3,18	2,27
BTG2	BTG family, member 2	3,17	3,78
OR4F21	olfactory receptor, family 4, subfamily F, member 21	3,16	3,20
AQP7P1	aquaporin 7 pseudogene 1	3,16	4,26
FN1	fibronectin 1	3,16	2,20*
SNORD12C	small nucleolar RNA, C/D box 12C	3,15	32,22
RN28S1	RNA, 28S ribosomal 1	3,15	6,11
MAN2A2	mannosidase, alpha, class 2A, member 2	3,15	4,47
CD58	CD58 molecule	3,15	3,78

CDHR1	<i>cadherin-related family member 1</i>	3,14	3,76
AGRN	<i>Agrin</i>	3,11	2,16
GOLGA8IP	<i>golgin A8 family, member I (pseudogene)</i>	3,10	4,17
CYP3A5	<i>cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5</i>	3,10	2,97
MICALL2	<i>MICAL-like 2</i>	3,09	3,56
LILRA6	<i>leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 6</i>	3,07	5,03
NPTX1	<i>neuronal pentraxin I</i>	3,06	2,13
SUSD2	<i>sushi domain containing 2</i>	3,06	2,71
ADD2	<i>adducin 2 (beta)</i>	3,05	2,33
MCCD1	<i>mitochondrial coiled-coil domain 1</i>	3,01	2,68
PLXNA3	<i>plexin A3</i>	3,00	2,03
CYBASC3	<i>cytochrome b, ascorbate dependent 3</i>	2,99	3,51
FAM138A	<i>family with sequence similarity 138, member A</i>	2,99	2,69
KLF10	<i>Kruppel-like factor 10</i>	2,99	2,69*
LOC100128364	<i>hypothetical LOC100128364</i>	2,98	2,22
GATS	<i>GATS, stromal antigen 3 opposite strand</i>	2,96	2,11
TFRC	<i>transferrin receptor (p90, CD71)</i>	2,96	3,34
FAM75C1	<i>family with sequence similarity 75, member C1</i>	2,95	2,41
SPDYE7P	<i>speedy homolog E7 (Xenopus laevis), pseudogene</i>	2,95	2,22
FLJ13197	<i>hypothetical FLJ13197</i>	2,95	2,00
POLR2A	<i>polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A, 220kDa</i>	2,91	2,99
C16orf7	<i>chromosome 16 open reading frame 7</i>	2,91	2,06*
KRTAP5-2	<i>keratin associated protein 5-2</i>	2,91	8,17
HNRNPM	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M</i>	2,91	2,75
HBE1	<i>hemoglobin, epsilon 1</i>	2,90	2,35
HMBS	<i>hydroxymethylbilane synthase</i>	2,90	2,35
MST1	<i>macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)</i>	2,89	3,12
LOC100128292	<i>hypothetical LOC100128292</i>	2,89	2,10
ZFYVE1	<i>zinc finger, FYVE domain containing 1</i>	2,88	2,50*
CTSL2	<i>cathepsin L2</i>	2,86	2,51*
HERC2P2	<i>hect domain and RLD 2 pseudogene 2</i>	2,86	3,63
OPTN	<i>Optineurin</i>	2,84	2,87
C1orf116	<i>chromosome 1 open reading frame 116</i>	2,84	2,35
DAPP1	<i>dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides</i>	2,83	3,92

*Genes com expressão reduzida na linhagem após tratamento com Imatinibe. VER mostra os valores de expressão relativos à linhagem sem tratamento.

Para os genes com expressão reduzidas das células de LMC, após tratamento com imatinibe, 501 genes estão inibidos em ambas as linhagens de LMC. Dentre eles, encontram-se genes como *NQO1*, *NQO2*, *IGF1* e *CDK6*. Nesta comparação, como em todas as outras descritas anteriormente, observamos genes diferencialmente expressos em comum às duas linhagens, mas com relação inversa, ou seja, se apresentam com expressão reduzida em uma linhagem e superexpresso na outra. Novamente, observamos genes diferencialmente expressos em comum às duas linhagens, mas com relação inversa, ou seja, se apresentam superexpressos em uma linhagem e com expressão reduzida na outra (tabela 6.6).

Tabela 6.6: Genes **inibidos** na linhagem Lucena após 48h de tratamento com Imatinibe, comparando com os genes igualmente diferencialmente expressos na linhagem K562 após 48h de tratamento com Imatinibe.

Símbolo	Nome do Gene	VER Lucena	VER K562
<i>CALB1</i>	<i>calbindin 1, 28kDa</i>	28,24	10,20
<i>VIM</i>	<i>Vimentin</i>	25,70	2,11
<i>TMSB4X</i>	<i>thymosin beta 4, X-linked</i>	20,47	8,69
<i>SEMA3C</i>	<i>sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C</i>	19,82	4,72
<i>PSAT1</i>	<i>phosphoserine aminotransferase 1</i>	18,55	13,45
<i>PHGDH</i>	<i>phosphoglycerate dehydrogenase</i>	17,77	4,29
<i>SOCS2</i>	<i>suppressor of cytokine signaling 2</i>	16,02	20,68
<i>ARG2</i>	<i>arginase, type II</i>	13,23	6,54
<i>CFH</i>	<i>complement factor H</i>	11,84	14,93
<i>PDE4DIP</i>	<i>phosphodiesterase 4D interacting protein</i>	11,49	12,38
<i>AGPAT9</i>	<i>1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9</i>	11,13	5,24
<i>MS4A3</i>	<i>membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3 (hematopoietic cell-specific)</i>	11,03	5,54
<i>SLC2A3</i>	<i>solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3</i>	10,94	10,20
<i>ACSM3</i>	<i>acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3</i>	10,47	3,41
<i>CTH</i>	<i>cystathionase (cystathionine gamma-lyase)</i>	9,81	7,73
<i>TM6SF1</i>	<i>transmembrane 6 superfamily member 1</i>	9,53	9,38
<i>CCND2</i>	<i>cyclin D2</i>	9,43	12,64
<i>CD69</i>	<i>CD69 molecule</i>	9,26	11,08
<i>ANXA1</i>	<i>annexin A1</i>	9,26	5,66
<i>MTHFD2</i>	<i>methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+</i>	9,25	3,16

	<i>dependent) 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase</i>		
SAMSN1	<i>SAM domain, SH3 domain and nuclear localization signals 1</i>	8,76	14,83
C12orf24	<i>chromosome 12 open reading frame 24</i>	8,46	2,35
ASNS	<i>asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)</i>	8,38	4,63
DNAJC12	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12</i>	8,35	13,18
SLC35F2	<i>solute carrier family 35, member F2</i>	8,27	10,20
C3orf26	<i>chromosome 3 open reading frame 26</i>	8,14	6,06
FABP5	<i>fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)</i>	8,11	2,85
MYB	<i>v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)</i>	8,06	4,69
WARS	<i>tryptophanyl-tRNA synthetase</i>	8,02	6,41
YARS	<i>tyrosyl-tRNA synthetase</i>	7,82	5,70
FMNL2	<i>formin-like 2</i>	7,77	2,55
SETD7	<i>SET domain containing (lysine methyltransferase) 7</i>	7,71	8,34
PKM2	<i>pyruvate kinase, muscle</i>	7,66	2,53
SHMT2	<i>serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)</i>	7,60	4,59
CTSH	<i>cathepsin H</i>	7,44	6,11
NQO1	<i>NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1</i>	7,42	4,23
GFPT1	<i>glutamine--fructose-6-phosphate transaminase 1</i>	7,38	4,17
PLA2G4A	<i>phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)</i>	7,35	3,89
NOB1	<i>NIN1/RPN12 binding protein 1 homolog (S. cerevisiae)</i>	7,29	5,54
ALDH1L2	<i>aldehyde dehydrogenase 1 family, member L2</i>	7,27	3,76
S100A11	<i>S100 calcium binding protein A11</i>	7,25	11,79
GDF15	<i>growth differentiation factor 15</i>	7,24	3,68
BCAT1	<i>branched chain amino-acid transaminase 1, cytosolic</i>	7,22	7,16
NET1	<i>neuroepithelial cell transforming 1</i>	6,88	5,03
LAPTM4B	<i>lysosomal protein transmembrane 4 beta</i>	6,80	6,32
TNFRSF10B	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b</i>	6,78	5,50
DDIT3	<i>DNA-damage-inducible transcript 3</i>	6,73	3,10
CHRNA5	<i>cholinergic receptor, nicotinic, alpha 5</i>	6,69	5,70
TMSL3	<i>thymosin-like 3</i>	6,62	9,25
TRIB3	<i>tribbles homolog 3 (Drosophila)</i>	6,59	7,46
IFITM1	<i>interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)</i>	6,51	3,36
SLC7A5	<i>solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5</i>	6,43	3,51
GLT25D2	<i>glycosyltransferase 25 domain containing 2</i>	6,41	4,44
NMU	<i>neuromedin U</i>	6,39	5,62
IFT57	<i>intraflagellar transport 57 homolog (Chlamydomonas)</i>	6,28	4,50
XBP1	<i>X-box binding protein 1</i>	6,26	3,78
NOC3L	<i>nucleolar complex associated 3 homolog (S.</i>	6,20	9,25

	<i>cerevisiae</i>)		
AMN1	antagonist of mitotic exit network 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	6,20	3,29
EIF4EBP1	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	6,13	5,74
ALDH1A2	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2	6,02	2,57
ETV1	ets variant 1	5,91	7,57
ERO1L	ERO1-like (<i>S. cerevisiae</i>)	5,90	6,73
HHEX	hematopoietically expressed homeobox	5,85	6,54
SLC39A14	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14	5,82	7,52
CBFB	core-binding factor, beta subunit	5,80	7,01
CCDC112	coiled-coil domain containing 112	5,79	2,91
PMP22	peripheral myelin protein 22	5,64	3,48
NARS2	asparaginyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial (putative)	5,63	3,97
LRP12	low density lipoprotein receptor-related protein 12	5,62	2,30
SCN9A	sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha subunit	5,59	12,38
CEP55	centrosomal protein 55kDa	5,47	9,19
FKBP14	FK506 binding protein 14, 22 kDa	5,44	3,46
ITM2A	integral membrane protein 2A	5,44	5,28
NAMPT	nicotinamide phosphoribosyltransferase	5,43	5,17
TPD52L1	tumor protein D52-like 1	5,39	2,81
EEA1	early endosome antigen 1	5,29	3,36
C4orf46	chromosome 4 open reading frame 46	5,28	8,06
TGFBR3	transforming growth factor, beta receptor III	5,26	4,99
CRYZ	crystallin, zeta (quinone reductase)	5,26	5,98
GPT2	glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2	5,24	4,56
SEL1L3	sel-1 suppressor of lin-12-like 3 (<i>C. elegans</i>)	5,19	3,86
HSPA5	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	5,16	4,06
CCDC99	coiled-coil domain containing 99	5,16	3,07
CEBPG	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma	5,11	5,50
MRPS35	mitochondrial ribosomal protein S35	5,09	3,23
CENPH	centromere protein H	5,06	2,14*
FAM69A	family with sequence similarity 69, member A	5,04	7,26
WDR3	WD repeat domain 3	5,01	6,73
MGST1	microsomal glutathione S-transferase 1	4,99	3,56
HMMR	hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	4,99	2,58
ETV5	ets variant 5	4,95	5,35
SMYD3	SET and MYND domain containing 3	4,92	5,06
FAM129A	family with sequence similarity 129, member A	4,90	5,62
SLC7A11	solute carrier family 7, (cationic amino acid	4,89	4,79

	<i>transporter, y+ system) member 11</i>		
<i>TMEM154</i>	<i>transmembrane protein 154</i>	4,87	10,27
<i>IL20RB</i>	<i>interleukin 20 receptor beta</i>	4,85	4,63
<i>TIMM9</i>	<i>translocase of inner mitochondrial membrane 9 homolog (yeast)</i>	4,85	5,03
<i>TSEN15</i>	<i>tRNA splicing endonuclease 15 homolog (S. cerevisiae)</i>	4,84	4,53
<i>CMTM6</i>	<i>CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 6</i>	4,84	6,54
<i>CELF2</i>	<i>CUGBP, Elav-like family member 2</i>	4,81	8,46
<i>TTC5</i>	<i>tetratricopeptide repeat domain 5</i>	4,74	3,61
<i>BZW2</i>	<i>basic leucine zipper and W2 domains 2</i>	4,74	3,73
<i>DDIT4</i>	<i>DNA-damage-inducible transcript 4</i>	4,74	3,01
<i>IDH1</i>	<i>isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble</i>	4,71	2,16
<i>ABCC4</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4</i>	4,70	2,33
<i>ARL15</i>	<i>ADP-ribosylation factor-like 15</i>	4,70	5,35
<i>IQGAP1</i>	<i>IQ motif containing GTPase activating protein 1</i>	4,69	3,78
<i>NOP16</i>	<i>NOP16 nucleolar protein homolog (yeast)</i>	4,68	4,26
<i>MND1</i>	<i>meiotic nuclear divisions 1 homolog (S. cerevisiae)</i>	4,64	2,66
<i>ACSL4</i>	<i>acyl-CoA synthetase long-chain family member 4</i>	4,63	2,36
<i>SRRD</i>	<i>SRR1 domain containing</i>	4,62	6,23
<i>MIF</i>	<i>macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)</i>	4,62	2,53
<i>CISD1</i>	<i>CDGSH iron sulfur domain 1</i>	4,59	5,58
<i>NDUFA4</i>	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, assembly factor 4</i>	4,59	6,92
<i>GALM</i>	<i>galactose mutarotase (aldose 1-epimerase)</i>	4,58	6,96
<i>EPB41L2</i>	<i>erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2</i>	4,58	5,13
<i>GPX8</i>	<i>glutathione peroxidase 8 (putative)</i>	4,57	2,46
<i>GNL3</i>	<i>guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)</i>	4,55	5,43
<i>MINA</i>	<i>MYC induced nuclear antigen</i>	4,54	9,65
<i>ACTR6</i>	<i>ARP6 actin-related protein 6 homolog (yeast)</i>	4,53	2,81
<i>MTHFD1L</i>	<i>methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like</i>	4,50	2,73
<i>RCHY1</i>	<i>ring finger and CHY zinc finger domain containing 1</i>	4,46	5,39
<i>RPF2</i>	<i>ribosome production factor 2 homolog (S. cerevisiae)</i>	4,46	5,43
<i>ANTXR2</i>	<i>anthrax toxin receptor 2</i>	4,44	3,63
<i>WDYHV1</i>	<i>WDYHV motif containing 1</i>	4,43	3,25
<i>SLC4A7</i>	<i>solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7</i>	4,39	3,01
<i>SSBP2</i>	<i>single-stranded DNA binding protein 2</i>	4,34	5,28
<i>INHBE</i>	<i>inhibin, beta E</i>	4,34	4,11
<i>ESYT1</i>	<i>extended synaptotagmin-like protein 1</i>	4,32	3,97

MRPL48	<i>mitochondrial ribosomal protein L48</i>	4,31	3,61
MLLT11	<i>myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 11</i>	4,29	4,63
CCNB1IP1	<i>cyclin B1 interacting protein 1</i>	4,28	3,46
RIPK2	<i>receptor-interacting serine-threonine kinase 2</i>	4,27	4,79
DZIP3	<i>DAZ interacting protein 3, zinc finger</i>	4,27	3,46
HSPA13	<i>heat shock protein 70kDa family, member 13</i>	4,27	5,58
MCTS1	<i>malignant T cell amplified sequence 1</i>	4,26	2,01
PUS7	<i>pseudouridylate synthase 7 homolog (S. cerevisiae)</i>	4,26	3,81
SPTBN1	<i>spectrin, beta, non-erythrocytic 1</i>	4,25	3,56
RAP1B	<i>RAP1B, member of RAS oncogene family</i>	4,25	2,57
SLC39A10	<i>solute carrier family 39 (zinc transporter), member 10</i>	4,25	4,50
FAM60A	<i>family with sequence similarity 60, member A</i>	4,24	4,50
LGALS1	<i>lectin, galactoside-binding, soluble, 1</i>	4,24	2,06
SLC31A1	<i>solute carrier family 31 (copper transporters), member 1</i>	4,23	3,73
WDR74	<i>WD repeat domain 74</i>	4,22	3,01
NUCB2	<i>nucleobindin 2</i>	4,20	3,68
DSG2	<i>desmoglein 2</i>	4,19	7,11
KIAA0020	<i>KIAA0020</i>	4,19	4,38
PCK2	<i>phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)</i>	4,17	2,64
NME1	<i>non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in</i>	4,15	6,54
IGF1	<i>insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)</i>	4,15	7,26
RPL22L1	<i>ribosomal protein L22-like 1</i>	4,14	2,01
COMMD10	<i>COMM domain containing 10</i>	4,10	2,77
IMPA1	<i>inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1</i>	4,09	4,69
MAP1B	<i>microtubule-associated protein 1B</i>	4,08	5,50
C10orf119	<i>chromosome 10 open reading frame 119</i>	4,07	4,56
FARSB	<i>phenylalanyl-tRNA synthetase, beta subunit</i>	4,06	5,74
FLNB	<i>filamin B, beta</i>	4,05	3,01
NUDCD1	<i>NudC domain containing 1</i>	4,05	3,03
IPO4	<i>importin 4</i>	4,05	2,10
TIPARP	<i>TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase</i>	4,04	5,74
GRB10	<i>growth factor receptor-bound protein 10</i>	4,04	2,14
RPL39L	<i>ribosomal protein L39-like</i>	4,03	5,66
ARL4A	<i>ADP-ribosylation factor-like 4A</i>	4,03	3,14*
BST2	<i>bone marrow stromal cell antigen 2</i>	4,02	2,53
NT5C3	<i>5'-nucleotidase, cytosolic III</i>	4,00	3,14
PNPT1	<i>polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1</i>	3,99	4,53
HSD17B7	<i>hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7</i>	3,99	2,77
HSPA4L	<i>heat shock 70kDa protein 4-like</i>	3,99	5,35
ELOVL7	<i>ELOVL family member 7, elongation of long chain fatty</i>	3,96	3,41

	acids (yeast)		
DDX21	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 21	3,96	5,17
LDHA	lactate dehydrogenase A	3,96	2,36
ZNHIT6	zinc finger, HIT type 6	3,95	6,15
PLD1	phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific	3,94	2,99
RRP15	ribosomal RNA processing 15 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	3,94	2,81
ACSL3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	3,93	2,62
HERPUD1	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	3,93	3,61
SFXN4	sideroflexin 4	3,93	3,78
PMAIP1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	3,92	3,29
LIN28B	lin-28 homolog B (<i>C. elegans</i>)	3,92	10,85
RALB	v-ral simian leukemia viral oncogene homolog B (ras related; GTP binding protein)	3,91	4,86
NCAM2	neural cell adhesion molecule 2	3,91	2,75
HSD17B12	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	3,91	4,69
AKR1C2	aldo-keto reductase family 1, member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III)	3,91	2,25
NEDD4	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4	3,90	4,06
POLR1B	polymerase (RNA) I polypeptide B, 128kDa	3,89	8,06
NT5DC3	5'-nucleotidase domain containing 3	3,87	6,32
POC1B	POC1 centriolar protein homolog B (<i>Chlamydomonas</i>)	3,87	3,97
CYB5R4	cytochrome b5 reductase 4	3,87	2,23
HK2	hexokinase 2	3,87	3,34
BNIP1	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 1	3,85	2,51
COCH	coagulation factor C homolog, cochlin (<i>Limulus polyphemus</i>)	3,83	3,39
DEPDC4	DEP domain containing 4	3,83	2,48
SACS	spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (sacsin)	3,83	6,68
SLC27A2	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2	3,82	5,31
HAUS6	HAUS augmin-like complex, subunit 6	3,80	2,46
LTV1	LTV1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	3,80	4,44
NUFIP1	nuclear fragile X mental retardation protein interacting protein 1	3,80	5,10
MAK16	MAK16 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	3,80	10,48
C6orf182	chromosome 6 open reading frame 182	3,80	2,25
FBXO16	F-box protein 16	3,79	3,16
RSL24D1	ribosomal L24 domain containing 1	3,79	4,26
MST4	serine/threonine protein kinase MST4	3,79	4,29
NHEDC2	Na ⁺ /H ⁺ exchanger domain containing 2	3,79	3,18
E2F5	E2F transcription factor 5, p130-binding	3,76	3,89

ABCE1	ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1	3,76	6,06
GPR63	G protein-coupled receptor 63	3,75	4,72
USP12	ubiquitin specific peptidase 12	3,74	3,61
MRPL3	mitochondrial ribosomal protein L3	3,74	2,62
MRPL16	mitochondrial ribosomal protein L16	3,74	5,39
GNPNAT1	glucosamine-phosphate N-acetyltransferase 1	3,73	7,41
DDX10	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 10	3,73	7,52
FERMT2	fermitin family member 2	3,72	8,28
LYPLA1	lysophospholipase I	3,72	4,92
GAL	galanin prepropeptide	3,72	4,26
CCDC41	coiled-coil domain containing 41	3,71	2,27
PSPH	phosphoserine phosphatase	3,71	7,67
CNKSR3	CNKSR family member 3	3,71	2,04
ENC1	ectodermal-neural cortex 1 (with BTB-like domain)	3,70	2,64
PMS1	PMS1 postmeiotic segregation increased 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	3,70	2,68
DTWD2	DTW domain containing 2	3,70	4,53
LONP1	lon peptidase 1, mitochondrial	3,70	3,48
PDPK1	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	3,69	2,10
MSL3L2	male-specific lethal 3-like 2 (<i>Drosophila</i>)	3,69	6,96
HAX1	HCLS1 associated protein X-1	3,69	5,06
UTP15	UTP15, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	3,68	13,55
QTRTD1	queuine tRNA-ribosyltransferase domain containing 1	3,67	6,92
ADSS	adenylosuccinate synthase	3,67	2,97
DNAJC3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3	3,66	3,78
POLR3G	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G (32kD)	3,66	4,99
NR2C2AP	nuclear receptor 2C2-associated protein	3,65	3,58
DOCK11	dedicator of cytokinesis 11	3,64	3,27
ZNF146	zinc finger protein 146	3,64	8,06
SLC19A2	solute carrier family 19 (thiamine transporter), member 2	3,62	2,25
RAB31	RAB31, member RAS oncogene family	3,62	3,16
TIMM8A	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog A (yeast)	3,61	7,01
NOL7	nucleolar protein 7, 27kDa	3,60	2,45
ZNF280C	zinc finger protein 280C	3,59	8,40
WDR36	WD repeat domain 36	3,57	3,76
G2E3	G2/M-phase specific E3 ubiquitin ligase	3,56	2,60
C1orf31	chromosome 1 open reading frame 31	3,56	4,32
CCBL2	cysteine conjugate-beta lyase 2	3,56	2,93

AP1S2	<i>adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit</i>	3,56	3,94
CEP70	<i>centrosomal protein 70kDa</i>	3,56	2,97
TBPL1	<i>TBP-like 1</i>	3,55	6,63
ERAL1	<i>Era G-protein-like 1 (E. coli)</i>	3,55	2,79
TCEA1	<i>transcription elongation factor A (SII), 1</i>	3,55	3,29
CARS	<i>cysteinyI-tRNA synthetase</i>	3,53	3,66
DSC3	<i>desmocollin 3</i>	3,53	4,32
SNORA8	<i>small nucleolar RNA, H/ACA box 8</i>	3,53	2,60*
ARHGDI B	<i>Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta</i>	3,53	2,93
PPID	<i>peptidylprolyl isomerase D</i>	3,52	3,01
ZNF721	<i>zinc finger protein 721</i>	3,52	4,92
SLC25A33	<i>solute carrier family 25, member 33</i>	3,52	3,94
CNIH	<i>cornichon homolog (Drosophila)</i>	3,50	3,53
PAK1IP1	<i>PAK1 interacting protein 1</i>	3,50	5,78
P4HA1	<i>prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I</i>	3,50	3,12
MECOM	<i>MDS1 and EVI1 complex locus</i>	3,49	4,96
UCK2	<i>uridine-cytidine kinase 2</i>	3,49	2,99
MRPL47	<i>mitochondrial ribosomal protein L47</i>	3,49	3,01
IARS	<i>isoleucyl-tRNA synthetase</i>	3,48	3,10
EIF2B3	<i>eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 3 gamma, 58kDa</i>	3,48	2,50
ETFDH	<i>electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase</i>	3,48	6,87
TUBE1	<i>tubulin, epsilon 1</i>	3,47	3,56
DPH5	<i>DPH5 homolog (S. cerevisiae)</i>	3,47	4,92
SGTB	<i>small glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR)-containing, beta</i>	3,46	2,11
NLN	<i>neurolysin (metallopeptidase M3 family)</i>	3,46	4,14
NMD3	<i>NMD3 homolog (S. cerevisiae)</i>	3,46	2,46
TSR1	<i>TSR1, 20S rRNA accumulation, homolog (S. cerevisiae)</i>	3,45	4,14
MYC	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>	3,45	3,66
ICT1	<i>immature colon carcinoma transcript 1</i>	3,44	4,29
LRRC40	<i>leucine rich repeat containing 40</i>	3,44	3,94
CCDC111	<i>coiled-coil domain containing 111</i>	3,44	4,32
GTF2E2	<i>general transcription factor IIE, polypeptide 2, beta 34kDa</i>	3,43	2,64
RAI14	<i>retinoic acid induced 14</i>	3,43	4,69
PIBF1	<i>progesterone immunomodulatory binding factor 1</i>	3,43	3,61
EXOSC5	<i>exosome component 5</i>	3,42	3,68
MRT04	<i>mRNA turnover 4 homolog (S. cerevisiae)</i>	3,42	6,68
PDSS1	<i>prenyl (decaprenyl) diphosphate synthase, subunit 1</i>	3,42	2,85
RPE	<i>ribulose-5-phosphate-3-epimerase</i>	3,41	3,51

DCAF17	<i>DDB1 and CUL4 associated factor 17</i>	3,41	2,53
ARMC10	<i>armadillo repeat containing 10</i>	3,40	7,01
C16orf80	<i>chromosome 16 open reading frame 80</i>	3,40	4,50
SDAD1	<i>SDA1 domain containing 1</i>	3,40	5,98
ALKBH8	<i>alkB, alkylation repair homolog 8 (E. coli)</i>	3,40	9,71
SAAL1	<i>serum amyloid A-like 1</i>	3,40	2,50
CENPL	<i>centromere protein L</i>	3,40	2,71
NOLC1	<i>nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1</i>	3,40	4,06
PYCR1	<i>pyrroline-5-carboxylate reductase 1</i>	3,39	2,39
PNO1	<i>partner of NOB1 homolog (S. cerevisiae)</i>	3,39	6,06*
CALU	<i>Calumenin</i>	3,39	3,53
C11orf75	<i>chromosome 11 open reading frame 75</i>	3,39	2,19
ZNRD1	<i>zinc ribbon domain containing 1</i>	3,38	6,28
LEPROTL1	<i>leptin receptor overlapping transcript-like 1</i>	3,37	6,11
PPAT	<i>phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase</i>	3,37	3,56
SGPL1	<i>sphingosine-1-phosphate lyase 1</i>	3,37	7,73
GALK2	<i>galactokinase 2</i>	3,37	2,20
DNAJA3	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 3</i>	3,36	3,16
ENOPH1	<i>enolase-phosphatase 1</i>	3,36	3,34
NIT2	<i>nitrilase family, member 2</i>	3,36	2,83
RSL1D1	<i>ribosomal L1 domain containing 1</i>	3,36	4,79
ZNF627	<i>zinc finger protein 627</i>	3,36	5,74
IQCB1	<i>IQ motif containing B1</i>	3,36	2,16
CTDSPL2	<i>CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase like 2</i>	3,35	3,46
NQO2	<i>NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2</i>	3,35	4,79
NAA15	<i>N(alpha)-acetyltransferase 15, NatA auxiliary subunit</i>	3,34	2,89
ASS1	<i>argininosuccinate synthase 1</i>	3,34	2,85
UBE2D1	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2D 1 (UBC4/5 homolog, yeast)</i>	3,34	7,11
CPNE8	<i>copine VIII</i>	3,34	5,10
TMEM55A	<i>transmembrane protein 55A</i>	3,33	3,43
C9orf91	<i>chromosome 9 open reading frame 91</i>	3,33	3,03
NIPSNAP3B	<i>nipsnap homolog 3B (C. elegans)</i>	3,33	5,35
EXOSC8	<i>exosome component 8</i>	3,33	2,99
MRPL42	<i>mitochondrial ribosomal protein L42</i>	3,32	5,03
LMAN1	<i>lectin, mannose-binding, 1</i>	3,32	2,89
HEPACAM2	<i>HEPACAM family member 2</i>	3,32	2,25
NHP2	<i>NHP2 ribonucleoprotein homolog (yeast)</i>	3,32	3,32
OPA1	<i>optic atrophy 1 (autosomal dominant)</i>	3,32	5,39
WDR12	<i>WD repeat domain 12</i>	3,31	2,55
ESR2	<i>estrogen receptor 2 (ER beta)</i>	3,31	2,23

MARS	<i>methionyl-tRNA synthetase</i>	3,31	2,64
SLAMF6	<i>SLAM family member 6</i>	3,31	2,50
NOP2	<i>NOP2 nucleolar protein homolog (yeast)</i>	3,30	6,68
EDEM1	<i>ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1</i>	3,30	4,29
NOL11	<i>nucleolar protein 11</i>	3,30	2,87
GSTA4	<i>glutathione S-transferase alpha 4</i>	3,30	2,10
SSR3	<i>signal sequence receptor, gamma (translocon-associated protein gamma)</i>	3,30	3,89
TFAM	<i>transcription factor A, mitochondrial</i>	3,29	4,79
THAP1	<i>THAP domain containing, apoptosis associated protein 1</i>	3,29	3,07
ZNF259	<i>zinc finger protein 259</i>	3,29	3,46
C14orf104	<i>chromosome 14 open reading frame 104</i>	3,28	2,55
IMP4	<i>IMP4, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (yeast)</i>	3,28	3,36
UFM1	<i>ubiquitin-fold modifier 1</i>	3,27	4,69
GMFB	<i>glia maturation factor, beta</i>	3,27	4,63
RAB27A	<i>RAB27A, member RAS oncogene family</i>	3,27	4,59
CDK6	<i>cyclin-dependent kinase 6</i>	3,26	5,39
TMEM194B	<i>transmembrane protein 194B</i>	3,26	3,03
C21orf91	<i>chromosome 21 open reading frame 91</i>	3,26	5,10
CCPG1	<i>cell cycle progression 1</i>	3,25	6,06
THNSL1	<i>threonine synthase-like 1 (S. cerevisiae)</i>	3,25	4,06
GARS	<i>glycyl-tRNA synthetase</i>	3,24	2,62
PPA1	<i>pyrophosphatase (inorganic) 1</i>	3,24	2,22
SLC25A21	<i>solute carrier family 25 (mitochondrial oxodicarboxylate carrier), member 21</i>	3,22	2,71
RPL31	<i>ribosomal protein L31</i>	3,22	3,73
C12orf48	<i>chromosome 12 open reading frame 48</i>	3,22	2,39
APOL1	<i>apolipoprotein L, 1</i>	3,22	5,90
YRDC	<i>yrdC domain containing (E. coli)</i>	3,22	3,03
C1QBP	<i>complement component 1, q subcomponent binding protein</i>	3,22	3,07
LYRM7	<i>Lym7 homolog (mouse)</i>	3,22	8,00
SEPT11	<i>septin 11</i>	3,21	3,12
TMEM192	<i>transmembrane protein 192</i>	3,20	2,99
COPS2	<i>COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 2 (Arabidopsis)</i>	3,20	2,51
GYG1	<i>glycogenin 1</i>	3,20	3,53
OTUD6B	<i>OTU domain containing 6B</i>	3,20	3,39
RNF125	<i>ring finger protein 125</i>	3,20	2,01
PRR11	<i>proline rich 11</i>	3,20	2,75
LRRFIP1	<i>leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1</i>	3,20	3,20

CCDC59	<i>coiled-coil domain containing 59</i>	3,20	5,17
PBK	<i>PDZ binding kinase</i>	3,20	4,11
AGA	<i>aspartylglucosaminidase</i>	3,19	3,94
AARS	<i>alanyl-tRNA synthetase</i>	3,19	2,23
TMED5	<i>transmembrane emp24 protein transport domain containing 5</i>	3,19	3,94
PEA15	<i>phosphoprotein enriched in astrocytes 15</i>	3,18	2,23
SEL1L	<i>sel-1 suppressor of lin-12-like (C. elegans)</i>	3,18	6,02
PSIP1	<i>PC4 and SFRS1 interacting protein 1</i>	3,18	2,41
SPRED1	<i>sprouty-related, EVH1 domain containing 1</i>	3,17	2,39
TTK	<i>TTK protein kinase</i>	3,17	3,05
RIOK2	<i>RIO kinase 2 (yeast)</i>	3,16	5,58
CEP110	<i>centrosomal protein 110kDa</i>	3,16	2,53
PINX1	<i>PIN2/TERF1 interacting, telomerase inhibitor 1</i>	3,16	4,53
DCTPP1	<i>dCTP pyrophosphatase 1</i>	3,15	6,02
MACC1	<i>metastasis associated in colon cancer 1</i>	3,15	2,75
TXNDC12	<i>thioredoxin domain containing 12 (endoplasmic reticulum)</i>	3,15	5,21
ZNF479	<i>zinc finger protein 479</i>	3,14	3,18*
TAF1A	<i>TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, A, 48kDa</i>	3,14	3,01
MS4A4A	<i>membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4</i>	3,14	6,19
WDR75	<i>WD repeat domain 75</i>	3,14	4,56
RAP1GDS1	<i>RAP1, GTP-GDP dissociation stimulator 1</i>	3,13	3,46
PRDX4	<i>peroxiredoxin 4</i>	3,13	3,66
MTMR6	<i>myotubularin related protein 6</i>	3,13	3,94
FAM177A1	<i>family with sequence similarity 177, member A1</i>	3,13	3,07
TRNT1	<i>tRNA nucleotidyl transferase, CCA-adding, 1</i>	3,12	3,29
ALG8	<i>asparagine-linked glycosylation 8, alpha-1,3-glucosyltransferase homolog (S. cerevisiae)</i>	3,12	3,12
SPTAN1	<i>spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin)</i>	3,12	2,14
CHMP2B	<i>chromatin modifying protein 2B</i>	3,11	2,50
UPF3A	<i>UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog A (yeast)</i>	3,10	3,18
MAD2L1	<i>MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)</i>	3,10	2,03
RPP40	<i>ribonuclease P/MRP 40kDa subunit</i>	3,10	4,66
AP3M2	<i>adaptor-related protein complex 3, mu 2 subunit</i>	3,10	2,16
ARL17B	<i>ADP-ribosylation factor-like 17B</i>	3,09	2,30*
TNPO1	<i>transportin 1</i>	3,09	2,87
MTIF2	<i>mitochondrial translational initiation factor 2</i>	3,09	4,86
YIF1B	<i>Yip1 interacting factor homolog B (S. cerevisiae)</i>	3,09	2,10*
SGK3	<i>serum/glucocorticoid regulated kinase family, member 3</i>	3,09	3,11

COMMD2	COMM domain containing 2	3,08	6,11
MRRF	mitochondrial ribosome recycling factor	3,08	3,29
HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (soluble)	3,08	2,25*
C15orf41	chromosome 15 open reading frame 41	3,08	2,57
RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)	3,07	2,20
RDH11	retinol dehydrogenase 11 (all-trans/9-cis/11-cis)	3,07	2,89
KIF11	kinesin family member 11	3,07	3,68
NKIRAS1	NFKB inhibitor interacting Ras-like 1	3,07	3,94
LRRC8B	leucine rich repeat containing 8 family, member B	3,07	2,77
HS3ST3B1	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3B1	3,06	5,43
TPM4	tropomyosin 4	3,06	4,08
ERO1LB	ERO1-like beta (<i>S. cerevisiae</i>)	3,06	3,58
SLC3A2	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2	3,06	2,60
SARS	seryl-tRNA synthetase	3,06	4,59
RABEPK	Rab9 effector protein with kelch motifs	3,05	2,43
RUVBL2	RuvB-like 2 (<i>E. coli</i>)	3,05	2,20
MRPL15	mitochondrial ribosomal protein L15	3,05	3,01
CHM	choroideremia (Rab escort protein 1)	3,05	2,60
BRX1	BRX1, biogenesis of ribosomes, homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	3,05	2,95
SEM	spermidine synthase	3,05	3,94
RUVBL1	RuvB-like 1 (<i>E. coli</i>)	3,03	4,86
ETV4	ets variant 4	3,03	5,21
KCNQ5	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 5	3,03	2,38
PTCD2	pentatricopeptide repeat domain 2	3,03	2,33
SGOL2	shugoshin-like 2 (<i>S. pombe</i>)	3,03	5,03
TOMM22	translocase of outer mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)	3,03	4,72
SEC11C	SEC11 homolog C (<i>S. cerevisiae</i>)	3,03	3,46
LOC401397	hypothetical LOC401397	3,02	3,23
FOXN2	forkhead box N2	3,02	2,33
ORC5L	origin recognition complex, subunit 5-like (yeast)	3,01	4,82
CAMSAP1L1	calmodulin regulated spectrin-associated protein 1-like 1	3,01	5,78
MEF2C	myocyte enhancer factor 2C	3,01	4,63
KIAA1430	KIAA1430	3,01	4,89
CCDC55	coiled-coil domain containing 55	3,00	4,23
ARID5B	AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)	3,00	3,51
RAB3GAP1	RAB3 GTPase activating protein subunit 1 (catalytic)	3,00	3,03
GMFG	glia maturation factor, gamma	3,00	3,76

SRPRB	<i>signal recognition particle receptor, B subunit</i>	3,00	5,46
NT5C2	<i>5'-nucleotidase, cytosolic II</i>	2,99	2,58
PDIA4	<i>protein disulfide isomerase family A, member 4</i>	2,99	2,87
RPF1	<i>ribosome production factor 1 homolog (S. cerevisiae)</i>	2,99	3,73
ME1	<i>malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic</i>	2,99	2,19
NUDT5	<i>nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 5</i>	2,99	2,97
HIST1H2BK	<i>histone cluster 1, H2bk</i>	2,99	2,73
HSPA9	<i>heat shock 70kDa protein 9 (mortalin)</i>	2,99	3,51
EBNA1BP2	<i>EBNA1 binding protein 2</i>	2,99	2,25
TGDS	<i>TDP-glucose 4,6-dehydratase</i>	2,98	3,84
TMSB10	<i>thymosin beta 10</i>	2,98	2,36
UHRF1BP1L	<i>UHRF1 binding protein 1-like</i>	2,98	2,51
C10orf32	<i>chromosome 10 open reading frame 32</i>	2,98	2,25
RBM3	<i>RNA binding motif (RNP1, RRM) protein 3</i>	2,97	2,01*
LRRC8D	<i>leucine rich repeat containing 8 family, member D</i>	2,97	6,02
PIGL	<i>phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class L</i>	2,97	6,36
APOO	<i>apolipoprotein O</i>	2,96	2,03
SRSF10	<i>serine/arginine-rich splicing factor 10</i>	2,96	3,34
RBM9	<i>RNA binding motif protein 9</i>	2,96	3,27
RAB30	<i>RAB30, member RAS oncogene family</i>	2,96	2,89
CTBS	<i>chitobiase, di-N-acetyl-</i>	2,96	4,32
RECQL	<i>RecQ protein-like (DNA helicase Q1-like)</i>	2,96	3,14
RBM34	<i>RNA binding motif protein 34</i>	2,95	5,86
PTGR2	<i>prostaglandin reductase 2</i>	2,95	2,57
PGRMC1	<i>progesterone receptor membrane component 1</i>	2,95	3,39
HIBCH	<i>3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase</i>	2,95	2,57
FNDC3A	<i>fibronectin type III domain containing 3A</i>	2,95	3,20
MED21	<i>mediator complex subunit 21</i>	2,95	3,39
TTC35	<i>tetratricopeptide repeat domain 35</i>	2,95	3,66
TMOD2	<i>tropomodulin 2 (neuronal)</i>	2,95	3,25
C4orf33	<i>chromosome 4 open reading frame 33</i>	2,95	7,46
ALKBH2	<i>alkB, alkylation repair homolog 2 (E. coli)</i>	2,94	7,52
SLC25A36	<i>solute carrier family 25, member 36</i>	2,94	2,73
ADAMTS3	<i>ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 3</i>	2,94	4,89
DIMT1L	<i>DIM1 dimethyladenosine transferase 1-like (S. cerevisiae)</i>	2,93	2,16
SRFBP1	<i>serum response factor binding protein 1</i>	2,93	5,24
CKAP2L	<i>cytoskeleton associated protein 2-like</i>	2,93	4,06
MRPS30	<i>mitochondrial ribosomal protein S30</i>	2,93	2,39
TMED10	<i>transmembrane emp24-like trafficking protein 10</i>	2,93	2,93

	(yeast)		
KIF3A	kinesin family member 3A	2,93	2,41
GRPEL2	GrpE-like 2, mitochondrial (<i>E. coli</i>)	2,93	2,83
C12orf45	chromosome 12 open reading frame 45	2,93	5,58
KTELC1	KTEL (Lys-Tyr-Glu-Leu) containing 1	2,92	6,92
PYGL	phosphorylase, glycogen, liver	2,92	3,66
ETS2	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)	2,92	3,41
ZNF429	zinc finger protein 429	2,92	2,89
KLHDC10	kelch domain containing 10	2,92	3,84
MASTL	microtubule associated serine/threonine kinase-like	2,92	2,06
EIF2A	eukaryotic translation initiation factor 2A, 65kDa	2,92	3,18
CNST	consortin, connexin sorting protein	2,91	3,10
GTF3A	general transcription factor IIIA	2,91	3,12
ZNF321	zinc finger protein 321	2,90	2,11
PIM2	pim-2 oncogene	2,90	3,78
RBBP8	retinoblastoma binding protein 8	2,90	3,29
ABCD3	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3	2,90	2,30
RAD51C	RAD51 homolog C (<i>S. cerevisiae</i>)	2,90	2,75
YDJC	YdjC homolog (bacterial)	2,90	3,56
QRSL1	glutaminyl-tRNA synthase (glutamine-hydrolyzing)-like 1	2,90	4,35
WDR55	WD repeat domain 55	2,89	2,08
GTSF1	gametocyte specific factor 1	2,89	2,89
TFB2M	transcription factor B2, mitochondrial	2,88	3,56
MRPS27	mitochondrial ribosomal protein S27	2,88	2,07
STOML2	stomatin (EPB72)-like 2	2,88	2,62
C7orf23	chromosome 7 open reading frame 23	2,87	4,59
RPAP3	RNA polymerase II associated protein 3	2,87	3,23
GAB2	GRB2-associated binding protein 2	2,87	2,91
MRPL1	mitochondrial ribosomal protein L1	2,86	3,34
TIMM50	translocase of inner mitochondrial membrane 50 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	2,86	3,07
LIAS	lipoic acid synthetase	2,86	2,17
SSBP1	single-stranded DNA binding protein 1	2,86	2,45
POLG2	polymerase (DNA directed), gamma 2, accessory subunit	2,85	2,48
CTSC	cathepsin C	2,84	6,15
C8orf33	chromosome 8 open reading frame 33	2,84	2,48
AK2	adenylate kinase 2	2,84	3,56
ZNF799	zinc finger protein 799	2,84	2,73
SESN2	sestrin 2	2,83	2,79
PPFIBP1	PTPRF interacting protein, binding protein 1 (liprin	2,83	2,51

	<i>beta 1)</i>		
<i>C1orf83</i>	<i>chromosome 1 open reading frame 83</i>	2,83	3,43
<i>GLMN</i>	<i>glomulin, FKBP associated protein</i>	2,83	3,71
<i>PAICS</i>	<i>phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase</i>	2,83	2,66

*Genes superexpressos na linhagem após tratamento com Imatinibe. *VER* mostra os valores de expressão relativos à linhagem sem tratamento.

De maneira complementar, também avaliamos os genes que estariam diferencialmente expressos na mesma linhagem celular, comparando os tratamentos com os dois compostos (Tabela 6.7).

Tabela 6.7: 3ª apresentação de comparações experimentais.

Comparações
K562xLQB-118 vs K562xImatinibe
LucenaxLQB-118 vs LucenaxImatinibe

Ao compararmos os tratamentos na mesma linhagem, observamos, para linhagem K562, 54 genes superexpressos nas células tratadas com ambos compostos. Para os genes inibidos, foi possível observar oito genes com expressão reduzida após os tratamentos (Figura 6.2 e tabelas 6.8 e 6.9).

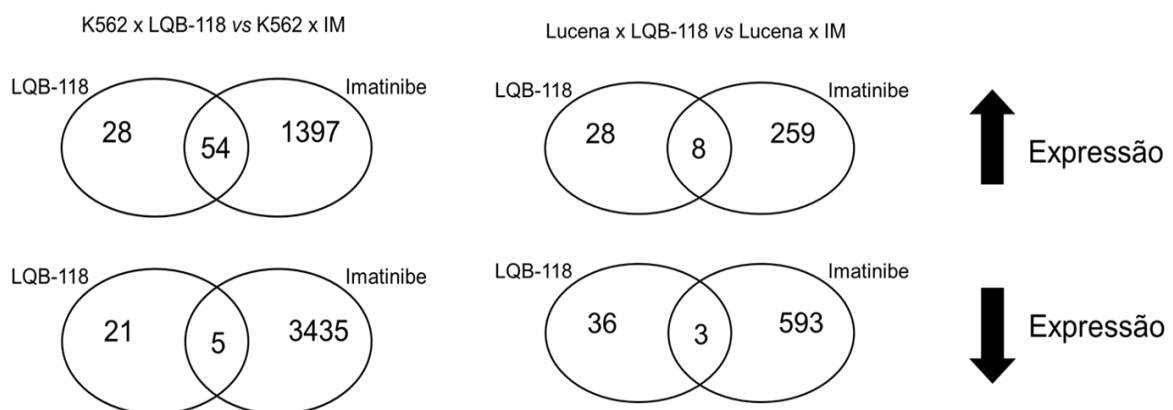


Figura 6.2: Esquema representativo dos genes diferencialmente expressos em comum entre os diferentes compostos (1,5 µM de LQB-118 e 1,0 µM de imatinibe) na mesma linhagem de LMC, tratada por 48h.

Tabela 6.8: Genes **superexpressos** na linhagem K562 após 48h de tratamento com LQB-118, comparando com os genes igualmente diferencialmente expressos na mesma linhagem após 48h de tratamento com Imatinibe.

Símbolo	Nome do gene	VER LQB-118	VER IM
LOC100293539	<i>similar to ribosomal protein 10</i>	59,10	15,56
UIMC1	<i>ubiquitin interaction motif containing 1</i>	8,71	14,03
SNORD3A	<i>small nucleolar RNA, C/D box 3A</i>	6,22	16,34
PPT2	<i>palmitoyl-protein thioesterase 2</i>	6,08	3,23
F8A1	<i>coagulation factor VIII-associated (intronic transcript) 1</i>	5,61	3,81
USP17L6P	<i>ubiquitin specific peptidase 17-like 6 (pseudogene)</i>	5,54	81,01
SNORD15B	<i>small nucleolar RNA, C/D box 15B</i>	4,92	4,47
SPDYE8P	<i>speedy homolog E8 (Xenopus laevis), pseudogene</i>	4,54	9,85
FABP5	<i>fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)</i>	4,27	2,85*
SNORA21	<i>small nucleolar RNA, H/ACA box 21</i>	4,17	4,17
TGIF1	<i>TGFB-induced factor homeobox 1</i>	4,16	2,89*
TATDN1	<i>TatD DNase domain containing 1</i>	4,11	3,14
CFHR4	<i>complement factor H-related 4</i>	3,82	3,61
UBTFL1	<i>upstream binding transcription factor, RNA polymerase I-like 1</i>	3,63	4,79
LOC349196	<i>hypothetical LOC349196</i>	3,60	17,03
TBC1D3G	<i>TBC1 domain family, member 3G</i>	3,49	9,85
CBWD3	<i>COBW domain containing 3</i>	3,43	2,07
TOB2	<i>transducer of ERBB2, 2</i>	3,37	16,45
VIPR2	<i>vasoactive intestinal peptide receptor 2</i>	3,22	6,59
SIAE	<i>sialic acid acetyltransferase</i>	2,98	3,20
CDK11B	<i>cyclin-dependent kinase 11B</i>	2,92	3,53*
HLA-DOA	<i>major histocompatibility complex, class II, DO alpha</i>	2,78	2,35
HNRNPM	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M</i>	2,70	2,75
RNU2-1	<i>RNA, U2 small nuclear 1</i>	2,64	9,92
KCNMB3	<i>potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M beta member 3</i>	2,64	3,97*
PLCXD1	<i>phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 1</i>	2,63	2,17
SNORD60	<i>small nucleolar RNA, C/D box 60</i>	2,62	3,92
MOG	<i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>	2,60	2,04
SNORD41	<i>small nucleolar RNA, C/D box 41</i>	2,60	4,35
LY6G6C	<i>lymphocyte antigen 6 complex, locus G6C</i>	2,55	2,58
GUSBL1	<i>glucuronidase, beta-like 1</i>	2,52	11,96
CFC1B	<i>cripto, FRL-1, cryptic family 1B</i>	2,52	2,89
NME2	<i>non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in</i>	2,48	3,43*

USP17L2	ubiquitin specific peptidase 17-like 2	2,40	11,63
UBD	ubiquitin D	2,37	3,61
SNORD33	small nucleolar RNA, C/D box 33	2,36	2,06
ARVP6125	hypothetical LOC442092	2,35	2,16
SPRYD5	SPRY domain containing 5	2,31	7,16
RPPH1	ribonuclease P RNA component H1	2,24	4,72
SNORD57	small nucleolar RNA, C/D box 57	2,24	2,62
SNORD32A	small nucleolar RNA, C/D box 32A	2,23	2,73
SNORD115-11	small nucleolar RNA, C/D box 115-11	2,20	19,03
KIF27	kinesin family member 27	2,20	4,96
TAPBP	TAP binding protein (tapasin)	2,20	2,55
FAM48B1	family with sequence similarity 48, member B1	2,19	2,04
BTNL8	butyrophilin-like 8	2,19	2,77
SNORA48	small nucleolar RNA, H/ACA box 48	2,19	3,29
LRRC37A	leucine rich repeat containing 37A	2,13	20,68
POM121L1P	POM121 membrane glycoprotein-like 1, pseudogene	2,13	4,66
SNORD54	small nucleolar RNA, C/D box 54	2,13	9,58
GOLGA8IP	golgin A8 family, member I (pseudogene)	2,10	4,17
RNU4ATAC	RNA, U4atac small nuclear (U12-dependent splicing)	2,09	6,06
GOLGA6L1	golgin A6 family-like 1	2,09	3,92
SNORD68	small nucleolar RNA, C/D box 68	2,05	2,53
VTRNA1-3	vault RNA 1-3	2,04	2,06
SCARNA9	small Cajal body-specific RNA 9	2,03	7,46
C6orf15	chromosome 6 open reading frame 15	2,01	3,84
CCDC72	coiled-coil domain containing 72	2,01	2,95
RNU1-4	RNA, U1 small nuclear 4	2,00	8,34

*Genes inibidos na linhagem após tratamento com Imatinibe. VER mostra os valores de expressão relativos à linhagem sem tratamento. IM - Imatinibe

Tabela 6.9: Genes **inibidos** na linhagem K562 após 48h de tratamento com LQB-118, comparando com os genes igualmente diferencialmente expressos na mesma linhagem após 48h de tratamento com Imatinibe.

Símbolo	Nome do gene	VER LQB-118	VER IM
OR4N4	olfactory receptor, family 4, subfamily N, member 4	2,03	4,72*
IKZF5	IKAROS family zinc finger 5 (Pegasus)	2,05	3,46
ZNF257	zinc finger protein 257	2,23	2,77
KGFLP2	keratinocyte growth factor-like protein 2	2,29	3,07*
NXF2	nuclear RNA export factor 2	2,32	2,64*
IGLJ3	immunoglobulin lambda joining 3	2,46	5,39*
FAM60A	family with sequence similarity 60, member A	2,69	4,50

<i>LOC729444</i>	<i>hypothetical LOC729444</i>	2,70	5,35*
<i>HLA-DMA</i>	<i>major histocompatibility complex, class II, DM alpha</i>	2,86	3,10
<i>HLA-DRA</i>	<i>major histocompatibility complex, class II, DR alpha</i>	3,00	2,77*
<i>NT5C3</i>	<i>5'-nucleotidase, cytosolic III</i>	3,12	3,84
<i>OR2A4</i>	<i>olfactory receptor, family 2, subfamily A, member 4</i>	3,92	2,97*
<i>IGHA1</i>	<i>immunoglobulin heavy constant alpha 1</i>	5,20	23,92*

*Genes superexpressos na linhagem após tratamento com Imatinibe. VER mostra os valores de expressão relativos à linhagem sem tratamento. IM – Imatinibe.

Para a linhagem Lucena, observamos oito genes superexpressos nas células tratadas tanto com LQB-118, tanto com imatinibe e apenas três genes com expressão reduzida nas células após tratamento com os compostos (Tabelas 6.10 e 6.11).

Tabela 6.10: Genes **superexpressos** na linhagem Lucena após 48h de tratamento com LQB-118, comparando com os genes igualmente diferencialmente expressos na mesma linhagem após 48h de tratamento com Imatinibe.

Símbolo	Nome do gene	VER LQB-118	VER IM
<i>FAM90A1</i>	<i>family with sequence similarity 90, member A1</i>	10,48	12,91
<i>C2</i>	<i>complement component 2</i>	4,24	7,67
<i>PRY</i>	<i>PTPN13-like, Y-linked</i>	2,88	5,82
<i>BAT3</i>	<i>HLA-B associated transcript 3</i>	2,42	6,92
<i>TCEB3CL</i>	<i>transcription elongation factor B polypeptide 3C-like</i>	2,31	3,66
<i>TSPY1</i>	<i>testis specific protein, Y-linked 1</i>	2,25	5,54
<i>ANKRD30BL</i>	<i>ankyrin repeat domain 30B-like</i>	2,13	4,20
<i>SNORD115-11</i>	<i>small nucleolar RNA, C/D box 115-11</i>	2,13	6,45
<i>OR4F16</i>	<i>olfactory receptor, family 4, subfamily F, member 16</i>	2,06	2,83*

*Genes inibidos na linhagem após tratamento com Imatinibe. VER mostra os valores de expressão relativos à linhagem sem tratamento. IM - Imatinibe

Tabela 6.11: Genes **inibidos** na linhagem Lucena após 48h de tratamento com LQB-118, comparando com os genes igualmente diferencialmente expressos na mesma linhagem após 48h de tratamento com Imatinibe.

Símbolo	Nome do gene	VER LQB-118	VER IM
<i>DAXX</i>	<i>death-domain associated protein</i>	3,65	3,25
<i>GPC2</i>	<i>glypican 2</i>	2,20	30,27*

<i>FAM160A1</i>	<i>family with sequence similarity 160, member A1</i>	2,17	3,61*
<i>HLA-DRA</i>	<i>major histocompatibility complex, class II, DR alpha</i>	2,17	2,93*
<i>ANKRD20A1</i>	<i>ankyrin repeat domain 20 family, member A1</i>	2,16	4,03
<i>ALPP</i>	<i>alkaline phosphatase, placental</i>	2,15	14,32
<i>LRRC37A</i>	<i>leucine rich repeat containing 37A</i>	2,09	4,56*

*Genes superexpressos na linhagem após tratamento com Imatinibe. VER mostra os valores de expressão relativos à linhagem sem tratamento. IM – Imatinibe.

A análise da expressão diferencial de genes através da técnica de microarranjos de DNA nas células tratadas com os compostos LQB-118 e imatinibe comparando com as células não tratadas teve como objetivo à identificação de genes cuja expressão é modificada em resposta ao tratamento. Esse processo permite a descoberta potencial de vias biológicas envolvidas na ação dos compostos. Também, como as informações geradas nas duas linhagens fornecem dados sobre um padrão de expressão gênica possível de gerar fatores preditivos de resposta aos tratamentos estudados. Nesse contexto, a integração de novas tecnologias no processo de identificação de alvos moleculares associados aos estudos dos efeitos citotóxicos de novas drogas se torna uma prioridade para identificação de novas ações terapêuticas antitumorais.

As análises por microarranjo de DNA mostraram genes diferencialmente expressos nas duas linhagens e tratamentos. Alguns foram escolhidos de acordo com sua função, expressão e/ou participação na carcinogênese para serem avaliados por PCR quantitativo após 48 horas de exposição a 1,5 µM de LQB-118 e 1,0 µM de imatinibe e suas expressões foram analisadas por PCR em tempo real, nas duas linhagens de LMC. Os níveis de expressão de RNAm foram analisados pelo método do Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). A expressão gênica foi normalizada pela expressão da β -actina. Os valores de *Fold Change (FC)* foram expressos em número de vezes em relação ao controle (1,0). Dentre os genes escolhidos destaca-se o gene *Transducer of ErbB-2 2 (TOB2)*, um novo candidato a gene supressor tumoral.

O gene *TOB2* apresentou um aumento na sua expressão na maioria das condições avaliadas, exceto nas células da linhagem Lucena, tratadas com 1,5 μ M de LQB-118. Na linhagem K562 observamos aumento de 3,37 e 16,45 vezes após tratamento com LQB-118 e imatinibe, respectivamente, quando comparado com as células controle nos experimentos de microarranjo de DNA. A linhagem resistente, Lucena, apresentou aumento de 4,04 vezes na expressão do mesmo gene, após tratamento com imatinibe. Ao avaliarmos a expressão do RNAm de *TOB2* por PCR em tempo real, foi possível observar aumento de sua expressão em FC 6,49 ($p=0,0015$) e FC 4,51 ($p=0,0031$), para K562 e Lucena após tratamento com imatinibe, respectivamente. As células K562 demonstraram um sutil aumento da expressão de *TOB2* após tratamento com LQB-118 por 48 horas ($FC = 1,69$; $p=0,0087$). Contudo, não observamos alteração na expressão de *TOB2* na linhagem Lucena tratada com 1,5 μ M de LQB-118 (Figura 6.3).

As proteínas TOBs reprimem a produção proteica de um RNAm alvo promovendo a diminuição do seu transcrito (EZZEDDINE *et al*, 2012). Dentre as moléculas já avaliadas que apresentam reduzidos níveis após a superexpressão de TOB destaca-se o fator de transcrição NF- κ B. No estudo de MAIA *et al.*,(2011), o composto LQB-118 reduziu os níveis de expressão das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) XIAP e survivina, bem como a expressão da P-gp, nas linhagens K562 e K562-Lucena. Considerando que NF κ B é um fator de transcrição comum a essas proteínas, e parece ser um alvo de regulação da proteína TOB, procuramos verificar se o composto LQB-118 regularia a localização de NF κ B.

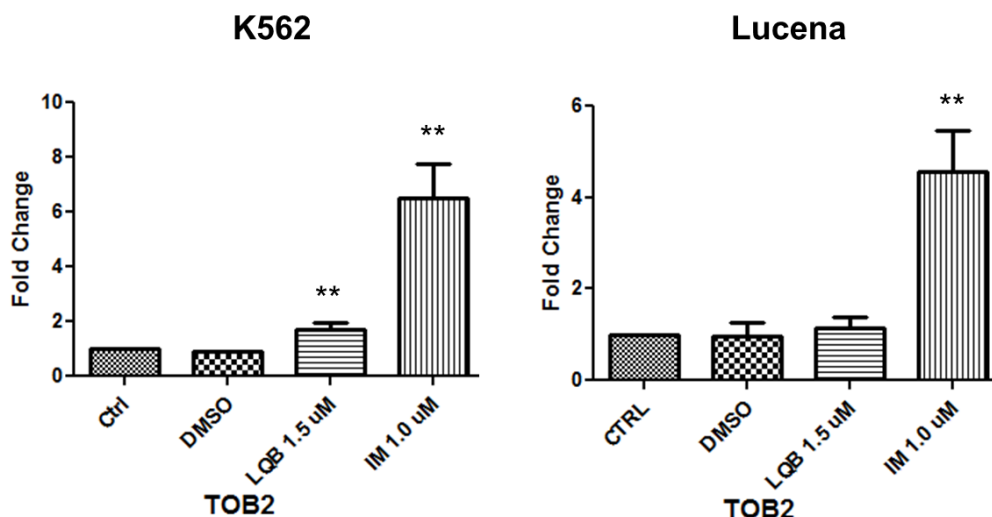


Figura 6.3: Quantificação relativa dos níveis de RNAm, por PCR em tempo real, de TOB2 após exposição aos compostos LQB-118 e imatinibe em linhagens celulares de LMC. Os valores representam a média de três experimentos independentes ($*p < 0,05$).

6.2 LQB-118 modula a localização subcelular de NFκB nas linhagens celulares de LMC

Previamente, demonstramos que os níveis de IκBα, inibidor endógeno de NFκB, aumentavam ou se mantinham constantes frente ao tratamento com LQB-118, em todas as concentrações e tempos de incubação testados (FARIA *et al*, 2015). Estes dados sugeriram que o complexo IκBα–NFκB continuaria a existir e, desta forma, não permitiria a translocação de NFκB para o núcleo para agir como fator de transcrição.

Através de ensaio de imunofluorescência, buscamos avaliar a localização subcelular de NFκB nas linhagens K562 e Lucena, tratadas, e não tratadas (controle) com o composto LQB-118. As células K562 controle (sem tratamento) apresentaram uma localização de NFκB difusa, citoplasmática e nuclear. Por outro lado, a incubação com LQB-118 resultou na localização da proteína NFκB predominantemente citoplasmática, após 24 horas de tratamento com 0,75 μM de LQB-118 (Figura 6.4).

Diferente da linhagem K562, as células Lucena controle (sem tratamento) apresentaram localização nuclear de NF κ B e, após 24 horas de incubação com 3,0 μ M de LQB-118, foi possível observar o predomínio de NF κ B no citoplasma (Figura 6.5).

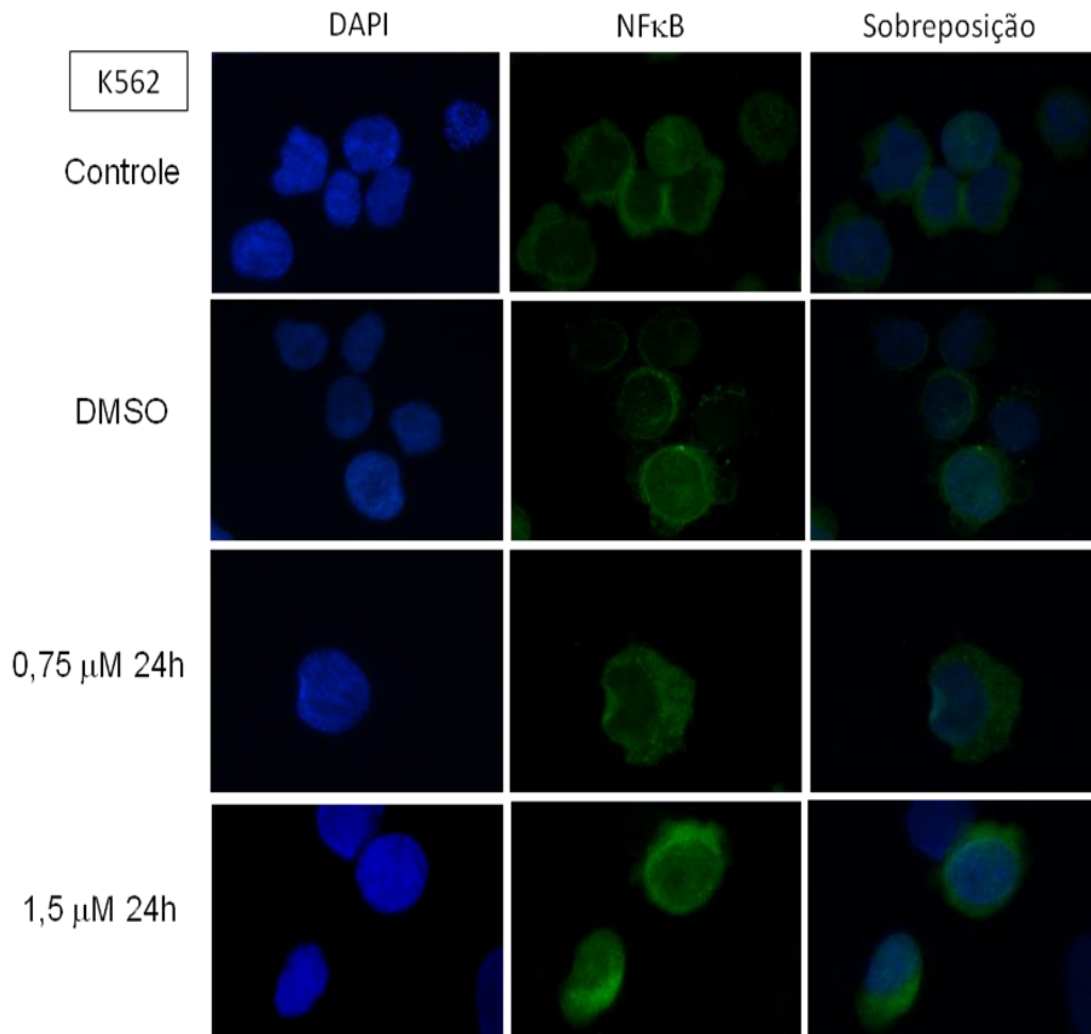


Figura 6.4: Imunofluorescência da proteína NF κ B após 24h de tratamento da linhagem K562 com LQB-118.

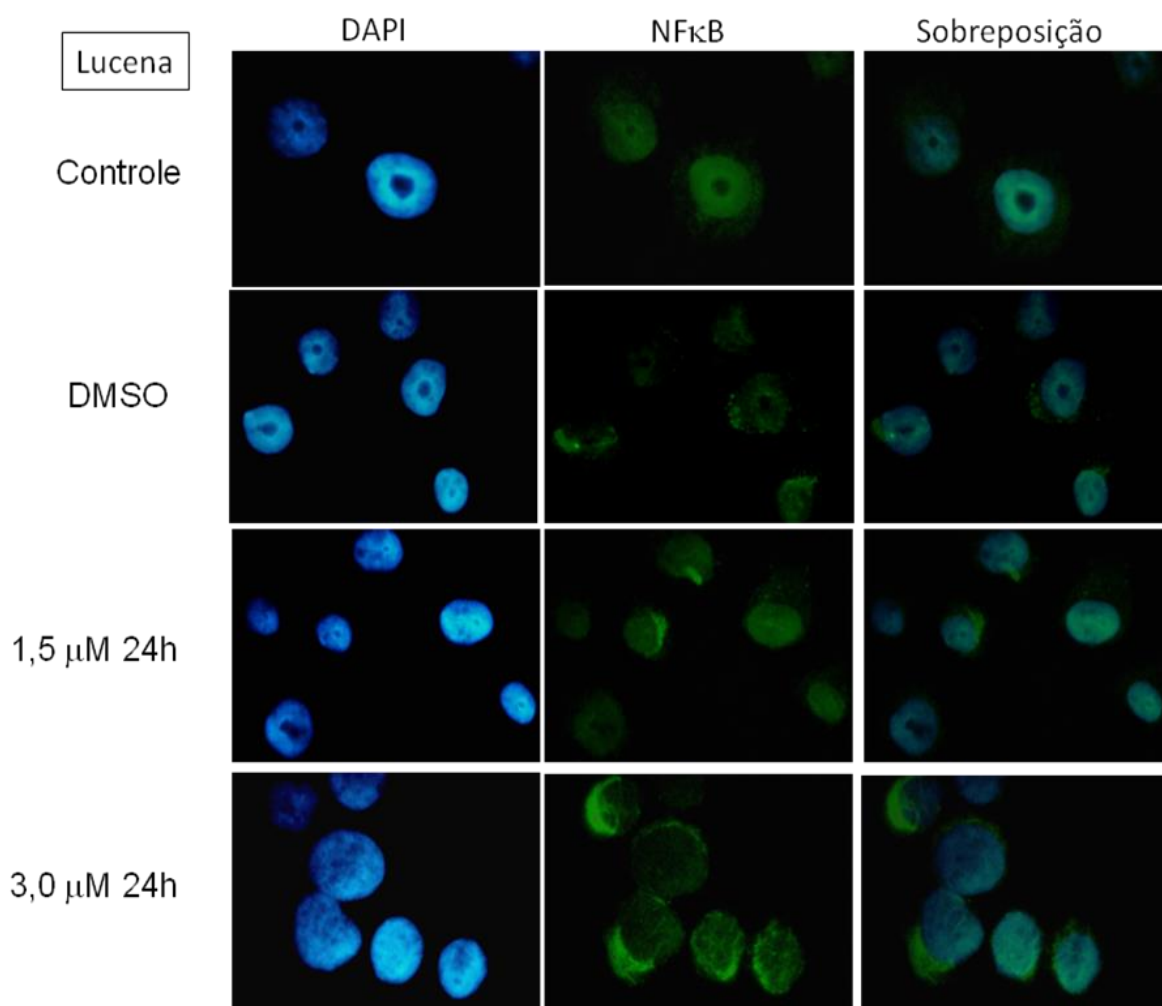


Figura 6.5: Imunofluorescência da proteína NFκB após 24h de tratamento da linhagem K562-Lucena com LQB-118.

A fim de confirmar a localização subcelular de NFκB após tratamento com LQB-118, realizamos o fracionamento das proteínas das linhagens tratadas com o composto e avaliamos por Western blot a expressão de NFκB. Como observado na Figura 6.6, ocorreu uma diminuição da expressão de NFκB (p65) nuclear a partir de 1,5 μM de LQB-118 nas duas linhagens de LMC após tratamento por 24 h.

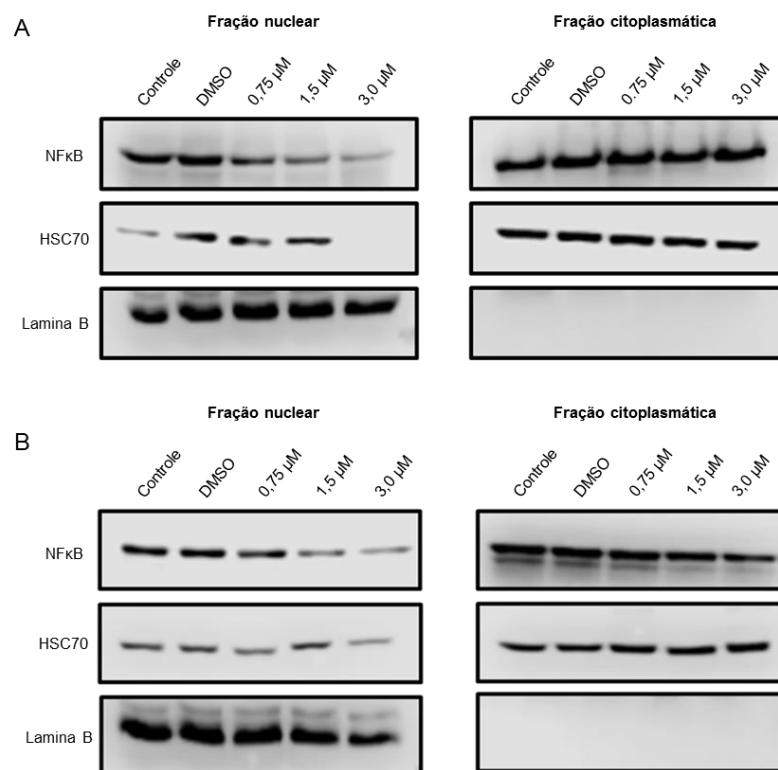


Figura 6.6: Expressão da proteína NF κ B (p65), pela técnica de Western blot, após fracionamento celular nas linhagens de LMC K562 (A) e Lucena (B), tratadas com LQB-118 por 24h.

Estes resultados demonstram que o composto LQB-118 modula a localização nuclear de NF κ B e, desta maneira, pode estar modulando seus genes alvos, como XIAP, survivina e Pgp.

6.3 LQB-118 modula a atividade do proteassoma

Dentre os compostos que agem como inibidores de NF κ B, os inibidores de proteassoma, como o Bortezomibe, têm sido amplamente usados no tratamento de neoplasias (HU *et al.*, 2009; ALBERO *et al.*, 2010). Logo, buscamos avaliar se o LQB-118 agiria como um inibidor de proteassoma, regulando assim a localização subcelular de NF κ B. Para isso, avaliamos a atividade do proteassoma nas linhagens de LMC após 2h de incubação com 3,0 ou 6,0 μ M de LQB-118. Como controle positivo da inibição, tratamos as

células K562 com 10 nM de Bortezomibe (BTZ), um inibidor clássico de proteassoma, pelo mesmo período de tempo. A atividade do proteassoma foi reduzida em aproximadamente 20% e 25% na linhagem K562 tratada com 3,0 e 6,0 μ M de LQB-118, respectivamente (Figura 6.7). Na linhagem Lucena, observamos redução de 5% e 15% na atividade do proteassoma em 3,0 e 6,0 μ M de LQB-118, respectivamente (Figura 6.7).

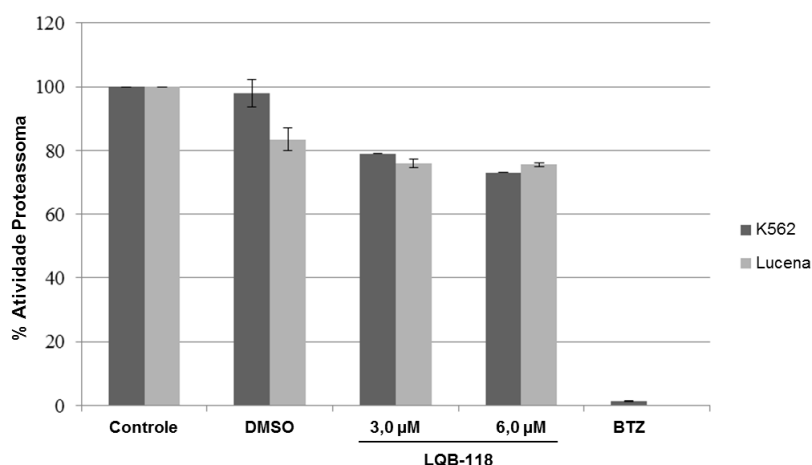


Figura 6.7: Análise da atividade do proteassoma das linhagens de LMC K562 e Lucena, após 2h de tratamento com LQB-118. Bortezomibe (BTZ) foi utilizado como controle positivo da inibição da atividade (10 nM por 2h, apenas na linhagem K562).

Estes resultados demonstraram que embora LQB-118 possa inibir parcialmente a atividade do proteassoma, esta inibição não é suficiente para caracterizá-lo como um inibidor clássico.

Uma vez que observamos a modulação da translocação de NF κ B pelo composto LQB-118, buscamos investigar possíveis vias ascendentes à via de NF κ B que poderiam estar envolvidas nessa regulação. Para isso, avaliamos se a ativação de NF κ B estaria sendo bloqueada a partir de vias como AKT e RAS/RAF/MAPK. Análises por Western blot demonstraram aumento nos níveis de fosforilação de AKT tanto nas células de K562 quanto nas células de Lucena tratadas com LQB-118 por 24 h (Figura 6.8). Após 24 h de incubação com 3,0 μ M de LQB-118, foi possível observar redução da expressão total de AKT em ambas as linhagens de LMC. Além disso, avaliamos os níveis de

expressão de ERK 1/2, e não observamos diferenças na expressão ou fosforilação dessas proteínas após tratamento com o composto nas duas linhagens (Figura 6.8).

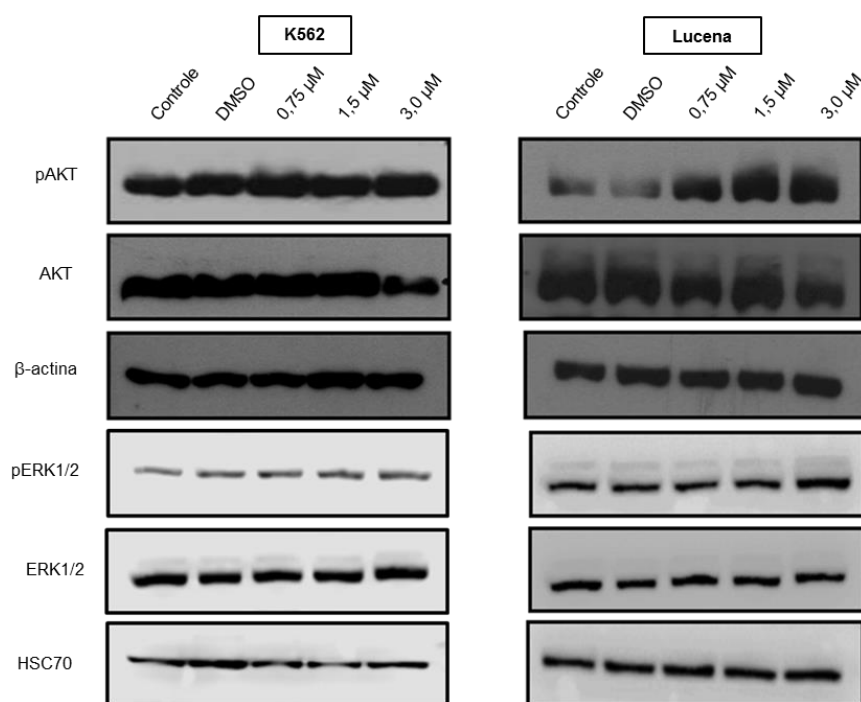


Figura 6.8: Expressão das proteínas AKT, pAKT, ERK 1/2 e pERK 1/2, analisado por Western blotting, após tratamento com LQB-118 por 24h nas duas linhagens de LMC.

6.4 Modulação da expressão de miR-9 e miR-21 pelo composto LQB-118

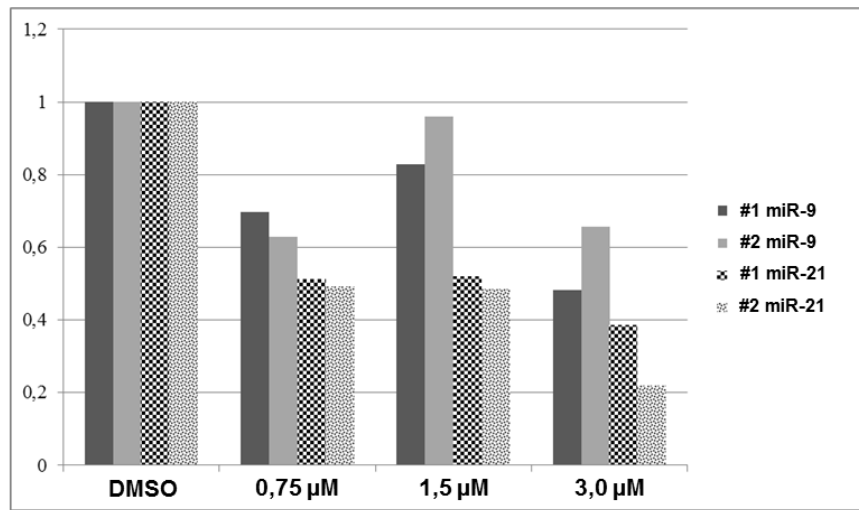
Dado que observamos a modulação da localização de NFκB, sem indícios do envolvimento das vias ascendentes de AKT e MAPK ou inibição da atividade do proteassoma, avaliamos os níveis de expressão de dois miRNAs relacionados ao fator de transcrição NFκB. Para isso, tratamos as linhagens com LQB-118 por 24h e avaliamos os níveis de expressão de miR-9 e miR-21 por PCR quantitativo. Os níveis de expressão, tanto do miR-9 quanto do miR-21 estavam reduzidos na linhagem K562 após tratamento com LQB-118. O miR-9 estava reduzido após exposição a 0,75 e 3,0 µM (diminuição de cerca de 1,5 vezes), não apresentando redução após 1,5 µM de LQB-118. A redução nos níveis de expressão de miR-21 foram mais proeminentes, onde as células tratadas com 0,75 e 1,5 µM apresentaram redução de aproximadamente 2

vezes, enquanto que 3,0 μ M de LQB-118 levou à redução de cerca de 4,5 vezes, em relação às células K562 não-tratadas (Figura 6.9 **A**). Entretanto, na linhagem Lucena, observamos o efeito contrário. As células tratadas com o composto apresentaram aumento na expressão dos miRNAs estudados. A expressão de miR-9 foi aumentada nas células Lucena tratadas com 0,75 μ M (aumento de 1,5 vezes) e 3,0 μ M (aumento de 2 vezes). O mesmo perfil foi observado com o miR-21, sendo observado um aumento de sua expressão nas concentrações de 0,75, 1,5 e 3,0 μ M de LQB-118, de 2, 3,5 e 4 vezes, respectivamente (Figura 6.9 **B**).

Posteriormente, analisamos os níveis proteicos de NF κ B1 (p50) para correlacionar a expressão de miR-9 e seu alvo molecular. Com isso, demonstramos uma redução da expressão de NF κ B1 (p50) na linhagem resistente Lucena tratada com 3,0 μ M LQB-118 (Figura 6.10 **B**), porém não observamos alteração nos níveis proteicos de NF κ B1 na linhagem K562 (Figura 6.10 **A**).

Em conjunto, nossos resultados apontam que a modulação de NF κ B na linhagem de LMC Lucena pode estar relacionada a um evento epigenético envolvendo miR-9.

A



B

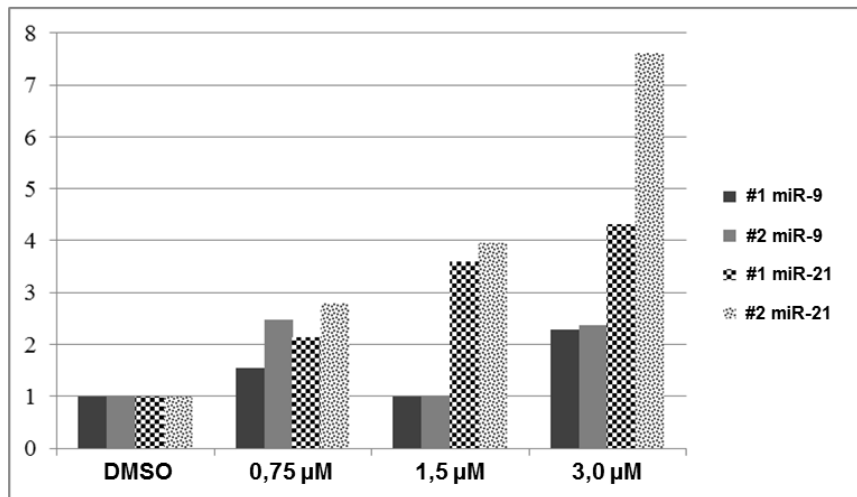


Figura 6.9: **A** – Padrão de expressão de miR-9 e miR-21 após 24h de exposição ao LQB-118 em células K562. **B** - Padrão de expressão de miR-9 e miR-21 após 24h de exposição ao LQB-118 em células Lucena. As expressões dos miRNAs foram normalizadas utilizando RNU6b. Os gráficos demonstram dois experimentos independentes (Exp #1 e Exp #2) por PCR em tempo real, para cada miRNA e linhagem celular.

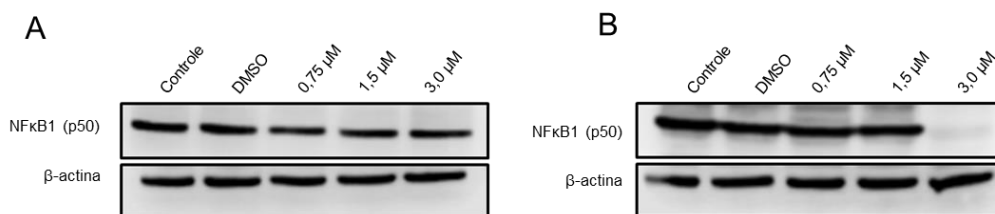


Figura 6.10: **A** – Expressão de NFκB1 (p50) nas células da linhagem K562 após 24h de tratamento com LQB-118. **B** – Expressão de NFκB1 (p50) nas células da linhagem Lucena após 24 h de tratamento com LQB-118. Figura representativa de três experimentos realizados pela técnica de Western blot.

6.5 Modulação da via IGF-1R/AKT/mTOR pelo LQB-118

As análises a partir dos dados obtidos com o microarranjo de DNA também indicaram que a via de sinalização de mTOR estaria inibida nas duas linhagens celulares de LMC após tratamento com o composto LQB-118 (Figuras 6.11 e 6.12). Estudos vêm demonstrando que essa via está intimamente relacionada ao crescimento e sobrevivência celular, assim como está relacionada à resistência ao tratamento em LMC (CARAYOL *et al.*, 2010; REIKVAM *et al.*, 2013, QUENTMEIER *et al.*, 2011).

Nossos resultados demonstraram também que o composto LQB-118 reduziu a expressão da proteína AKT nas duas linhagens de LMC (Figura 6.8) e o mesmo perfil também foi observado em outros modelos, como glioma e LMA (dados ainda não publicados pelo nosso grupo). Por isso, buscamos avaliar os possíveis mecanismos relacionados à modulação de AKT e mTOR mediados pelo LQB-118.

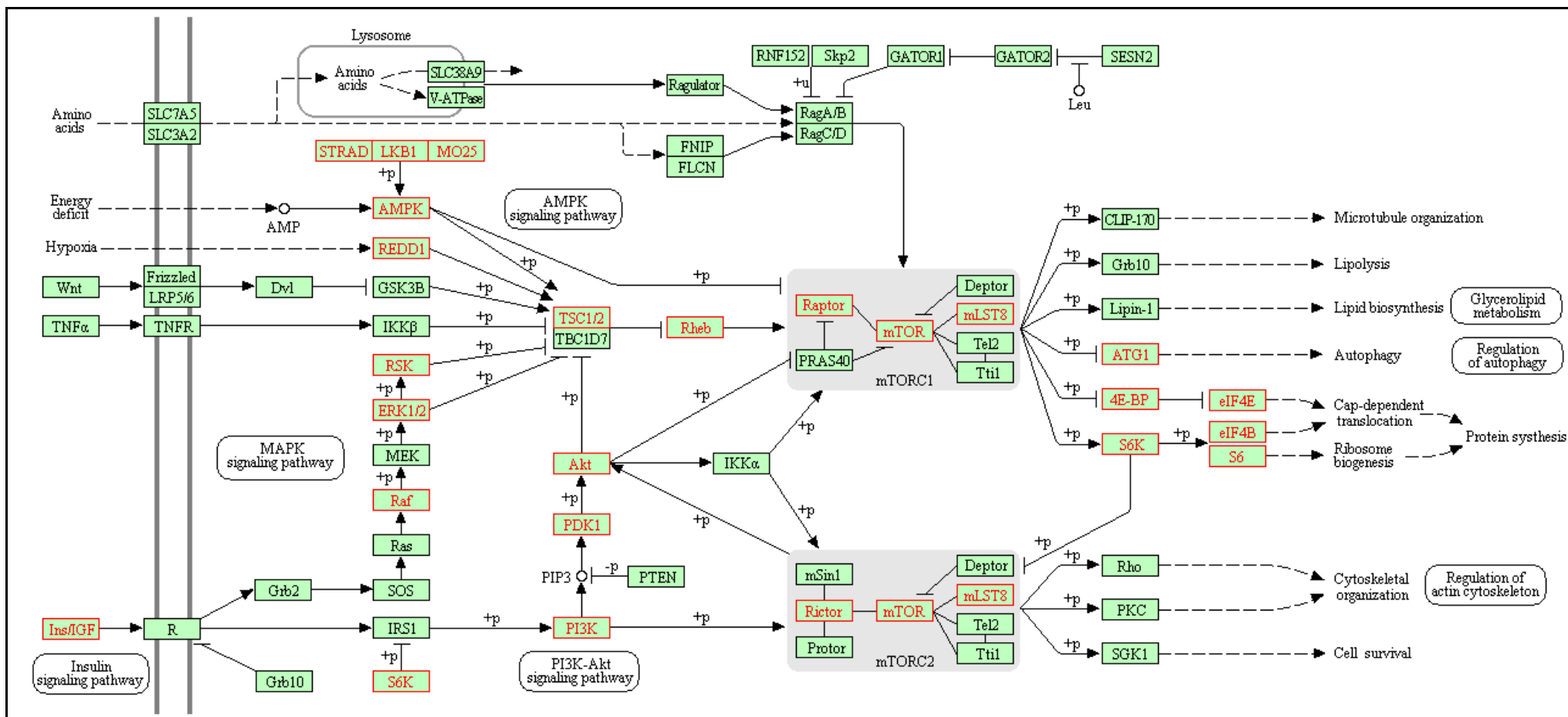


Figura 6.11: Via de sinalização de mTOR da linhagem Lucena após tratamento com LQB-118 (1,5 μ M; 48h). Em vermelho, os genes que se demonstraram diferencialmente expressos (<http://www.genome.jp/>).

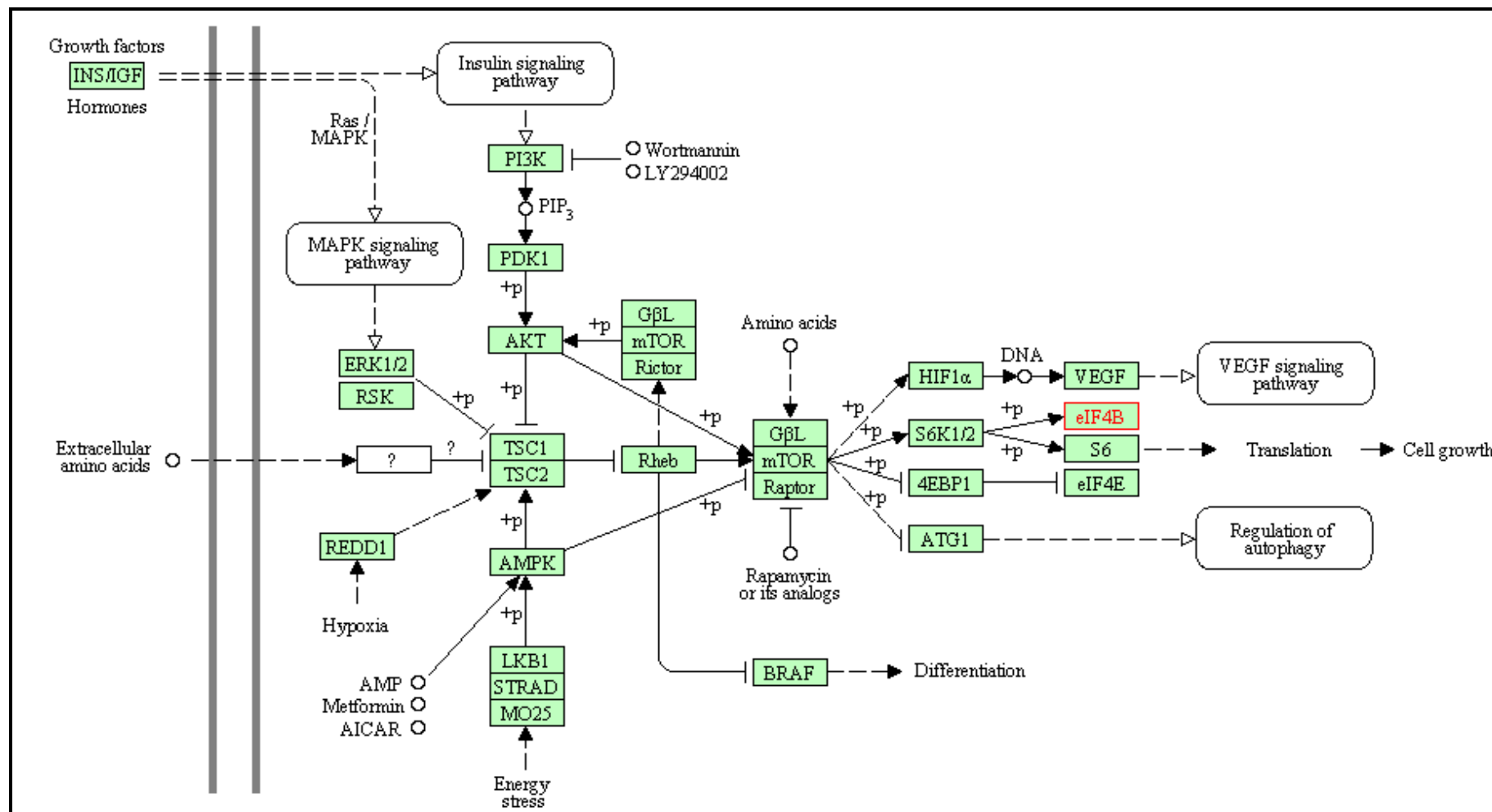


Figura 6.12: Via de sinalização de mTOR da linhagem K562 após tratamento com LQB-118 (1,5 μ M; 48h). Em vermelho, os genes que se demonstraram diferencialmente expressos (<http://www.genome.jp/>).

Além da expressão de AKT, avaliamos a expressão do receptor IGF1R, um conhecido modulador da via de PI3K/AKT e a expressão de mTOR, proteína tanto alvo quanto moduladora de AKT (SHI *et al*, 2010). Após 24h de tratamento com LQB-118 foi observada redução nos níveis de IGF1R e de mTOR total nas linhagens K562 e Lucena (Figura 6.13).

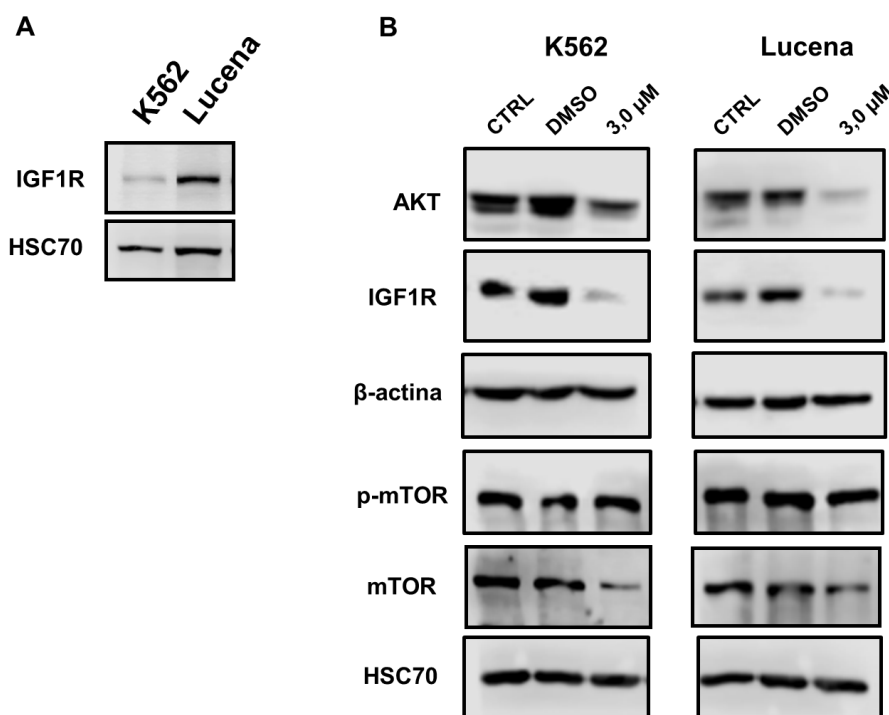


Figura 6.13: **A** – Expressão basal de IGF1R nas linhagens K562 e Lucena. **B** – Expressão das proteínas AKT, IGF1R, p-mTOR e mTOR nas linhagens K562 e Lucena após 24 h de tratamento com LQB-118. Figura representativa de três experimentos de western blot.

Nossos dados sugerem que o tratamento com o composto LQB-118 leva a uma redução da expressão proteica de IGF1R, AKT e mTOR, mas como a proteína BCR-ABL continua ativa, a ativação (fosforilação) das vias é sustentada até que não haja mais proteína total a ser fosforilada.

A diminuição nos níveis de expressão total de AKT, observada após tratamento com LQB-118, poderia estar associada a alguma regulação pós-transcricional. Desta maneira, avaliamos a expressão dos miRNAs da família miR-29 (a, b e c), onde AKT parece ser um possível alvo dessa família

(BERTACCHINI et al, 2015). A expressão dos miRNAs da família miR-29 foi avaliada por PCR em tempo real, após 24h de exposição ao LQB-118. A expressão de miR-29a foi ligeiramente aumentada na linhagem K562 (Figura 6.14 **A**) e foi diminuída na linhagem Lucena (Figura 6.14 **B**) após tratamento com LQB-118.

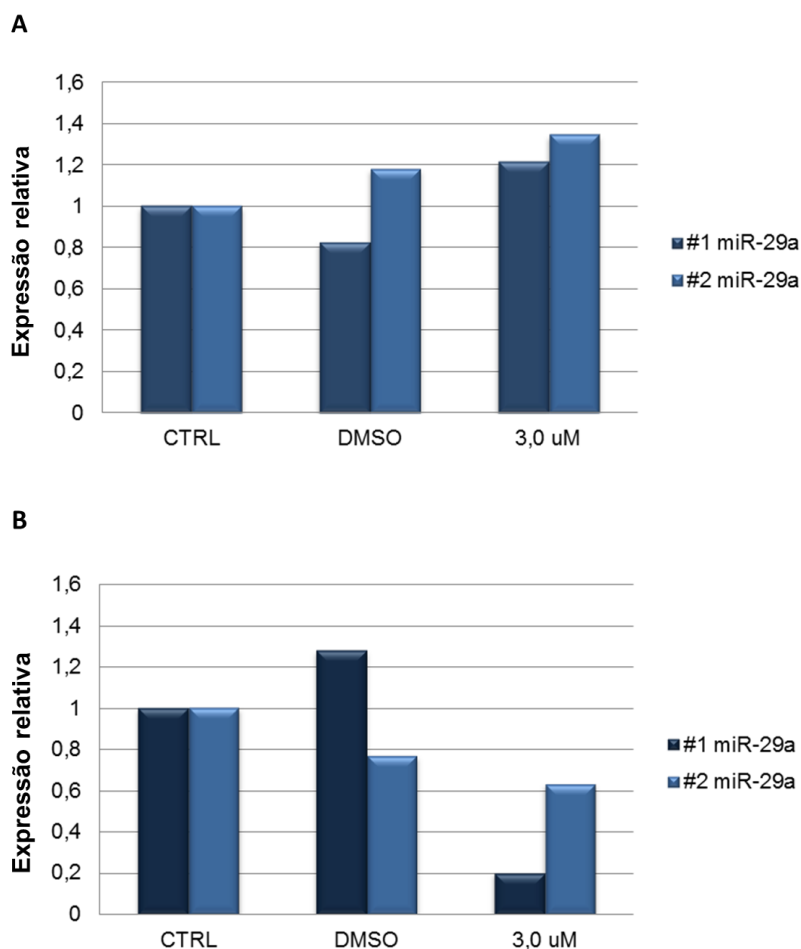


Figura 6.14: Padrão de expressão de miR-29a após 24h de exposição ao LQB-118. **A** – em células K562. **B** - em células Lucena. As expressões dos miRNAs foram normalizadas utilizando RNU6b. Os gráficos demonstram dois experimentos independentes (Exp #1 e Exp #2) por PCR em tempo real, para cada miRNA e linhagem celular.

Os níveis de miR-29b não são alterados na linhagem K562 e estão diminuídos na linhagem Lucena (Figura 6.15 **A** e **B**). Nas duas linhagens de LMC, observou-se diminuição nos níveis de miR29c (Figura 6.16 **A** e **B**).

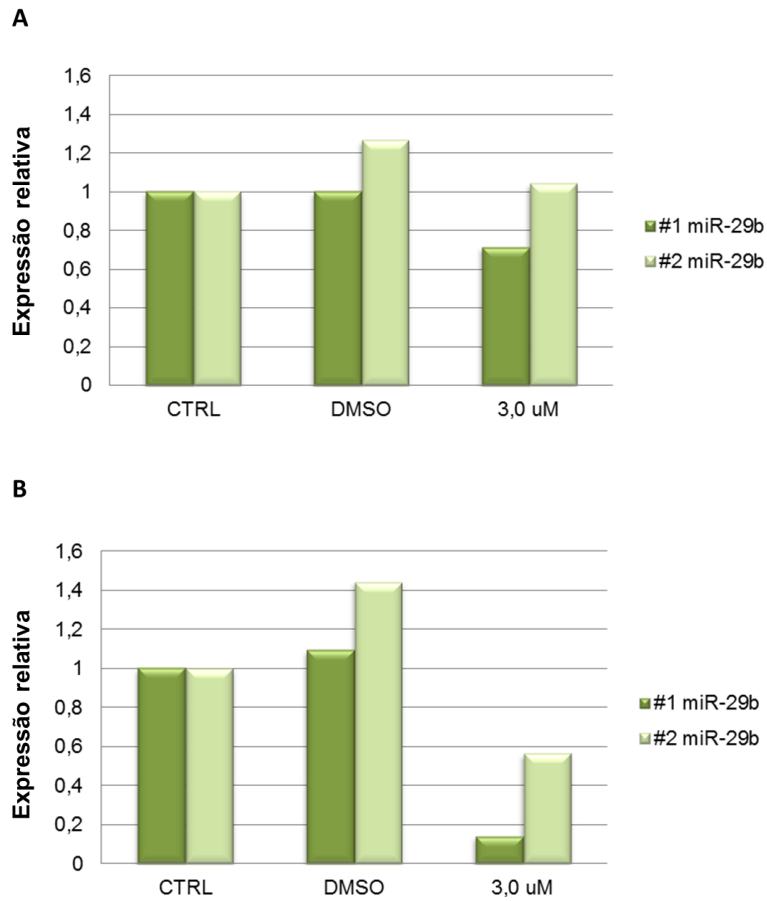


Figura 6.15: Padrão de expressão de miR-29b após 24h de exposição ao LQB-118 **A** –em células K562. **B** - em células Lucena. As expressões dos miRNAs foram normalizadas utilizando RNU6b. Os gráficos demonstram dois experimentos independentes (Exp #1 e Exp #2) por PCR em tempo real, para cada miRNA e linhagem celular.

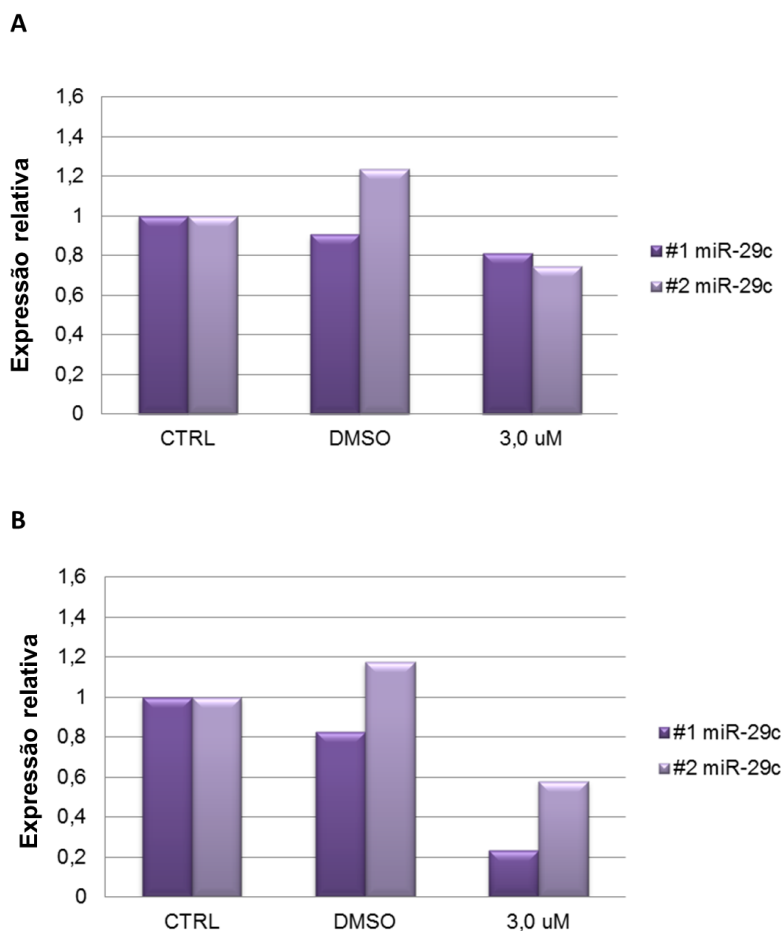


Figura 6.16: Padrão de expressão de miR-29c após 24h de exposição ao LQB-118 **A** –em células K562. **B** - em células Lucena. As expressões dos miRNAs foram normalizadas utilizando RNU6b. Os gráficos demonstram dois experimentos independentes (Exp #1 e Exp #2) por PCR em tempo real, para cada miRNA e linhagem celular.

6.6 Efeito da combinação do LQB-118 com o imatinibe nas linhagens LMC.

Os TKIs capazes de sobrepujar a resistência dependente de BCR-ABL, exceto a mutação T315I, são amplamente utilizados. Contudo, os mecanismos independentes de BCR-ABL envolvidos na resistência aos TKIs podem ser importantes alvos para novos compostos antitumorais. Nesse contexto, o uso de novos compostos indutores de morte celular, como o LQB-118, combinado a drogas utilizadas na prática clínica, tal como o Imatinibe, pode oferecer benefícios a esse grupo de pacientes resistentes à quimioterapia convencional.

Os dados demonstrados até o momento apontam para uma regulação do conteúdo proteico pelo LQB-118, e não por uma regulação da fosforilação das vias estudadas. Essas vias podem estar sendo mantidas ativas estimuladas pela proteína BCR-ABL que continua ativa, uma vez que o composto LQB-118 não inibe a atividade tirosina quinase da mesma (MAIA *et al*, 2011). Para isso, buscamos avaliar a eficiência da combinação do novo composto LQB-118 com o imatinibe nas linhagens de LMC. Dessa forma, realizamos ensaios de viabilidade e de detecção de morte celular.

Dados prévios do nosso grupo demonstraram que as linhagens K562 e Lucena apresentam redução na viabilidade celular quando tratadas com os compostos LQB-118 e imatinibe (MAIA *et al*, 2011). Buscamos então, avaliar se haveria efeito potencializador ao combinarmos o composto LQB-118 com imatinibe, nas concentrações de 0,75 e 1,5 μM de LQB-118; e 0,2 e 0,4 μM de imatinibe. A partir daí foi possível observar, embora de maneira não significativa, uma pequena diminuição na viabilidade celular apenas na combinação com a maior concentração de LQB-118 (1,5 μM), nas duas linhagens de LMC. As células K562 apresentaram uma redução de 47% e 76% nas combinações com 0,2 μM e 0,4 μM de imatinibe por 48h, respectivamente (Figura 6.17 **A**). O mesmo perfil foi demonstrado na linhagem Lucena, com uma redução da viabilidade de 46% e 55% nas combinações de 0,2 μM e 0,4 μM de imatinibe em 48h, respectivamente (Figura 6.17 **B**).

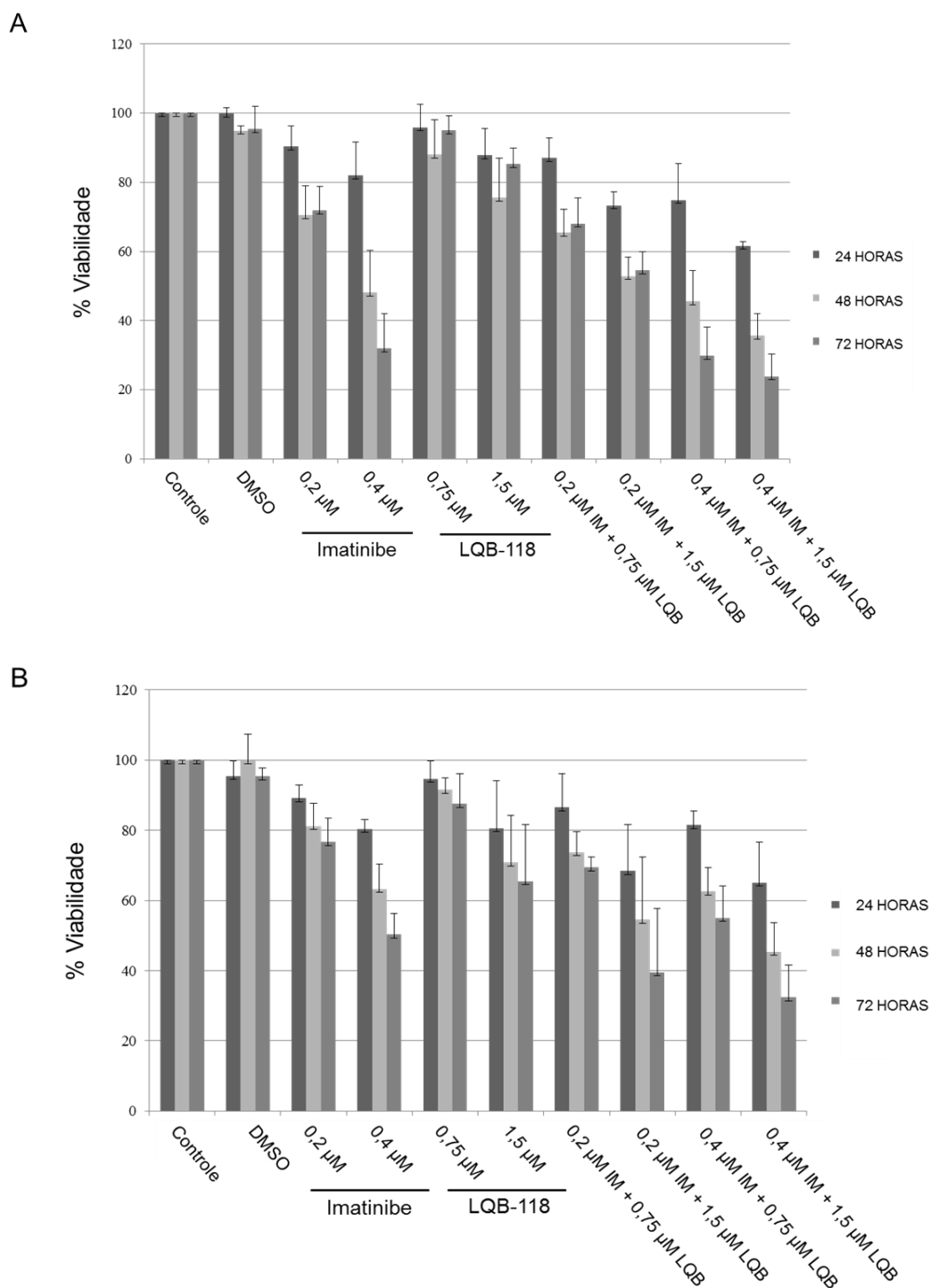


Figura 6.17: Viabilidade celular das linhagens K562 (A) e Lucena (B) após incubação com a combinação do LQB-118 e Imatinibe, avaliada pelo ensaio de MTT. Porcentagem de células viáveis da linhagem K562 após incubação com diferentes concentrações do LQB-118, Imatinibe e combinação por 24, 48 e 72h. Média de três experimentos independentes \pm desvio padrão. IM – imatinibe; LQB – LQB-118.

O ensaio de anexina V/PI por citometria de fluxo foi utilizado para avaliar se a redução da viabilidade observada no ensaio por MTT é referente à indução de morte celular, após a combinação do composto LQB-118 na concentração de 1,5 μM e Imatinibe nas concentrações de 0,2 μM e 0,4 μM por 48 horas. Na linhagem K562, observamos um aumento no número de células anexina V⁺ após tratamento combinado com os compostos, em relação às células tratadas com os compostos de maneira isolada. Nossos dados demonstram um índice de apoptose de aproximadamente 20% na combinação de 1,5 μM de LQB- 118 com 0,2 μM de Imatinibe e aproximadamente 57%, com 0,4 μM de imatinibe, combinado com LQB- 118 na mesma concentração (Figura 6.18 **A** e **B**). Entretanto, a linhagem Lucena não apresentou o mesmo perfil, não tendo induzido apoptose diferenciada em relação às células tratadas com cada composto isoladamente (Figura 6.19 **A** e **B**).

Dado que na concentração de 1,5 μM de LQB-118 não foi observada alteração, tanto na viabilidade celular quanto nos níveis de apoptose da linhagem Lucena, buscamos avaliar se o mesmo perfil de indução de apoptose ocorre após a combinação de uma concentração superior de LQB-118 (3,0 μM) às mesmas concentrações de imatinibe anteriormente testadas (0,2 e 0,4 μM). Para isso, as células K562 e Lucena foram incubadas por 48h com os compostos combinados e de maneira isolada, e posteriormente marcadas com Anexina V/PI. Após análise, observamos que o aumento na concentração de LQB-118 para 3,0 μM induziu morte celular nas duas linhagens de LMC, após combinação com 0,4 μM de imatinibe de 55% e 39% para K562 e Lucena, respectivamente (Figura 6.20).

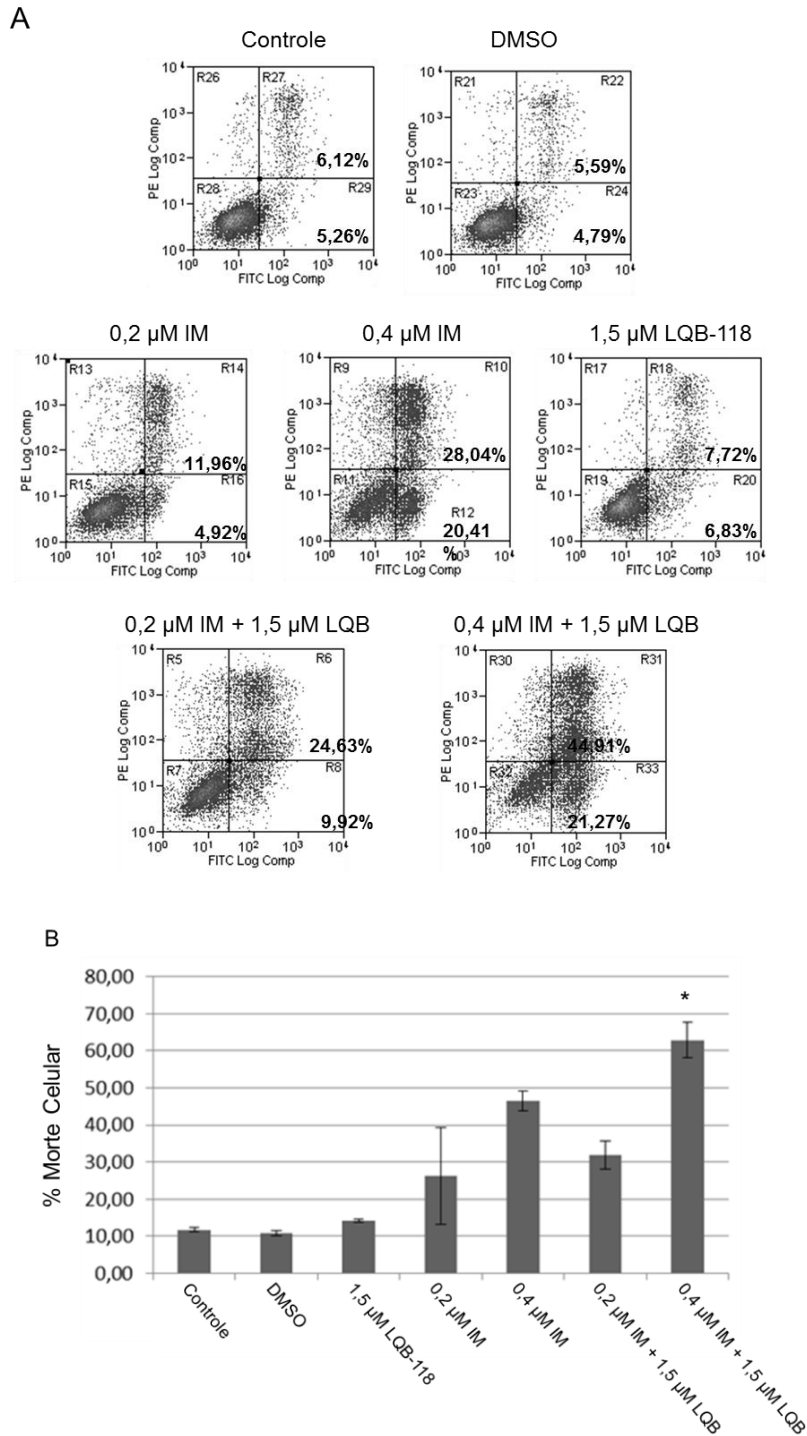


Figura 6.18: **A** - Dot-plot representativo do ensaio de morte celular da linhagem K562 após a combinação dos compostos. **B** – Porcentagem de células anexina V⁺ na linhagem K562 após incubação com a 1,5 μM de LQB-118 e 0,2 e 0,4 μM de Imatinibe por 48h. Média de três experimentos independentes. * $p < 0,05$. IM – imatinibe; LQB – LQB-118.

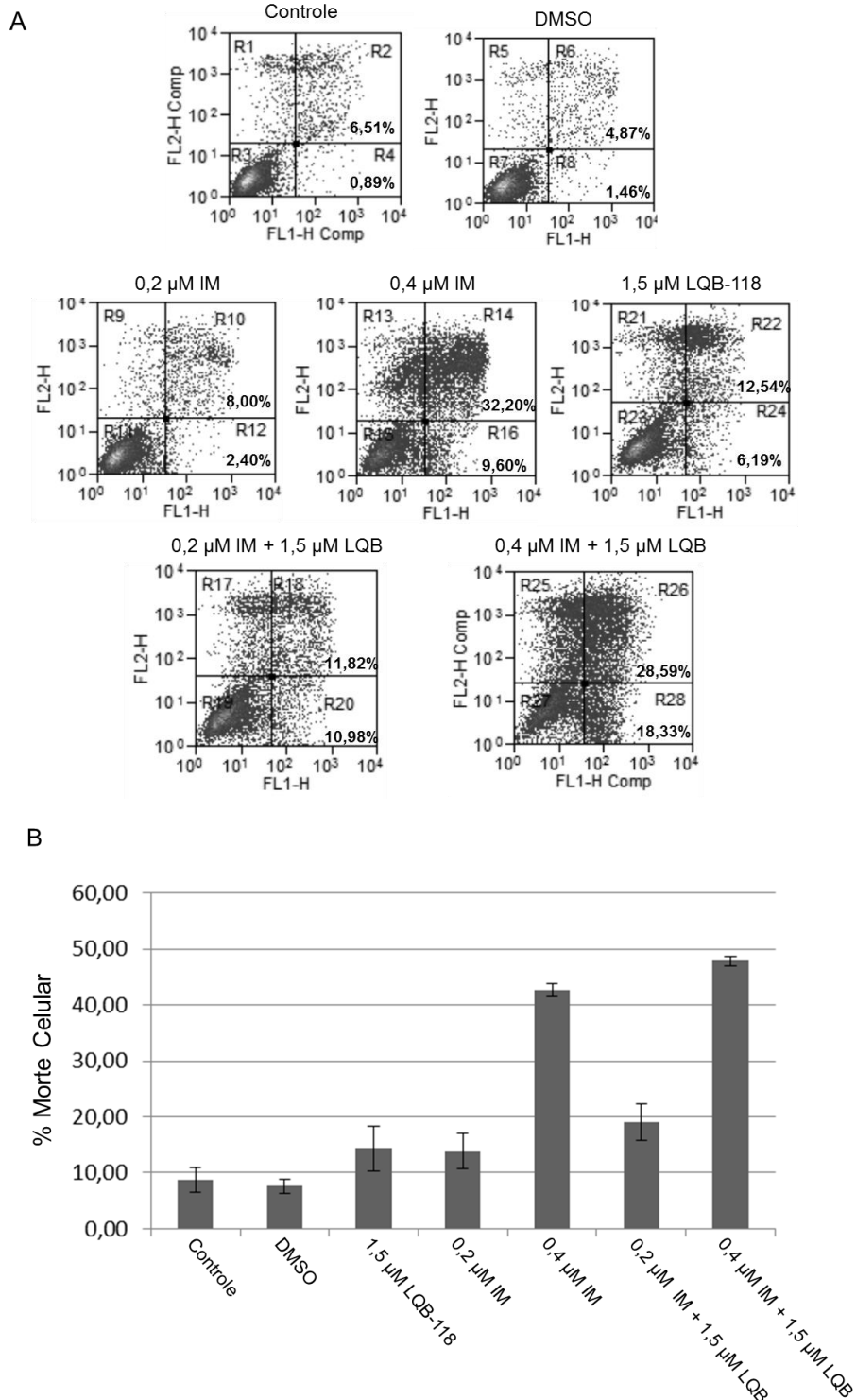


Figura 6.19: **A** - Dot-plot representativo do ensaio de morte celular da linhagem Lucena após a combinação dos compostos. **B** – Porcentagem de células anexina V⁺ na linhagem Lucena após incubação com a 1,5 μM de LQB-118 e 0,2 e 0,4 μM de Imatinibe por 48h. Média de três experimentos independentes. IM – imatinibe; LQB – LQB-118.

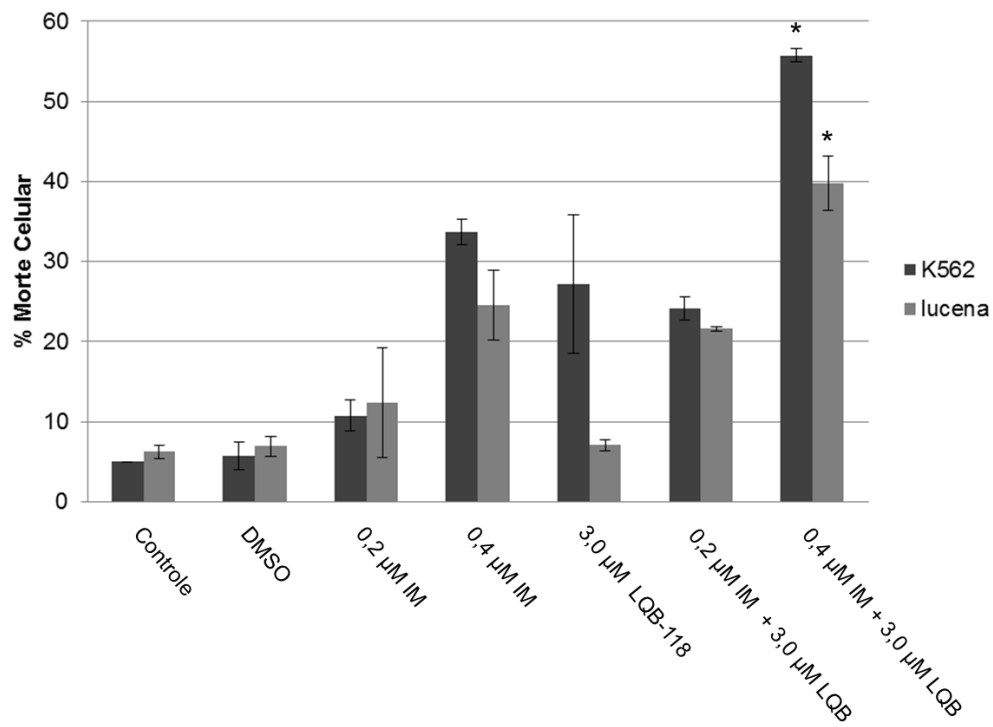


Figura 6.20: Porcentagem de células anexina V⁺ nas linhagens K562 e Lucena após incubação com a 3,0 μM de LQB-118 e 0,2 e 0,4 μM de Imatinibe por 48h. Média de três experimentos independentes. $p < 0,05$. IM – imatinibe; LQB – LQB-118.

7. Discussão

Na LMC, a oncoproteína BCR-ABL ativa NFκB, levando a regulação transcricional de diversos genes, como *c-myc*, que é necessário para transformação das células BCR-ABL⁺ e *XIAP* e *Survivina*, que auxilia no crescimento inibindo a apoptose (CILLONI *et al.*, 2007; BRAUN *et al.*, 2006). Alterações em NFκB e em suas vias de sinalização de ativação ascendentes estão envolvidas na carcinogênese, progressão da doença e resistência ao tratamento (LU e STARK, 2004). O bloqueio de NFκB pode levar as células tumorais a cessarem a proliferação ou a se tornarem mais sensíveis aos agentes antitumorais. Logo, compostos capazes de inibir a ativação de NFκB têm potencial terapêutico de inibir a carcinogênese (LUQMAN e PEZZUTO, 2010).

A ativação da via PI3K/AKT é uma das principais vias onde BCR-ABL exerce seus efeitos anti-apoptóticos, ativando a transcrição de genes anti-apoptóticos através da regulação de NFκB (DANISZ e BLASIAK, 2013; GASPARINI *et al.*, 2014). O tratamento com LQB-118 modulou a localização de NFκB, mas de maneira independente de AKT, uma vez que observamos aumento nos níveis de fosforilação de AKT após exposição das células de LMC ao LQB-118. Estas observações sugerem que a via de AKT está provavelmente ativada mediante estímulo por BCR-ABL, já que o composto LQB-118 não inibe a atividade desta tirosina quinase. Dentre as diversas vias reguladas por BCR-ABL, a via de Ras/Raf/MAPK também é relevante para o potencial de transformação e ativação de NFκB em células BCR-ABL⁺ (FUCHS, 2010; HENTSCHEL *et al.*, 2011; FREDERICKS e REN, 2013). As linhagens de LMC tratadas com LQB-118 não apresentaram alteração nos níveis de expressão ou fosforilação de ERK1/2, sugerindo que a via de Ras não é alvo do composto LQB-118. Desta maneira, nossos dados indicam que as vias de AKT e MAPK não estão envolvidas na regulação de NFκB pelo LQB-118.

Nossos dados demonstraram a modulação da expressão de miR-9 e -21. Os elevados níveis de miR-9 observados na linhagem resistente Lucena pode contribuir para a inibição de NFκB uma vez que a subunidade NFκB1

(p50) é um dos alvos de miR-9 (FREDERICKS e REN, 2013). Estes resultados foram corroborados pela redução da expressão de NFκB1 (p50), após tratamento com LQB-118. O miR-21 tem sido descrito como um alvo e um regulador de NFκB (MA et al., 2011), logo os níveis elevados de miR-21 nas células de Lucena podem estar relacionados à modulação de NFκB. Na linhagem K562, a diminuição nos níveis de expressão de miR-9, seguido pela estabilização dos níveis proteicos de NFκB1, indicam que a modulação de NFκB nas células de K562 não está associada a esses miRNAs. Entretanto, a redução de miR-21 observada na linhagem K562 pode ser importante para a indução de apoptose pelo LQB-118, como observado anteriormente (MAIA *et al.*, 2011), uma vez que miR-21 é um onco-miR bem descrito.

Diferentes estudos demonstraram atividade de NFκB em células Bcr-Abl⁺ nas fases crônica e blástica, com um aumento progressivo dessa atividade na progressão da doença (CILLONI *et al.*, 2007). Esses dados evidenciam a importância da atividade de NFκB na LMC, tornando essa via um potencial alvo terapêutico. Alguns trabalhos conseguem demonstrar que a associação de inibidores da via de NFκB com imatinibe é capaz de sobrepujar a resistência observada em alguns pacientes (CILLONI *et al.*, 2006; DUNCAN *et al.*, 2008; LOUNNAS *et al.*, 2009). Desta maneira, nossos dados mostram que a modulação de NFκB pelo composto LQB-118 parece ser um importante evento na resposta a esse composto. Esses dados foram publicados na revista *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry* (FARIA *et al.*, 2015).

BCR-ABL é uma “super tirosina quinase” capaz de ativar diversas vias de sinalização pró sobrevivência. Diversos substratos e proteínas adaptadoras já foram identificadas de modo a melhor elucidar os mecanismos moleculares que caracterizam a LMC. A inibição de BCR-ABL pelos TKIs resulta numa inibição consecutiva de vias reguladas por ela como a via PI3K/AKT/mTOR. Entretanto, mesmo com a proteína BCR-ABL inibida, é possível observar a manutenção da sobrevivência das células leucêmicas mediada pela via PI3K/AKT/mTOR (MACHADO-NETO *et al.*, 2011; AIRIAU *et al.*, 2013).

A via de PI3K/AKT/mTOR tem sido demonstrada como uma via frequentemente desregulada em malignidades hematológicas e associada a

um pior prognóstico. Com isso, diversos trabalhos vêm sugerindo membros dessa via, como AKT e mTOR, como promissores alvos terapêuticos. O uso de inibidores de PI3K/mTOR, como NVPBEZ235, sensibilizam as células tronco de LMC ao nilotinibe, aumentando sua citotoxicidade em células resistentes com BCR-ABL mutado. Ainda, a combinação entre dasatinibe com rapamicina (inibidor de mTOR) ou LY294002 (inibidor de PI3K) também induzem as células a apoptose. (QUENTMEIER *et al*, 2011; AIRIAU *et al*, 2013; BERTACCHINI *et al*, 2015; GAO *et al*, 2016). Em LMC, foi demonstrado que a inibição de mTORC1 possui efeito sinérgico com imatinibe na indução de apoptose, e uma vez inibindo mTORC1 e mTORC2 simultaneamente, esse efeito foi observado em células que apresentam a mutação T315I no gene BCR-ABL (AIRIAU *et al*, 2013; DINNER e PLATANIAS, 2016). Contudo, alguns trabalhos demonstram que o efeito com uso de rapamicina de maneira isolada não é muito eficiente em pacientes resistentes ao imatinibe e em células tronco hematopoiéticas na fase blástica da doença, apontando que esta via pode estar associada à resistência aos TKIs (DINNER e PLATANIAS, 2016). Neste trabalho, observamos a diminuição nos níveis de expressão das proteínas AKT e mTOR após tratamento com LQB-118. Entretanto, observamos aumento da fosforilação das mesmas, sugerindo que a proteína BCR-ABL continua ativando a via, uma vez que não é alvo do composto LQB-118.

IGF-1R, receptor com capacidade de ativar a via PI3K/AKT/mTOR, está expresso em células hematopoiéticas e sua sinalização promove a proliferação e sobrevivência dessas células (SHI *et al*, 2010). Na LMC, a expressão da proteína IGF-1R é maior em células de pacientes na crise blástica, bem como o bloqueio dessa via é capaz de induzir morte celular em células resistentes ao imatinibe (SHI *et al*, 2010). Além de IGF-1R, uma de suas proteínas adaptadoras IRS1 parece desempenhar um papel oncogênico, podendo, por si só, induzir a transformação maligna, sendo descrito como constitutivamente fosforilado e associado à BCR-ABL em células da linhagem K562. Tanto a inibição de IGF-1R quanto de IRS1 diminuíram a proliferação de células leucêmicas, bem como a diminuição da ativação do eixo PI3K/AKT/mTOR na linhagem de LMC K562 (MACHADO-NETO *et al*, 2011). O tratamento com o

composto LQB-118 reduziu a expressão de IGF-1R, sugerindo um bloqueio da ativação da via, que deverá ser posteriormente explorado.

Ding e colaboradores descreveram que BEZ235, um inibidor dual de PI3K/mTOR, reduz a atividade de PI3K e mTOR a partir da competição pelo sítio de ligação do ATP dessas enzimas. Com isso, as células tratadas com esse inibidor apresentam parada no ciclo celular e são induzidas a apoptose, e esse efeito é potencializado quando BEZ235 é utilizado em combinação com nilotinib. A principal razão pelos efeitos observados após a inibição de PI3K/mTOR pelo BEZ235 foi o bloqueio da maquinaria de tradução, levando a uma rápida redução dos níveis proteicos da proteína antiapoptótica MDM2. (DING *et al*, 2013; OKABE *et al*, 2014). De maneira semelhante, observamos uma redução nos níveis proteicos de IGF-1R, AKT e mTOR após o tratamento com o composto LQB-118, sugerindo que o composto possa bloquear a maquinaria de tradução das células de LMC.

TOB2 é um membro da família anti-proliferativa BTG/Tob, sendo um possível candidato a supressor tumoral, e é muito similar ao membro da mesma família Tob1 (WINKLER, 2010). A proteína TOB2 apresenta atividade anti-proliferativa e essa capacidade de supressão do crescimento celular parece estar associada a sua função de amplificar a deadenilação de RNAs mensageiros alvos (EZZEDDINE *et al*, 2012). Além disso, já foi demonstrado que a superexpressão de TOB induz parada em G0/G1 do ciclo celular, através da supressão da expressão de ciclina D1 (ITO *et al.*, 2005; FENG *et al*, 2011). Em tumores de mama e tireóide, por exemplo, sua expressão está diminuída e a inativação por fosforilação, mediada por ERK1/2 e AKT, está aumentada (O'MALLEY *et al.*, 2009; ITO *et al.*, 2005). A redução ou perda da expressão de TOB estão relacionadas à progressão tumoral em câncer de mama, e sua atividade antitumoral parece ocorrer a partir da sua função de amplificar a deadenilação de RNAs mensageiros alvos (EZZEDDINE *et al*, 2012). Além disso, TOB atua na regulação do ciclo celular, agindo como um repressor transcricional de ciclina D1, induzindo um acúmulo de células em G1. A superexpressão de TOB também está relacionada com a diminuição da expressão de p27, Bcl-2 e NFκB, assim como na regulação negativa da fosforilação das proteínas proliferativas ERK1/2 e Crkl (O'MALLEY *et al.*, 2009;

FENG *et al.*, 2011). Até o momento, não há relatos na literatura sobre TOB2 no contexto da LMC. Portanto, o aumento expressivo de *TOB2*, observado após o tratamento com imatinibe nas duas linhagens de LMC sugere que esta molécula pode ser um importante participante na resposta ao imatinibe. Além disso, o aumento de *TOB2* observado na linhagem K562 após tratamento com LQB-118 corrobora com a diminuição da expressão das proteínas IGF-1R, AKT e mTOR. Dessa forma, podemos sugerir que TOB2 atua como um regulador da produção proteica dessas moléculas.

MiRNAs desempenham um importante papel na regulação de diversas funções celulares, como proliferação e diferenciação. A desregulação de miRNAs tem sido descrita em uma variedade de neoplasias hematológicas. Além disso, miRNAs são importantes reguladores da via IGF-1R/PI3K/AKT/mTOR, sugerindo miRNAs como possíveis alvos terapêuticos na leucemia.

A família miR-29 abrange três membros, miR-29a, -29b e -29c que funcionam como supressores tumorais em diferentes tipos tumorais, incluindo leucemias. Os níveis dos miR-29 são menores em pacientes com LMC quando comparado voluntários saudáveis. Ainda, foi demonstrado que miR-29b reduz a expressão de ABL1 e BCR-ABL, bem como reduz a proliferação e induz apoptose em K562 (KOLLINEROVA *et al.*, 2014). Os miR-29 regulam proliferação e apoptose a partir da inibição do RNAm de AKT em diversos modelos. Uma vez que a via de PI3K/AKT/mTOR é uma importante via de sinalização na LMC, terapias que induzem miRNAs que regulam membros dessa via parecem promissoras (BERTACCHINI *et al.*, 2015). Neste trabalho, buscamos avaliar a expressão de miR-29a, -29b e -29c, uma vez que observamos diminuição da expressão de AKT. De maneira contrária à hipótese, o tratamento com LQB-118 reduziu ou não alterou a expressão dos miRNAs nas duas linhagens de LMC. Existem poucos estudos a respeito do decaimento dos miRNAs, inclusive dos mR-29s. A meia vida dos miRNAs pode durar vários dias a poucas horas (AMODIO *et al.*, 2015). Nossa observação com relação à modulação da expressão dos miR-29s pelo LQB-118 pode estar relacionada a sua meia vida e avaliações em tempos mais precoces se faz

necessário para refutar ou confirmar a sua participação na resposta a este composto.

Os dados obtidos na literatura indicam que a ativação dessas moléculas e vias de sinalização, mediadas ou não pela proteína BCR-ABL, levam a transformação maligna das células e é responsável pelo fenótipo leucêmico. Ainda, indicam que a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR é um importante mecanismo de sobrevivência e resistência ao tratamento. Com isso, uma das estratégias para sobrepujar a resistência ao tratamento envolve uma terapia combinada com o objetivo de inibir tanto a proteína BCR-ABL quanto vias de sinalização alternativas nas células leucêmicas. O tratamento dual utilizando TKIs e inibidores de membros da via IGF-1R/PI3K/AKT/mTOR tem apresentado resultados promissores *in vitro* (MACHADO-NETO *et al*, 2011; STOKLOSA *et al*, 2013; DINNER e PLATANIAS, 2016).

Diversos trabalhos vêm demonstrando que combinações envolvendo TKIs apresentam resultados promissores. Combinações entre compostos de origem vegetal, como o α -bisabolol, e imatinibe ou nilotinibe induzem toxicidade preferencial contra células tumorais, apresentando efeito sinérgico em linhagens BCR-ABL positivas (BONIFACIO, *et al.*, 2012). Além de compostos naturais, a combinação entre TKIs e carfilzomibe, um inibidor de proteassoma, também demonstrou efeito sinérgico em modelos de LMC (CRAWFORD *et al*, 2014). Neste trabalho, observamos que a combinação do composto LQB-118 com o TKI Imatinibe, leva a redução da viabilidade celular pelo ensaio de MTT nas duas linhagens de LMC (K562 e Lucena) além de induzir maiores níveis de apoptose na linhagem K562, porém sem alteração na linhagem Lucena na menor concentração de LQB-118. Contudo, ao aumentarmos a dose de LQB-118, combinado a maior dose de imatinibe, observamos indução de morte celular inclusive na linhagem resistente. Nossos dados mostram que a combinação do LQB-118 com os TKIs é eficaz, podendo contribuir para a redução de doses das drogas já utilizadas na clínica.

8. Conclusões

- Os compostos LQB-118 e imatinibe aumentam a expressão de *TOB2*;
- O composto LQB-118 modula a localização subcelular de NF κ B nas duas linhagens de LMC (K562-sensível e Lucena- resistente), sugerindo essa via como um possível alvo deste novo composto;
- A modulação da localização subcelular de NF κ B nas linhagens de LMC parece ser independente das vias de AKT e Ras/Raf/MAPK;
- O composto LQB-118 não é um inibidor clássico da atividade do proteassoma em LMC;
- O composto LQB-118 modula a expressão dos miRNAs 9 e 21 nas duas linhagens de LMC;
- O composto LQB-118 reduziu a expressão de IGF-1R, AKT e mTOR, sem alterar os níveis de fosforilação dessas proteínas;
- O composto LQB-118 reduziu ou não alterou a expressão dos miR-29s nas duas linhagens de LMC
- A combinação do LQB-118 com o imatinibe reduziu a viabilidade celular e induziu morte celular nas linhagens de LMC;

9. Conclusão Geral

O composto LQB-118 modula a expressão de proteínas da via proliferativa IGF-1R/AKT/mTOR e NF κ B, bem como a expressão gênica de TOB2 e de miRNAs em células de LMC com diferentes fenótipos de resistência.

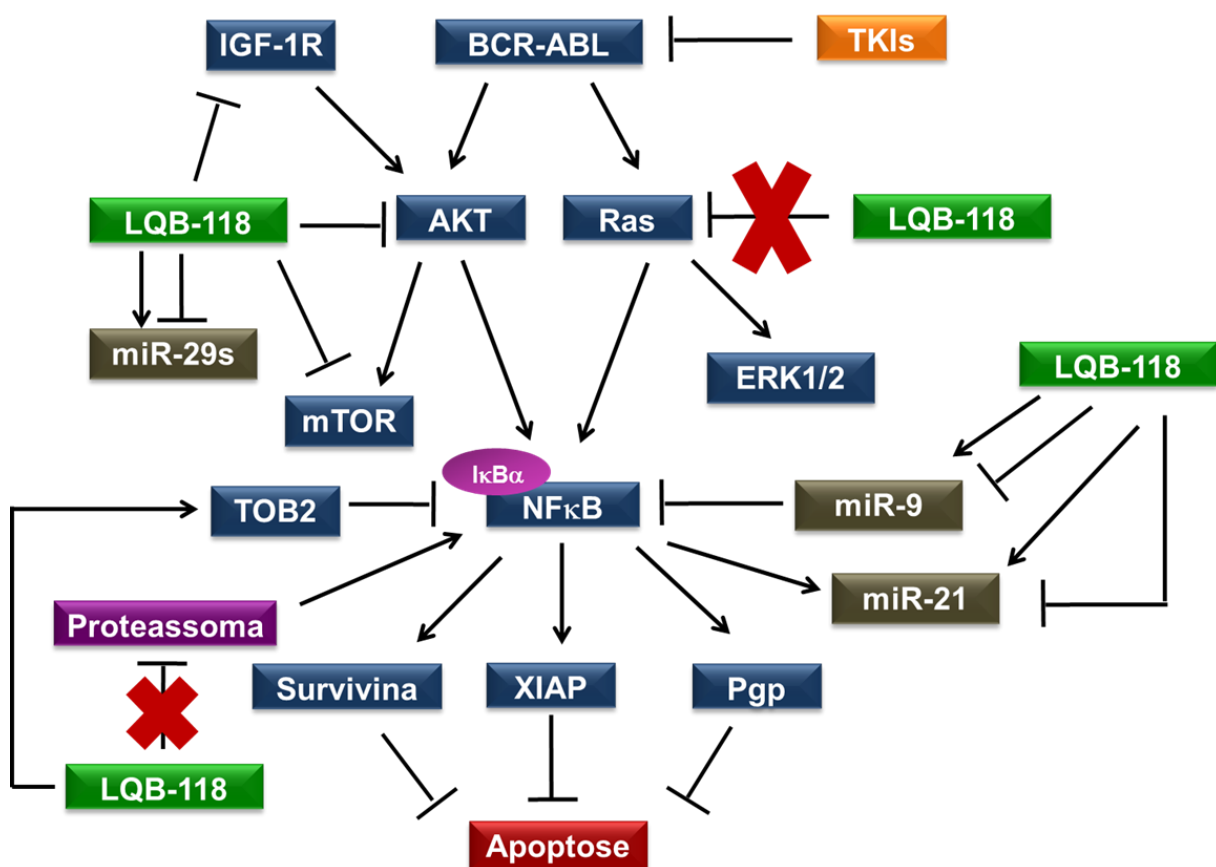


Figura 6.21: Esquema resumido das vias envolvidas no mecanismo de ação do LQB-118 nas linhagens de LMC.

10. Perspectivas

- Avaliar se os compostos LQB-118 e imatinibe regulam a expressão protéica de Tob2 nas linhagens de LMC e qual o papel de TOB2 na resposta aos compostos;
- Avaliar a associação entre a expressão da via IGF-1R/PI3K/AKT/mTOR, NFκB e TOB2 em resposta aos compostos LQB-118 e imatinibe, em linhagens de LMC;
- Avaliar a sensibilidade das linhagens de LMC tratadas com LQB-118, após a superexpressão e silenciamento de AKT;
- Avaliar a regulação da degradação das proteínas IGF-1R, AKT e mTOR por fosfatases e pelo sistema ubiquitina-proteassoma, após tratamento com LQB-118 em linhagens de LMC;
- Avaliar o bloqueio ou não da maquinaria de tradução proteica pelo composto LQB-118.

11. Referências

ABELE R, TAMPE R. **The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing.** *Physiology*, v. 19, p. 216-224, 2004.

AIRIAU K *et al.* **PI3K/mTOR pathway inhibitors sensitize chronic myeloid leukemia stem cells to nilotinib and restore the response of progenitors to nilotinib in the presence of stem cell factor.** *Cell Death and Disease*, 4, e827, 2013.

ALBERO, MP *et al.* **Bortezomib decreases Rb phosphorylation and induces caspase-dependent apoptosis in imatinib-sensitive and –resistant Bcr-Abl1-expressing cells.** *Oncogene*, v. 29, p. 3276-3286, 2010.

ALLAN NC. **Therapeutic options in chronic myeloid leukemia.** *Blood Reviews*, v. 3, n. 1, p. 45-52, 1989.

AMODIO N, *et al.* **miR-29s: a family of epi-miRNAs with therapeutic implications in hematologic malignancies.** *Oncotarget*, 30;6(15):12837-61, 2015.

ARONSON L *et al.* **Understanding the interplay between the proteasome pathway and autophagy in response to dual PI3K/mTOR inhibition in myeloma cells is essential for their effective clinical application.** *Leukemia*. v. 27, p. 2397–2403, 2013.

ARORA, H *et al.* **miR-9 and let-7 enhance the sensitivity to ionizing radiation by suppression of NFκB1.** *Exp Mol Med*, v. 43, n. 5, p. 298-304, 2011.

AUNER V, *et al.* **ABC transporter gene expression in benign and malignant ovarian tissue.** *Gynecologic Oncology*, v. 117, p. 198-201, 2010.

BACCARANI M, *et al.* **Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet.** *Blood*, v. 108, p. 1809-1820, 2006.

BARNES DJ, *et al.* **BCR-ABL expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia.** *Cancer Research*, v. 65, p. 8912-8919, 2005.

BERTACCHINI J, *et al.* **Targeting PI3K/AKT/mTOR network for treatment of leukemia.** Cell Mol Life Sci, 72(12):2337-47, 2015.

BIGGS JC, *et al.* **Treatment of chronic myeloid leukemia with allogeneic bone marrow transplantation after preparation with BuCy2.** Blood, v. 80, n. 5, p. 1352-1357, 1992.

BIXBY, D.; TALPAZ, M. **Seeking the causes and solutions to imatinib-resistance in chronic myeloid leukemia.** Leukemia, v. 25, n. 1, p. 7-22, Jan 2011.

BLAGOSKLONNY MV. **Apoptosis, proliferation, differentiation: in search of the order.** Seminars in Cancer Biology, v. 13, n. 2, p. 97-105, 2003.

BOLDIN, M.P.; BALTIMORE, D. **MicroRNAs, new effectors and regulators of NFκB.** Immunol Rev, v. 246, n. 1, p. 205-1220, 2012.

BOLSTAD BM, *et al.* **Comparison of Normalization Methods for High Density Oligonucleotide Array Data Based on Bias and Variance.** Bioinformatics, v. 19, n. 2, p. 185-193, 2003.

BONIFACIO M *et al.* **α-bisabolol Is an Effective Proapoptotic Agent against BCR-ABL+ Cells in Synergism with Imatinib and Nilotinib.** Plos one, v. 7, n. 10, p. 1 – 10, 2012.

BRAHMKHATRI VP, PRASANNA C, ATREYA HS. **Insulin-Like Growth Factor System in Cancer: Novel Targeted Therapies.** BioMed Research International, 2015:538019, 2015.

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

BRAUN T, *et al.* **Targeting NF-κB in hematologic malignancies.** Cell Death and Differentiation, v. 13, p. 748-758, 2006.

BRIEST F, GRABOWSKI P. **PI3K-AKT-mTOR-Signaling and beyond: the Complex Network in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms.** Theranostics, 4(4):336-365, 2014.

BRUCHERT A *et al.* **Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance Development.** *Leukemia*, v. 19, p. 1774–1782, 2005.

BUENO MJ *et al.* **Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression.** *Cancer Cell*, v. 13, n. 6, p. 496-506, 2008.

CALDAS C, BRENTON J. D. **Sizing up miRNAs ascancer genes.** *Nat Med*, v. 11, n. 7, p. 712-4, 2005.

CARAYOL N *et al.* **Critical roles for mTORC2- and rapamycin-insensitive mTORC1-complexes in growth and survival of BCR-ABL-expressing leukemic cells.** *PNAS*, v. 107, n. 28, p. 12469–12474, 2010.

CHEREDA B; MELO JV. **Natural course and biology of CML.** *Ann Hematol*, v. 94, Supl 2, p. S107–S121, 2015.

Chronic Myeloid Leukemia Knowledge Centre, disponível em <<http://www.epgonline.org>>. Acesso em 02 fev. 2013.

CILLONI D, *et al.* **Nuclear Factor κ B as a target for new drug development in myeloid malignancies.** *Haematologica*, v. 92, p. 1224-1229, 2007.

CILLONI D, *et al.* **The NF- κ B pathway blockade by the IKK inhibitor PS1145 can overcome Imatinib resistance.** *Leukemia*, v. 20, n. 1, p. 61–67, 2006.

CORTES JE, *et al.* **Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: results from the BELA trial.** *J Clin Oncol*, 30(28); 3486-92, 2012.

CRAWFORD LJ *et al.* **Synergistic effects of proteasome inhibitor carfilzomib in combination with tyrosine kinase inhibitors in imatinib-sensitive and -resistant chronic myeloid leukemia models.** *Oncogenesis*, v. 3, e90, 2014.

DALMAY T. **MicroRNAs and cancer.** *J Intern Med*, v. 263, n. 4, p. 366-75, 2008.

DANISZ, K.; BLASIAK, J. **Role of anti-apoptotic pathways activated by BCR-ABL in the resitance of chronic myeloid leukemia cells to tyrosine kinase inhibitors.** *Acta Biochim Pol*, v. 60, n. 4, p. 503-514, 2013.

DE SÁ BACELAR T, *et al.* **The pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in tumor cells through the intrinsic pathway and the endoplasmatic reticulum stress pathway.** *Anti-Cancer Drugs*, v. 24, n. 1, p. 73-83, 2013.

DEAN M, HAMON Y, CHIMINI G. **The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily.** *Journal of Lipid Research*, v. 42, n. 7, p. 1007-1017, 2001.

DENAULT, J. B.; SALVESEN, G. S. **Caspases: keys in the ignition of cell death.** *Chem Rev*, v. 102, n. 12, p. 4489-500, 2002.

DIAMOND JM, MELO JV. **Mechanism of resistance to BCR-ABL kinase inhibitors.** *Leukemia & Lymphoma*, v. 52, n. S1, p. 12-22, 2011.

DING J, *et al.* **Inhibition of PI3K/mTOR Overcomes Nilotinib Resistance in BCR-ABL1 Positive Leukemia Cells through Translational Down-Regulation of MDM2.** *PLOS ONE*, 8:12, e83510, December 2013.

DINNER S, PLATANIAS LC. **Targeting the mTOR Pathway in Leukemia.** *Journal of Cellular Biochemistry*, 117:1745–1752, 2016.

DRAKAKI A, ILIOPOULOS D. **MicroRNA Gene Networks in Oncogenesis.** *Curr Genomics*, v. 10, n. 1, p. 35-41, 2009.

DUNCAN EA, *et al.* **I κ B kinase β inhibition induces cell death in Imatinib-resistant and T315I Dasatinib-resistant BCR-ABL⁺ cells.** *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 7, n. 2, p. 391–397, 2008.

EARNSHAW W. C, *et al.* **Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis.** *Annual Reviews in Biochemistry*, v. 68, p. 383-424, 1999.

ERNST T; HOCHAUS A. **Chronic myeloid leukemia: Clinical impact of BCR-ABL1 mutations and other lesions associated with disease progression.** *Seminars in Oncology*, v. 39, n. 1, p. 58-66, 2012.

EZZEDDINE N, CHEN CYA, SHYU AB. **Evidence Providing New Insights into TOB-Promoted Deadenylation and Supporting a Link between TOB's Deadenylation-Enhancing and Antiproliferative Activities.** *Molecular and Cellular Biology*, 32(6):1089-98, 2012.

FANG Y, *et al.* **MEK/ERK dependent activation of STAT1 mediates dasatinib-induced differentiation of acute myeloid leukemia.** PLoS One, 8:e66915, 2013.

FARAZI T. A *et al.* **miRNAs in human cancer.** J Pathol, v. 223, n. 2, p. 102-15, 2011.

FARIA FC, *et al.* **NFκB pathway and microRNA-9 and -21 are involved in sensitivity to the pterocarpanquinone LQB-118 in different CML cell lines.** Anticancer Agents Med Chem, v. 15, n. 3, p. 345-52, 2015.

FAVALORO B, *et al.* **Role of apoptosis in disease.** Aging, v. 4, n. 5, p. 330-349, 2012.

FENG M, *et al.* **Myc/miR-378/TOB2/cyclin D1 functional module regulates oncogenic transformation.** Oncogene, v. 30, p. 2242-2251, 2011.

FENGER, JM *et al.* **Overexpression of miR-9 in mast cells is associated with invasive behavior and spontaneous metastasis.** BMC Cancer, v. 11, n. 14, p.84, 2014.

FERREIRA, AF *et al.* **ApoptomiRs expression modulated by BCR-ABL is linked to CML progression and imatinib resistance.** Blood Cells Mol Dis, v. 53, n. 1-2, p. 47-55, 2014.

FRAZER R, *et al.* **Chronic Myeloid Leukemia in the 21st century.** Ulster Medical Journal, v. 76, n. 1, p. 8-17, 2007.

FREDERICKS, J.; REN, R. **The role of Ras effectors in BCR-ABL induced chronic myeloid leukemia.** Front Med, v. 7, n. 4, p. 452-461, 2013.

FUCHS, O. **Transcription factor NF-κB inhibitors as single therapeutic agents or in combination with classical chemotherapeutic agents for the treatment of hematologic malignancies.** Curr Mol Pharmacol, v.3, p. 98-122, 2010.

GAO Y, Yuan CY, Yuan W. **Will targeting PI3K/Akt/mTOR signaling work in hematopoietic malignancies?** Stem Cell Investig, 3:31, 2016.

GASPARINI, C *et al.* **NF-κB pathways in hematological malignancies.** Cell Mol Life Sci, v. 71, n. 11, p. 2083-2102, 2014.

GAUTIER L, *et al.* **Affy-analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level.** Bioinformatics v. 20, n. 3, p. 307-315, 2004.

GENTLEMAN R, *et al.* **Genefilter: methods for filtering genes from microarray experiments.** R package version 1.32.0, 2004.

GENTLEMAN R. **Annotate: Annotation for microarrays.** R package version 1.28.0, 2002.

GORRE M, *et al.* **Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification.** Science, v. 293, p. 876-880, 2001.

GOUNARIS-SHANNON, S.; CHEVASSUT, T. **The role of microRNA in hematological malignancy.** Bone Marrow Res, v. 2013, n. 269107, 2013.

GREGORY RI, SHIEKHATTAR R. **MicroRNA biogenesis and cancer.** Cancer Res, v. 65, n. 9, p. 3509-12, 2005.

GUO, LM *et al.* **MicroRNA 9 inhibits ovarian cancer cell growth through regulation of NFκB1.** FEBS J, v. 276, n. 19, p. 5537-5546, 2009.

GYRD-HANSEN M & MEIER P. **IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NFκB, inflammation and cancer.** Nature Reviews, v. 10, p. 561-574, 2010.

HARHAJ EW, DIXIT VM. **Deubiquitinases in the regulation of NFκB signaling.** Cell Research, v. 21, p. 22-39, 2011.

HEIMERL S, *et al.* **Mapping ATP-binding cassette transporter gene expression profiles in melanocytes and melanomas cells.** Melanoma Research, v. 17, p. 265-273, 2007.

HENTSCHEL, J *et al.* **BCR-ABL- and Ras-independent activation of Raf as a novel mechanism of imatinib resistance in CML.** Int J Oncol, v. 39, n. 3, p. 585-591, 2011.

HILDEMAN D, *et al.* **Apoptosis and the homeostatic control of immune responses.** Current Opinion in Immunology, v. 19, n. 5, p. 516-521, 2007.

HO PK & HAWKINS CJ. **Mammalian initiator apoptotic caspases.** FEBS Journal, v. 272, p. 5436-5453, 2005.

HOLE PS.; DARLEY RL.; TONKS A. **Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias?** Blood, v. 117, n. 22, 2011.

HONG, L *et al.* **MicroRNA 21: a therapeutic target for reversing drug resistance in cancer.** *Expert Opin Ther Targets*, v. 17, n. 9, p. 1073-1080, 2013.

HU, Z *et al.* **Synergy between proteasome inhibitors and imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia.** *PLoS One*, v. 4, n. 7, e6257, 2009.

IAMS WT, LOVLY CM. **Molecular Pathways: Clinical Applications and Future Direction of Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Pathway Blockade.** *Clin Cancer Res*; 21(19) October 1, 2015.

IORIO MV, CROCE CM. **Causes and consequences of microRNA dysregulation.** *Cancer J*, v. 18, n. 3, p. 215-22, 2012.

IRIZARRY RA, *et al.* **Exploration, Normalization, and Summaries of High Density Oligonucleotide Array Probe Level Data.** *Biostatistics*, v. 4, n. 2, 2003b.

IRIZARRY RA, *et al.* **Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data.** *Nucleic Acids Research*, v.31, n. 4 p. e15, 2003a.

ITO Y, *et al.* **Phosphorylation and inactivation of Tob contributes to the progression of papillary carcinoma of the thyroid.** *Cancer Letters*, v. 220, p. 237-242, 2005.

IWANAGA K, *et al.* **Alteration of expression of phosphorylation status of Tob, a novel tumor suppressor gene product, is an early event in lung cancer.** *Cancer Letters*, v.202, p. 71-79, 2003.

JABBOUR, E, KANTARJIAN H. **Chronic myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, monitoring, and management.** *American Journal of Hematology*, v. 87, p. 1038-1045, 2012.

JAGER R, *et al.* **Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms.** *Leukemia*, v. 24, p. 1290-1298, 2010.

JAIN MV, *et al.* **Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy and development.** *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 17, n. 1, p. 12-29, 2013.

JANSSON M.D, LUND A.H. **MicroRNA and cancer.** *Mol Oncol*, v. 6, n. 6, p. 590-610, 2012.

JIN Z, EL-DEIRY WS. **Overview of cell death signaling pathways**. Cancer Biology Therapies, v. 4, p. 139-163, 2005.

JOHN LB, WARD AC. **The Ikaros gene family: transcriptional regulators of hematopoiesis and immunity**. Molecular Immunology, v. 48, p. 1272-1278, 2011.

JUNG H, SUH Y. **Regulation of IGF-1 signaling by microRNAs**. Frontiers in genetics, 5 Article 472, 2015.

KANTARI C, WALCZAK H. **Caspase-8 and Bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria**. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1813, p. 558-563, 2011.

KANTARJIAN HM, *et al.* **Important Therapeutic Targets in Chronic Myelogenous Leukemia**. Clinical Cancer Research, v. 13, p. 1089-1097, 2007.

KERR, JF *et al.* **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics**. Br J Cancer, v. 26, n. 4, p. 239-57, 1972.

KHAJAPEER KV, BASKARAN R. **Hsp90 Inhibitors for the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia**. Leukemia Research and Treatment, Article ID 757694, 2015.

KITAMURA H, *et al.* **MAIL, a novel nuclear I κ B protein that potentiates LPS-induced IL-6 production**. FEBS Letter, v. 485, p. 53-56, 2000.

KOLLINEROVAA S, VASSANELLIB S, MODRIANSKYA M. **The role of miR-29 family members in malignant hematopoiesis**. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub; 158(4):489-501, 2014.

KURZROCK, R. *et al.* **Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics**. Ann Intern Med, v. 138, n. 10, p. 819-30, 2003.

KWEE JK, *et al.* **Modulation of reactive oxygen species by antioxidants in chronic myeloid leukemia cells enhances imatinib sensitivity through survivin downregulation**. Anti-Cancer Drugs, v. 10, p. 975-981, 2008.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. Nature, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970.

LAMBETH JD. **NOX enzymes and the biology of reactive oxygen.** Nature Reviews in Immunology, v. 4, n. 3, p. 181-189, 2004.

LEITNER, AA; HEHLMANN, R. **Modern therapy of chronic myeloid leukemia: an example for paradigm shift in hemato-oncology.** Internist (Berl), v. 52, n. 2, p. 209-17, 2011.

LI Y *et al.* **Inhibition of BCR/ABL protein expression by miR-203 sensitizes for imatinib mesylate.** PLoS One, v. 16, n. 8(4):e61858, 2013.

LIU S, CHEN ZJ. **Expanding role of ubiquitination in NF- κ B signaling.** Cell Research, v. 21, p. 6-21, 2011.

LIU Y, *et al.* **Expression of antigen processing and presenting molecules in brain metastasis of breast cancer.** Cancer of Immunology and Immunotherapeutic, v. 61, p. 789-801, 2012.

LIU, N *et al.* **MicroRNA 9 supresses uveal melanoma cell migration and invasion through the NF κ B1 pathway.** Oncol Rep, v. 28, n. 3, p. 961-968, 2012.

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, n. 4, p. 402-8, Dec 2001.

LOPEZ-MEDINA E, *et al.* **RNA isolation of *Pseudomonas aeruginosa* colonizing the murine gastrointestinal tract.** Journal of Visualized Experiments, v. 55, p. 3293, 2011.

LOUNNAS N, *et al.* **NF- κ B inhibition triggers death of imatinib-sensitive and imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells including T315I Bcr-Abl mutants.** International Journal of Cancer, v. 125, n. 2, p. 308–317, 2009.

LU T; STARK GR, **Cytokine overexpression and constitutive NF κ B in cancer.** *Cell Cycle*, v. 3, n. 9, p. 1114–1117, 2004.

LUQMAN S; PEZZUTO JM. **NF κ B: a promising target for natural products in cancer chemoprevention.** Phytotherapy Research, v. 24, n. 7, p. 949–963, 2010.

MA X.; BLENIS J. **Molecular mechanisms of mTORmediated translational control.** Nature Reviews Molecular cell Biology. V. 10, p. 307- 317., 2009.

MA, X *et al.* **MicroRNAs in NF- κ B signaling.** J Mol Cell Biol, v. 3, n. 3, p. 159-166, 2011.

MACDONALD JW. **Affycoretools: Functions useful for those doing repetitive analyses with Affymetrix GeneChips.** R package version 1.22.0, 2008

MACHADO-NETO JA, *et al.* **Knockdown of insulin receptor substrate 1 reduces proliferation and downregulates Akt/mTOR and MAPK pathways in K562 cells.** Biochimica et Biophysica Acta, 1813, 1404–1411, 2011.

MACHOVÁ POLÁKOVÁ K, *et al.* **Expression patterns of microRNAs associated with CML phases and their disease related targets.** Mol Cancer, n. 18, p. 10:41, 2011.

MACHOVA POLAKOVA K, KOBLIHOVA J, STOPKA T. **Role of epigenetics in chronic myeloid leukemia.** Curr Hematol Malig Rep, v. 38, n. 1, p. 28-36, 2013.

MAIA RC, *et al.* **LQB-118, a pterocarpanquinone structurally related to lapachol [2-hydroxy-3-(3-metyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone]: a novel class of agent with high apoptotic effect in chronic myeloid leukemia cells.** Investigational New Drugs, v. 29, n. 6, p. 1143-1155, 2011.

MANKAN AK, *et al.* **NF- κ B regulation: the nuclear response.** Journal of Cellular and Molecular Medicine, v. 13, n. 4, p. 631-643, 2009.

MANNING B. D.; CANTLEY L. C. **AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream.** Cell, v. 129, n. 07, p. 1261 – 1274, 2007.

MEIER P, *et al.* **Apoptosis in development.** Nature, v. 407, n. 6805, p. 796-801, 2000.

MELO JV, BARNES DJ. **Chronic myeloid leukemia as a model of disease evolution in human cancer.** Nature Reviews in Cancer, v. 7, p. 441-453, 2007.

MELO JV, CHUAH C. **Novel agents in CML therapy: tyrosine kinase inhibitors and beyond.** Hematology, p. 427-435, 2008.

MILLER GD, BRUNO BJ, LIM CS. **Resistant mutations in CML and Ph ALL – role of ponatinib.** Biologics: Targets and Therapy, V. 8, p. 243–254, 2014.

MOREIRA, MA *et al.* **Changes in gene expression profile in two multidrug resistant cell lines derived from a same drug sensitive cell line.** *Leuk Res*, v. 38, n. 8, p. 983-987, 2014.

MOSCHONAS A, *et al.* **CD40 induces antigen transporter and immunoproteasome gene expression in carcinomas via the coordinated action of NF- κ B and of NF- κ B-mediated de novo synthesis of IRF-1.** *Molecular and Cellular Biology*, v. 28, n. 20, p. 6208-6222, 2008.

MULLIGHAN CG, *et al.* **BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros.** *Nature*, v. 453, p. 110-114, 2008.

NESTAL DE MORAES G, *et al.* **The Interface between BCR-ABL-Dependent and – Independent Resistance Signaling Pathways in Chronic Myeloid Leukemia.** *Leukemia Research and Treatment*, artigo ID 671702, 19 páginas, 2012.

NESTAL DE MORAES, G *et al.* **The pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells of distinct molecular subtypes and targets FoxO3a and FoxM1 transcription factors.** *Int J Oncol*, v. 45, n. 5, p. 1949-58, 2014.

NETTO CD, *et al.* **New pterocarpanquinones: synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF-alpha modulation in human PBMC cells.** *Bioorg Med Chem*, v. 18, p. 1610-1616, 2010.

NISHIKORI M. **Classical and Alternative NF- κ B Activation Pathways and Their Roles in Lymphoid Malignancies.** *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology*, v. 45, n. 1, p. 15-24, 2005.

NOWELL, P. C.; HUNGERFORD, D. A. **Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes.** *J Natl Cancer Inst*, v. 25, p. 85-109, 1960.

NOWICKI MO, *et al.* **BCR/ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen speies-dependent DNA double-strand breaks.** *Blood*, v. 104, p. 3746-3753, 2004.

O'HARE T, *et al.* **AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance.** *Cancer Cell.*, v. 16 n. 5, p. 401-12, 2009.

O'MALLEY S, *et al.* **Tob suppresses breast cancer tumorigenesis.** International Journal of Cancer, v. 125, p. 1805-1813, 2009.

OCKER M & HOPFNER M. **Apoptosis-modulating drugs for improved cancer therapy.** European Surgical Research, v. 48, n. 3, p. 111-120, 2012.

ODENIKE, O. *et al.* **Gene mutations, epigenetic dysregulation, and personalized therapy in myeloid neoplasia: are we there yet?** Seminars in Oncology, v. 38, n. 2, p. 196-214, 2011.

O'HARE T, *et al.* **In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants.** Cancer Research, v. 65, n. 11, p. 4500-4505, 2005.

OKABE S *et al.* **Efficacy of the dual PI3K and mTOR inhibitor NVP-BEZ235 in combination with nilotinib against BCR-ABL-positive leukemia cells involves the ABL kinase domain mutation.** Cancer Biology & Therapy, 15:2, 207–215; February 2014.

OKADA, H.; MAK, T. W. **Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells.** Nat Rev Cancer, v. 4, n. 8, p. 592-603, 2004.

OKAMOTO T, *et al.* **NFκB signaling and carcinogenesis.** Current Pharmaceutical Design, v. 13, p. 447-462, 2007.

OUYANG L, *et al.* **Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis.** Cell Proliferation, v. 45, p. 487-498, 2012.

PANWALKAR A, *et al.* **Nuclear Factor-KappaB modulation as a therapeutic approach in hematologic malignancies.** Cancer, v. 100, p. 1578-1589, 2004.

PERDOMO J, *et al.* **Eos and Pegasus, two members of the Ikaros family of proteins with distinct DNA binding activities.** The Journal of Biological Chemistry, v. 275, n. 49, p. 38347-38354, 2000.

PERROTTI D, *et al.* **Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation.** Journal of Clinical Investigation, v. 120, n. 7, p. 2254–2264, 2010.

PHILCHENKOV, A. **Caspases: potential targets for regulating cell death.** J Cell Mol Med, v. 8, n. 4, p. 432-444, 2004.

POGRIBNY I. P., *et al.* **Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin.** Int J Cancer, v. 127, n. 8, p. 1785-94, 2010.

PRABHJOT S, *et al.* **AKT in cancer: new molecular insights and advances in drug development.** Br J Clin Pharmacol, 82 943–956 943, 2016.

QUENTMEIER H *et al.* **BCR-ABL1-independent PI3Kinase activation causing imatinib-resistance.** Journal of Hematology & Oncology. v. 4, n. 6, p. 1-10, 2011.

RANDO OJ. **Chromatin structure in the genomics era.** Trends Genet, v. 23, n.2, p.67-73, 2006.

REA D, *et al.* **Curing chronic myeloid leukemia.** Current Hematologic Malignancies Reports, v. 7, p. 103-108, 2012.

REDAELLI, A. *et al.* **Clinical and epidemiologic burden of chronic myelogenous leukemia.** Expert Reviews in Anticancer Therapy, v. 4, n. 1, p. 85-96, 2004.

REDIG A. J.; VAKANA E.; PLATANIAS L. **Regulation of mammalian target of rapamycin and mitogen activatedprotein kinase pathways by BCR–ABL.** Leukemia & Lymphoma. v. 52, n. S1, p. 45 – 53, 2011.

REIKVAM HA *et al.* **Antileukaemic effect of PI3K-mTOR inhibitors in acute myeloid leukaemia-gene expression profiles reveal CDC25B expressionas determinate of pharmacological effect.** Br J Haematol, v. 164, p. 200-211, 2014 .

REIS FRS, *et al.* **The Therapeutical Potential of a Novel pterocarpanquinone LQB-118 to Target Inhibitor of Apoptosis Proteins in Acute Myeloid Leukemia Cells.** Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry, v. 13, n. 2, p. 341-351, 2013.

RHO O, KIM DJ, KIGUCHI K, DIGIOVANNI J. **Growth factor signaling pathways as targets for prevention of epithelial carcinogenesis.** Molecular Carcinogenesis, 50 (4): 264-279, 2011.

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

ROYCHOWDHURY, S.; TALPAZ, M. **Managing resistance in chronic myeloid leukemia.** Blood Reviews, v. 25, n. 6, p. 279-90, 2011.

RUMJANEK VM *et al.* **Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena1.** Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 73, n. 1, p. 57-69, 2001.

SALUSTIANO EJ, *et al.* **Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, alpha-lapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells.** Invest New Drugs, v. 28, n. 2, p. 139-144, 2010.

SANTOS FPS *et al.* Evolution of therapies for chronic myelogenous leukemia. **Cancer Journal**, v. 17, n. 6, p. 465-476, 2011.

SARBASSOV DD *et al.* **Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB.** Molecular cell, v. 22, n. 02, p. 159-168, 2006.

SAUßELE S *et al.* **The concept of treatment-free remission in chronic myeloid leukemia.** Leukemia, 30, 1638–1647, 2016.

SAYERS TJ. **Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy.** Cancer Immunology and Immunotherapy, v. 60, p. 1173-1180, 2011.

SCHIMMER, A. D. *et al.* **Functional blocks in caspase activation pathways are common in leukemia and predict patient response to induction chemotherapy.** Cancer Research, v. 63, n. 6, p. 1242-8, 2003.

SCHINDLER T, *et al.* **Structural mechanism for STI-572 inhibition of Abelson tyrosine kinase.** Science, v. 289, n. 5486, p. 1938-1942, 2000.

SELIGER B, *et al.* **Association of HLA class I antigen abnormalities with disease progression and early recurrence in prostate cancer.** Cancer of Immunology and Immunotherapeutic, v. 59, p. 529-540, 2010.

SEN R, BALTIMORE D. **Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences.** Cell, v. 46, n. 5, p. 705-16, 1986.

SHAH NP, *et al.* **Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinibe (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia.** *Cancer Cell*, v. 2, p. 117-125, 2002.

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

SHAKER ME, GHANI A, SHIHA GE, IBRAHIM TM, MEHAL WZ. **Nilotinib induces apoptosis and autophagic cell death of activated hepatic stel-late cells via inhibition of histone deacetylases.** *Biochim Biophys Acta*, v. 1833, p. 1992–2003, 2013.

SHI P, *et al.* **Inhibition of IGF-1R tyrosine kinase induces apoptosis and cell cycle arrest in imatinibe-resistant chronic myeloid leukemia cells.** *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14, n° 6B, 1777 – 1792, 2010.

SHIH VFS *et al.* **A single NF- κ B system for both canonical and non-canonical signaling.** *Cell Research*, v. 21, p. 86-102, 2011.

SINGH MM, *et al.* **Inhibition of the NADPH oxidase regulates Heme Oxygenase 1 expression in chronic myeloid leukemia.** *Cancer*, v. 118, n. 13, p. 3433-3445, 2012.

SINGH P, ALEX JM, BAST F. **Insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor receptor 1(IGF-1R) signaling systems: novel treatment strategies for cancer.** *Med Oncol*, 31:805, 2014.

SKORSKI T. **Genetic mechanism of chronic myeloid leukemia blastic transformation.** *Current Hematologic Malignancies Reports*, v. 7, p. 87-93, 2012.

SMITH CA. **Annaffy: Annotation tools for Affymetrix biological metadata.** R package version 1.22.0, 2008.

SMITH, ML, *et al.* **Independent prognostic variables in acute myeloid leukaemia.** *Blood Reviews*, v. 25, n. 1, p. 39-51, Jan 2011.

SMYTH, G. K. **Limma: linear models for microarray data.** In: Gentleman R *et al.*, 'Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor'. Ed. Springer, New York, p. 397—420, 2005.

STAUDT LM. **Oncogenic activation of NF- κ B**. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, v. 2, a000109, 2010.

STEELMAN LS, *et al.* **JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and Leukemogenesis**. Leukemia, 18, 189–218, 2004.

STOKLOSA T *et al.* **Diverse mechanisms of mTOR activation in chronic and blastic phase of chronic myelogenous leukemia**. Experimental Hematology. v. 41, n. 05, p. 462 – 469, 2013.

SURESH S, *et al.* **MicroRNAs 130a/b are regulated by BCR-ABL and downregulate expression of CCN3 in CML**. J Cell Commun Signal, v. 5, n. 3, p. 183-91, 2011.

Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, US National Cancer Institute, disponível em <<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/cm1.html>>. Acesso em 27 jul. 2015.

SUZUKI K, *et al.* **Ikaros isoform 6 enhances BCR-ABL1-mediated proliferation of human CD34⁺ hematopoietic cells on stromal cells**. International Journal of Oncology, v. 40, p. 53-62, 2012.

SUZUKI T, *et al.* **A serine/threonine kinase p90rsk 1 phosphorylates the anti-proliferative protein TOB**. Genes Cells, v. 6, p. 131-138, 2001.

SUZUKI T, *et al.* **Phosphorylation of three regulatory serines of TOB by Erk1 and Erk2 is required for Ras-mediated cell proliferation and transformation**. Genes Development, v. 16, p. 1356-1370, 2002.

TARCA AL, *et al.* **SPIA: Signaling Pathway Impact Analysis (SPIA) using combined evidence of pathway over-representation and unusual signaling perturbations**. R package version 1.8.0, 2010.

The National Cancer Institute's Dictionary of Cancer Terms, disponível em <<http://www.cancer.gov/dictionary>>. Acesso em 27 jul. 2015.

TOKARSKI JS, *et al.* **The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants**. Cancer Research, v. 66 n. 11, p. 5790-5797, 2006.

TRINDADE, GS *et al.* **Differences in sensitivity to UVC, UVB and UVA radiation of a multidrug-resistant cell line overexpressing P-glycoprotein.** Photochem Photobiol, v. 69, n. 6, p. 694-699, 1999.

TURCO MC, *et al.* **NF κ B/Rel-mediated regulation of apoptosis in hematologic malignancies and normal hematopoietic progenitors.** Leukemia, v. 18, p. 11-17, 2004.

UMEZAWA K. **Inhibition of tumor growth by NF κ B inhibitors.** Cancer Science, v. 97, n. 10, p. 990-995, 2006.

USHIJIMA T. **Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells.** Nat Rev Cancer, v.5, p.223-31, 2005.

USHIO-FUKAI M, NAKAMURA Y. **Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy.** Cancer Letters, v. 266, n. 1, p. 37-52, 2008.

VAUGHAN S; JAT PS. **Deciphering the role of Nuclear Factor- κ B in cellular senescence.** Aging, v. 3, n. 10, p. 913-919, 2011.

VENTURINI L, *et al.* **Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells.** Blood, v. 15, n. 109(10), p. 4399-405, 2007.

VISONE R, CROCE C.M. **MiRNAs and cancer.** Am J Pathol, v. 174, n. 4, p. 1131-8, 2009.

WEIDHAAS JB. *et al.* **MicroRNAs as Potential Agents to Alter Resistance to Cytotoxic Anticancer Therapy.** Cancer Res, v. 67, n. 23, p. 11111–6, 2007.

WEISBERG E, *et al.* **Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl.** Cancer Cell, v. 7, n. 2, p. 129-141, 2005.

WINKLER GS. **The mammalian anti-proliferative BTG/Tob protein family.** Journal of Cellular Physiology, v. 222, p. 66-72, 2010.

WINTER J, *et al.* **Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation.** Nat Cell Biol, v. 11, n. 3, p. 228-34, 2009.

XIE J, *et al.* **IGF-1R determines the fates of BCR/ABL leukemia.** Journal of Hematology & Oncology, 8:3, 2015.

XU G.; SHI Y. **Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis.** Cell Research, v. 17, n. 9, p. 759-771, 2007.

YANG K; FU L. **Mechanisms of resistance to BCR–ABL TKIs and the therapeutic strategies: A review.** Critical Reviews in Oncology/Hematology, v. 93, p. 277–292, 2015.

YU C, *et al.* **Neuroinflammation Activates Mdr1b Efflux Transport Through NFκB: Promoter Analysis in BBB Endothelia.** Cellular Physiology and Biochemistry, v. 22, p. 745-756, 2008.

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

ZHANG B, PAN X, COBB G. P, ANDERSON T. A. **microRNAs as oncogenes and tumor suppressors.** Dev Biol, v. 1, n. 302(1), p. 1-12, 2007.

ZHU, X *et al.* **Studies on microRNAs that are correlated with cancer stem cells in chronic myeloid leukemia.** Mol Cell Biochem, v. 390, n. 1-2, p. 75-84, 2014.

12. Anexos

12.1 Trabalho científico publicado, não relacionado à tese

NESTAL DE MORAES G, CASTRO CP, SALUSTIANO EJ, DUMAS ML, **COSTAS F**, LAM EW, COSTA PR, MAIA RC.

The pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells of distinct molecular subtypes and targets FoxO3a and FoxM1 transcription factors. *Int J Oncol.*, 2014, 45(5):1949-58.

[Int J Oncol](#), 2014 Nov;45(5):1949-58. doi: 10.3892/ijo.2014.2615. Epub 2014 Aug 21.

The pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells of distinct molecular subtypes and targets FoxO3a and FoxM1 transcription factors.

[Nestal de Moraes G¹](#), [Castro CP¹](#), [Salustiano EJ²](#), [Dumas ML³](#), [Costas F¹](#), [Lam EW⁴](#), [Costa PR²](#), [Maia RC¹](#).

⊕ **Author information**

Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) patients' outcome is usually poor, mainly because of drug resistance phenotype. The identification of new drugs able to overcome mechanisms of chemoresistance is essential. The pterocarpanquinone LQB-118 compound has been shown to have a potent cytotoxic activity in myeloid leukemia cell lines and patient cells. Our aim was to investigate if LQB-118 is able to target FoxO3a and FoxM1 signaling pathways while sensitizing AML cell lines. LQB-118 induced apoptosis in both AML cell lines HL60 (M3 FAB subtype) and U937 (M4/M5 FAB subtype). Cell death occurred independently of alterations in cell cycle distribution. In vivo administration revealed that LQB-118 was not cytotoxic to normal bone marrow-derived cells isolated from mice. LQB-118 induced FoxO3a nuclear translocation and upregulation of its direct transcriptional target Bim, in HL60 cells. However, LQB-118 induced FoxO3a nuclear exclusion, followed by Bim downregulation, in U937 cells. Concomitantly, LQB-118 exposure reduced FoxM1 and Survivin expression in U937 cells, but this effect was more subtle in HL60 cells. Taken together, our data suggest that LQB-118 has a selective and potent antitumor activity against AML cells with distinct molecular subtypes, and it involves differential modulation of the signaling pathways associated with FoxO3a and FoxM1 transcription factors.

12.2 Trabalho científico publicado, relacionado à tese

DE FARIA FC, LEAL ME, BERNARDO PS, COSTA PR, MAIA RC

NFκB pathway and microRNA-9 and -21 are involved in sensitivity to the pterocarpanquinone LQB-118 in different CML cell lines. *Anticancer Agents Med Chem.* 2015;15(3):345-52.