UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

ANA PAULA NUNES RODRIGUES ALVES

**Investigação Funcional da Participação da Via de Sinalização
IGF1R/IRS1 na Leucemia Linfóide Aguda**

Ribeirão Preto
2018

ANA PAULA NUNES RODRIGUES ALVES

**Investigação Funcional da Participação da Via de Sinalização
IGF1R/IRS1 na Leucemia Linfóide Aguda**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências. Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Tese e Dissertação da USP (BDTD).

Programa de pós-graduação em Clínica Médica. Área de Concentração: Investigação biomédica.

Orientadora: **Profa. Dra. Fabíola Traina**

**Ribeirão Preto
2018**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

Rodrigues Alves, Ana Paula Nunes

Investigação Funcional da Participação da Via de Sinalização IGF1R/IRS1 na Leucemia Linfóide Aguda - Ribeirão Preto, 2018.

96p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Programa de Pós-graduação em Clínica Médica. Área de concentração: Investigação Biomédica. Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Orientadora: Traina, Fabíola

1. Leucemia linfóide aguda 2. IGF1R/IRS1 3. NT157

4. Vias de sinalização

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Bolsa de Doutorado - FAPESP 2014/14844-9; janeiro/2017 a agosto/2018).
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Bolsa de Doutorado – 350.961.048-26; outubro/2014 a dezembro/2016).
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP - USP).
- Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP).
- Centro de terapia celular (CTC); Auxílio à Pesquisa - Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão - CEPIDs (FAPESP 13/08135-2).
- INCT 2014: em Células Tronco e Terapia Celular no Câncer; Auxílio à Pesquisa – Temático (FAPESP 14/50947-7).
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA - HCFMRP - USP).
- Santander-Universidades (Programa Fórmula 2015).

Nome: RODRIGUES ALVES, Ana Paula Nunes

Título: Investigação funcional da participação da via de sinalização IGF1R/IRS1 na leucemia linfóide aguda

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências, Programa de Pós-graduação em Clínica Médica, Área de Concentração: Investigação Biomédica.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais, com amor, admiração e extrema gratidão por toda compreensão, carinho, e incansável apoio ao longo de toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser meu guia e minha fortaleza em todos os momentos, me dando sabedoria para alcançar os meus objetivos, e abençoando a minha trajetória.

À minha orientadora Profa. Dra. Fabíola Traina, agradeço a oportunidade, confiança e o crescimento profissional e pessoal proporcionados. Obrigada pela orientação deste trabalho que foi de extrema contribuição para minha formação acadêmica, um período de intenso aprendizado, que levarei por toda a minha jornada profissional.

Às queridas funcionárias Bárbara Santana, Rita de Cássia, Ana Sílvia Gouvêa, Amélia Góes, Priscila Scheucher, Cleide Silva, Fernanda Ursoli, Carla Ribeiro, Virgínia Lipoli, Diva Hodniki, Adriana Oliveira, Elizabete Auddino, Fabiana Fernandes e Joana Freitas, agradeço por todos os auxílios prestados, pela grande contribuição ao meu aprendizado e principalmente pela amizade. Obrigada pela paciência e carinho dedicados a mim.

A todos do laboratório de Hematologia da FMRP, principalmente aos amigos e pós-graduandos Fernanda Borges, Bruna Fenerich, Jaqueline Fernandes, João Paulo Lopes, Flávia Donaires, André Pinto, Bruno Alves, Luciana Yamamoto, Thiago Mantello, Lilian Figueiredo, Maria Florência, Juan Silva e Diego Martins à parceria, aos ensinamentos, risadas, amizade conquistada e a todas as experiências vividas. Obrigada pela força e torcida em cada conquista e etapa alcançada por mim, e por dividirem comigo esta fase da minha vida.

Um agradecimento especial aos professores João Agostinho Machado Neto, Anne J. Ridley e Belinda Pinto Simões que ao longo do meu doutorado agregaram muito à minha formação científica, obrigada pelo apoio sem igual.

Agradeço também a todos os professores que me acompanharam durante minha trajetória educacional e aos membros da banca por terem encontrado tempo para dedicar na avaliação desse trabalho.

Aos meus pais Adão Rodrigues Alves e Marly Nunes Alves, obrigada por terem feito de suas vidas a luta necessária para que eu e meus irmãos conquistássemos nossas vitórias pessoais. Obrigada pela estrutura familiar que norteia e apoia minha vida, minhas escolhas e minhas conquistas. Vocês, meus irmãos Jorge Augusto, Leilane e Fabiana, meus cunhados Larissa e Breno, minhas sobrinhas Yasmin e Isadora, meus amados avós Sebastião Rodrigues Nunes e Augusta Maria Nunes, meus tios e primos queridos são sem dúvida o que eu tenho de mais importante na minha vida. Obrigada pelo amor incondicional e pelo incentivo marcante para que este sonho se realizasse.

Ao meu namorado Felipe Roque, pelo companheirismo, incentivo diário para que eu alcance todos os meus objetivos e por caminhar ao meu lado nessa busca pelo crescimento profissional e pessoal, fazendo a caminhada mais leve.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Fundação CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado e ao programa Santander Universidades 2015 pela bolsa de estudo internacional.

“Educar verdadeiramente não é ensinar fatos novos ou enumerar fórmulas prontas, mas sim preparar a mente para pensar.”

Albert Einstein

RESUMO

RODRIGUES ALVES, A. P. N. **Investigação Funcional da Participação da Via de Sinalização IGF1R/IRS1 na Leucemia Linfóide Aguda.** 2018, 96f. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A leucemia linfóide aguda (LLA) é uma neoplasia hematológica agressiva, caracterizada pela expansão clonal de progenitores linfóides e ativação exacerbada de vias de sinalização. A via de sinalização de IGF1R/IRS1 inicia-se pela ligação do ligante IGF1 ao seu receptor transmembrana IGF1R, e subsequente ativação de seu substrato IRS1, que transmite sinais mitogênicos e antiapoptóticos, principalmente através da modulação das vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK. Estas vias de sinalização desempenham uma importante função na proliferação, sobrevivência e migração de células de leucêmicas. Dessa forma, o objetivo do nosso trabalho foi investigar o efeito dos inibidores farmacológicos da via de sinalização IGF1R/IRS1 na LLA. Linhagens celulares Jurkat, MOLT-4, Namalwa e Raji foram tratadas ou não com inibidor de IGF1R/IRS1-2, NT157, ou com inibidor de IGF1R/IR, OSI-906, e submetidas à avaliação da viabilidade celular, apoptose, proliferação, ciclo celular, migração e expressão/ativação gênica e proteica. Células mononucleares de pacientes com LLA e de doadores saudáveis foram submetidas aos ensaios de viabilidade e apoptose, após tratamento com NT157 e OSI-906. O efeito do NT157 *in vivo* foi avaliado utilizando modelo de xenotransplante de células CEM em camundongos NSG. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Comitê de Ética no Uso dos Animais da Instituição. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e teste t de *Student*. O tratamento com NT157 reduziu a viabilidade e a proliferação, induziu apoptose e modulou o ciclo celular em todas as linhagens testadas ($p < 0,05$). Similarmente, OSI-906 reduziu a viabilidade e a proliferação, modulou o ciclo celular ($p < 0,05$), porém não foi capaz de induzir apoptose nas linhagens de LLA. Os tratamentos com NT157 e com OSI-906 diminuíram significativamente a migração de Jurkat em fibronectina, porém não modularam a migração de Namalwa. Em um contexto molecular, a exposição ao NT157 resultou em inibição da fosforilação de proteínas da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR e modulou a expressão de 25 genes

relacionados com a via de sinalização MAPK, dentre eles *CDKN1A* (*p21*), *FOS* e *JUN* ($p<0,05$). OSI-906 modulou a ativação das proteínas da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR e a expressão gênica de *p21*, *FOS* e *JUN*, porém de uma forma diferente da modulação encontrada pelo tratamento com NT157 ($p<0,05$). Em células mononucleares de pacientes com LLA, NT157 reduziu a viabilidade e induziu apoptose, e OSI-906 reduziu a viabilidade ($p<0,05$), porém não foi capaz de induzir apoptose nestes pacientes. Os tratamentos com NT157 e OSI-906 não apresentaram citotoxicidade em células de doadores saudáveis. Adicionalmente, o tratamento *in vivo* com veículo ou NT157 na dose de 50mg/kg/dia, via intraperitoneal, em modelos de xenotransplante com células CEM em camundongos NSG (n=5 para cada grupo) não apresentou efeitos antineoplásicos. Em conclusão, a inibição farmacológica de IGF1R/IRS1-2, por NT157, e de IGF1R/IR, por OSI-906, apresentaram efeitos antineoplásicos significativos em modelos de linhagens celulares e amostras primárias de pacientes com LLA *in vitro*. Os resultados dos estudos *in vivo* em modelos de xenotransplante indicam a necessidade de estudos de farmacocinética e farmacodinâmica para o NT157. Nossos resultados revelaram que NT157 exerce um efeito citotóxico nas células de LLA, enquanto que OSI-906 tem um efeito predominantemente citostático. Em conclusão, a inibição direta de IRS1 pode ser um potencial alvo terapêutico em LLA.

Palavras-chave: Leucemia linfóide aguda; vias de sinalização; NT157; IGF1R; IRS1

ABSTRACT

RODRIGUES ALVES, A. P. N. **Functional Investigation of IGF1/IRS1 signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia**. 2018, 96f. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Acute lymphoid leukemia (ALL) is an aggressive hematological neoplasm, characterized by clonal expansion of lymphoid progenitors and exacerbated activation of signaling pathways. The IGF1R/IRS1 signaling pathway initiated through binding of the ligand IGF1 to its transmembrane receptor IGF1R, and the subsequent activation of its substrate IRS1, which transmit mitogenic and antiapoptotic signals, mainly through the modulation of the PI3K/AKT/mTOR and MAPK signaling pathways. These signaling pathways play an important function in cell proliferation, survival and migration of leukemia cells. Therefore, the aim of our study was to investigate the biological effects of IGF1R/IRS1 pharmacological inhibition in ALL. Jurkat, MOLT-4, Namalwa and Raji cell lines were treated or not with IGF1R/IRS1-2 inhibitor, NT157, or with IGF1R/IR inhibitor, OSI-906, and evaluated for cell viability, apoptosis, proliferation, cell cycle, migration, gene and protein expression/activation. Mononuclear cells from patients with ALL and from healthy donors were submitted to the viability and apoptosis assays, after treatment with NT157 and OSI-906. The NT157 effect *in vivo* was evaluated using CEM cell line xenograft model in NSG mice. The study was approved by the Research Ethics Committee and the Ethics Committee on the Use of Animals of the Institution. Statistical analysis was performed by ANOVA and Student t test. Treatment with NT157 reduced viability and proliferation, induced apoptosis, and modulated the cell cycle in all cell lines tested ($p<0.05$). Similarly, OSI-906 reduced viability and proliferation, modulated the cell cycle ($p<0.05$), but was not able to induce apoptosis in ALL cell lines. Treatments with NT157 and OSI-906 significantly decreased the migration of Jurkat in fibronectin, but did not modulate the Namalwa migration. In a molecular context, the NT157 exposure resulted in inhibition of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway protein phosphorylation and modulated the expression of 25 genes related to the MAPK signaling pathway, including *CDKN1A* (*p21*), *FOS* and *JUN* ($p<0.05$). OSI-906 modulated the activation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway proteins and the *p21*, *FOS* and *JUN* gene

expression, but in a different way from the modulation found by treatment with NT157 ($p<0.05$). In mononuclear cells of patients with ALL, NT157 reduced cell viability and induced apoptosis, and OSI-906 reduced viability($p<0.05$), but was not able to induce apoptosis in these patients. Treatments with NT157 and OSI-906 did not show cytotoxicity in healthy donor cells. Additionally, *in vivo* treatment with vehicle or NT157 at the dose of 50 mg/kg/day, intraperitoneally, in xenotransplantation models with CEM cells in NSG mice (n=5 for each group) showed no antineoplastic effects. In conclusion, the pharmacological inhibition of IGF1R/IRS1-2, by NT157, and IGF1R/IR, by OSI-906, showed significant antineoplastic effects in cell line models and in primary samples of patients with ALL *in vitro*. The results of *in vivo* studies in xenotransplantation models indicate the need for pharmacokinetic and pharmacodynamic studies for NT157. Our results revealed that NT157 exerts a cytotoxic effect on ALL cell lines and primary ALL cells, whereas OSI-906 has a predominantly cytostatic effect. In conclusion, direct inhibition of IRS1 may be a potential therapeutic to target in ALL.

Keywords: Acute lymphoblastic leukemia; signaling pathway; NT157; IGF1R; IRS1

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	<i>AKT Serine/Threonine Kinase</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (análise de variância)
AP-1	<i>AP-1 Transcription Factor</i>
BCR/ ABL1	Gene de fusão (<i>Breakpoint Cluster Region/ABL Proto-Oncogene 1</i>)
<i>c-DNA</i>	<i>Complementary DNA</i> (DNA complementar)
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i> (Dimetilsulfóxido)
DNA	<i>Desoxiribonucleic Acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
ERK	Extracellular signal–regulated kinases
FOS	<i>Fos, AP-1 Transcription Factor Subunit</i>
γ H2AX	Histona <i>gamma</i> -H2AX
IGF1	<i>Insulin Like Growth Factor 1</i>
IGF1R	<i>Insulin Like Growth Factor 1 Receptor</i>
IgG	Imunoglobulina G
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
JUN	<i>JUN proto-oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit</i>
JNK	<i>c-Jun NH2 terminal kinase</i>
HPRT	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
LLA	Leucemia linfoide aguda
LLC	Leucemia linfoide crônica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
mRNA	<i>messenger RNA</i> (RNA mensageiro)
mTOR	<i>Mechanistic Target Of Rapamycin</i>
MYC	<i>MYC proto-oncogene</i>
NSG	<i>NOD scid gamma</i> (linhagem de camundongo)
OMS	Organização Mundial da Saúde
p21	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A (CDKN1A)</i>
PI	<i>propidium iodide</i> (iodeto de propídeo)
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>

PIIB	Processamento de imagem baseado em bioluminescência
PPP	<i>Picropodophyllin</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico)
RPM	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> (meio do Instituto Memorial Roswell Park)
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i> (síndrome da imunodeficiência severa combinada)
SBF	Soro bovino fetal
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
STAT5	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de sinalização mediada pelas proteínas IRS1/2.....	23
Figura 2. NT157, inibidor de IGF1R/IRS1-2, reduz a viabilidade celular de linhagens celulares de LLA.....	44
Figura 3. OSI-906, inibidor de IGF1R/IR, reduz a viabilidade de linhagens celulares de LLA.....	45
Figura 4. NT157, inibidor de IGF1R/IRS1-2, induz apoptose nas linhagens celulares de LLA.....	47
Figura 5. OSI-906, inibidor de IGF1R/IR, induz apoptose na linhagem celular Jurkat apenas na maior dose testada, e não induz a apoptose nas linhagens MOLT-4, Namalwa e Raji.....	49
Figura 6. Tratamento com NT157, inibidor de IGF1R/IRS1-2, provoca aumento de clivagem de caspase 3 nas linhagens celulares de LLA.....	50
Figura 7. Tratamento com OSI-906, inibidor de IGF1R/IR, não provoca clivagem de caspase 3 em linhagens celulares de LLA.....	50
Figura 8. O NT157, inibidor de IGF1R/IRS1-2, reduz a proliferação e atrasa a progressão do ciclo celular em células de leucemia linfóide aguda.....	52
Figura 9. O OSI-906, inibidor de IGF1R/IR, reduz a proliferação e atrasa a progressão do ciclo celular em células de leucemia linfóide aguda.....	54
Figura 10. NT157 (inibidor de IGF1R/IRS1-2) e OSI-906 (inibidor de IGF1R/IR) reduzem a migração de células Jurkat.....	56
Figura 11. O tratamento com o inibidor de IGF1R/IRS1-2, NT157, modula a expressão de 25 genes da via de sinalização MAPK.....	58
Figura 12: O tratamento com NT157, inibidor de IGF1R/IRS1-2, modula as vias de sinalização PI3K/Akt/mTOR e MAPK nas células Jurkat e Namalwa.....	60
Figura 13: O tratamento com OSI-906, inibidor de IGF1R/IR, modula as vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK nas células Jurkat e Namalwa.....	62
Figura 14. NT157 (inibidor de IGF1R/IR1-2) reduz seletivamente a viabilidade e induz apoptose em células primárias de pacientes com LLA.....	64
Figura 15. OSI-906 (inibidor de IGF1R/IR) reduz a viabilidade células primárias de pacientes com LLA.....	66
Figure 16. Padronização da indução de neoplasia sistêmica com células CEM ^{Luc2} em camundongos NSG.....	68
Figura 17. Desenho experimental.....	69
Figura 18. Tratamento com NT157 em camundongos NSG xenotransplantados.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com leucemia linfóide aguda.....	32
Tabela 2. Sequência dos iniciadores utilizados para validação do PCR <i>array</i>	36
Tabela 3. Anticorpos contra as proteínas de interesse, totais e fosforiladas, avaliadas por <i>Western blotting</i>	38

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Leucemia linfóide aguda	19
1.2. A via de sinalização do IGF1R/IRS	21
1.3. Inibidores farmacológicos da via de sinalização IGF1R/IRS	25
1.4. Justificativa do trabalho	27
OBJETIVOS	28
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo geral	29
2.2. Objetivos específicos	29
MATERIAL E MÉTODOS	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Casuística	31
3.2. Linhagens celulares	32
3.3. Inibidores farmacológicos	32
3.4. Ensaios funcionais	33
3.5. Ensaios moleculares	35
3.6. Padronização de um modelo de camundongos xenotransplantados com linhagem celular humana de LLA T (CEM)	38
3.7. Experimento piloto para o tratamento com NT157 <i>in vivo</i>	40
3.8. Análise estatística	41
RESULTADOS	42
4. RESULTADOS	43
4.1. A inibição farmacológica de IGF1R/IRS1-2 por NT157 e de IGF1R/IR por OSI-906 reduzem a viabilidade em linhagens celulares de LLA	43
4.2. O inibidor farmacológico NT157, mas não o OSI-906, induz a apoptose e clivagem de caspase 3 em linhagens celulares de LLA	46
4.3. Os tratamentos com NT157 e OSI-906 reduzem a proliferação e atrasam a progressão do ciclo celular em linhagens celulares de LLA	51
4.4. Os inibidores farmacológicos NT157 e OSI-906 reduzem a migração de células Jurkat	55
4.5. NT157 modula a expressão de 25 genes da via de sinalização MAPK	57
4.6. NT157 e OSI-906 modulam de formas distintas as vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK em células de LLA	59
4.7. Os inibidores farmacológicos NT157 e OSI-906 reduzem a viabilidade celular de células primárias de pacientes com LLA, mas não de leucócitos normais	63
4.8. Padronização de modelo xenográfico de neoplasia sistêmica induzida por linhagem celular CEM	67
4.9. Tratamento com NT157 em camundongos NSG xenotransplantados	69
DISCUSSÃO	71
5. DISCUSSÃO	72
CONCLUSÕES	76
6. CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	79

7. REFERÊNCIAS	80
ANEXOS	88
ANEXO A – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP	89
Anexo B – Parecer de aprovação da Comissão de Ética ao Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo	93
APÊNDICE	94
APÊNDICE A – Tabela Suplementar 1: Genes relacionados a via de sinalização da MAPK avaliados por PCR array	95

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leucemia linfoide aguda

A leucemia linfoide aguda (LLA) é uma neoplasia maligna hematológica em que a proliferação descontrolada de linfoblastos ocorre na medula óssea, sangue e/ou tecidos. A LLA possui uma distribuição bimodal com cerca de 60% casos diagnosticados em pacientes com menos de 20 anos de idade, representando quase 80% das leucemias infantis e o segundo pico é em torno da quinta década de vida e responde por apenas 20% dos diagnósticos de leucemias em adultos¹. Os pacientes pediátricos têm taxas elevadas de cura com taxa de aproximadamente 95% de remissão completa e taxas estimadas de sobrevida livre de eventos em cinco anos de 79 a 82% dos casos^{2; 3 4}. Em menor frequência, a LLA ocorre também nos adultos, e embora avanços significativos tenham sido atingidos no tratamento da LLA de adultos, a taxa de cura para estes pacientes ainda é insatisfatória por causa das recaídas^{5; 6; 7}. A sobrevida global em cinco anos é aproximadamente de 90% em crianças e de 30 a 40% em pacientes adultos e idosos⁶.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2008, a classificação da LLA é baseada na combinação citogenética e características imunofenotípicas dos blastos^{8; 9}. A LLA se divide em dois grandes grupos: precursor B (LLA B) e precursor T (LLA T), de modo que elas podem ser subclassificadas de acordo com o grau de diferenciação B ou T das células leucêmicas, pois a expressão das proteínas celulares reflete a ontogenia linfoide normal¹⁰. A LLA de células B compreende aproximadamente 90% dos casos em crianças e 75% em adultos, enquanto a LLA de células T compreende os demais casos¹¹. As alterações citogenéticas encontradas na LLA B são: hiperdiploidia de pelo menos 5 cromossomos (incluindo X, 4, 6, 10, 14, 17, 18, e 21); hipodiploidia com menos de 44 cromossomos; e translocações recorrentes, incluindo t(12;21)(p13;q22) que codifica *ETV6-RUNX1*, t(1;19)(q23;p13) que codifica *TCF3-PBX1*, t(9;22)(q34;q11) que codifica *BCR-ABL1* (cromossomo *Philadelphia* ou *Ph*), rearranjos *MLL* e rearranjos *MYC*¹². A LLA T não apresenta alterações citogenéticas e a mutação no gene *NOTCH1* é a mais frequente¹². Na revisão da OMS de 2016, além das categorias linfoblástica B e T, a LLA é classificada com duas novas entidades genéticas provisoriamente adicionadas: LLA B com amplificação intracromossômica do cromossomo 21; e LLA B com translocações envolvendo

tirosinoquinasas ou receptores de citocinas, denominadas LLA “BCR-ABL1-like” ou “*Philadelphia-like*” (*Ph-like*)¹¹. A LLA *Ph-like* possui perfil de expressão gênica semelhante à LLA BCR-ABL1 positivo, é responsável por 15 a 20% das LLA em adolescentes e jovens adultos e está relacionado a um prognóstico desfavorável¹³.

A incorporação de agentes direcionados nos protocolos padrão de tratamento da LLA em adulto melhorou a sobrevivência em vários subconjuntos de pacientes, como por exemplo, ao adicionar o imatinibe no tratamento da LLA BCR-ABL1 positivo houve melhoras nas taxas de remissão completa da doença e na sobrevida global destes pacientes¹⁴. Contudo, para a maioria dos adultos recém-diagnosticados com LLA, apesar da capacidade de obter uma completa remissão da doença, esses resultados raramente são duradouros e apenas alguns pacientes podem ser levados para o transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas⁷. Desta forma, novos agentes de tratamento estão sendo desenvolvidos para melhora no tratamento da LLA em adulto.

Um dos grupos de compostos sob investigação em ALL em maior evidência são os anticorpos monoclonais. Os linfoblastos expressam vários antígenos de superfície celular que podem servir como alvos para anticorpos monoclonais. Mais de 95% das células de LLA B expressam CD19 e mais de 90% expressam CD22, tornando-os assim atraentes sítios alvos¹. Existem quatro construções diferentes de anticorpos monoclonais que estão sendo desenvolvidas atualmente na LLA: (1) os anticorpos não conjugados rituximabe (anti-CD20)¹⁵ e epratuzumabe (anti-CD22)¹⁶ que destroem e atingem as células através da citotoxicidade de células dependentes de anticorpos; (2) ozogamicina de inotuzumab¹⁷ e SGN-CD19a¹⁸ que são anticorpo conjugados a fármaco; (3) SAR3419¹⁹ e combotox^{20; 21} que são anticorpos conjugados a toxinas; e (4) blinatumomabe que é um anticorpo biespecífico (anti-CD3 e anti-CD19), onde o anti-CD3 reconhece as células citotóxicas T e o anti-CD19 reconhece os linfoblastos²². Além das CAR T cells (do inglês *Chimeric Antigen Receptor T Cell*) que é uma molécula híbrida composta de domínios de ligação ao antígeno fundidos com domínios de ativação e co-estimulatórios de células T²³.

Estes são apenas alguns dos exemplos mais reconhecidos dos avanços que ocorreram no campo do desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da LLA. Apesar dessas descobertas, pacientes adultos diagnosticados com LLA continuam a apresentar recaída da doença e resistência às opções de tratamento disponíveis, o que sugere que a necessidade de desenvolver novas abordagens que possam ser usadas isoladamente ou em combinação com as modalidades terapêuticas

atuais para erradicar a doença permanece crítica. Ainda existem importantes lacunas no conhecimento do mecanismo biológico para o desenvolvimento da fisiopatologia da LLA, e um fator relevante seria a identificação de genes e proteínas diferencialmente expressos, que podem contribuir para o entendimento da fisiopatologia da doença, e representar novos alvos terapêuticos²⁴.

Dessa forma, grandes esforços têm sido feitos na tentativa de se desenvolver terapias alvos que atuem em vias de sinalização que participem da proliferação e sobrevivência celular. As vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK são frequentemente desreguladas em neoplasias, contribuindo para o fenótipo leucêmico da LMA^{25; 26}, e da LLA^{27; 28}.

Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo da investigação das proteínas IRS, responsáveis pela ativação das vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK e da eficácia dos inibidores farmacológicos destas proteínas em modelos leucêmicos. As proteínas responsáveis pela ativação destas vias ainda são pouco exploradas na fisiopatologia da LLA. Dessa forma, o presente trabalho tem como foco a via de sinalização IGF1R/IRS1, a qual ativa as vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK na LLA, e representa um potencial alvo para o desenvolvimento de novas drogas em neoplasias hematológicas^{25; 29}.

1.2. A via de sinalização do IGF1R/IRS

O gene *IGF1R* (do inglês, *Insulin-like growth factor 1 receptor*) está localizado no braço longo do cromossomo 15 (15q25.26), e codifica a glicoproteína transmembrana IGF1R que possui atividade tirosinoquinase intrínseca³⁰. Estruturalmente, IGF1R é semelhante ao receptor de insulina (IR) com aproximadamente 50% de homologia na sequência de aminoácidos, e é composto por uma subunidade α extracelular, responsável pela ligação de IGF1R ao seu ligante IGF1, e uma subunidade β , constituída por um domínio transmembrana e um domínio catalítico com atividade tirosinoquinase³¹.

Os substratos do receptor de insulina (IRS) são proteínas citoplasmáticas adaptadoras compostas por 6 membros (IRS1-6)^{32; 33; 34; 35; 36; 37} que atuam conectando o sinal de um receptor transmembrana com atividade tirosinoquinase às vias de sinalização intracelular³⁸. As proteínas IRS1 e IRS2 são os membros da família IRS que

estão presentes na maioria dos tecidos normais³⁹. As proteínas IRS1/2 não possuem atividade enzimática intrínseca e contribuem para a sinalização através de suas funções como adaptadoras³³, ambas compartilham homologia na porção N-terminal, em que dois domínios altamente conservados contribuem para o recrutamento de IRS até seus receptores^{40; 41}. A associação das proteínas IRS com seus receptores resulta na fosforilação de IRS em seus resíduos de tirosina na porção C-terminal, gerando sítios de ligação que recrutam proteínas efetoras que participam da sinalização celular das vias PI3K/AKT/mTOR, MAPK e JAK2/STAT^{34; 42; 43}. As proteínas IRS1/2 são comuns aos membros da família de receptores tirosinoquinase, tais como, IR, IGF1R, EGFR, os quais podem influenciar na tumorigênese e progressão do câncer^{38; 44}. As atividades pró-oncogênicas do IGF1R são altamente dependentes das proteínas adaptadoras IRS1 e IRS2, por exercerem importantes funções na transformação celular⁴⁵.

A via de sinalização do IGF1R inicia-se através da ligação do ligante IGF1 ao seu receptor IGF1R e subsequente ativação de seus substratos IRS1 e IRS2⁴⁶. A via de sinalização estimulada pelo IGF1 regula o crescimento normal das células e contribui para transformação e crescimento de células malignas em muitos contextos de neoplasia²⁹. As proteínas IRS, uma vez fosforiladas em tirosina pelo receptor IGF1R, transmitem sinais mitogênicos, antiapoptóticos e antidiferenciação, principalmente por meio da ativação das vias de sinalização tais como, PI3K/AKT/mTOR e MAPK, fundamentais para a diferenciação e proliferação celular^{47; 48} (**Figura 1**).

Figura 1. Via de sinalização mediada pelas proteínas IRS1/2. As proteínas IRS são recrutadas pelos seus domínios de PH/PTB e fosforiladas em resíduos de tirosina pelos receptores tirosinoquinase IGF1R ou IR. A fosforilação em tirosina das proteínas IRS desencadeia a ativação da sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK, regulando muitos processos biológicos, incluindo proliferação celular, síntese de proteínas, sobrevivência e expressão gênica em tecidos humanos específicos. Abreviaturas: P, fosforilação; PY, fosforilação da tirosina. A figura foi produzida através da plataforma Servier Medical Art disponível em <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>.

Evidências substanciais de que a via de sinalização IGF1R/IRS é importante para a manutenção e a sobrevivência de células malignas de tumores sólidos e de neoplasias hematológicas têm sido demonstradas⁴⁵. Além disso, a via de sinalização IGF1R/IRS também é conhecido por dar às células malignas a capacidade de sobreviver independente de ancoragem, apoiando a invasão tumoral e disseminação metastática^{49; 50}.

As proteínas IRS estão frequentemente mais expressas em tumores humanos, quando comparados ao tecido normal³⁹. Os tipos de tumores sólidos reportados com alta expressão de IRS1 e de IRS2 são câncer hepatocelular⁵¹, pancreático⁵², de próstata⁵³, e mesotelioma⁵⁴. Em neoplasia de mama⁵⁵, ovário⁵⁶ e meduloblastoma⁵⁷, o IRS1 se apresenta com altos níveis de expressão e sua função na proliferação celular foi dependente da ativação de IGF1R³⁸.

As proteínas IRS também estão frequentemente mais expressas nas neoplasias hematológicas. Recentemente, o nosso grupo de pesquisa identificou que o RNAm de *IRS1*, *β-catenina* e *MYC* estavam altamente expressos em um coorte de 45 pacientes com LLA em comparação com células mononucleares de 13 doadores saudáveis. A

expressão de mRNA do *MYC* correlacionou-se positivamente com a β -catenina e com o *IRS1*. O aumento da idade e a expressão de *MYC* afetaram negativamente a sobrevida global destes pacientes por meio de análise univariada⁵⁸. Fernandes e Rodrigues Alves *et al.*⁵⁸ também relataram altos níveis de expressão proteica de IGF1R, IRS1, MYC e β -catenina em linhagens celulares de LLA. Além disso, observaram que IRS1 e β -catenina estavam colocalizados no núcleo e no citoplasma das células⁵⁸, corroborando com os dados de Chen e colaboradores⁵⁹ que haviam descrito previamente que o IRS1, através da sinalização de IGF1R, é a proteína responsável pela translocação nuclear e ativação de β -catenina⁵⁹.

Em um estudo usando células primárias de pacientes adultos com LLA B, Juric e colaboradores⁶² identificaram, através de análises computacionais de dados obtidos por *microarray*, uma baixa expressão de IRS1 em células de LLA B BCR-ABL1 positivo em relação às células LLA B BCR-ABL1 negativo. No entanto, a elevada expressão de IRS1 encontrada em alguns pacientes com LLA B BCR-ABL1 positivo foi negativamente correlacionada com a sobrevida destes pacientes, independente da idade e da contagem de leucócitos no momento do diagnóstico⁶².

Traina e colaboradores⁶⁰ demonstraram pela primeira vez o envolvimento da proteína IRS1 na transdução de sinal BCR-ABL1 na leucemia mieloide crônica (LMC). Em K562, linhagem celular positiva para BCR-ABL1 derivada de um paciente com LMC em crise blástica, a proteína IRS1 mostrou ser constitutivamente fosforilada e associada à fosforilação de BCR-ABL1. O estudo também descreveu a associação entre IRS1 e PI3K em células K562⁶⁰. O envolvimento funcional do IRS1 na via de sinalização BCR-ABL1 foi demonstrado mais tarde utilizando o silenciamento do IRS1 por shRNA lentiviral nas células K562⁶¹. A inibição do IRS1 reduziu a proliferação celular e o crescimento clonal, interrompendo a progressão do ciclo celular na fase G₀/G₁. A inibição de IRS1 também diminuiu a fosforilação de AKT, P70S6K e ERK, indicando inibição das vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK. A inibição do IRS1 não modulou a apoptose e nem a fosforilação de BCR-ABL1⁶¹.

Chapuis e colaboradores²⁵ identificaram que a elevada expressão de IGF1/IGF1R resultante da produção autócrina de IGF1 e ativação constitutiva de IGF1R são responsáveis pela ativação de PI3K/AKT/mTOR em leucemia mieloide aguda (LMA). O tratamento de células primárias de LMA com inibidor de IGF1R, α IR3, resultou na inibição da via PI3K/AKT/mTOR em 70% dos casos de LMA com ativação constitutiva de PI3K²⁵.

A elevada expressão de IGF1R foi também identificada em células primárias de leucemia linfóide crônica (LLC), sugerindo a contribuição da via de sinalização IGF1R/IRS para patologia da doença⁶³. O tratamento com inibidores de IGF1R (AG1024, PPP) e inibidores de IGF1R/IR (OSI-906) reduziu a viabilidade de células primárias de LLC e induziu apoptose. A perda da atividade ou expressão de IGF1R foi associada com redução significativa dos níveis de fosforilação de IRS1, PI3K, AKT, MEK, e ERK⁶³.

Em tricoleucemia, ou HCL (do inglês, *Hairy Cell Leukemia*), Durham e colaboradores⁶⁴ identificaram, através de sequenciamento e análise de número de cópias, uma nova mutação de ganho de função no IRS1 que contribuiu para a resistência clínica ao inibidor de BRAF^{V600E} vemurafenibe em 1 de 53 pacientes com tricoleucemia. Além disso, eles observaram que o IRS1 mutado foi capaz de ativar a via de sinalização PI3K/AKT e fosforilar ERK1/2, levando ao crescimento celular independente de citocina *in vitro* de células Ba/F3⁶⁴.

1.3 Inibidores farmacológicos da via de sinalização IGF1R/IRS

A inibição farmacológica de IGF1R foi descrita como uma estratégia terapêutica potencial na LLA. Medyouf e colaboradores⁶⁵ observaram que a inibição da sinalização de IGF1R por inibidores farmacológicos (BMS-536924 e α IR3) bloqueou o crescimento e a sobrevivência de células primárias e de linhagens humanas leucêmicas de LLA T (ALLSIL e HPBALL), confirmando prévios resultados com inibidores de membros da via PI3K/AKT/mTOR^{66; 67}. Além disso, ilustraram que a ativação de IGF1R estimulada por IGF1, contribuiu positivamente na via de sinalização PI3K/AKT/mTOR nas LLA T com mutação em *NOTCH*⁶⁵. Outros estudos mostraram que o inibidor seletivo do IGF1R *picropodophyllin* (PPP) diminuiu eficientemente a viabilidade celular, a apoptose induzida e a interrupção do ciclo celular na fase G₂/M em linhagens celulares de malignidades hematológicas, tais como a LLA T⁶⁸ e o linfoma difuso de grandes células B⁶⁹.

O inibidor de tirosinoquinase GZD824 teve um efeito antitumoral em células de LLA pré-B, inibindo ambas as vias de sinalização SRC quinase e PI3K/AKT/mTOR, e as células de LLA pré-B com menor expressão de IRS1 foram mais sensíveis ao tratamento com GZD824. Portanto, a expressão de IRS1 poderia ser usada como um

biomarcador para prever a eficácia de GZD824 no tratamento de células de LLA pré-B⁷⁰.

O inibidor OSI-906 é seletivo para os receptores tirosina quinase IGF1R e IR, e seu efeito antiproliferativo *in vitro* foi comprovado em linhagens celulares de tumores sólidos colorretal, mama, pulmão, pâncreas e rhabdomyosarcoma⁷¹. Em neoplasias hematológicas, o tratamento com OSI-906 reduziu a viabilidade celular e induziu a apoptose em células primárias de pacientes com LLC⁶³. Em linhagens celulares e células primárias de pacientes com mieloma múltiplo, o OSI-906 mostrou ter ação antitumoral sinérgica com bortezomibe⁷². O inibidor OSI-906 é interessante pela sua capacidade de ser altamente seletivo para dois receptores tirosina quinase, IGF1R e IR, e por possuir eficácia na inibição de vias de sinalização comum a ambos os receptores, incluindo a via PI3K/AKT/mTOR e MAPK, com consequente inibição de proliferação celular⁷¹. Atualmente, o OSI-906 está sendo usado em ensaios clínicos de Fase I/II/III que incluem pacientes com uma variedade de tumores sólidos e neoplasias hematológicas (www.clinicaltrials.gov).

A inibição da sinalização das proteínas IRS ocorre quando estas estão fosforiladas em serina, o que causa a inibição e a degradação das proteínas IRS, inibindo a sua função⁷³. NT157 foi identificado como uma droga específica e capaz de inibir o IRS1 e IRS2 em neoplasias sólidas⁷⁴. Reuveni e colaboradores⁷⁴ demonstraram que, em modelos de linhagens de neoplasias sólidas, o NT157 induz a fosforilação do IRS1 e IRS2 em serina, resultando na sua degradação, com consequente inibição da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR, redução da proliferação celular e aumento da apoptose. O tratamento com NT157 *in vivo*, inibiu significativamente o crescimento de tumores sólidos, como câncer de ovário e próstata⁷⁴. Achados semelhantes foram relatados em câncer de próstata⁷⁵ e osteosarcoma⁷⁶. Recentemente, foi demonstrado que o NT157 é um agente de direcionamento duplo para inibir não apenas a IGF1R/IRS1-2, mas também a via de sinalização STAT3, ao exercer sua atividade anticâncer em células de melanoma, enquanto não mostrou efeitos sobre melanócitos normais⁷⁷. O NT157 também demonstrou efeitos anticâncer, afetando tanto as células malignas quanto seu microambiente no câncer colorretal através da inibição das vias de sinalização IGF1R/IRS1-2 e STAT3, e da inibição da expressão de citocinas pró-tumorigênicas, de quimiocinas e de fatores de crescimento que contribuem para tumorigênese⁷⁸. Em neoplasias hematológicas, NT157 demonstrou diminuir a viabilidade celular em células de pacientes com neoplasia mieloproliferativa JAK2^{V617F} positivo⁷⁹.

1.4. Justificativa do trabalho

Tendo em vista a identificação da relevância das proteínas IGF1R e IRS1 na fisiopatologia da LLA e a dificuldade em se encontrar tratamentos eficazes para pacientes adultos com LLA, o nosso trabalho tem como hipótese que IGF1R/IRS1 representa um alvo de inibição com grande potencial para o tratamento da LLA. Como estratégia de inibição, utilizamos o composto NT157, inibidor de IGF1R/IRS1-2, e o composto OSI-906, inibidor seletivo de IGF1R e IR, para estudos funcionais e de expressão/ativação gênica e proteica em modelos de LLA para elucidar o significado biológico destas proteínas na fisiopatologia da LLA.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho é investigar o efeito dos inibidores farmacológicos de IGF1R/IRS1-2, NT157, e de IGF1R/IR, OSI-906, na leucemia linfóide aguda.

2.2. Objetivos específicos

-Avaliar o efeito da inibição farmacológica de IGF1R/IRS1-2 por NT157 e de IGF1R/IR por OSI-906:

- ✓ Em linhagens celulares de leucemia linfóide aguda:
 - Nos processos celulares de viabilidade, apoptose, proliferação, ciclo celular e migração;
 - Na expressão/ativação gênica e proteica das vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK.
- ✓ Em células primárias de pacientes com leucemia linfóide aguda e em células mononucleares do sangue periférico de doadores saudáveis:
 - Na viabilidade e na apoptose celular.

-Avaliar o efeito da inibição farmacológica de IGF1R/IRS1-2 por NT157:

- ✓ Em um modelo de camundongos xenotransplantados com linhagem celular humana de leucemia linfóide aguda:
 - No fenótipo neoplásico e na sobrevida.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística

3.1.1. Células hematopoiéticas normais

Amostras de sangue periférico de doadores saudáveis foram coletadas de voluntários do laboratório de Hematologia (n=4). A mediana de idade dos controles normais foi de 35 anos (mínimo: 27 - máximo: 44).

3.1.2. Células primárias de pacientes com LLA

Amostras de sangue periférico ou medula óssea de pacientes com LLA, ao diagnóstico ou no momento da recidiva, foram coletadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). A mediana de idade dos pacientes foi de 33 anos (mínimo: 19 - máximo: 61). Os pacientes foram classificados como LLA B (n=8) e LLA T (n=2). Os pacientes também foram classificados como BCR-ABL1 positivo (n=2) e BCR-ABL1 negativo (n=8). As amostras foram obtidas de medula óssea (n=4) ou sangue periférico (n=6). Para as amostras obtidas de medula óssea, a porcentagem de blastos na medula óssea variou de 45% a 97% (mediana: 78%). Para as amostras obtidas de sangue periférico a porcentagem de blastos no sangue periférico variou de 45% a 98% (mediana: 82%). As características clínicas dos pacientes incluídos no estudo estão detalhadas na **Tabela 1**. A utilização das amostras foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (**ANEXO A**).

As amostras dos pacientes com LLA e dos doadores saudáveis foram submetidas à separação por gradiente, utilizando Ficoll-Hypaque (Sigma, St.Louis, MO, EUA) para a obtenção das células mononucleares, seguida de lise de hemácias com tampão contendo cloreto de amônio. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RPMI, acrescido de 1% de penicilina/estreptomicina, enriquecido com 30% de SBF, IL7 (100 ng/mL), IL3 (30 ng/mL), SCF (30 ng/mL) e FLT3L (100 ng/mL), plaqueadas na ausência ou na presença de NT157 (0,4; 0,8 e 1,6 μ M) e de OSI-906 (1, 5, 10 e 20 μ M) por 72 horas, e submetidas aos ensaios de viabilidade celular e apoptose.

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com leucemia linfóide aguda

Parâmetros	Número
Pacientes com LLA	10
Diagnóstico	7
Recidiva	3
Amostra	
Medula óssea, % blastos [mediana (intervalo)]	78% (45 - 97)
Sangue periférico, % blastos [mediana (intervalo)]	82% (45 - 98%)
Gênero	
Masculino	8
Feminino	2
Idade, anos [mediana (intervalo)]	33 (19 - 61)
Imunofenotipagem	
LLA T	2
LLA B	8
BCR-ABL1	
Positivo	3
Negativo	7

3.2. Linhagens celulares

Neste estudo, foram utilizadas as linhagens celulares humanas de LLA T (Jurkat e MOLT-4) e de LLA B (Namalwa e Raji). As linhagens celulares de leucemia linfóide aguda foram adquiridas da ATCC (ATCC, Philadelphia, PA, USA). As células foram autenticadas utilizando-se a técnica de *Short Tandem Repeat* (STR) e testadas para a presença de micoplasma. O cultivo foi realizado em meio RPMI, acrescido de 1% de penicilina/estreptomicina e enriquecido com 10% de soro bovino fetal (SBF). As células foram mantidas em garrafas de 75 cm² em estufa à 37°C com 5% de CO₂.

3.3. Inibidores farmacológicos

O composto NT157 foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Alexander Levitzki (Unidade de Sinalização Celular, Departamento de Química Biológica, Universidade Hebraica de Jerusalém, Jerusalém, Israel) para a realização de testes iniciais, e posteriormente foi adquirido comercialmente de Sun-Shinechem (Sun-Shinechem, Wuhan, HB, China). O OSI-906 foi obtido da Selleckchem (Selleck Chemicals,

Houston, TX, EUA). Ambos os inibidores foram dissolvidos em DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e armazenados em soluções estoque de 10 mM (a concentração final de DMSO foi inferior a 0,02% em volume). Experimentos utilizando diferentes doses e tempos de exposição às drogas foram realizados para a definição das condições de tratamento para cada experimento proposto.

3.4. Ensaios funcionais

3.4.1. Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de metabolização de methylthiazoltetrazolium (MTT). Para o tratamento, células Jurkat, MOLT-4, Namalwa e Raji foram submetidas à privação de SBF por quatro horas e após este período, 1×10^4 células/poço foram cultivadas em placas de 96 poços na ausência ($\emptyset$) e na presença de NT157 em diferentes concentrações (0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μ M) ou na presença de OSI-906 nas concentrações (1, 5, 10 e 20 μ M). Após os períodos de tratamento (24, 48 e 72 horas), foram adicionados 10 μ L de uma solução de MTT (5 mg/mL) aos poços e as placas foram incubadas à 37°C por 4 horas. Para interromper a reação, foram adicionados 100 μ L de 0,1N HCl em isopropanol. A avaliação da proliferação foi realizada pela mensuração da absorbância à 570nm por espectrofotometria. Os valores de IC₅₀ foram calculados por meio de regressão não linear, utilizando-se o *software* CalcuSyn (Biosoft, Ferguson, MO, EUA).

3.4.2. Avaliação da apoptose

A indução da apoptose foi verificada através do ensaio de apoptose por citometria de fluxo, utilizando anexina V conjugada com FITC ou APC e iodeto de propídio (PI) e confirmada pela avaliação da atividade da caspase 3 através de *Western Blot*. Células Jurkat, MOLT-4, Namalwa e Raji foram cultivadas em placas de 24 poços na ausência ($\emptyset$) e na presença de NT157 (0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 μ M) ou de OSI-906 (1; 5 e 10 μ M) por 24, 48 e 72 horas. Após tratamento, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em um tampão de ligação contendo 1 μ g/mL de PI e 1 μ g/mL de anexina V. As amostras foram incubadas por 15 minutos na ausência de luz em temperatura ambiente e analisadas em equipamento FACSCalibur (BD Bioscience, San Jose, CA,

EUA). Para cada amostra, foram adquiridos dez mil eventos. As análises foram realizadas com o *software* FlowJo (Treestar, Inc., San Carlos, CA, EUA). Em paralelo, o extrato total das células foram obtidos e submetidos a *western blotting* com anticorpo específico para Caspase 3 (#9665 - Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA).

3.4.3. Avaliação da proliferação celular

A análise de proliferação celular foi realizada através da marcação para Ki-67. Células Jurkat e Namalwa foram tratadas com NT157 (Ø; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 µM) e com OSI-906 (Ø; 1; 5; 10 e 20 µM) por 24 horas, fixadas com etanol 70% e armazenadas em freezer -20°C. O ensaio de marcação com o antígeno Ki67 foi realizado de acordo com a orientação do fabricante (Ki-67 FITC clone B56; BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) e a média da intensidade de fluorescência foi obtida através do aparelho FACSCalibur (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA). Isótopo IgG foi utilizado como controle negativo.

3.4.4. Análise do ciclo celular

O ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo, utilizando-se marcação com iodeto de propídeo (BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit, BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) de acordo com orientações do fabricante. Células Jurkat e Namalwa foram submetidas aos tratamentos com NT157 (Ø; 0,2; 0,4 e 0,8 µM) e com OSI-906 (Ø; 1; 5; 10 µM) por 24 horas. A porcentagem de células em cada fase do ciclo foi adquirida por mensuração do conteúdo de DNA celular em aparelho FACSCalibur (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) e analisada através do *software* FlowJo (Treestar, Inc., San Carlos, CA, EUA).

3.4.5. Avaliação da migração celular

Os experimentos de migração celular foram realizados na King's College London sob a supervisão da Prof. Dra. Anne J. Ridley através do financiamento do Programa Fórmula de Bolsas de Mobilidade Internacional Santander Universidades 2015. Para avaliação da capacidade de migração celular, Jurkat e Namalwa foram

tratadas na ausência ($\emptyset$) e na presença de NT157 (0.4 μ M) ou de OSI-906 (10 μ M) durante 24 ou 48 horas. Após o tratamento, as células foram plaqueadas (1×10^5 células por poço) em placas de 24 poços previamente revestidas com 10 μ g/mL de fibronectina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 2 horas. A migração celular foi acompanhada por microscopia *time-lapse* e uma série de imagens foram adquiridas, 1 foto a cada 1,5 minutos por 3 horas para Jurkat e a cada 5 minutos por 5 horas para Namalwa, em condições atmosféricas (37°C, 5% CO₂), usando um software Metamorph (Molecular Devices, Wokingham, Reino Unido) em um microscópio Nikon Eclipse TE2000 com objetivas de 10x ou 20x. As imagens em *time-lapse* da duração do experimento foram exibidas como um filme e as células foram rastreadas usando a ferramenta *Manual Tracking* do *software* ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). A distância acumulada percorrida e a velocidade das células foram obtidas da média de pelo menos 30 células para cada condição.

3.5. Ensaios moleculares

3.5.1. Avaliação do perfil de expressão gênica por PCR *array*

RNA total de células Jurkat tratadas ou não com NT157 0,8 μ M por 24 horas foi isolado utilizando Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Para mensurar a quantidade e qualidade do RNA, alíquotas de 2 μ L de cada amostra foram submetidas à leitura da densidade ótica a 260nm (DO₂₆₀) pelo espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Apenas amostras apresentando razão A₂₆₀/A₂₈₀ entre 1,7 e 2,0 foram utilizadas. O DNA complementar (cDNA), foi sintetizado a partir de 1 μ g do RNA total, utilizando kit High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

O PCR *array* foi realizado, adicionando-se o cDNA em placas comerciais específicas para a determinação do perfil de expressão de genes relacionados à via de sinalização MAPK (*Human MAP Kinase Signaling Pathway RT² ProfilerTM PCR array* kit - #PAHS-061A; SA Biosciences, Frederick, MD, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As placas são constituídas por 96 poços, incluindo 12 controles de qualidade da reação e 84 genes de interesse. A amplificação das amostras foi realizada em equipamento ABI 7500 Sequence Detector System (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Os dados obtidos no PCR *array* foram analisados em uma plataforma online

disponibilizada pela empresa que forneceu as placas. Os níveis de RNA mensageiro foram normalizados em relação aos níveis de expressão das amostras não tratadas e para a determinação dos genes modulados adotou-se um *fold-change* de ≥ 2 .

3.5.2. Avaliação da expressão gênica por PCR quantitativo

Para validar a modulação da expressão gênica identificada pelo PCR *array*, realizou-se PCR quantitativo (PCRq) para os principais genes alterados, nas linhagens Jurkat, MOLT-4, Namalwa e Raji tratadas ou não com NT157 0,8 μM ou OSI-906 20 μM por 24 horas. Foram realizados cinco experimentos independentes, extração de RNA total e transcrição em cDNA. As amostras foram amplificadas no equipamento ABI 7500 Sequence Detector System (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) com iniciadores específicos para *CDKN1A*, *FOS*, *JUN* e o endógeno *HPRT1*. As sequências dos iniciadores estão descritas na **Tabela 2**. A quantificação relativa da expressão dos genes de interesse foi calculada utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$.

Tabela 2. Sequência dos iniciadores utilizados para validação do PCR *array*

Genes-Alvo	Sequência de iniciadores (5' - 3')
<i>CDKN1A</i>	FW: 5' TGT CAC TGT CTT GTA CCC TTG T 3'
	RW: 5' GCC GGC GTT TGG AGT GGT AG 3'
<i>FOS</i>	FW: 5' AGA ATC CGA AGG GAA AGG AA 3'
	RW: 5' CTT CTC CTT CAG CAG GTT GG 3'
<i>JUN</i>	FW: 5' CAG GTG GCA CAG CTT AAA CA 3'
	RW: 5' GTT TGC AAC TGC TGC GTT AG 3'
<i>HPRT1</i>	FW: 5' GAA CGT CTT GCT CGA GAT GTG A 3'
	RW: 5' TCC AGC AGG TCA GCA AAG AAT 3'

3.5.3. Análise da expressão e ativação proteica por *western blotting*

Células Jurkat e Namalwa foram tratadas ou não com NT157 0.8 μM e com OSI-906 20 μM por 1, 4, 8, 12, 24 e 48 horas e submetidas a avaliação da expressão e ativação proteica. Após o tratamento, o precipitado celular contendo 5×10^6 células foi submetido a extração de proteína e quantificação. Ao produto do extrato total proteico, foi adicionado tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditioneitol (DTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Em seguida, as proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% -SDS-PAGE em aparelho de eletroforese Mini-Protean (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada por 90 minutos a 120 V (constante) em aparelho de transferência Mini-Protean (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). A ligação dos anticorpos às proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por pelo menos 1 hora com tampão de bloqueio. A membrana de nitrocelulose foi então incubada com anticorpos específicos diluídos em tampão de bloqueio por 12 horas a 4°C e então lavadas três vezes com solução basal (10 mmol/L de Tris, 150 mmol/L de NaCl, e 0.02% de Tween 20). Após este período, realizou-se incubação com anticorpos secundários e as membranas foram reveladas, utilizando-se o kit SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate System (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA) e Gel Doc XR+ system (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Os anticorpos utilizados estão listados na **Tabela 3**. A intensidade de expressão proteica foi normalizada pela expressão da proteína endógena actina, e a intensidade da fosforilação proteica, através da expressão da proteína total correspondente. As imagens finais foram elaboradas a partir das porções do gel que contêm as bandas de interesse.

Tabela 3. Anticorpos contra as proteínas de interesse, totais e fosforiladas, avaliadas por *Western blotting*

Empresa	Proteína alvo	Número de catálogo
Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA)	p-IRS1	sc-17195
	p-P70S6K	sc-7984-R
	P70S6K	sc-8418
	γ H2AX	sc-517348
Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EUA)	p-IGF1R	#3918
	IGF1R	#9750
	IRS1	#3407
	p-AKT1/2/3	#4060
	AKT1/2/3	#4685
	p-mTOR	#2971
	mTOR	#2972
	p-4EBP1	#9455
Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA)	4EBP1	#9452
	p-ERK1/2 ^{T183/Y185}	700012
Novus Biologicals (Littleton, CO, EUA)	ERK1/2	44-654G
	Actina	NB600-501H

3.6. Padronização de um modelo de camundongos xenotransplantados com linhagem celular humana de LLA T (CEM)

3.6.1. Animais

Para a padronização do modelo murino, foram utilizados oito camundongos fêmeas NSG, com idade entre 11 e 12 semanas. Os animais foram fornecidos pelo Laboratório de Estudos Experimentais em Animais (LEEA) do Hemocentro de Ribeirão Preto. Durante os experimentos, os animais foram alojados em racks ventiladas de pressão positiva, mantidos em grupos com quatro indivíduos em caixas com dimensões de 10x30 cm, forradas com maravalha. A limpeza das caixas foi realizada de duas a três vezes por semana e o regime alimentar, composto por água e ração autoclavadas à vontade. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado

pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEUA 046/2017) - **ANEXO B**.

3.6.2. Geração de células CEM expressando luciferase 2

O modelo de xenotransplante de células CEM em camundongos NSG foi previamente descrito por Correia e colaboradores⁸⁰, no entanto, relevantes alterações foram realizadas. Neste trabalho, optou-se por transformar as células, incorporando o gene da luciferase (Luc2), para possibilitar o acompanhamento da leucemogênese através da leitura da bioluminescência. O vetor lentiviral contendo o gene da luciferase (pMSCV-Luc2-T2A-Puro) foi gentilmente cedido pelo Dr. Lucas Eduardo Botelho de Souza do Hemocentro de Ribeirão Preto⁸¹.

Para a transdução, 2×10^5 células da linhagem CEM foram incubadas com 6 partículas infectantes por célula (multiplicidade de infecção [MOI] = 6) e polibreno por quatro horas, após 60 minutos de centrifugação a 800g. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 500 μ L de meio RPMI suplementado com 10% de SBF e incubadas por um período de 48 horas em placa de 24 poços. Após 48 horas, deu-se início ao período de seleção das células transduzidas, através da adição de antibiótico puromicina (1 μ g/ml) por 15 dias. Ao final da seleção, a bioluminescência das células CEM (agora denominadas CEM^{Luc2}) foi avaliada *in vitro* por processamento de imagem baseado em bioluminescência (PIBB). As células CEM^{Luc2} (1×10^7 células por criotubo) foram criopreservadas em freezer à -80°C.

3.6.3. Processamento de imagem baseado em bioluminescência

A aquisição da bioluminescência foi realizada através do equipamento IVIS Lumina System (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA). Para a avaliação *in vitro*, foram utilizadas seis diferentes concentrações de células CEM^{Luc2} (1×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 , 6×10^4 , 8×10^4 e 10×10^4). Aos poços contendo as células, adicionou-se enzima D-luciferina (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) a uma concentração final de 150 μ g/mL.

Para avaliação *in vivo*, os animais receberam 150mg/kg de D-luciferina por injeção via intraperitoneal. Após aproximadamente 5 minutos, período de difusão da enzima, os camundongos receberam anestesia inalatória (2,5% de isoflurano em oxigênio) e foram posicionados no equipamento IVIS Lumina System (Perkin Elmer,

Waltham, MA, EUA). Durante o período da captura das imagens, a sedação foi mantida por exposição constante ao isoflurano (1,5%).

O tempo de exposição variou de 10 segundos a 3 minutos, dependendo da intensidade do sinal. A intensidade da bioluminescência foi quantificada através da seleção manual da região que abrange o sinal, utilizando a ferramenta ROI (do inglês, *region of interest*), disponibilizada pelo *software* Living Image 3.0. A intensidade é contabilizada como fluxo de fótons e expressa em fótons/s.

3.6.4. Xenotransplante

Células CEM^{Luc2} foram descongeladas 15 dias antes da injeção e expandidas em meio RPMI, suplementado com 10% de SBF e puromicina (1µg/ml) para manter a seleção e evitar a expansão de células não transduzidas. Para a indução da neoplasia sistêmica, 2x10⁶ células foram ressuspensas em 100µL de PBS e implantadas nos camundongos por via endovenosa, através da veia caudal. Os camundongos foram pesados no dia do transplante, que foi considerado como D0. Nos dias D+6, D+12 e D+18, os animais foram novamente pesados e submetidos à avaliação da bioluminescência *in vivo* para acompanhar a leucemogênese. Todos os animais foram mantidos para análise de sobrevida.

3.7. Experimento piloto para o tratamento com NT157 *in vivo*

Após a padronização, um novo grupo de camundongos fêmeas NSG (n=10) recebeu injeção de células CEM^{Luc2} para indução da leucemia. Os animais foram acompanhados através da avaliação da bioluminescência *in vivo*, nos dias D+6, D+13, D+20 e D+27. No dia D+1 os animais foram divididos em dois grupos para tratamento com NT157 (50 mg/kg de NT157 diluído em 2-Hidroxipropil Beta-Ciclodextrina 20%) ou veículo. O tratamento foi realizado diariamente, por injeção intraperitoneal até a data do sacrifício. Para a avaliação da sobrevida, os animais foram acompanhados até apresentarem problemas para excreção de urina e fezes e/ou problemas de locomoção ou alimentação.

3.8. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad InStat 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA). Os testes t de *Student* e ANOVA com pós-teste Bonferroni foram empregados, conforme apropriado. A sobrevida dos camundongos foi descrita através da curva de Kaplan Meier. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. A inibição farmacológica de IGF1R/IRS1 por NT157 e de IGF1R/IR por OSI-906 reduzem a viabilidade em linhagens celulares de LLA

Inicialmente, investigamos os aspectos funcionais de linhagens celulares de LLA T (Jurkat e MOLT-4) e LLA B (Namalwa e Raji) tratadas ou não com o inibidor farmacológico de IGF1R/IRS1-2, NT157, a 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μ M, por 24, 48 e 72 horas. Após a exposição ao fármaco, avaliamos o impacto da inibição farmacológica sobre a viabilidade celular submetendo as linhagens ao ensaio de MTT. Para cada condição, as análises foram realizadas em sextuplicatas e pelo menos três experimentos independentes foram realizados para cada tempo de tratamento.

NT157 reduziu significativamente a viabilidade celular de Jurkat, MOLT-4, Namalwa e Raji; o tempo e a dose de tratamento necessários para a redução da viabilidade variou para cada linhagem celular (**Figura 2A-D**). NT157, por 72 horas, nas doses de 0,4 a 3,2 μ M, reduziu significativamente a viabilidade celular nas 4 linhagens celulares avaliadas. As menores doses e tempos de tratamento necessários para induzirem redução significativa da viabilidade celular foram observadas para a linhagem Jurkat (**Figura 2A**). A viabilidade das células Raji foi significativamente reduzida somente após 72 horas de tratamento com NT157 (**Figura 2D**). Utilizando uma análise de regressão não-linear, a IC_{50} para citotoxicidade de Jurkat, MOLT-4, Namalwa e Raji às 72 horas de tratamento foi de 0,3; 0,9; 1,8 e 1,9 μ M, respectivamente (**Figura 2E**).

Figura 2. NT157, inibidor de IGF1R/IRS1-2, reduz a viabilidade celular de linhagens celulares de LLA. A viabilidade celular das linhagens (A) Jurkat, (B) MOLT-4 (C) Namalwa e (D) Raji foi determinada pelo ensaio de methylthiazoltetrazolium (MTT) após 24 horas, 48 horas e 72 horas de incubação na ausência (∅ = controle) ou na presença de NT157 (0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μM). Os resultados estão representados como média ± DP de pelo menos três experimentos independentes; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ para células tratadas com NT157 *versus* células não tratadas, teste ANOVA e pós-teste Bonferroni. (E) Tabela dos valores de IC₅₀ encontrados para cada linhagem testada após 72 horas de tratamento com NT157.

Investigamos também a viabilidade celular destas linhagens tratadas ou não com o inibidor farmacológico de IGF1R/IR, OSI-906, a 1, 5, 10 e 20 μM, por 24, 48 e 72 horas. Após a exposição ao fármaco, a viabilidade celular foi significativamente reduzida em relação ao controle em todas as doses testadas nas linhagens Jurkat,

MOLT-4 e Namalwa (**Figura 3A-C**). A viabilidade das células Raji, tratadas com OSI-906 foi significativamente reduzida somente nas doses de 10 e 20 μM (**Figura 3D**). Altas doses de OSI-906 foram necessárias para induzir a citotoxicidade; a IC_{50} de Jurkat, MOLT-4, Namalwa e Raji às 72 horas de tratamento foram de 9, 30, 30, e 28 μM , respectivamente (**Figura 3E**).

Figura 3. OSI-906, inibidor de IGF1R/IR, reduz a viabilidade de linhagens celulares de LLA. A viabilidade das linhagens (A) Jurkat, (B) MOLT-4 (C) Namalwa e (D) Raji foi determinada pelo ensaio de methythiazoletetrazolium (MTT) após 24 horas, 48 horas e 72 horas de incubação na ausência ($\emptyset$ = controle) ou na presença de OSI-906 (1, 5, 10 e 20 μM). Os resultados são representados como média $\pm$ DP de pelo menos três experimentos independentes; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ para células tratadas com OSI-906 *versus* células não tratadas; teste ANOVA e pós-teste Bonferroni. (E) Tabela dos valores de IC_{50} encontrados para cada linhagem testada após 72 horas de tratamento com OSI-906.

4.2 O inibidor farmacológico NT157, mas não o OSI-906, induz a apoptose e clivagem de caspase 3 em linhagens celulares de LLA

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular, procuramos avaliar se estes efeitos poderiam ser secundários a um aumento das taxas de apoptose. Para isso, as células Jurkat, MOLT-4, Namalwa e Raji tratadas ou não com NT157 (0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 μ M) por 24, 48 e 72 horas foram submetidas à análise de apoptose através da avaliação de anexina V conjugada com FITC ou APC e iodeto de proprídio (PI) por citometria de fluxo. Para cada condição, as análises foram realizadas em triplicatas e pelo menos três experimentos independentes foram realizados para cada tempo de tratamento.

Nas células Jurkat, a inibição farmacológica de IGF1R/IRS1 por NT157 aumentou significativamente a porcentagem de células apoptóticas (anexina V positivas) em relação ao controle nas concentrações 0,8 e 1,6 μ M de NT157 nos três tempos de tratamento, e as médias das porcentagens foram de 50 e 59% em 24 horas, 72 e 79% em 48 horas, e 78 e 87% em 72 horas de tratamento (**Figura 4A**). Nas células MOLT-4, o tratamento com NT157 aumentou significativamente a porcentagem de células apoptóticas nas doses 0,8 e 1,6 μ M nos tempos de 48 e 72 horas, e as médias das porcentagens foram de 38 e 89% em 48 horas, e 59 e 95% em 72 horas de tratamento (**Figura 4B**). Nas células Namalwa, o tratamento com NT157 aumentou significativamente a porcentagem de células apoptóticas em relação ao controle na concentração 1,6 μ M nos três tempos de tratamento, e as médias das porcentagens foram de 29%, 40% e 41% após 24, 48 e 72 horas de tratamento (**Figura 4C**). Nas células Raji, o tratamento com NT157 aumentou significativamente a porcentagem de células apoptóticas em relação ao controle apenas na concentração 1,6 μ M com 48 horas de tratamento (40% de células apoptóticas) (**Figura 4D**).

Figura 4. NT157, inibidor de IGF1R/IRS1-2, induz apoptose nas linhagens celulares de LLA. A apoptose foi analisada através da avaliação de anexina V/PI por citometria de fluxo nas linhagens celulares (A) Jurkat, (B) MOLT-4, (C) Namalwa e (D) Raji após 24 horas, 48 horas e 72 horas de incubação na ausência ($\emptyset$ = controle) ou na presença de NT157 (0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 μM). Um *dot plot* representativo de um experimento é ilustrado para cada linhagem estudada. A porcentagem (%) de células apoptóticas (anexina V+/PI- e anexina V+/PI+) foi comparada entre as células controles ($\emptyset$) e tratadas com NT157 em diferentes doses e tempos, e está representada pelos gráficos de barra; * $p<0.05$, ** $p<0.01$ e *** $p<0.001$ para células tratadas *versus* não tratadas; Teste ANOVA e pós-teste Bonferroni.

Avaliamos também a apoptose das linhagens celulares de LLA tratadas com o OSI-906, inibidor dos receptores IGF1R/IR. Para isso, células Jurkat, MOLT-4, Namalwa e Raji tratadas ou não com OSI-906 (1, 5, e 10 μ M) por 24, 48 e 72 horas foram submetidas à análise de apoptose através da avaliação de anexina V conjugada com FITC ou APC e iodeto de propídeo (PI) por citometria de fluxo. Para cada condição, utilizaram-se triplicatas e pelo menos três experimentos independentes para cada tempo de tratamento.

O inibidor farmacológico de IGF1R/IR, OSI-906, aumentou significativamente a apoptose apenas em células Jurkat, na dose de 10 μ M, após 48 horas de tratamento; a média de células apoptóticas foi 18% (**Figura 5A**). OSI-906 não induziu apoptose de células MOLT-4, Namalwa e Raji em todas as doses e tempos testados (**Figura 5B-D**). O tratamento com OSI-906 1 e 10 μ M por 24 horas reduziu significativamente a porcentagem de células Raji Anexina V positivas se comparadas ao controle (**Figura 5D**).

Figura 5. OSI-906, inibidor de IGF1R/IR, induz apoptose na linhagem celular Jurkat apenas na maior dose testada, e não induz a apoptose nas linhagens MOLT-4, Namalwa e Raji. A apoptose foi analisada através da avaliação de anexina V/PI por citometria de fluxo nas linhagens celulares (A) Jurkat, (B) MOLT-4, (C) Namalwa e (D) Raji após 24 horas, 48 horas e 72 horas de incubação na ausência ($\emptyset$ = controle) ou na presença de OSI-906 (1, 5 e 10 μM). Um *dot plot* representativo de um experimento é ilustrado para cada linhagem estudada. A porcentagem (%) de células apoptóticas (anexina V+/PI- e anexina V+/PI+) foi comparada entre as células controles ($\emptyset$) e tratadas com OSI-906 em diferentes doses e tempos, e está representada pelos gráficos de barra; * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ para células tratadas *versus* não tratadas; Teste ANOVA e pós-teste Bonferroni.

Para confirmar os resultados obtidos por citometria de fluxo, avaliamos através de *Western blotting*, a clivagem de caspases 3, 8 e 9 após 48 horas de exposição ao composto NT157 em diferentes concentrações. O tratamento com NT157 promoveu clivagem da caspase 3 nas quatro linhagens celulares testadas, e clivagem das caspases 8 e/ou 9 de forma diferente em cada linhagem, indicando a indução da apoptose em células Jurkat, MOLT-4, Namalwa e Raji (**Figura 6**).

Figura 6. Tratamento com NT157, inibidor de IGF1R/IRS1-2, provoca aumento de clivagem de caspase 3 nas linhagens celulares de LLA. *Western blotting* para análise dos níveis de caspases 3, 8 e 9 (total e clivada) em extratos proteicos de células Jurkat, MOLT-4, Namalwa e Raji após 48 horas de incubação na ausência ($\emptyset$ = controle) ou na presença de NT157 (0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 μM); membranas foram incubadas com anticorpos para a detecção das respectivas proteínas e da actina, e reveladas com o reagente *SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate* e o sistema *Gel Doc XR+*.

Adicionalmente, avaliamos a clivagem de caspase 3 após 48 horas de exposição ao OSI-906 em diferentes concentrações. O tratamento com OSI-906 não promoveu clivagem da caspase 3 em nenhuma das quatro linhagens celulares testadas (**Figura 7**).

Figura 7. Tratamento com OSI-906, inibidor de IGF1R/IR, não provoca clivagem de caspase 3 em linhagens celulares de LLA. *Western blotting* para análise dos níveis de caspases 3 (total e clivada) em extratos proteicos de células Jurkat, MOLT-4, Namalwa e Raji após 48 horas de incubação na ausência ($\emptyset$ = controle) ou na presença de OSI-906 (1, 5, 10 e 20 μM); membranas foram incubadas com anticorpos para a detecção das respectivas proteínas e da actina, e reveladas com o reagente *SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate* e o sistema *Gel Doc XR+*.

4.3 Os tratamentos com NT157 e OSI-906 reduzem a proliferação e atrasam a progressão do ciclo celular em linhagens celulares de LLA

Escolhemos uma linhagem de LLA T (Jurkat) e uma de LLA B (Namalwa) para darmos seguimentos aos ensaios funcionais e de expressão/ativação proteica, pois os experimentos de viabilidade celular e apoptose revelaram que estas foram as linhagens, em cada subgrupo da doença, que melhor responderam aos inibidores farmacológicos utilizados.

Para continuarmos à avaliação dos efeitos celulares do tratamento com NT157, realizamos a análise de proliferação celular através da marcação para Ki-67. As células Jurkat e Namalwa foram tratadas ou não com NT157 a 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μM por 24 horas. O tratamento com NT157 reduziu significativamente a proliferação de células Jurkat a partir da dose de 0,8 μM , sendo que na dose de 3,2 μM a proliferação foi reduzida em mais de 50% ($p < 0.001$). NT157 reduziu drasticamente a proliferação de células Namalwa desde a dose 0,2 μM ($p < 0.01$), sendo que a partir da dose 0,8 μM a proliferação foi reduzida em mais de 50% ($p < 0.001$) (**Figura 8A**).

Para verificarmos os efeitos do tratamento com NT157 na progressão do ciclo celular, as células Jurkat e Namalwa foram submetidas ao tratamento com NT157 nas concentrações inferiores ou próximas ao IC_{50} (0,2; 0,4 e 0,8 μM). As doses de 1,6 e 3,2 μM não foram utilizadas para a avaliação do ciclo celular, pois os experimentos de viabilidade celular e apoptose revelaram um significativo número de células mortas nestas concentrações, o que poderia interferir na marcação com iodeto de propídeo. A avaliação foi realizada apenas após 24 horas de tratamento, visto que alterações no ciclo celular antecedem os eventos celulares já avaliados, não sendo ideal avaliá-lo em períodos mais tardios.

Em ambas as linhagens celulares analisadas, o tratamento com o NT157 resultou em uma parada da progressão do ciclo celular. Em Jurkat, o tratamento na dose de 0,8 μM provocou um aumento significativo na percentagem de células na fase S ($p < 0.01$), sugerindo uma parada no ciclo celular em S, que corresponde à fase de replicação do DNA. Em Namalwa, os tratamentos com as doses 0,4 e 0,8 μM provocaram redução significativa na percentagem de células na fase G_2/M ($p < 0.05$) e um forte acúmulo de células na fase G_0/G_1 ($p < 0.001$), na qual se encontra o principal ponto de checagem para a integridade do DNA⁸² (**Figura 8B**).

Figura 8. O NT157, inibidor de IGF1R/IRS1-2, reduz a proliferação e atrasa a progressão do ciclo celular em células de leucemia linfóide aguda. (A) A média de intensidade de fluorescência (M.I.F.) de Ki-67 foi determinada por citometria de fluxo em células Jurkat e Namalwa incubadas na ausência ($\emptyset$) ou na presença de NT157 (0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μ M) por 24 horas e um histograma é ilustrado. A M.I.F. de Ki-67 foi normalizada pelas respectivas células controle e os resultados são apresentados como média $\pm$ DP de pelo menos três experimentos independentes. **(B)** A progressão do ciclo celular foi determinada pelo kit *BD Cycletest™ Plus DNA Reagent* em células Jurkat e Namalwa incubadas na ausência ($\emptyset$) ou na presença de NT157 (0,2; 0,4 e 0,8 μ M) por 24 horas. Um histograma representativo para cada condição é ilustrado. Os gráficos de barra representam a média $\pm$ DP das percentagens de células em G₀/G₁, S e G₂/M após tratamento de pelo menos três experimentos independentes. Os valores de p estão indicados nos gráficos; * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001 para células tratadas com NT157 *versus* células não tratadas; Teste ANOVA e pós-teste Bonferroni.

Adicionalmente, realizamos a análise de proliferação celular através da marcação para Ki-67 nas células Jurkat e Namalwa após tratamento com OSI-906 a 1, 5, 10 e 20 μM por 24 horas. O tratamento com OSI-906 reduziu significativamente a proliferação celular de Jurkat na dose de 20 μM ($p < 0.01$), e de Namalwa nas doses de 10 e 20 μM ($p < 0.01$) (**Figura 9A**).

Para verificarmos os efeitos do tratamento com OSI-906 na progressão do ciclo celular, as células Jurkat e Namalwa foram tratadas ou não com OSI-906 em diferentes concentrações (1, 5 e 10 μM) por 24 horas. A dose de 20 μM não foi utilizada para a avaliação do ciclo celular, pois os experimentos de viabilidade celular revelaram uma significativa redução no número de células viáveis nesta concentração, o que poderia interferir na marcação com iodeto de propídeo.

Nas células Jurkat, a inibição de IGF1R/IR por OSI-906 não demonstrou diferença significativa na progressão do ciclo celular em relação ao controle nas concentrações testadas de OSI-906 por 24 horas de tratamento. Entretanto, nas células Namalwa, o tratamento provocou acúmulo significativo na percentagem de células na fase G_0/G_1 ($p < 0.01$) e consequente redução de células na fase G_2/M ($p < 0.05$) em relação ao controle (**Figura 9B**), o que sugere atraso na progressão do ciclo celular.

Os resultados da análise de proliferação celular em Jurkat e Namalwa foram condizentes com os resultados obtidos na análise do ciclo celular destas linhagens quando tratadas com o NT157 e com o OSI-906.

Figura 9. O OSI-906, inibidor de IGF1R/IR, reduz a proliferação e atrasa a progressão do ciclo celular em células de leucemia linfóide aguda. (A) A média de intensidade de fluorescência (M.I.F.) de Ki-67 foi determinada por citometria de fluxo em células Jurkat e Namalwa incubadas na ausência (Ø) ou na presença de OSI-906 (1, 5, 10 e 20 μM) por 24 horas e um histograma é ilustrado. A M.I.F. de Ki-67 foi normalizada pelas respectivas células controle e os resultados são apresentados como média ± DP de pelo menos três experimentos independentes. **(B)** A progressão do ciclo celular foi determinada pelo kit *BD Cycletest™ Plus DNA Reagent* em células Jurkat e Namalwa incubadas na ausência (Ø) ou na presença de NT157 (1, 5 e 10 μM) por 24 horas. Um histograma representativo para cada condição é ilustrado. O gráfico de barra representa a média ± DP das percentagens de células em G₀/G₁, S e G₂/M após tratamento de pelo menos três experimentos independentes. Os valores de *p* estão indicados nos gráficos; **p*<0.05, ***p*<0.01 e ****p*<0.001 para células tratadas com OSI-906 versus células não tratadas; Teste ANOVA e pós-teste Bonferroni.

4.4 Os inibidores farmacológicos NT157 e OSI-906 reduzem a migração de células Jurkat

Uma complicação clínica recorrente em pacientes com LLA é a infiltração de células leucêmicas em alguns órgãos, como baço, fígado e sistema nervoso central (SNC)⁷. Proteínas das vias de sinalização ativadas por IGF1R/IRS participam da mobilidade celular⁸³. Desta forma, investigamos os efeitos de NT157 e de OSI-906 na migração das células Jurkat e Namalwa. Após o tratamento com NT157 a 0,4 μ M e OSI-906 10 μ M por 24 horas, células Jurkat foram semeadas em uma monocamada de fibronectina e imagens foram adquiridas por microscopia de *time-lapse* a cada 1,5 minutos por 3 horas, em condições atmosféricas (37°C, 5% CO₂). Ambos os inibidores reduziram significativamente a distância acumulada e a velocidade de migração de células Jurkat em relação às células não tratadas ($p < 0,05$) (**Figura 10A**).

As células Namalwa foram tratadas nas mesmas condições que as células Jurkat, porém por 48 horas de tratamento. Após serem semeadas em uma monocamada de fibronectina, as imagens foram adquiridas por microscopia de *time-lapse* a cada 5 minutos por 5 horas, em condições atmosféricas. Mesmo após um tempo maior de exposição aos fármacos e um tempo maior para captura das imagens em relação às condições utilizadas para as células Jurkat, ambos os inibidores não modularam a migração de células Namalwa em relação às células não tratadas (**Figura 10B**).

Figura 10. NT157, inibidor de IGF1R/IRS1-2, e OSI-906, inibidor de IGF1R/IR, reduzem a migração de células Jurkat. Utilizando-se microscopia de *time-lapse*, imagens de células (A) Jurkat foram capturadas a cada 1,5 minutos por 3 horas e de (B) Namalwa a cada 5 minutos por 5 horas, após serem tratadas na ausência (Ø) ou na presença de NT157 0,4 μ M e de OSI-906 10 μ M. Pelo menos 30 células por condição foram analisadas individualmente e os diagramas dos gráficos de quimiotaxia ilustram a migração de células Jurkat e Namalwa nas três condições testadas. O ponto de partida de cada trilha é colocado na origem do eixo. Os gráficos de barras representam a média $\pm$ DP da distância acumulada e da velocidade de migração das células em fibronectina de pelo menos três experimentos independentes. Os valores de p estão indicados nos gráficos; * p <0.05, ** p <0.01 para células tratadas com NT157 ou OSI-906 *versus* células não tratadas; Teste ANOVA e pós-teste Bonferroni.

4.5 NT157 modula a expressão de 25 genes da via de sinalização MAPK

Para investigar os efeitos moleculares do tratamento com NT157 e compreender melhor os resultados obtidos nos ensaios funcionais, realizamos um PCR *array* para a via de sinalização MAPK. Este experimento foi realizado com placas comerciais (*Human MAP Kinase Signaling Pathway RT² ProfilerTM*), compostas por 12 controles da reação e 84 genes de interesse. Este experimento permitiu a análise do perfil de expressão gênica de um painel de genes relevantes à via de sinalização e ao desenvolvimento e progressão de doenças, incluindo oncogenes, supressores tumorais, e genes envolvidos em processos celulares essenciais, como proliferação, progressão do ciclo celular e apoptose. Foram analisadas amostras de células Jurkat não tratadas ($\emptyset$) e tratadas por 24 horas com NT157 na concentração de 0,8 μ M, provenientes de 2 experimentos independentes. O tratamento com NT157 modulou a expressão de 25 genes desta via de sinalização, 5 genes regulados negativamente, dentre eles o oncogene *MYC*, e 20 genes regulados positivamente, dentre eles *CDKN1A* (*p21*), *FOS* e *JUN*. Todos os genes modulados encontram-se listados no *heat map* ilustrativo apresentado na **Figura 11A**. Os dados obtidos no PCR *array* foram analisados em uma plataforma online disponibilizada pela empresa que forneceu as placas. A análise é baseada em um método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, normalizado com os dados dos genes endógenos e para a determinação dos genes modulados, adotou-se um *fold-change* de 2. A lista com todos os genes avaliados e suas expressões relativas encontra-se na **Tabela Suplementar 1 (APÊNDICE A)**.

Baseados nos resultados dos experimentos funcionais e função dos genes da via de sinalização em estudo, foram selecionados *CDKN1A* (*p21*), *FOS* e *JUN* para serem validados através de PCR quantitativo (PCRq) em um número maior de experimentos (n=5), em Jurkat, MOLT-4, Namalwa e Raji, submetidas ao tratamento com os dois inibidores farmacológicos estudados, NT157 e OSI-906. O aumento da expressão de *CDKN1A*, *FOS* e *JUN* induzidos pelo tratamento com NT157 observado no PCR *array* foi confirmado por PCRq nas 4 linhagens testadas ($p < 0.05$), exceto o gene *FOS* na Raji. O tratamento com OSI-906 também aumentou significativamente a expressão de *FOS* nas quatro linhagens celulares estudadas. Entretanto, OSI-906 induziu o aumento significativo da expressão de *CDKN1A* e *JUN* apenas nas linhagens Raji e Jurkat, respectivamente (**Figura 11B-C**).

A redução da expressão gênica de *MYC* induzido por NT157 em células Jurkat observado no PCR *array* foi confirmada através da análise da expressão proteica por *western blotting* em células Jurkat e Namalwa tratadas com NT157 e OSI-906 (**Figura 11D**), corroborando com dados publicados da redução da expressão proteica de *MYC* por OSI-906⁵⁸.

Figura 11. O tratamento com o inibidor de IGF1R/IRS1-2, NT157, modula a expressão de 25 genes da via de sinalização MAPK. (A) *Heat map* ilustrativo, contendo os dados do PCR *array* de células Jurkat tratadas, ou não, com NT157 0,8 μ M por 24 horas. Para as células Jurkat não tratadas, os níveis de RNAm foram expressos como *fold change* = 1 e os genes que apresentaram *fold change* ≥ 2 depois do tratamento com NT157 foram apresentados no *heat map*. Os dados são provenientes de dois experimentos independentes para cada condição; cor verde indica níveis reduzidos de RNAm e

vermelho, aumento nos níveis de expressão. **(B-C)** Os genes *CDKN1A*, *FOS* e *JUN* foram escolhidos para a validação por PCR quantitativo (PCRq), em um número maior de experimentos (n=5), nas linhagens celulares Jurkat, MOLT-4, Namalwa e Raji tratadas, ou não, com **(B)** NT157 0,8 μ M e com **(C)** OSI-906 20 μ M por 24 horas. A linha pontilhada representa a média da expressão gênica de células não tratadas e as barras representam o *fold change* da expressão gênica de células tratadas em relação às não tratadas. Os valores de *p* encontram-se indicados nos gráficos; **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001 para células tratadas com NT157 ou OSI-906 *versus* células não tratadas; Teste t de Student. **(D)** Análise de *western blotting* nos extratos proteicos totais de Jurkat e Namalwa tratadas, ou não, com NT157 a 1,6 μ M ou OSI-906 a 20 μ M por 24 e 48 horas. As membranas foram incubadas com o anticorpo para a detecção da proteína MYC e actina (endógeno), e reveladas com o SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate, em aparelho Gel Doc XR+.

4.6 NT157 e OSI-906 modulam as vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK em células de LLA

Para caracterizarmos os efeitos do tratamento com NT157 na expressão e ativação das proteínas das vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK, células Jurkat e Namalwa foram tratadas na ausência ($\emptyset$) ou na presença de NT157 1,6 μ M por 1, 4, 8, 12, 24 e 48 horas de tratamento. As amostras foram coletadas e o extrato proteico foi submetido à técnica de *western blotting*. Nesta etapa, avaliamos a ativação/fosforilação e a expressão das proteínas IRS1, IGF1R, AKT, mTOR, 4EBP1, P70S6K, ERK totais e fosforiladas, a expressão proteica de γ H2AX e do endógeno actina.

Nas células Jurkat, a análise de *western blotting* revelou que o tratamento com NT157 inibiu a fosforilação e a expressão proteica total de IGF1R, IRS1, AKT, mTOR e P70S6K; reduziu a fosforilação de 4EBP1; provocou aumento seguido de redução na fosforilação de p-ERK, não modulou a expressão proteica de ERK; e aumentou consideravelmente a expressão da proteína γ H2AX a partir de 8 horas de tratamento **(Figura 12)**.

Nas células Namalwa, NT157 reduziu a fosforilação de p-IGF1R e p-IRS1, não modulou a expressão proteica de IGF1R, aumentou expressão de IRS1 em 24 horas de tratamento, mas depois reduziu drasticamente em 48 horas; inibiu a fosforilação e a expressão de AKT, mTOR e P70S6K, reduziu a fosforilação de 4EBP1, provocou aumento seguido de redução na fosforilação de p-ERK, não modulou a expressão proteica de ERK; e aumentou a expressão da proteína γ H2AX a partir de 24 horas de tratamento **(Figura 12)**.

Figura 12: O NT157, inibidor de IGF1R/IRS1-2, modula as vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK nas células Jurkat e Namalwa. Análise por *western blotting* dos níveis de p-IGF1R, IGF1R, p-IRS1, IRS1, p-AKT1/2/3, AKT1/2/3, p-mTOR, mTOR, p-P70S6K, P70S6K, p-ERK1/2, ERK1/2, γH2AX e actina em extratos totais de células Jurkat ou Namalwa incubadas na ausência (Ø) ou na presença de NT157 1,6 μM por 1, 4, 8, 12, 24 e 48 horas. As membranas foram incubadas com anticorpos para a detecção da respectiva proteína total ou da actina, utilizada como controle. A revelação foi realizada com o sistema *SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate*, em aparelho *Gel Doc XR+*.

Da mesma forma, para caracterizarmos os efeitos do tratamento com OSI-906 na expressão e ativação das proteínas das vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK, células Jurkat e Namalwa foram tratadas na ausência ($\emptyset$) ou na presença de OSI-906 20 μ M por 1, 4, 8, 12, 24 e 48 horas de tratamento. As amostras foram coletadas e o extrato proteico foi submetido à técnica de *western blotting*. Nesta etapa, avaliamos a ativação/fosforilação e a expressão das proteínas IRS1, IGF1R, AKT, mTOR, 4EBP1, P70S6K, ERK totais e fosforiladas, a expressão proteica de γ H2AX e do endógeno actina.

Nas células Jurkat, a análise de *western blotting* revelou que o tratamento com OSI-906 inibiu a fosforilação de p-IGF1R, p-IRS1, p-mTOR, p-P70S6K e p-ERK; não modulou a fosforilação e a expressão de AKT e de 4EBP; e aumentou consideravelmente a expressão da proteína γ H2AX a partir de 4 horas de tratamento (**Figura 13**).

Nas células Namalwa, OSI-906 reduziu a fosforilação de p-IGF1R, p-IRS1, p-mTOR, p-P70S6K e p-ERK; não modulou a fosforilação e a expressão de AKT e de 4EBP; e aumentou consideravelmente a expressão da proteína γ H2AX em 4, 8 e 12 horas de tratamento, mas reduziu em 24 e 48 horas do tratamento com o OSI-906 (**Figura 13**).

Figura 13: O OSI-906, inibidor de IGF1R/IR, modula as vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK nas células Jurkat e Namalwa. Análise por *western blotting* dos níveis de p-IGF1R, IGF1R, p-IRS1, IRS1, p-AKT1/2/3, AKT1/2/3, p-mTOR, mTOR, p-P70S6K, P70S6K, p-ERK1/2, ERK1/2, γH2AX e actina em extratos totais de células Jurkat ou Namalwa incubadas na ausência (Ø) ou na presença de OSI-906 20 µM por 1, 4, 8, 12, 24 e 48 horas. As membranas foram incubadas com anticorpos para a detecção da respectiva proteína total ou da actina, utilizada como controle. A revelação foi realizada com o sistema *SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate*, em aparelho *Gel Doc XR+*.

4.7 Os inibidores farmacológicos NT157 e OSI-906 reduzem a viabilidade celular de células primárias de pacientes com LLA, mas não de leucócitos normais

A fim de validar os resultados obtidos em linhagens celulares de LLA, investigamos os efeitos do inibidor de IGF1R/IRS1-2, NT157, e do inibidor de IGF1R/IR, OSI-906, em células mononucleares de sangue periférico ou medula óssea de pacientes com o diagnóstico de LLA T (n=2) e de pacientes com LLA B (n=8), no momento do diagnóstico ou da recaída da doença. O mesmo tratamento foi realizado em células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de doadores saudáveis (n=4). As células primárias de pacientes com LLA e as células dos doadores saudáveis, tratadas na ausência ($\emptyset$) ou na presença de NT157 (0,4; 0,8 e 1,6 μ M) por 72 horas, foram submetidas aos ensaios de viabilidade celular (MTT) e apoptose (Anexina V/PI).

O tratamento com NT157 reduziu a viabilidade de células primárias de pacientes com LLA (n=10) de forma significativa; as duas amostras de células de pacientes com LLA T (LLA T #1 e LLA T #2) apresentaram diminuição proeminente na viabilidade celular, com média de 43% de redução de células viáveis após 72h de tratamento com NT157 1,6 μ M (**Figura 14A**). NT157 aumentou significativamente a apoptose (células anexina V positivas) de células de pacientes com LLA (n=7) na dose de 1,6 μ M ($p \leq 0,05$) (**Figura 14B**).

NT157 não foi capaz de modular a viabilidade ou a apoptose de CMSP de doadores saudáveis (n=4), em qualquer dose testada (**Figura 14A-B**).

Figura 14. NT157, inibidor de IGF1R/IR1-2, reduz seletivamente a viabilidade e induz apoptose em células primárias de pacientes com LLA. Células mononucleares de sangue periférico ou de medula óssea de pacientes com LLA e células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de doadores saudáveis foram tratadas na ausência ($\emptyset$) ou na presença de NT157 (0,4; 0,8 e 1,6 μM) durante 72 horas. Após o tratamento, **(A)** a viabilidade celular foi determinada pelo teste de methylthiazoltetrazolium (MTT) em células de pacientes com LLA (n=10) e em CMSP de doadores saudáveis (n=4). **(B)** A apoptose foi avaliada através da marcação de anexina V/PI por citometria de fluxo em células de pacientes com LLA (n=7) e em CMSP de doadores saudáveis (n=4). As linhas nos gráficos representam células primárias de cada paciente com LLA ou de doadores saudáveis. Um *dot plot* representativo de um experimento de apoptose é ilustrado. Os valores *p* estão indicados nos gráficos; **p*<0.05 para células tratadas com NT157 *versus* não tratadas; Teste ANOVA e pós-teste Bonferroni.

Da mesma forma, células primárias de pacientes com LLA e de doadores saudáveis, tratadas na ausência ($\emptyset$) ou na presença de OSI-906 (5, 10 e 20 μ M) por 72 horas, foram submetidas aos ensaios de viabilidade celular e apoptose.

O tratamento com OSI-906 reduziu significativamente a viabilidade de células primárias de pacientes com LLA (n=10) nas doses de 10 e 20 μ M ($p<0,01$) (**Figura 15A**), mas não foi capaz de modular a apoptose de células de pacientes com LLA (n=7) (**Figura 15 B**), corroborando com os dados observados no tratamento das linhagens leucêmicas de LLA com OSI-906.

OSI-906 não modulou a viabilidade e a apoptose de CMSP de doadores saudáveis (n=4), em qualquer dose testada (**Figura 15A-B**).

Figura 15. OSI-906, inibidor de IGF1R/IR, reduz a viabilidade células primárias de pacientes com LLA. Células mononucleares de sangue periférico ou de medula óssea de pacientes com LLA e células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de doadores saudáveis foram tratadas na ausência (Ø) ou na presença de OSI-906 (1, 5, 10 e 20 µM) durante 72 horas. Após o tratamento, **(A)** a viabilidade celular foi determinada pelo teste de metilthiazoltetrazolium (MTT) em células de pacientes com LLA (n=10) e em CMSP de doadores saudáveis (n=4), e **(B)** a apoptose foi avaliada através da marcação de anexina V/PI por citometria de fluxo em células de pacientes com LLA (n=7) e em CMSP de doadores saudáveis (n=4). As linhas nos gráficos representam células primárias de cada paciente com LLA ou de doadores saudáveis. Um dot plot representativo de um experimento de apoptose é ilustrado. Os valores *p* estão indicados nos gráficos; ***p*<0.01 para células tratadas com OSI-906 *versus* não tratadas; Teste ANOVA e pós-teste Bonferroni.

4.8. Padronização de modelo xenográfico de neoplasia sistêmica induzida por linhagem celular CEM

A linhagem celular humana de LLA T (CEM) foi escolhida para padronizar o modelo de neoplasia sistêmica em camundongos através de xenotransplante⁸⁰, pois as linhagens que utilizamos neste trabalho até o momento (Jurkat, MOLT-4, Namalwa e Raji) foram previamente testadas pelo grupo da Dra. Fabíola Traina e falharam em induzir leucemia sistêmica em camundongos.

Células CEM foram transduzidas com partículas lentivirais (*multiple of infection*; MOI=6) contendo o gene da Luciferase 2 (Luc2) e o gene de resistência à puromicina. Após a seleção com puromicina por 15 dias, a eficiência e a atividade da luciferase foi demonstrada em um equipamento IVIS Lumina pela adição de 15 mg/mL de D-luciferina. Para esta avaliação, foram utilizadas seis concentrações de células CEM^{Luc2} (1×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 , 6×10^4 , 8×10^4 e 10×10^4). O processamento de imagem baseado em bioluminescência confirmou que as células CEM passaram a expressar luciferase biologicamente ativa, indicando o sucesso da transformação (**Figura 16A**). Em um experimento piloto, células CEM^{Luc2} (2×10^6 células/100 μ L) foram injetadas pela veia caudal em camundongos NSG (n=8) e a atividade *in vivo* da luciferase foi avaliada após 6, 12 e 18 dias do transplante, o que indica a presença e localização das células CEM^{Luc2} injetadas. As análises demonstraram que as células CEM^{Luc2} sobreviveram após o transplante e colonizaram o animal, confirmando a indução da neoplasia sistêmica com sinal forte na cabeça de fêmures e ossos da coluna vertebral; além de sinal forte na cabeça dos camundongos, mostrando a migração das células de CEM^{Luc2} para o cérebro. O sinal da bioluminescência, que é equivalente ao número de células expressando luciferase, aumentou a cada aquisição em todos os animais, evidenciando a progressão da doença (**Figura 16B**). Os primeiros 5 camundongos morreram aos 21 dias após o transplante, sendo a mediana de sobrevida de 21 dias (mínimo: 21 – máximo: 28). A curva de sobrevida composta pelos 8 animais está ilustrada na **Figura 16C**.

Figure 16. Padronização da indução de neoplasia sistêmica com células CEM^{Luc2} em camundongos NSG. (A) Avaliação da atividade e sensibilidade da luciferase *in vitro* em células CEM^{Luc2} através de diluição seriada e adição de D-luciferina. O número de células presente em cada poço está indicado. Note que a quimioluminescência apresentou sinal intenso e que foi proporcional à densidade celular. (B) Imagem representativa de um camundongo NSG que recebeu injeção de células CEM^{Luc2} após 6, 12 e 18 dias após o transplante e injeção de D-luciferina no momento da aquisição das imagens. A intensidade de bioluminescência é medida em fótons por segundo e está expressa no gráfico em Log¹⁰. O sinal da bioluminescência é diretamente proporcional ao número de células CEM^{Luc2} que expressam luciferase biologicamente ativa. A aquisição das imagens foi realizada em equipamento IVIS. (C) Curva de sobrevivência dos camundongos NSG (n=8) após transplante das células CEM^{Luc2}. O eixo x representa o dia pós transplante e o eixo y, a porcentagem de sobrevivência. Todos os animais (n=8) morreram entre o 21º e 28º dias após receberem as células leucêmicas humanas. A sobrevivência dos camundongos foi descrita através da curva de *Kaplan Meier*.

4.9. Tratamento com NT157 em camundongos NSG xenotransplantados

Após a padronização do modelo, realizamos um tratamento inicial com NT157 no modelo estabelecido. Para tal, 10 animais receberam 2×10^6 células CEM^{Luc2}, como descrito no tópico da padronização. A avaliação da bioluminescência *in vivo* para acompanhamento da leucemogênese foi realizada nos dias D+6, D+13, D+20 e D+27 após o transplante. No dia D+1, os animais foram separados em dois grupos e começaram a receber NT157 50 mg/kg diluído em 2-Hidroxipropil Beta-Ciclodextrina 20% (n=5) ou veículo (n=5), diariamente. Um fluxograma do experimento está detalhado na **Figura 17**.

Figura 17. Desenho experimental. O experimento incluiu 10 fêmeas NSG entre 8 e 12 semanas de vida. Foram injetadas 2×10^6 células CEM^{Luc2}. O tratamento foi iniciado no dia D+1 e os animais foram divididos em dois grupos de tratamentos diários: veículo e 50 mg/Kg de NT157. Os tratamentos foram interrompidos no dia D+29 e os animais foram sacrificados no dia D+32, devido à perda de peso excessiva.

No dia D+7, um dos animais do grupo controle foi excluído e sacrificado, devido à perda de peso ($\geq 20\%$ peso corporal) e no dia D+20, um dos animais do grupo tratado morreu por causas desconhecidas. Os demais animais foram monitorados por até 32 dias após o xenotransplante das células CEM^{Luc2} para comparação da sobrevivência entre os grupos. As análises de bioluminescência demonstraram que as células sobreviveram ao transplante e colonizaram o animal, induzindo a neoplasia sistêmica (**Figura 18A**). O tratamento com NT157 não alterou o número de células neoplásicas, sendo que os dois grupos apresentaram o mesmo padrão de desenvolvimento da doença e aumento das células (**Figura 18B**). O tratamento com NT157 também não resultou em aumento da sobrevivência, sendo que todos os animais, exceto os dois animais já mencionados, foram sacrificados por eutanásia no dia D+32, quando o primeiro sinal de morbidade foi observado (**Figura 18C**).

Figura 18. Tratamento com NT157 em camundongos NSG xenotransplantados. (A) Rastreamento das células CEM^{Luc2} xenotransplantadas em camundongos NSG. As Células CEM^{Luc2} foram transplantadas em camundongos NSG (n=10). Quantificação da bioluminescência emitida pelas células CEM^{Luc2} nos dias D+6, D+13, D+20 e D+27 para os animais tratados com veículo (n=5) e NT157 (n=5). A imagem de um camundongo CTRL (controle) e de um tratado com NT157 (50 mg/kg/dia) está ilustrado. A aquisição das imagens foi realizada em sistema IVIS Lumina. (B) A intensidade de bioluminescência é medida em fótons por segundo e está expressa em Log^{10} . O sinal da bioluminescência é diretamente proporcional ao número de células CEM que expressam luciferase biologicamente ativa (CEM^{Luc2}). (C) Curva de sobrevida dos camundongos NSG xenotransplantados. O eixo x representa o dia pós transplante e o eixo y, a porcentagem de sobrevivência. Um animal de cada grupo morreu antes do término do experimento, os demais foram sacrificados por eutanásia no 32º dia após receberem as células. A sobrevida dos camundongos foi descrita através da curva de *Kaplan Meier*.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, realizamos a caracterização pré-clínica dos inibidores de IGF1R/IRS1-2, NT157, e de IGF1R/IR, OSI-906, em modelos celulares de LLA. Nossos resultados demonstraram que o NT157 reduziu a viabilidade celular, a proliferação, a progressão do ciclo celular e induziu a apoptose em células LLA. O OSI-906 reduziu a viabilidade celular, a proliferação e a progressão do ciclo celular, mas em menor extensão que o NT157, e não induziu apoptose nas células de LLA.

No cenário molecular, o NT157 regulou negativamente a expressão e a ativação das proteínas IGF1R e IRS1, e modula as vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK, reduzindo a ativação de AKT, mTOR, P70S6K e 4EBP1 em linhagens celulares Jurkat e Namalwa. Observamos também que NT157 regulou positivamente a expressão proteica de γ H2AX e a expressão gênica de *CDKN1A* (o gene que codifica p21). γ H2AX, a forma fosforilada em serina 139 de uma histona variante de H2AX, é um marcador de dano ao DNA, que recruta complexos de proteínas de reparo de DNA que ativam a expressão de p21 para deter a progressão do ciclo celular^{84; 85}. É bem conhecido que o p21, dependente da ativação de p53, medeia a parada do ciclo celular na fase G₁ e a apoptose sob uma variedade de tipos de stress celular^{86; 87; 88; 89}, o que corrobora com os nossos achados em LLA. Além disso, o NT157 aumentou a expressão de *JUN* (o gene que codifica JNK) e *FOS*, que são subunidades do fator de transcrição AP-1 que atuam sob estresse celular^{90; 91}. Recentemente, a análise proteômica dos efeitos do NT157 em linhagens celulares de melanoma relatou um aumento na ativação de quinases relacionadas ao estresse celular, JNK e p38 MAPK³⁷⁹², o que corrobora com os nossos dados de que o NT157 induziu estresse celular em LLA.

Entre os mecanismos de ação do NT157, um é a degradação de proteínas IRS mediada por ativação e fosforilação de ERK⁷⁴. De fato, nossos resultados indicaram um aumento transitório de ERK nas primeiras horas de tratamento, seguido por uma redução consistente na expressão de IRS1 e uma posterior inibição de ERK, sugerindo que o mecanismo proposto de ação de NT157 em células de melanoma⁷⁴ é preservado em LLA. Essa modulação transitória de ERK pode ser secundária a uma alça regulatória semelhante ao descrito para a ação da insulina⁹³. O aumento nas subunidades de AP-1, e possivelmente a atividade de JNK, pode revelar um mecanismo de descoberta da regulação da proteína IRS1, uma vez que a JNK também é capaz de fosforilar e comprometer proteínas de IRS por degradação⁹³.

O OSI-906, um inibidor duplo de receptores tirosinoquinase IGF1R e IR, tem sido descrito por apresentar excelentes resultados pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*, com efeitos antiproliferativos em várias linhagens de células cancerígenas e em um modelo xenográfico dirigido por IGF1R, respectivamente⁷¹. A diferença farmacodinâmica entre o NT157 e o OSI-906 é um ponto a ser destacado. O NT157 inibe as proteínas adaptadoras citoplasmáticas IRS1/2⁷⁴, e outras vias de sinalização ou receptores que dependem das proteínas IRS1/2, produzindo um efeito de amplificação. Por outro lado, o OSI-906 inibe seletivamente a sinalização celular do IGF1R e IR⁷¹, o que pode gerar a oportunidade para as células ativarem vias *downstream* por receptores alternativos. Um exemplo é a manutenção da ativação de AKT nos modelos celulares estudados no tratamento com OSI-906, mas não com o NT157. No presente estudo, o OSI-906 foi capaz de reduzir a proliferação celular, a ativação de mTOR e p70S6K, mas não reduziu a ativação de AKT nem induziu apoptose em células de LLA. Abbas e colaboradores⁸⁴ demonstraram que a AKT pode fosforilar a p21, que por sua vez inibe as proteínas proapoptóticas. A AKT fosforila e inibe o BAD, que é uma proteína da família BCL2 chave envolvida na indução da via de apoptose intrínseca^{94; 95; 96}. Nosso grupo de pesquisa já havia demonstrado que o eixo IGF1R/IRS1 desempenha um papel relevante na expressão de MYC, que foi um fator prognóstico independente na coorte de LLA analisada⁵⁸. Nós confirmamos que tanto os inibidores NT157 como OSI-906 reduziram a expressão de MYC, o que pode contribuir para o fenótipo observado, incluindo a viabilidade celular reduzida^{97; 98}.

É notável que as linhagens celulares de LLA T tenham apresentado uma resposta mais alta que as células de LLA B, especialmente para NT157, o que foi corroborado pelos resultados observados em amostras primárias. A redução média na viabilidade celular foi de $43 \pm 5\%$ e $10 \pm 8\%$ na dose mais alta de NT157 para pacientes LLA T e LLA B, respectivamente. Neste sentido, NT157 inibiu a mobilidade de Jurkat (LLA T), mas não Namalwa (LLA B). Mais importante, ambas as drogas mostraram seletividade para linfócitos malignos, uma vez que nenhuma citotoxicidade foi observada para os linfócitos de doadores saudáveis, que expressam baixos níveis de expressão de IGF1R e IRS1⁵⁸. Resultados semelhantes foram relatados nos modelos de melanoma: o NT157 reduziu a viabilidade de células de melanoma, mas não de melanócitos normais⁷⁴.

Para a expansão da investigação da participação da via de sinalização IGF1R/IRS1 na LLA, vislumbramos a necessidade de estabelecer um modelo *in vivo*. Para isso, partimos de um modelo descrito por Correia e colaboradores⁸⁰ e

implementamos a transformação da linhagem celular de LLA T, CEM, com o gene da luciferase 2, o que permitiu a avaliação da leucemogênese através da atividade biológica da luciferase. Deste modo, reduz-se o número amostral necessário e todos os animais podem ser mantidos para análise da sobrevida, além de dispensar a citometria de fluxo para determinar a enxertia da doença.

Diante da oportunidade de realizar um estudo preliminar do tratamento com NT157 no modelo murino estabelecido, avaliamos dois grupos de animais xenotransplantados, tratados com NT157 ou com o veículo. Nossos resultados indicaram que não houve diferença entre os grupos para todos os aspectos avaliados, incluindo características clínicas (peso corporal), carga tumoral (quantidade de células detectadas) e sobrevida. É relevante salientar que este modelo resulta no desenvolvimento de uma doença agressiva, com um curto período de sobrevida. Nesse cenário, a adequação do esquema de tratamento pode ser necessária, baseada em estudos de farmacodinâmica e farmacocinética da droga NT157. Todos os grupos de pesquisa que descreveram o tratamento com NT157 *in vivo*, optaram por uma frequência de tratamento de três vezes por semana e doses entre 50 a 100 mg/kg. No entanto, estes testes foram realizados somente em tumores sólidos, com evolução clínica mais lenta^{74; 75; 77}. Diante dessas considerações, adequações serão necessárias para se avaliar a eficácia do tratamento com NT157 *in vivo* em LLA. Em relação ao modelo de xenotransplante com células CEM^{LUC2}, uma possível estratégia para melhorar a avaliação do efeito de droga seria a redução do número de células injetadas para a indução neoplásica, o que poderia reduzir a agressividade da neoplasia e possibilitar um tratamento mais longo.

Os resultados negativos do uso do NT157 em modelos de xenotransplante com células CEM não invalida a nossa hipótese de que IRS1 é um bom alvo terapêutico em LLA. Possivelmente questões relacionadas a farmacocinética e farmacodinâmica da droga resultaram no efeito final observado nos animais. Destacamos a inexistência de trabalhos que avaliam aspectos farmacológicos do composto. O NT157 atua em vias de sinalização envolvidas em processos celulares metabólicos essenciais, como a via de sinalização da insulina. Um estudo do efeito do NT157 sobre o metabolismo energético e desenvolvimento se faz necessário e pode ser realizado através da avaliação de variáveis como peso corporal e concentração plasmática de lipídios, glicose e insulina.

Em suma, em modelos de LLA, a inibição de IGF1R/IRS1-2 através do composto NT157 apresentou notáveis efeitos antineoplásicos. O tratamento resultou na inibição efetiva das proteínas IGF1R e IRS1 e de proteínas das vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK, duas das principais vias de sinalização desreguladas em LLA. A análise da expressão gênica de genes da via de sinalização da MAPK possibilitou uma maior compreensão dos mecanismos moleculares da ação de NT157. A expansão dos estudos *in vivo* se faz necessária para a caracterização farmacocinética, farmacodinâmica e toxicológica do composto NT157 para verificação de sua ação antineoplásica em modelos de LLA e avaliação de seus efeitos secundários sobre o metabolismo. Por atuar sobre múltiplos alvos, NT157 apresentou resultados mais atrativos quando comparado com OSI-906. O NT157 mostrou exercer atividades citotóxicas, enquanto o OSI-906 induziu efeitos citostáticos, como evidenciado pela parada do ciclo G₀/G₁ e por não ter afetado a apoptose em células de LLA. Dessa forma, nossos achados indicam que a inibição farmacológica do IRS1, através do composto NT157, emerge como uma alternativa terapêutica em LLA.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

O conjunto dos resultados apresentados neste trabalho permite as seguintes conclusões:

- Em linhagens celulares de LLA, o tratamento com o inibidor farmacológico de IGF1R/IRS1-2, NT157, apresenta notáveis efeitos antineoplásicos:
 - Redução da viabilidade, proliferação e migração celular;
 - Indução da apoptose;
 - Atraso na progressão do ciclo celular.
- A avaliação dos efeitos do tratamento com NT157 na expressão gênica e expressão/ativação proteica em linhagens celulares de LLA, possibilitou a identificação de múltiplos alvos da droga:
 - Inibição da fosforilação de IGF1R, IRS1, AKT, mTOR, P70S6K e 4EBP1;
 - Aumento, seguido de redução, da fosforilação de ERK;
 - Aumento da expressão proteica do marcador de dano de DNA, γ H2AX;
 - Redução da expressão do oncogene *MYC* e aumento da expressão dos genes supressores tumorais *p21*, *FOS* e *JUN*.
- Em células primárias de pacientes com LLA, mas não em células de doadores saudáveis, o tratamento com NT157 reduz a viabilidade celular e induz a apoptose.
- No modelo padronizado de camundongos xenotransplantados com células CEM^{Luc2} para tratamento com NT157 *in vivo*:
 - As células CEM^{Luc2} sobrevivem ao transplante e induzem leucemia sistêmica;
 - A leucemogênese pode ser acompanhada através da atividade biológica da luciferase;
 - O tratamento com NT157 neste modelo, nas doses e frequência adotadas, não altera o desenvolvimento leucêmico e a sobrevida dos animais.

- Em linhagens celulares de LLA, o tratamento com o inibidor farmacológico de IGF1R/IR, OSI-906, apresenta notáveis efeitos antineoplásicos:
 - Redução da viabilidade, proliferação e migração celular;
 - Atraso na progressão do ciclo celular;
 - Não induz apoptose.
- A avaliação dos efeitos do tratamento com OSI-906 na expressão gênica e expressão/ativação proteica em linhagens celulares de LLA, possibilitou a identificação de múltiplos alvos da droga:
 - Inibição da fosforilação de IGF1R, IRS1, mTOR, P70S6K e ERK;
 - Aumento da expressão proteica do marcador de dano de DNA, γ H2AX;
 - Aumento da expressão do gene supressor tumoral *FOS*.
- Em células primárias de pacientes com LLA, o tratamento com OSI-906 reduz a viabilidade celular, porém não induz a apoptose. OSI-906 não modula a viabilidade celular e a apoptose em células de doadores saudáveis.

Em conclusão, a inibição farmacológica de IGF1R/IRS1-2, por NT157, e de IGF1R/IR, por OSI-906, apresentaram efeitos antineoplásicos significativos em modelos de linhagens celulares e amostras primárias de pacientes com LLA *in vitro*. NT157 exerce um efeito citotóxico nas células de LLA, enquanto que OSI-906 tem um efeito predominantemente citostático.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- ¹ DIAS, A. et al. Novel Therapeutic Strategies in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Curr Hematol Malig Rep**, v. 11, n. 4, p. 253-64, Aug 2016.
- ² MORICKE, A. et al. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. **Blood**, v. 111, n. 9, p. 4477-89, May 1 2008.
- ³ MOGHRABI, A. et al. Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 896-904, Feb 1 2007.
- ⁴ PUI, C. H. et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII at St Jude Children's Research Hospital. **Blood**, v. 104, n. 9, p. 2690-6, Nov 1 2004.
- ⁵ SIVE, J. I. et al. Outcomes in older adults with acute lymphoblastic leukaemia (ALL): results from the international MRC UKALL XII/ECOG2993 trial. **Br J Haematol**, v. 157, n. 4, p. 463-71, May 2012.
- ⁶ JABBOUR, E. et al. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 121, n. 15, p. 2517-28, Aug 1 2015.
- ⁷ PAUL, S.; KANTARJIAN, H.; JABBOUR, E. J. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. **Mayo Clin Proc**, v. 91, n. 11, p. 1645-1666, Nov 2016.
- ⁸ BOROWITZ MJ, C. J. B lymphoblastic leukaemia/lymphoma, not otherwise specified. In: PRESS, I. (Ed.). **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 4th ed. Lyon, France, 2008. p.168-170.
- ⁹ BOROWITZ MJ, C. J. T lymphoblastic leukemia/lymphoma. . In: PRESS, I. (Ed.). **WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 4th ed. Lion, France, 2008. p.176-178.
- ¹⁰ CHAUFFAILLE, M. D. L. L. F. Y., M. . **Classificação das Leucemias Agudas. Citologia, Citoquímica, Imunofenotipagem, Citogenética e Genética Molecular. . Tratado de Hematologia**. ATHENEU. Rio de Janeiro, Brasil: Zago, M. A.; Falcão, R. P., et al 2014.
- ¹¹ ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391-405, May 19 2016.
- ¹² INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v. 381, n. 9881, p. 1943-55, Jun 1 2013.

- 13 ROBERTS, K. G. et al. Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 371, n. 11, p. 1005-15, Sep 11 2014.
- 14 FIELDING, A. K. et al. UKALLXII/ECOG2993: addition of imatinib to a standard treatment regimen enhances long-term outcomes in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 123, n. 6, p. 843-50, Feb 6 2014.
- 15 ASSOULINE, S. et al. Pharmacokinetics and safety of subcutaneous rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia. **Br J Clin Pharmacol**, v. 80, n. 5, p. 1001-9, Nov 2015.
- 16 ADVANI, A. S. et al. SWOG S0910: a phase 2 trial of clofarabine/cytarabine/epratuzumab for relapsed/refractory acute lymphocytic leukaemia. **Br J Haematol**, v. 165, n. 4, p. 504-9, May 2014.
- 17 KANTARJIAN, H. et al. Inotuzumab ozogamicin, an anti-CD22-calecheamicin conjugate, for refractory and relapsed acute lymphocytic leukaemia: a phase 2 study. **Lancet Oncol**, v. 13, n. 4, p. 403-11, Apr 2012.
- 18 WEI, G. et al. Novel immunotherapies for adult patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia. **J Hematol Oncol**, v. 10, n. 1, p. 150, Aug 18 2017.
- 19 BLANC, V. et al. SAR3419: an anti-CD19-Maytansinoid Immunoconjugate for the treatment of B-cell malignancies. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 20, p. 6448-58, Oct 15 2011.
- 20 HERRERA, L. et al. A phase 1 study of Combotox in pediatric patients with refractory B-lineage acute lymphoblastic leukemia. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 31, n. 12, p. 936-41, Dec 2009.
- 21 SCHINDLER, J. et al. A phase I study of a combination of anti-CD19 and anti-CD22 immunotoxins (Combotox) in adult patients with refractory B-lineage acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**, v. 154, n. 4, p. 471-6, Aug 2011.
- 22 KAPLAN, J. B.; GRISCHENKO, M.; GILES, F. J. Blinatumomab for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Invest New Drugs**, v. 33, n. 6, p. 1271-9, Dec 2015.
- 23 SADELAIN, M.; RIVIERE, I.; BRENTJENS, R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 1, p. 35-45, Jan 2003.
- 24 VOGELSTEIN, B. et al. Cancer genome landscapes. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1546-58, Mar 29 2013.
- 25 CHAPUIS, N. et al. Autocrine IGF-1/IGF-1R signaling is responsible for constitutive PI3K/Akt activation in acute myeloid leukemia: therapeutic value of

neutralizing anti-IGF-1R antibody. **Haematologica**, v. 95, n. 3, p. 415-23, Mar 2010.

- 26 WEISBERG, E. et al. Potentiation of antileukemic therapies by the dual PI3K/PDK-1 inhibitor, BAG956: effects on BCR-ABL- and mutant FLT3-expressing cells. **Blood**, v. 111, n. 7, p. 3723-34, Apr 1 2008.
- 27 NERI, L. M. et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in B-precursor acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic potential. **Leukemia**, v. 28, n. 4, p. 739-48, Apr 2014.
- 28 SILVA, A. et al. Intracellular reactive oxygen species are essential for PI3K/Akt/mTOR-dependent IL-7-mediated viability of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. **Leukemia**, v. 25, n. 6, p. 960-7, Jun 2011.
- 29 POLLAK, M. N.; SCHERNHAMMER, E. S.; HANKINSON, S. E. Insulin-like growth factors and neoplasia. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 7, p. 505-18, Jul 2004.
- 30 WARD, C. W. et al. The three dimensional structure of the type I insulin-like growth factor receptor. **Mol Pathol**, v. 54, n. 3, p. 125-32, Jun 2001.
- 31 NAKAE, J.; KIDO, Y.; ACCILI, D. Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. **Endocr Rev**, v. 22, n. 6, p. 818-35, Dec 2001.
- 32 LEE, Y. H.; WHITE, M. F. Insulin receptor substrate proteins and diabetes. **Arch Pharm Res**, v. 27, n. 4, p. 361-70, Apr 2004.
- 33 SUN, X. J. et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**, v. 352, n. 6330, p. 73-7, Jul 4 1991.
- 34 SUN, X. J. et al. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. **Nature**, v. 377, n. 6545, p. 173-7, Sep 14 1995.
- 35 SMITH-HALL, J. et al. The 60 kDa insulin receptor substrate functions like an IRS protein (pp60IRS3) in adipose cells. **Biochemistry**, v. 36, n. 27, p. 8304-10, Jul 8 1997.
- 36 LAVAN, B. E. et al. A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. **J Biol Chem**, v. 272, n. 34, p. 21403-7, Aug 22 1997.
- 37 CAI, D. et al. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. **J Biol Chem**, v. 278, n. 28, p. 25323-30, Jul 11 2003.
- 38 MARDILOVICH, K.; PANKRATZ, S. L.; SHAW, L. M. Expression and function of the insulin receptor substrate proteins in cancer. **Cell Commun Signal**, v. 7, p. 14, Jun 17 2009.

- 39 DEARTH, R. K. et al. Oncogenic transformation by the signaling adaptor proteins insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. **Cell Cycle**, v. 6, n. 6, p. 705-13, Mar 15 2007.
- 40 SAWKA-VERHELLE, D. et al. Insulin receptor substrate-2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine-binding domain and through a newly identified domain comprising amino acids 591-786. **J Biol Chem**, v. 271, n. 11, p. 5980-3, Mar 15 1996.
- 41 YENUSH, L. et al. The pleckstrin homology domain is the principal link between the insulin receptor and IRS-1. **J Biol Chem**, v. 271, n. 39, p. 24300-6, Sep 27 1996.
- 42 SUN, X. J. et al. Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. **Mol Cell Biol**, v. 13, n. 12, p. 7418-28, Dec 1993.
- 43 SAAD, M. J. et al. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. **J Biol Chem**, v. 271, n. 36, p. 22100-4, Sep 6 1996.
- 44 MACHADO-NETO, J. A. T., F. **IRS1 (insulin receptor substrate 1)**. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol: 17(9):594-598 p. 2013.
- 45 BASERGA, R. The insulin receptor substrate-1: a biomarker for cancer? **Exp Cell Res**, v. 315, n. 5, p. 727-32, Mar 10 2009.
- 46 BASERGA, R.; PERUZZI, F.; REISS, K. The IGF-1 receptor in cancer biology. **Int J Cancer**, v. 107, n. 6, p. 873-7, Dec 20 2003.
- 47 BEITNER-JOHNSON, D. et al. The proto-oncogene product c-Crk associates with insulin receptor substrate-1 and 4PS. Modulation by insulin growth factor-I (IGF) and enhanced IGF-I signaling. **J Biol Chem**, v. 271, n. 16, p. 9287-90, Apr 19 1996.
- 48 VIRKAMAKI, A.; UEKI, K.; KAHN, C. R. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 103, n. 7, p. 931-43, Apr 1999.
- 49 HIMMELMANN, B. et al. Anchorage-independent growth of fibroblasts that express a truncated IGF-I receptor. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 286, n. 3, p. 472-7, Aug 24 2001.
- 50 VISHWAMITRA, D. et al. Type I insulin-like growth factor receptor signaling in hematological malignancies. **Oncotarget**, v. 8, n. 1, p. 1814-1844, Jan 3 2017.
- 51 TAOUIS, M. et al. Insulin receptor substrate 1 antisense expression in an hepatoma cell line reduces cell proliferation and induces overexpression of the Src homology 2 domain and collagen protein (SHC). **Mol Cell Endocrinol**, v. 137, n. 2, p. 177-86, Feb 1998.

- 52 BERGMANN, U. et al. Increased expression of insulin receptor substrate-1 in human pancreatic cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 220, n. 3, p. 886-90, Mar 27 1996.
- 53 HELLAWELL, G. O. et al. Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease. **Cancer Res**, v. 62, n. 10, p. 2942-50, May 15 2002.
- 54 HOANG, C. D. et al. Selective activation of insulin receptor substrate-1 and -2 in pleural mesothelioma cells: association with distinct malignant phenotypes. **Cancer Res**, v. 64, n. 20, p. 7479-85, Oct 15 2004.
- 55 ROCHA, R. L. et al. Insulin-like growth factor binding protein-3 and insulin receptor substrate-1 in breast cancer: correlation with clinical parameters and disease-free survival. **Clin Cancer Res**, v. 3, n. 1, p. 103-9, Jan 1997.
- 56 RAVIKUMAR, S. et al. Insulin receptor substrate-1 is an important mediator of ovarian cancer cell growth suppression by all-trans retinoic acid. **Cancer Res**, v. 67, n. 19, p. 9266-75, Oct 1 2007.
- 57 DEL VALLE, L. et al. Insulin-like growth factor I receptor activity in human medulloblastomas. **Clin Cancer Res**, v. 8, n. 6, p. 1822-30, Jun 2002.
- 58 FERNANDES, J. C. et al. IRS1/beta-Catenin Axis Is Activated and Induces MYC Expression in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. **J Cell Biochem**, v. 118, n. 7, p. 1774-1781, Jul 2017.
- 59 CHEN, J. et al. Functional significance of type 1 insulin-like growth factor-mediated nuclear translocation of the insulin receptor substrate-1 and beta-catenin. **J Biol Chem**, v. 280, n. 33, p. 29912-20, Aug 19 2005.
- 60 TRAINA, F. et al. BCR-ABL binds to IRS-1 and IRS-1 phosphorylation is inhibited by imatinib in K562 cells. **FEBS Lett**, v. 535, n. 1-3, p. 17-22, Jan 30 2003.
- 61 MACHADO-NETO, J. A. et al. Knockdown of insulin receptor substrate 1 reduces proliferation and downregulates Akt/mTOR and MAPK pathways in K562 cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 8, p. 1404-11, Aug 2011.
- 62 JURIC, D. et al. Differential gene expression patterns and interaction networks in BCR-ABL-positive and -negative adult acute lymphoblastic leukemias. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 11, p. 1341-9, Apr 10 2007.
- 63 YAKTAPOUR, N. et al. Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) as a novel target in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 122, n. 9, p. 1621-33, Aug 29 2013.
- 64 DURHAM, B. H. et al. Genomic analysis of hairy cell leukemia identifies novel recurrent genetic alterations. **Blood**, v. 130, n. 14, p. 1644-1648, Oct 5 2017.

- 65 MEDYOUNF, H. et al. High-level IGF1R expression is required for leukemia-initiating cell activity in T-ALL and is supported by Notch signaling. **J Exp Med**, v. 208, n. 9, p. 1809-22, Aug 29 2011.
- 66 AVELLINO, R. et al. Rapamycin stimulates apoptosis of childhood acute lymphoblastic leukemia cells. **Blood**, v. 106, n. 4, p. 1400-6, Aug 15 2005.
- 67 CHIARINI, F. et al. Dual inhibition of class IA phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin as a new therapeutic option for T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Res**, v. 69, n. 8, p. 3520-8, Apr 15 2009.
- 68 HUANG, Z. et al. Inhibition of type I insulin-like growth factor receptor tyrosine kinase by picropodophyllin induces apoptosis and cell cycle arrest in T lymphoblastic leukemia/lymphoma. **Leuk Lymphoma**, v. 55, n. 8, p. 1876-83, Aug 2014.
- 69 STROMBERG, T. et al. Picropodophyllin inhibits proliferation and survival of diffuse large B-cell lymphoma cells. **Med Oncol**, v. 32, n. 7, p. 188, Jul 2015.
- 70 YE, W. et al. GZD824 suppresses the growth of human B cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells by inhibiting the SRC kinase and PI3K/AKT pathways. **Oncotarget**, v. 8, n. 50, p. 87002-87015, Oct 20 2017.
- 71 MULVIHILL, M. J. et al. Discovery of OSI-906: a selective and orally efficacious dual inhibitor of the IGF-1 receptor and insulin receptor. **Future Med Chem**, v. 1, n. 6, p. 1153-71, Sep 2009.
- 72 KUHN, D. J. et al. Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor to overcome bortezomib resistance in preclinical models of multiple myeloma. **Blood**, v. 120, n. 16, p. 3260-70, Oct 18 2012.
- 73 GUAL, P.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; TANTI, J. F. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. **Biochimie**, v. 87, n. 1, p. 99-109, Jan 2005.
- 74 REUVENI, H. et al. Therapeutic destruction of insulin receptor substrates for cancer treatment. **Cancer Res**, v. 73, n. 14, p. 4383-94, Jul 15 2013.
- 75 IBUKI, N. et al. The tyrphostin NT157 suppresses insulin receptor substrates and augments therapeutic response of prostate cancer. **Mol Cancer Ther**, v. 13, n. 12, p. 2827-39, Dec 2014.
- 76 GAROFALO, C. et al. Preclinical Effectiveness of Selective Inhibitor of IRS-1/2 NT157 in Osteosarcoma Cell Lines. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 6, p. 74, 2015.
- 77 FLASHNER-ABRAMSON, E. et al. Targeting melanoma with NT157 by blocking Stat3 and IGF1R signaling. **Oncogene**, v. 35, n. 20, p. 2675-80, May 19 2016.

- 78 SANCHEZ-LOPEZ, E. et al. Targeting colorectal cancer via its microenvironment by inhibiting IGF-1 receptor-insulin receptor substrate and STAT3 signaling. **Oncogene**, v. 35, n. 20, p. 2634-44, May 19 2016.
- 79 DE MELO CAMPOS, P. et al. IRS2 silencing increases apoptosis and potentiates the effects of ruxolitinib in JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasms. **Oncotarget**, v. 7, n. 6, p. 6948-59, Feb 9 2016.
- 80 CORREIA, N. C. et al. MiR-146b negatively regulates migration and delays progression of T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Sci Rep**, v. 6, p. 31894, Aug 23 2016.
- 81 DE SOUZA, L. E. B. **Geração de organoides vascularizados como veículos produtores do fator VIII da coagulação em um modelo murino de hemofilia A.** . 2016. 117f (Doutorado). Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- 82 BARNUM, K. J.; O'CONNELL, M. J. Cell cycle regulation by checkpoints. **Methods Mol Biol**, v. 1170, p. 29-40, 2014.
- 83 ZHANG, D.; SAMANI, A. A.; BRODT, P. The role of the IGF-I receptor in the regulation of matrix metalloproteinases, tumor invasion and metastasis. **Horm Metab Res**, v. 35, n. 11-12, p. 802-8, Nov-Dec 2003.
- 84 ABBAS, T.; DUTTA, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 6, p. 400-14, Jun 2009.
- 85 EL-DEIRY, W. S. p21(WAF1) Mediates Cell-Cycle Inhibition, Relevant to Cancer Suppression and Therapy. **Cancer Res**, v. 76, n. 18, p. 5189-91, Sep 15 2016.
- 86 DENG, C. et al. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. **Cell**, v. 82, n. 4, p. 675-84, Aug 25 1995.
- 87 EL-DEIRY, W. S. et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. **Cancer Res**, v. 54, n. 5, p. 1169-74, Mar 1 1994.
- 88 GARTEL, A. L.; TYNER, A. L. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. **Mol Cancer Ther**, v. 1, n. 8, p. 639-49, Jun 2002.
- 89 ZHANG, Y.; FUJITA, N.; TSURUO, T. Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. **Oncogene**, v. 18, n. 5, p. 1131-8, Feb 4 1999.
- 90 ANGEL, P.; KARIN, M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1072, n. 2-3, p. 129-57, Dec 10 1991.

- ⁹¹ IP, Y. T.; DAVIS, R. J. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. **Curr Opin Cell Biol**, v. 10, n. 2, p. 205-19, Apr 1998.
- ⁹² SU, S. P. et al. Impact of the Anticancer Drug NT157 on Tyrosine Kinase Signaling Networks. **Mol Cancer Ther**, v. 17, n. 5, p. 931-942, May 2018.
- ⁹³ AGUIRRE, V. et al. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. **J Biol Chem**, v. 277, n. 2, p. 1531-7, Jan 11 2002.
- ⁹⁴ ZHAO, S. et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase dephosphorylates BAD and promotes apoptosis in myeloid leukemias. **Leukemia**, v. 18, n. 2, p. 267-75, Feb 2004.
- ⁹⁵ BORNHAUSER, B. C. et al. Low-dose arsenic trioxide sensitizes glucocorticoid-resistant acute lymphoblastic leukemia cells to dexamethasone via an Akt-dependent pathway. **Blood**, v. 110, n. 6, p. 2084-91, Sep 15 2007.
- ⁹⁶ DATTA, S. R. et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. **Cell**, v. 91, n. 2, p. 231-41, Oct 17 1997.
- ⁹⁷ NESBIT, C. E.; TERSAK, J. M.; PROCHOWNIK, E. V. MYC oncogenes and human neoplastic disease. **Oncogene**, v. 18, n. 19, p. 3004-16, May 13 1999.
- ⁹⁸ SCHICK, M. et al. Pathogenesis and therapeutic targeting of aberrant MYC expression in haematological cancers. **Br J Haematol**, v. 179, n. 5, p. 724-738, Dec 2017.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação da expressão de IGF1, IGF1R, IRS1 e IRS2 na leucemia linfóide aguda

Pesquisador: Ana Paula Nunes Rodrigues Alves

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 23975014.1.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.040.102

Data da Relatoria: 15/04/2015

Apresentação do Projeto:

A leucemia linfóide aguda (LLA) é uma neoplasia de células linfóides imaturas e se divide em dois grandes grupos imunofenotípicos: precursor B (LLA-B) e precursor T (LLA-T), cada qual com suas características clínicas, morfológicas, imunofenotípicas, citogenéticas e moleculares. A via de sinalização IGF1/IGF1R e IRS1/IRS2 está relacionada ao desenvolvimento e progressão de múltiplas neoplasias. Esta via de sinalização se inicia através da ligação do ligante (IGF1) ao seu receptor (IGF1R) e subsequente ativação de seus substratos que incluem os substratos do receptor de insulina (IRS1 e IRS2). Recentes evidências indicam que IGF1/IGF1R e os seus substratos IRS1/IRS2 ativam a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR e participam das neoplasias hematológicas, podendo atuar como oncogenes e induzir transformação maligna. Dessa forma, o objetivo do nosso trabalho é investigar e comparar a expressão gênica de IGF1, IGF1R, IRS1 e IRS2 em células hematopoéticas normais e de pacientes com LLA, comparar a expressão gênica entre os diferentes subtipos de LLA (LLA B versus LLA T, LLA BCR-ABL1 positivo versus LLA BCR-ABL1 negativo); e estudar a expressão proteica destas proteínas em linhagens de LLA. Utilizaremos uma casuística de amostras coletadas de voluntários sadios e pacientes com diagnóstico de LLA atendidos no HCFMRP USP, e linhagens celulares de LLA. PCR quantitativo e Western blot serão utilizados para estudos de expressão gênica e proteica, respectivamente. As medianas de expressão gênica serão

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.040.102

comparadas através do teste estatístico de Mann-Whitney U.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a expressão de IGF1, IGF-1R, IRS1 e IRS2 na leucemia linfóide aguda.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O projeto de pesquisa não confere risco aos indivíduos participantes da pesquisa, pois a coleta das amostras já é prevista no atendimento e/ou nos procedimentos diagnósticos para os participantes da pesquisa.

Benefícios: O projeto não confere benefícios diretos aos indivíduos participantes da pesquisa, entretanto os dados obtidos serão importantes para guiar o desenho de novos projetos de pesquisa sobre o tema podendo assim ser úteis para o tratamento de pacientes no futuro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Processamento das amostras: amostras serão submetidas à lise de hemácias. - Extração de RNA total: o RNA das células será isolado utilizando Trizol. A purificação do RNA seguirá segundo o protocolo do fabricante. - Transcrição em cDNA: Uma vez extraído e quantificado, o RNA total será utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA) com o kit High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, EUA). As reações ocorrerão em volumes de 10L, contendo um micrograma de RNA total, 1L de 10x RT Buffer, 0.4L de dNTP Mix 100mM, 1L 10x RT Random Primers, 0.5uL de MultiScribe RT (50U/l), 0.4uL de RNasin Plus RNase Inhibitor (Promega, EUA) e H₂O deionizada autoclavada suficiente para completar o volume final. As reações ocorrerão durante 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C. - PCR quantitativo para avaliar a eficiência da síntese de cDNA: Para avaliar a eficiência da síntese de cDNA, as amostras serão submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real para amplificação de um gene constitutivamente expresso que codifica o GAPDH Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), uma enzima endógena essencial na via da glicólise e da gliconeogênese. As reações ocorrerão em um volume de 20L, contendo: 2L de cDNA e 10L de SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), 0.8L de GAPDH F, 0.8L de GAPDH R e água livre de nucleases suficiente para completar o volume final. Inicialmente, as amostras serão aquecidas a 50°C por 2 minutos, desnaturadas a 95°C por 10 minutos, seguindo-se 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto; por fim, uma extensão a 95°C por 15 segundos, 60°C a 30 segundos e 95°C a 15 segundos. - PCR quantitativo (qPCR): Amplificação em tempo real será realizada no 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando-se Power

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.040.102

SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). Um controle negativo, sem adição de cDNA, será realizado para cada par de iniciadores. A concentração dos iniciadores e das amostras serão padronizadas para cada iniciador. O protocolo de dissociação será realizado no final de cada reação para verificar amplificações não específicas. Cada reação será realizada em triplicata no mesmo experimento. As expressões de HPRT ou β actina serão utilizadas como controle endógeno e uma amostra de cDNA de um doador normal será utilizada como a amostra calibradora. A quantificação relativa da expressão gênica de IGF1, IGF1R, IRS1 e IRS2 será calculada utilizando-se a fórmula potência $2^{-(\Delta\Delta CT)}$. -Western Blotting: Ao precipitado celular contendo 5×10^6 a 1×10^7 células será adicionado tampão de extração de proteínas. Ao produto do extrato de proteínas serão adicionados tampão Laemmli com DTT 100 mM. As amostras serão então submetidas à eletroforese e eletrotransferência para membrana de nitrocelulose e imunoblotting com anticorpos específicos. O sistema de revelação usado será baseado em quimioluminescência, de acordo com as instruções no kit ECLTM Western Blotting Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, UK).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não há.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa, assim como os Termos TCLE paciente v.4 31/03/15; TCLE controle v.2 31/03/15; TA paciente v.1 31/03/15 e TA controle v.1 31/03/15, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -

Continuação do Parecer: 1.040.102

RIBEIRÃO PRETO, 28 de Abril de 2015

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Anexo B – Parecer de aprovação da Comissão de Ética ao Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Investigação funcional da participação da via de sinalização IGF1R/IRS1 na leucemia linfóide aguda*”, registrado com o número **046/2017**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Fabíola Traina**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 02 de agosto de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 60 camundongos NSG fêmeas pesando 23g oriundos do Laboratório de Estudos Experimentais em Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 02/08/2017 a 24/07/2021.

We certify that the Protocol nº 046/2017, entitled “*Functional Investigation of IGF1/IRS1 signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 08/02/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 60 female NSG mice weighing 23g from the Laboratory of Experimental Studies in Animals of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 07/24/2021.

Ribeirão Preto, 02 de agosto de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Carneiro
Vice-Presidente da CEUA-FMRP – USP,
em exercício

APÊNDICE

APÊNDICE A – Tabela Suplementar 1: Genes relacionados a via de sinalização da MAPK avaliados por PCR array

Tabela 1. Genes relacionados à via de sinalização da MAPK investigados por PCR array

Gene	Fold change do controle
<i>ARAF</i>	1.03
<i>ATF2</i>	1.61
<i>BRAF</i>	1.17
<i>CCNA1</i>	1.86
<i>CCNA2</i>	0.62
<i>CCNB1</i>	0.61
<i>CCNB2</i>	0.66
<i>CCND1</i>	0.97
<i>CCND2</i>	1.18
<i>CCND3</i>	0.63
<i>CCNE1</i>	1.75
<i>CDC42</i>	1.04
<i>CDK2</i>	0.85
<i>CDK4</i>	0.73
<i>CDK6</i>	0.65
<i>CDKN1A</i>	29.20
<i>CDKN1B</i>	1.74
<i>CDKN1C</i>	6.58
<i>CDKN2A</i>	2.76
<i>CDKN2B</i>	2.10
<i>CDKN2C</i>	1.16
<i>CDKN2D</i>	0.98
<i>CHUK</i>	0.99
<i>COL1A1</i>	1.96
<i>CREB1</i>	1.23
<i>CREBBP</i>	1.51
<i>DLK1</i>	2.83
<i>E2F1</i>	0.99
<i>EGFR</i>	4.98
<i>EGR1</i>	19.18
<i>ELK1</i>	0.81
<i>ETS1</i>	0.67
<i>ETS2</i>	0.34
<i>FOS</i>	66.26
<i>GRB2</i>	1.11
<i>HRAS</i>	0.70
<i>HSPA5</i>	1.44
<i>HSPB1</i>	0.45
<i>JUN</i>	9.25
<i>KRAS</i>	0.96
<i>KSR1</i>	2.05
<i>LAMTOR3</i>	1.66
<i>MAP2K1</i>	1.40
<i>MAP2K2</i>	1.71
<i>MAP2K3</i>	1.85
<i>MAP2K4</i>	1.35
<i>MAP2K5</i>	1.18
<i>MAP2K6</i>	0.40
<i>MAP2K7</i>	0.99
<i>MAP3K1</i>	2.01
<i>MAP3K2</i>	1.99
<i>MAP3K3</i>	1.45

<i>MAP3K4</i>	1.19
<i>MAP4K1</i>	0.63
<i>MAPK1</i>	1.04
<i>MAPK10</i>	17.01
<i>MAPK11</i>	3.20
<i>MAPK12</i>	2.60
<i>MAPK13</i>	0.87
<i>MAPK14</i>	1.38
<i>MAPK3</i>	0.75
<i>MAPK6</i>	2.23
<i>MAPK7</i>	1.79
<i>MAPK8</i>	1.57
<i>MAPK8IP2</i>	2.77
<i>MAPK9</i>	0.94
<i>MAPKAPK2</i>	1.13
<i>MAPKAPK3</i>	0.43
<i>MAX</i>	1.40
<i>MEF2C</i>	2.03
<i>MKNK1</i>	0.96
<i>MOS</i>	4.87
<i>MST1</i>	2.29
<i>MYC</i>	0.27
<i>NFATC4</i>	2.33
<i>NRAS</i>	1.12
<i>PAK1</i>	1.07
<i>PRDX6</i>	1.54
<i>RAC1</i>	0.85
<i>RAF1</i>	1.17
<i>RB1</i>	0.60
<i>SFN</i>	1.59
<i>SMAD4</i>	1.05
<i>TP53</i>	1.90

A expressão gênica relativa de genes que apresentam *fold-change* ≥ 2 do controle está destacada em negrito.