

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Imunologia Básica e Aplicada

Larissa Ananias Cândido

Investigação dos mecanismos de resistência ao tratamento com halofuginona em
leucemia mieloide aguda

Ribeirão Preto

2016

LARISSA ANANIAS CÂNDIDO

Investigação dos mecanismos de resistência ao tratamento com halofuginona em
leucemia mieloide aguda

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências.

Área de concentração: **Imunologia Básica e
Aplicada.**

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi

Ribeirão Preto

2016

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

Cândido, Larissa Ananias.

Investigação dos mecanismos de resistência ao tratamento com halofuginona em leucemia mieloide aguda– Ribeirão Preto, 2016.

p.68 il.;30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Eduardo Antônio Donadi

1. Leucemia mieloide aguda 2. Halofuginona 3. Apoptose

Cândido, LA. **Investigação dos mecanismos de resistência ao tratamento com halofuginona em leucemia mieloide aguda** Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento: _____

Assinatura: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

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

- CNPQ (Bolsa de mestrado) - agosto/2013 a julho/2015.
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Bolsa de Treinamento Técnico (TT3) - dezembro/2015 – atual.
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).
- Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular (INCTC).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Izaltino e Maria José, pelo amor, exemplo de empenho e dedicação, por toda compreensão destes longos anos que estive longe de vocês e pelo apoio que sempre me deram.

Ao meu irmão Fábio pelo companheirismo, compreensão e apoio.

Aos meus avós Antonio, Maria Augusta e Maria Aparecida (*in memoriam*) por todo amor e carinho que recebi de vocês.

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial a meus pais Izaltino e Maria José por terem apoiado as minhas escolhas mesmo nos momentos mais difíceis destes últimos 7 anos fora de casa. Obrigada por me apioarem, pelo carinho e amor que dedicam a mim. Obrigada meu pai por ter colocado em mim o desejo e a força para ir atrás dos meus sonhos. Ao meu irmão Fábio, obrigada por sempre me apoiar, por fazer tudo por nós dois ao longo destes anos que estive fora de casa, por todos os momentos de alegria e descontração.

Aos amigos queridos de Poços Natasha, Elisandra, Liliane e Marcos por todo o apoio e torcida, por festejarem comigo as minhas conquistas, por estarem sempre prontos para me dar força, o que foi extremamente precioso em alguns momentos destes anos que estive em Ribeirão. Obrigada pela amizade da vida toda, pelas conversas, pelo carinho e por toda ajuda.

Às queridas amigas Mariana, Natália e Flávia obrigada por me receberem tão bem no laboratório, por toda a ajuda e ensinamentos. Obrigada Mari por sempre dividir comigo os seus conhecimentos, por me ensinar tanto nos anos que estive comigo aqui e por ainda hoje estar sempre aberta para me ouvir e me ajudar. Obrigada Nat e Toco(linda) pela amizade e pela ajuda que sempre estiveram dispostas a me dar. Obrigada Toco(linda) por me ajudar a formatar essa dissertação.

Às queridas Mariana, Diandra, Fernanda e Marlusa por terem formado a minha família de Ribeirão, obrigada por todo o apoio que vocês me deram, pela torcida, pela alegria, por todos os momentos felizes que dividimos. Obrigada Di por ter esse coração maravilhoso, por ter ajudado tanto a mim e a minha família, nunca vou esquecer e deixar de agradecer por tudo o que fez por nós.

Aos amigos do biotério, Cleide, Larissa, Mônica e Geovani, muito obrigada pela amizade e generosidade de vocês. Obrigada Cleidoca por ser essa pessoa extremamente generosa, carinhosa, alegre, compressiva, por me ensinar, me oferecer sua ajuda em tudo, por todo apoio, se não fosse seu coração de luz seria muito difícil que agora eu estivesse defendendo o mestrado.

As queridas amigas Flor, Isabel e Luciana, muito obrigada por toda a ajuda, pela paciência, pela compreensão. Muito obrigada Flor por sua disposição em me ajudar e ensinar, e a Is e Lu por toda ajuda nessa reta final do meu mestrado, vocês foram imprescindíveis para que eu chegasse até aqui.

A todas as funcionárias do laboratório, especialmente às técnicas Ana Silvia e Adriana, por terem me recebido e ensinado tudo o que agora sei de biologia molecular, pela amizade e pelo apoio, por toda a ajuda que me deram nestes anos no laboratório.

À Priscila e Aglair pela ajuda nos experimentos de citometria, à Bárbara por sempre estar aberta para tirar minhas dúvidas e ajudar. Às meninas da citogenética Diva, Ivana e Virgínia pelo convívio e por estarem sempre disponíveis nos momentos que precisei da ajuda de vocês. À Amélia, Júlia e Josiane por toda ajuda e socorros.

As meninas do Hemocentro, Camila e Patrícia, pela ajuda e por todos os socorros com os experimentos de citometria.

Aos colaboradores desse trabalho, Daniel, Cleide e Luciana pela ajuda nos experimentos com os animais, e por estarem sempre abertos a discutir comigo e me ensinarem e Carol por toda sua ajuda nos experimentos.

Aos amigos e colegas do laboratório, os que já se mudaram Katarina, Helder, Mari, e aos que ainda estão por aqui, Leo, Gustavo, João Paulo, Bruna, Renata, João (Prof.), Fernanda, Silvia e Juliana obrigada pela companhia, pelas conversas e pela ajuda.

A Ana, secretária da Imuno, obrigada por ser meu anjo na pós-graduação. Muito obrigada Aninha por sempre me ajudar desde que cheguei aqui e por todo o apoio.

A Dalvinha, por estar sempre disponível para me ajudar, conversar, e por todo o apoio que tem me dado.

Ao professor Fernando Chaud e sua técnica Mônica por nos ajudarem com os experimentos in vivo.

Ao professor Eduardo Antonio Donadi por aceitar me “orientar só para que eu pudesse defender o mestrado”, muito obrigada pela sua simpatia.

Ao professor Eduardo Magalhães Rego, por ter aberto as portas do seu laboratório, ainda que eu tivesse muito pouca experiência com pesquisa quando aqui cheguei. Obrigada por ter sido compreensivo nos momentos que tanto precisei. O senhor é para mim um exemplo de sabedoria, compreensão e humildade.

RESUMO

Cândido, L. A. **Investigação dos mecanismos de resistência ao tratamento com halofuginona em leucemia mieloide aguda.** 2016. 68 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A leucemia mieloide aguda (LMA) compreende um grupo heterogêneo de doenças hematológicas caracterizadas pela expansão clonal de células mieloides imaturas que apresentam diferentes tipos de alterações genéticas e epigenéticas. O diagnóstico requer a identificação de infiltração da medula óssea e/ou sangue por blastos mieloides leucêmicos em frequência igual ou superior a 20% das células nucleadas. Os tratamentos mais frequentemente empregados para a LMA englobam o uso de quimioterapia convencional com uso de citarabina e antraciclinas, bem como agentes imunoterápicos. Embora a pesquisa da biologia da LMA tenha levado ao desenvolvimento de novos agentes direcionados a alvos específicos como as mutações em FLT3, faltam avanços para os pacientes com outras leucemias que não a leucemia promielocítica aguda (LPA). A halofuginona (HF) é um derivado halogenado de febrifugina, que possui propriedades antifibróticas, anticancerígenas, antiinflamatórias e pró-apoptóticas. No presente estudo, avaliamos a indução de apoptose pela HF nas linhagens de LMA Kasumi-1, THP-1, MV4-11, U937 e OCI-AML3, verificando a sensibilidade ao tratamento. Verificamos que a linhagem Kasumi-1 foi sensível à atividade pró-apoptótica da HF exibindo dose efetiva 50 DE₅₀ de 125,58 ng/ml, e que as células THP-1 foram resistentes exibindo DE₅₀ de 786,15 ng/ml. As células Kasumi-1 sofreram diminuição significativa da porcentagem de células na fase S do ciclo celular, enquanto que as porcentagens de células THP-1 em qualquer das fases analisadas não se alterou em comparação às amostras controles tratadas com veículo. Usando a metodologia de Western Blot, foi detectada a ativação da via das caspases com aumento da clivagem de caspase 3 após 3 horas de incubação com HF nas amostras de células Kasumi-1 e após 12 horas para as células THP-1. Bandas correspondentes a forma clivada de PARP foram identificadas em amostras de células Kasumi-1 após 12 horas de tratamento e nas amostras de células THP-1 após 3 horas de tratamento. Usando a metodologia de *Proteome Profiler™ Array – HumanPhospho-Kinase Array* para rastreamento de proteínas fosforiladas pelo tratamento com HF, detectamos que houve modulação de 3 proteínas diferencialmente para as duas linhagens, 9 proteínas moduladas exclusivamente nas células Kasumi-1 e 6 exclusivamente nas células THP-1. Entre as alterações mais relevantes, destacamos a diminuição da fosforilação de Stat3 e Stat5 nas células Kasumi-1 e a diminuição das formas fosforiladas de p53 nas células THP-1. Nossos achados confirmam o efeito pró-apoptótico da HF, sobretudo nas células Kasumi-1, e sugerem que este efeito envolva a diminuição das fosforilações de Stat3 e de Stat5.

Palavras chaves: LMA, halofuginona, apoptose

ABSTRACT

Cândido, L. A. 2016. **Analysis of the resistant mechanism upon treatment with Halofuginone in AML.** 68 p. Dissertation (Master degree) - Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous hematological disorder characterized by the clonal expansion of immature myeloid cells exhibiting different types of genetic and epigenetic alterations. A diagnosis is established when a patient presents $\geq 20\%$ of blast in the bone marrow or in the peripheral blood. The WHO classifies AML in seven subtypes depending on the morphology, immunophenotype, genetics and clinical presentation of the cells. The most common treatment until nowadays is chemotherapy in combination with cytarabine and anthracycline and furthermore also the application of immunotherapeutic agents. Although researchers have attempted to develop new agents targeting directly specific mutations such as FLT3, further studies are necessary to find new therapeutic approaches for other leukemic subtypes aside from acute promyelocytic leukemia (APL). Halofuginone (HF) is a halogenated derivate of Febrifugine, which is a molecule isolated from the plant *Dichroa febrifuga*. It has been demonstrated that Halofuginone exhibits anti-fibrotic, anti-cancerogenic, anti-inflammatory and pro-apoptotic properties. We evaluated the induction of apoptosis of HF in the AML cell lines Kasumi-1, THP-1, MV4-11, U937 e OCI-AML3, we verified the sensitivity and resistance of these cell lines after treatment, performed a cell cycle analysis, analyzed the activation of proteins associated with apoptosis and the proteins associated with cell proliferation and survival. We established that the Kasumi-1 cell line was sensitive to the treatment of HF displaying a dose IC_{50} of 125, 58 ng/ml, while the THP-1 cell lines presented resistance displaying a dose IC_{50} of 786,15 ng/ml. When treated with HF, the Kasumi-1 cell line stopped in the S phase of the cell cycle displaying significant decrease of proliferation, while HF showed no significant on THP-1. Furthermore we performed a western blot and It was demonstrated that the cleavage of caspase 3 appeared after 3 hours of treatment in Kasumi-1 and after 12 hours of treatment in THP-1, while cleavage of caspase 9 appeared after 12 hours in both cell lines. PARP was cleaved in Kasumi-1 after 12 hours of HF treatment, whereas the cleavage of PARP in THP-1 remained the same after 3 hours of treatment. Performing the methodology of Proteome Profiler™ Array – HumanPhospho-Kinase Array we detected 3 proteins modulated in both cell lines, 9 proteins were modulated only in Kasumi-1 cells and 6 in THP-1 cells. Amongst the different tyrosine kinases and signaling pathways that were modulated, we observed that the phosphorylation of Stat3 and Stat5 was diminished in Kasumi-1, while THP-1 presented

decreased phosphorylation of p53. Our findings confirm that HF exhibits pro-apoptotic effect on Kasumi-1 and is capable of modulating the various proteins important for cell survival.

Key words: AML, halofuginone, apoptosis

Lista de figuras

Figura 1: Ensaio de apoptose das células Kasumi-1 com Anexina V- FITC e PI. A) Gráficos do tipo *dot plot* representativos dos experimentos de apoptose com células Kasumi-1 tratadas por 24 horas com Halofuginona (HF) ou Ácido Lático (AL). B) Gráfico de barras evidenciando a média das porcentagens de apoptose (Anexina-V positivos) de células kasumi-1 tratadas com 50, 100 e 200 ng/ml de HF. O valor de p obtido no teste de Kruskal Walli foi de 0,0027. A dose de 200ng/ml resultou em índice apoptótico 3,9 vezes superior em relação ao controle. As demais doses não apresentaram diferença significativa. Foram realizados pelo menos dois experimentos independentes em duplicata. Controle (AL - 200ng/ml)..... 35

Figura 2: Ensaio de apoptose das células MV4-11 com Anexina V- APC e PI. C) Gráficos do tipo *dot plot* representativos dos experimentos de apoptose com células MV4-11 tratadas por 24 horas com Halofuginona (HF) ou Ácido Lático (AL). D) Gráfico de barras evidenciando a média das porcentagens de apoptose (Anexina-V positivos) de células MV4-11 tratadas com 25, 50 e 100 ng/ml de HF. O valor de p obtido no teste de Kruskal Walli foi de 0,0002. A dose de 100 ng/ml resultou em índice apoptótico 3,6 superior em relação ao controle e 2,3 vezes superior em relação a dose de 25 ng/ml. Foram realizados pelo menos dois experimentos independentes em duplicata. Controle (AL - 100 ng/ml).....36

Figura 3: Ensaio de apoptose células U937 com Anexina V - APC e PI. Ensaio de apoptose das células U937 com Anexina V- APC e PI. E) Gráficos do tipo *dot plot* representativos dos experimentos de apoptose com células U937 tratadas por 24 horas com Halofuginona (HF) ou Ácido Lático (AL). F) Gráfico de barras evidenciando a média das porcentagens de apoptose (Anexina-V positivos) de células U937 tratadas com 50, 100 e 200 ng/ml de HF. O valor de p obtido no teste de Kruskal Walli foi de 0,0001. A dose de 200ng/ml e a dose de 100 ng/ml resultaram em índice apoptótico 3,4 e 2,4 vezes superior em relação ao controle, respectivamente A dose de 200 ng/ml induziu um índice 2,1 vezes maior de apoptose em relação à dose de 50 ng/ml. As demais doses não apresentaram diferença significativa. Foram realizados pelo menos dois experimentos independentes em duplicata. Controle (AL 200 ng/ml).....38

Figura 4: Ensaio de apoptose células OCI-AML3 com Anexina V - APC e PI. G) Gráficos do tipo *dot plot* representativos dos experimentos de apoptose com células OCI-AML 3 tratadas por 24 horas com Halofuginona (HF) ou Ácido Lático (AL). H) Gráfico de barras

evidenciando a média das porcentagens de apoptose (Anexina-V positivos) de células OCI-AML3 tratadas com 50, 100, 200, 500 e 1000 ng/ml de HF. O valor de p obtido no teste de Kruskal Walli foi de 0,0024. A dose de 1000 ng/ml resultou em índice apoptótico 3,5 vezes superior em relação ao controle. As demais doses não apresentaram diferença significativa. Foram realizados pelo menos dois experimentos independentes em duplicata. Controle (AL 1000 ng/ml).....40

Figura 5: Ensaio de apoptose células THP-1 com Anexina V- APC e PI. I) Gráficos do tipo *dot plot* representativos dos experimentos de apoptose com células THP-1 tratadas por 24 horas com Halofuginona (HF) ou Ácido Lático (AL). J) Gráfico de barras evidenciando a média da porcentagem de apoptose (Anexina-V positivos) de células THP-1 tratadas com 50, 100, 200, 500 e 1000 ng/ml de HF. O valor de p obtido no teste de Kruskal Walli foi de 0,003. A dose de 1000 ng/ml e a de 500 ng/ml resultaram em índice apoptótico 2,4 e 2,1 vezes superior em relação ao controle, respectivamente. A dose de 1000 ng/ml foi, também, superior em relação às doses de 50 ng/ml e de 100 ng/ml, induzindo apoptose 2 e 1,8 vezes maior, respectivamente. As demais comparações não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Foram realizados pelo menos dois experimentos independentes em duplicata. Controle (AL 1000 ng/ml).....42

Figura 6: Efeito do tratamento com halofuginona sobre o ciclo celular nas linhagens Kasumi-1 e THP-1. Os resultados estão apresentados graficamente com as médias das porcentagens de células Kasumi-1 (A) e THP-1(B) nas fases G0/G1 (coluna cinza), S (coluna branca) e G2/M (coluna preta) do ciclo celular após tratamento com HF ou veículo (AL) na concentração de 125 ng/ml durante 6 horas. HF reduziu significativamente a porcentagem de células Kasumi-1 na fase S do ciclo celular ($p = 0,004$ - teste de *Mann-Whitney*) quando comparada a AL (A). HF não induziu alterações significativas na distribuição de células THP-1 dentre as fases do ciclo celular quando comparada ao grupo AL nas mesmas condições experimentais (G0/G1, $p = 0,694$; S, $p = 0,94$ e G2/M, $p = 0,666$ - teste t pareado).....44

Figura 7: Detecção de caspase-3, caspase-9 e PARP após o tratamento com HF (125 ng/ml) nas linhagens celulares Kasumi-1 e THP-1 por *western blott*. Células Kasumi-1 e THP-1 foram tratadas com HF (125 ng/ml) pelos tempos indicados ou seu veículo (ácido lático) por 24 horas. Pró-caspase-3, caspase-3 clivada, pró-caspase-9, caspase-9 clivada, PARP, PARP clivada e GAPDH foram visualizadas por *western blott*.45

Figura 8: Avaliação de proteínas fosforiladas após o tratamento com HF (125 ng/ml) nas linhagens celulares Kasumi-1 e THP-1 por *Proteome Profiler Array*. A) Células Kasumi-1 e

B) THP-1 foram tratadas com HF (125 ng/ml) *overnight* ou seu veículo (ácido láctico). O gráfico apresenta o *fold change* das proteínas que foram maiores que 1,25 ou menores que 0,75.....47

Lista de Abreviaturas

Abl – do inglês *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*

AKT 1/2/3 S473 - do inglês *Protein kinase B phosphorylation of serine 473*

AKT 1/2/3 T308 - do inglês *Protein kinase B phosphorylation of threonine 308*

AP-1 – do inglês *Activator protein 1*

ATF - do inglês *Activating transcription factor*

Bcl-2 - do inglês *B-cell lymphoma 2*

Bcl-xL - do inglês *B-cell lymphoma-extra large*

BCR - do inglês *breakpoint cluster region*

CCNA2 - do inglês *Cyclin-A2*

CDK - do inglês *cyclin-dependent kinases*

CEBPA – do inglês *CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha*

Chk2 - do inglês *Checkpoint kinase 2*

CREB – do inglês *CREB binding protein*

Csk - do inglês *C-Src Tyrosine Kinase*

ECM – *Matrix extracelular*

EGF- *Epidermal growth factor*

EMT – *Tranição epitélio-mesenquimal*

eNOS - do inglês *Endothelial nitric oxide synthases*

FAK – do inglês *Focal adhesion kinase*

Fgr - do inglês *Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog*

FLT3 - do inglês *FMS-like tyrosine kinase-3*

FLT3-ITD – *Trosina quinase 3 relacionada a fms*

Fyn - do inglês *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn*

GSK3 α/β - do inglês *Glycogen synthase kinase 3*

Hck - do inglês *hematopoietic cell kinase*

HOXA9 - do inglês *Homeobox protein Hox-A9*

ITD – do inglês Internal tandem duplication

JNK1/2/3 - do inglês c-Jun N-terminal protein kinase

Lck - do inglês Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

Lyn - do inglês Tyrosine-protein kinase Lyn

MEF - do inglês Mouse embryo fibroblasts

MLL- do inglês Mixed lineage leukemia

MMP - do inglês Matrix-Metalloproteasen

MPT - do inglês Mitochondrial Permeability Transition

NPM1- Nucleofosfamina – Proteína nuclear B23 numatrina

p38 α - do inglês P38 mitogen-activated protein kinases α

p53 S15 - do inglês Tumor protein p53 phosphorylation of serine 15

p53 S392 - do inglês Tumor protein p53 phosphorylation of serine 392

p53 S46 - do inglês Tumor protein p53 phosphorylation of serine 46

p70 S6 kinase - do inglês Ribosomal protein S6 kinase beta-1

PARP - do inglês Poly (ADP-ribose) polymerase

PYK2 - do inglês Protein tyrosine kinase

Rac1 - do inglês Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

RSK 1/2/3 - Ribosomal s6 kinase

Runx1 - do inglês Runt-related transcription factor 1

SAPK - do inglês *Stress-activated phospho-kinases*

SMAC/Diablo - do inglês Second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI

Src - do inglês Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src

STAT3 S727 - do inglês Signal transducer and activator of transcription phosphorylation of serine 727

STAT3 Y 705 - do inglês Signal transducer and activator of transcription 3 phosphorylation of tyrosine 705

STAT5 a/b - do inglês Signal transducer and activator of transcription a/b

STAT5b - do inglês Signal transducer and activator of transcription 5B

TGF β – do inglês transforming growth factor β

TIMP - do inglês tissue inhibitors of metalloproteinases

TNF- α – do inglês Tumor necrosis factor α

TOR – do inglês **T**arget of rapamycin **O**f **R**apamycin

TRAIL - do inglês TNF-related apoptosis-inducing ligand

VEGF- do inglês Vascular endothelial growth factor

WHO – Organização Mundial da Saúde

WNK1- do inglês WNK lysine deficient protein kinase 1

β -catenina – do inglês Beta catenina

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| RESUMO | i |
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA)..... | 12 |
| 1.2 HALOFUGINONA | 16 |
| 2. OBJETIVOS | 22 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 22 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 22 |
| 3. METODOLOGIA | 23 |
| 3.1 LINHAGENS CELULARES | 23 |
| 3.2 CULTIVO E MANUTENÇÃO DE LINHAGENS CELULARES | 23 |
| Contagem de células em câmara de Neubauer | 23 |
| Descongelamento | 24 |
| Cultura celular | 24 |
| Congelamento..... | 25 |
| 3.3 PREPARO DA SOLUÇÃO DE HF..... | 25 |
| 3.4 AVALIAÇÃO DA TAXA DE MORTE CELULAR POR APOPTOSE..... | 25 |
| 3.5 CALCULO DA DOSE EFETIVA 50 (DE ₅₀)..... | 26 |
| 3.6 ANÁLISE DO CICLO CELULAR..... | 26 |
| 3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO PROTEICA | 27 |
| Extração de proteínas | 27 |
| Quantificação de proteínas..... | 27 |
| Western blot..... | 28 |
| Avaliação de proteínas fosforiladas..... | 29 |
| 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 31 |
| 4. RESULTADOS | 31 |
| 4.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM HF SOBRE A TAXA DE MORTE CELULAR POR APOPTOSE | 31 |
| 4.2 DETERMINAÇÃO DA DE50 DO TRATAMENTO COM HF EM LINHAGENS DE LMA | 42 |
| 4.3 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR | 43 |
| 4.4 AVALIAÇÃO DE ENZIMAS LIGADAS À APOPTOSE | 44 |
| 4.5 AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS FOSFORILADAS | 46 |
| 5. DISCUSSÃO | 48 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA)

A LMA compreende um grupo heterogêneo de desordens hematológicas caracterizadas pela expansão clonal de células mieloides imaturas que apresentam diferentes tipos de alterações genéticas e epigenéticas. O diagnóstico desta doença requer a identificação de $\geq 20\%$ blastos mieloides leucêmicos na medula óssea ou no sangue periférico dos pacientes, ou, $< 20\%$ de blastos mieloides em presença de anormalidades citogenéticas específicas para LMA (Rina, 2016).

Do ponto de vista epidemiológico, a LMA apresenta 2 picos de ocorrência: na primeira infância e ao final da idade adulta. Além disto, possui uma incidência de 3,7 a cada 100 mil pessoas (Deschler; Lübbert, 2006). Nos Estados Unidos a cada ano são diagnosticados 18.000 novos casos de leucemia aguda e destes, cerca de 12.000 são definidos como LMA e 10.000 morrem em virtude da doença (Juliussen et al., 2012; Jemal et al., 2007). No Brasil, dados das Estimativas de Incidência e Mortalidade do Instituto Nacional de Câncer (INCA) previram para o ano de 2016, 10.070 casos novos (5.540 em homens e 4.530 em mulheres) (INCA, 2016).

A etiologia desta doença ainda não é bem compreendida, no entanto, Strom e colaboradores (2012) realizaram um estudo caso-controle em uma população de 638 adultos no Texas e identificaram que alguns fatores de risco estão associados ao desenvolvimento da LMA *de novo*, tais como o tabagismo, a exposição ocupacional a solventes e a obesidade (Strom et al., 2012). Além disto, neste mesmo estudo, os perfis de risco diferiram entre os sexos e subtipos de LMA segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS).

A OMS classifica a LMA com base nos aspectos clínicos, morfológicos, imunofenotípicos e genéticos, os quais identificaram 7 subtipos de LMA: 1) LMA com

anormalidades genéticas recorrentes (RUNX1-RUNX1T1 t(8;21), PML-RARA t(15;17) entre outras) e com mutações gênicas (Nucleofosfina NPM1 e CEBPA); 2) LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia; 3) Neoplasia mieloide relacionada à terapia ; 4) LMA não especificada; 5) Sarcoma mieloide; 6) Proliferações mieloides relacionadas a Síndrome de Down e 7) Neoplasia plasmocitoide de célula dendrítica (Vardiman et al., 2009).

Entre as várias alterações genéticas que estão presentes na LMA a translocação t(8;21) é uma alteração que causa a fusão do gene RUNX1 presente no cromossomo 21 ao gene ETO (ou RUNX1T1) presente no cromossomo 8 codificando o fator de transcrição RUNX1/ETO quimérico. A proteína RUNX1 contém na sua porção N-terminal um domínio de ligação ao DNA homólogo a runt (DHR), o qual foi descrito ter interação com diversos fatores reguladores da transcrição. A proteína CBF β forma um heterodímero com RUNX1 promovendo uma eficiente ligação ao DNA e é essencial para a total ativação transcricional da proteína RUNX1 (Kanno et al., 1998). Outras interações proteicas demonstradas por ter interação com RUNX1 via seu DHR são os fatores de transcrição PU.1 e CEBP α , esta interação aumenta suas capacidades de ligação ao DNA.

A proteína RUNX1T1 é composta de 4 domínios do tipo *zinc finger* denominados região homóloga a nervo (NHR). Foram descritas interações de fatores de repressão da transcrição aos domínios NHR. O domínio NHR2 é importante para a interação da proteína RUNX1T1 à proteína repressora MTGR1, os fatores repressores de transcrição: receptor repressor nuclear NCOR, receptor de hormônio da tireóide SMRT e diversos membros da família das histona deacetilases HDAC foram descritos interagir com o domínio NHR4. A proteína quimérica RUNX1- RUNX1T1 é composta da porção N-terminal da proteína RUNX1 e da proteína RUNX1T1, o que confere capacidade de ligação ao DNA via RUNX1 e interação com diversos fatores repressores via RUNX1T1, o que leva à regulação negativa de promotores alvos de RUNX1 (Peterson; Zhang, 2004).

Por outro lado, estudos com modelos murinos demonstraram que a expressão da proteína quimérica RUNX1-RUNX1T1 induz auto-renovação das células, mas é insuficiente para induzir leucemia. Camundongos que expressam a molécula de fusão AML1- RUNX1T1 em células mieloides aparentemente são saudáveis e só desenvolvem LMA se expostos à substância mutagênica (Yuan et al., 2001; Reikvam et al. 2011).

A LMA com t(8;21) é encontrada em até 12% dos pacientes com LMA e em 40% dos casos de LMA com maturação, e 10 a 20% das crianças com LMA apresentam essa translocação (Lam; Zhang, 2012; Reikvam et al., 2011). O diagnóstico deste subtipo também é dado pela presença de > 20% de blastos na medula óssea e morfologicamente estas células foram descritas como blastos largos com citoplasma basofílico com numerosos grânulos azurófilos e a área perinuclear clara. Bastonetes de Auer são comuns e podem ser detectados nos blastos e em neutrófilos imaturos. As células mostram maturação de promielócitos e mielócitos e neutrófilos maduros com possíveis sinais de displasia. Precusores de eosinófilos estão sempre aumentados, basófilos e mastócitos também podem estar aumentados e as células eritróides e megacariócitos são normais (Arber et al., 2003)

Este é um subtipo de LMA considerado de bom prognóstico após quimioterapia intensiva. O estudo de Grimwade e colaboradores de 2010 com 421 pacientes com t(8;21) demonstrou que 61% dos pacientes tiveram longo tempo de sobrevida livre de doença e em comparação com pacientes que além da translocação tinham alterações citogenéticas adicionais não foi observada diferença. Outros estudos observaram taxas de sobrevida livre de doença similares (Grimwade et al., 2010; Muller-Tidow et al., 2010; Narimatsu et al., 2008).

A leucemia monocítica é outro subtipo de LMA associada alterações genéticas específicas que incluem a t(8;16) e várias outras translocações que incluem o locus MLL t(9;11), t(10;11), t(11;19) entre outras. Clinicamente a doença está associada à

hiperleucocitose, envolvimento extramedular e coagulações anormais como a coagulação intravascular disseminada. A classificação FAB caracterizou esta LMA como LMA M5 e ainda é subdividida em M5a e M5b, com base na diferenciação das células, a primeira mostra células menos diferenciadas (monoblastos) e a segunda mostra células diferenciadas (prómonócito) (Tallman et al., 2004).

A translocação t(9;11) é a mais frequente nos casos de Leucemias monocíticas. Essa translocação causa a fusão dos genes MLL presente no cromossomo 11 ao gene AF9 presente no cromossomo 9. A fusão dos genes conserva a porção amino-terminal de MLL que é necessária para a associação à cromatina. O gene AF9 possui domínios Yeats que são importantes para a ligação ao DNA e a transcrição. A proteína quimérica de fusão interage com diversos outros fatores de regulação da transcrição gênica importantes para a expressão dos genes Hox (Muntean; Hass, 2012). Foi demonstrado haver cooperação entre a proteína *wild type* (WT) MLL e a proteína de fusão MLL-AF9, ambas são recrutadas pelo fator menin ao loci dos genes Hox ,onde a proteína MLL WT catalisa a metilação das histonas no locus HOXA9 e CCNA2 promovendo a proliferação e sobrevivência das células leucêmicas que possuem a proteína quimérica MLL-AF9 (Thiel et al., 2010).

O diagnóstico da LMA monocítica também é dado pela presença de mais de 20% de blastos na medula óssea. Na LMA M5a mais de 80% dessas células são monoblastos e na LMA M5b menos de 80% são blastos apresentado diferenciação prómonocítica. Aproximadamente 40% do pacientes com este tipo de LMA apresentam também mutações no gene FLT3 do tipo ITD, essas mutações são associadas a prognóstico desfavorável (Tallman et al., 2004)..

As LMA foram subdivididas em grupos de riscos. O grupo de risco com melhor prognóstico inclui as LMA com: t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22) e t(15;17)(q22;q12). O grupo de alto risco inclui LMA com t(6;9) e t(3;3) e cariótipos complexos com presença de monossômias. Já o grupo de risco intermediário apresenta casos com

citogenética normal, ou presença de um cromossomo 8 somente e a t(9;11). Outras anormalidades moleculares estão relacionadas a alterações na classificação dos grupos de riscos, como a presença de mutação no gene Kit altera o risco das translocações t(8;21) e t(16;16) para intermediário e a presença de mutação no gene NPM1 em ausência de duplicação interna em tandem de FLT3 (FLT3-ITD) e mutação no gene CEBPA altera o risco de intermediário para o de melhor prognóstico (Estey, 2013).

Os tratamentos mais recentes da LMA englobam o uso de quimioterapia convencional com uso de citarabina e antraciclinas, bem como agentes imunoterápicos. No entanto, até o momento, não há um tratamento padrão eficiente para casos de recaída ou recorrência da doença (Ramos et al., 2015). A cura a longo tempo de pacientes com Leucemia promielocítica aguda (LPA) com o uso de ácido retinóico e trióxido arsênico representa um avanço na terapia há duas décadas na LMA (Lo-Cocco et al., 2013). Embora a pesquisa da biologia da LMA tenha levado ao desenvolvimento de novos agentes direcionados a alvos específicos como as mutações em FLT3, faltam avanços para os pacientes com outras leucemias que não a LPA. Em pacientes jovens a remissão completa pode chegar a mais de 80% mas a sobrevida em 5 anos é em torno de 40%. Em pacientes idosos o uso de agentes hipometilantes tem aumentado pouco tempo na sobrevida e não representou aumento de cura destes pacientes (Dombret; Gardin, 2016). Ainda que a remissão completa seja alcançada em cerca de 70% dos casos de LMA utilizando-se os esquemas terapêuticos convencionais, ela é frequentemente seguida por recaídas (Slovak et al., 2011; Byrd et al., 2002).

1.2 HALOFUGINONA

Halofuginona (HF) é um derivado halogenado de febrifugina, uma molécula isolada da planta *Dichroa febrifug* pertencente à família *Saxifragaceae*. A substância febrifugina se tornou conhecida por seu uso contra a malária e consiste de um heterociclo aromático de 4-

quinazolina, um anel N-piperidina e um grupo hidroxila (Jang et al., 1948; Jang et al., 1946; Koepfli et al., 1947). As propriedades anti-malária de febrifugina parecem ser a partir da cadeia lateral.

Alterações da cadeia lateral aboliram o efeito de febrifugina e os seus análogos, enquanto modificações no heterociclo aromático 4-quinazolina não afetam a sua atividade biológica (Takaya et al., 1999). A HF apresenta a mesma estrutura química da febrifugina com dois grupos halogenio adicionais: brometo e cloro ligados ao heterociclo aromático 4-quinazolina (Zhang et al., 2012; Pinion et al., 1995). Em adição às suas características anti-malária, tem sido demonstrado que a halofuginona possui propriedades antifibróticas, anti-cancerígenas, anti-inflamatórias e pró-apoptóticas. (Grudzien et al., 2010; MacGaha et al., 2002; Elkin et al., 1999; Pines et al., 1998).

A HF também tem sido descrita por seus efeitos anti-cancerígenos. Em relação ao desenvolvimento tumoral, o crescimento bem-sucedido, a proliferação e a propagação de uma célula se dão por proliferação descontrolada e a formação de um ambiente pró-angiogênico. A angiogênese refere-se à gênese de novos vasos sanguíneos e acredita-se ser crucial para a sobrevivência da massa tumoral, já que o fornecimento de oxigênio e nutrientes fica impedido devido à persistente proliferação de células tumorais. No entanto, a angiogênese não somente mantém a sobrevivência destas células, mas concomitantemente promove metástase, o que resulta na invasão de novos órgãos (Folkman et al., 2001; Folkman et al., 2000). No entanto, para que uma célula se liberte do tumor primário e migre, ela deve primeiro superar a matriz extracelular (MEC), um suporte estrutural para as células vizinhas e da membrana basal (Gurvan et al., 2010). Uma remodelação adequada da MEC depende de uma interação exata entre matriz-metaloproteinases (MMP), inibidor de tecido de metaloproteinases (TIMP) e TGF- β (Roderfeld et al., 2007). A citocina TGF- β é capaz de estimular a diferenciação de fibroblastos estromais a miofibroblastos, sendo que as MMPs quebram a MEC e TIMPs neutralizam as MMPs (Ito et al., 2004). Além disso, as MMPs podem estimular a liberação de fatores de crescimento e citocinas, tais como fator de

crescimento epidérmico (EGF), o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) ou Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) crucial para neo-vascularização (Rundhaug et al., 2005). Por outro lado, o papel de TGF- β tem sido comprovado na transição epitélio-mesenquimal (EMT). A EMT é um mecanismo através do qual as células cancerosas adquirem propriedades invasivas e, posteriormente, são capazes de metastatizar (Miettinen et al., 1994).

O efeito anticancerígeno associado à HF tem sido destacado por sua capacidade em interferir na cascata angiogênica, inibindo assim a neovascularização e a metástase. Mais especificamente, foi demonstrado *in vitro* que a HF foi capaz de inibir a expressão de MMP-2, a invasão da membrana basal, formação do tubo capilar, a germinação vascular e a deposição de ECM sub-endotelial.

Pesquisadores da Universidade de Jerusalém demonstraram que MMP-2 foi alvo da HF em um modelo de carcinoma de bexiga em ratos. Neste trabalho foi demonstrado que MMP-2 promove a degradação de colágeno tipo IV localizado na membrana basal, além disso, a MMP-2 pode ativar TGF- β . Um ensaio de invasão de matrigel, em que a linhagem celular de carcinoma murino metastático MBT2-T50 foi tratada com diferentes concentrações de halofuginona indicaram que a queda da invasão da ECM foi dose-dependente. Além disso, as experiências *in vivo* com camundongos C3H, revelaram diminuição do número de colônias pulmonares quando as células MBT2-T50 foram pré-tratados com halofuginona (Gross et al., 2003; Elkin et al., 2000).

Resultados semelhantes foram obtidos a partir de outro estudo que analisou a propagação de células de carcinoma hepatocelular metastático em ratos. Os resultados revelaram menos nódulos no fígado e metástases nos pulmões dos animais tratados com HF em comparação com animais tratados com veículo respectivamente. Além disso, os ratos tratados com HF apresentaram uma sub-regulação da MMP-9 de 89% em regiões não

neoplásicas e em 63% no tumor, enquanto que a MMP-2 foi regulada para baixo em 90% nas regiões não neoplásicas e em 61% no tumor (Taras et al., 2006).

Outro papel importante atribuído ao HF é a sua capacidade de indução de apoptose. A apoptose refere-se aos fenômenos de morte celular programada e ocorre por uma via intrínseca ou extrínseca. As enzimas executoras de apoptose são enzimas caspases, que são proteases de cisteína. As caspases estão presentes na célula na forma pró-caspase e precisam ser clivadas no resíduo ácido aspártico, a fim de serem ativadas. Uma vez que uma caspase iniciadora (caspase-2, 8, 9, 10, 11 e 12) é clivada, a sua ativação levará à clivagem da caspase seguinte na cascata de transdução de sinal (Chang et al., 2000). A via extrínseca pode ser estimulada pela interação do ligante de Fas e a proteína Fas ou pela ligação do fator de necrose tumoral indutor de apoptose (TRAIL) a um receptor de morte, enquanto que a intrínseca é iniciada pela liberação de citocromo c das mitocôndrias. A ativação de um receptor de morte ativa as caspases 8 e 10, que clivam as caspases 3 e 7 promovendo a apoptose (Ashkenazi et al., 1998; Bodmer et al., 2002). A via intrínseca é desencadeada pelo estresse intracelular, que subsequentemente resulta na ruptura da membrana mitocondrial e do potencial e permeabilidade promovida por BH3, proteína pró-apoptótica homóloga à Bcl-2. Como consequência, a liberação de citocromo c para o citosol leva ao acúmulo de proteínas adaptadoras Apaf1 e à clivagem de pró-caspase 9 e ainda das caspases 3 e 7 (Vaux et al., 2003).

Outra enzima efetora que participa da indução de apoptose é a Poli (ADP-ribose) Polimerase (PARP). Esta enzima pode realizar modificação de proteínas por adição do polímero de ADP-ribose (PAR) à proteína contendo um sítio de ligação a PAR (Burzio et al., 1979; Pleschke et al., 2000). A enzima PARP pertence a uma família de enzimas que contém 18 membros no total (Otto et al., 2005). Uma das PARP melhor descrita é PARP-1, a qual tem papel na manutenção da integridade do Ácido Desoxiribonucleico (DNA) e na sobrevivência celular (Woodhouse et al., 2008). Além disso, tem sido demonstrado que a indução suave de estresse é capaz de provocar a despolarização da membrana mitocondrial

(transição de permeabilidade de membrana; MPT), a ativação do segundo ativador derivado de mitocôndrias de caspase (SMAC/Diablo), a inibição do inibidor de apoptose IAP, ou a ativação de fator indutor de apoptose (AIF)/endonuclease G. A ativação de AIF/endonuclease G induz a fragmentação do DNA e é caspase independente, enquanto que MPT e ativação de SMAC/Diablo resultam na liberação de citocromo c e, posteriormente, o início da ativação de apoptose caspase dependente (Yu et al., 2002; Yu et al., 2006; Modjtahedi et al., 2006).

O papel indutor de apoptose da HF foi evidenciado em vários tipos de células cancerígenas através de mecanismos diferentes. Em células de mieloma, a presença de HF levou à ativação das enzimas caspase 3, 8 e 9, à redução das proteínas anti-apoptóticas Mcl-1 e X-IAP, à clivagem da PARP e diminuição do potencial de membrana mitocondrial (Leiba et al., 2012). Além disso, os estudos em células de melanoma humano demonstraram que halofuginona foi capaz de interferir na via de TGF- β por inibição da fosforilação de Smad3, uma das proteínas necessárias para transmitir sinais extracelulares para o núcleo na ligação de um ligante específico ao receptor de TGF- β (Juárez et al., 2012).

Roffe e colaboradores evidenciaram, em modelo animal de distrofia muscular, que a HF induziu a fosforilação das proteínas Akt e MAPK/ERK e assim interferiu na via do TGF- β mediada por SMAD3 (ROFFE et al., 2010). Akt quando fosforilada liga-se à SMAD3 e impede sua fosforilação (REMY et al., 2004), já MAPK/ERK uma vez ativada fosforila SMAD3 no domínio N-terminal de ligação ao DNA, interferindo na sua atividade como fator de transcrição (KRETZSCHMAR et al., 1999). Xavier e colaboradores demonstraram que a HF reduziu a fibrose induzida por radiação em camundongos através do aumento da expressão gênica de *SMAD7*, inibidor da sinalização da via do TGF β , e expressão proteica das SMADs 2 e 3 (XAVIER et al., 2004).

A HF também tem demonstrado eficácia em ensaios clínicos. A aplicação tópica da HF em paciente com doença do enxerto contra hospedeiro levou à diminuição da expressão

do gene colágeno $\alpha 1$ e do conteúdo de colágeno sem levar a reações adversas ou toxicidade (Nagler et al., 1999). O efeito antifibrótico também foi demonstrado em Sarcoma de Kaposi relacionado a AIDS (Koon et al., 2011).

A administração oral da HF em estudo clínico de fase 1 com pacientes com tumores sólidos mostrou resultados favoráveis. A dose máxima de HF tolerada foi de 3,5 mg/dia com efeitos tóxicos de náusea, vômito e fadiga, mas nenhum efeito adverso foi observado quando a dose administrada foi de 1 mg/dia (De Jonge et al., 2006).

Quanto ao efeito da HF sobre doenças hematológicas foi demonstrada a indução de apoptose nas linhagens de células de leucemia promielocítica aguda NB4 (t15;17) e NB4-R2 (ATRA resistente), promovendo a expressão de inibidores de ciclina dependente de quinase p15 e de p21 e inibindo expressão de MYC. P15^{INK4B} pode se associar com CDK4 e CDK6, assim, impedindo a ligação de ciclinas deslocando p21^{Cip1} ou p27^{KIP1} inativando os complexos CDK2-ciclina A e CDK2-ciclina, o que leva à parada do ciclo celular na fase G1 (Reynisdottir et al., 1995; Sandhu et al., 1997).

O nosso grupo demonstrou que além da inibição da proliferação celular e da indução de apoptose o tratamento das linhagens leucêmicas NB4 e NB4-R2 com HF levou ao aumento na expressão de genes alvos da via TGF- β , assim como da proteína TGF- β . Nesse estudo também detectou-se o bloqueio do ciclo celular na fase G1/S (de Figueiredo-Pontes et al., 2011). Em outro trabalho do nosso grupo mostrou-se que a halofuginona modulou a expressão de diversos fatores pró e antiangiogênicos, reduziu a secreção de VEGF e a fosforilação de Smad-2 induzida por TGF β (Assis, et al., 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar vias celulares envolvidas na citotoxicidade induzida pela halofuginona em células de leucemia mieloide aguda.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a DE_{50} da halofuginona em células de diversas linhagens de leucemia mieloide aguda;
- Baseado nos valores de DE_{50} identificar as linhagens sensíveis e resistentes à halofuginona;
- Comparar a ativação das caspases e PARP nas linhagens sensível e resistente;
- Identificar proteínas fosforiladas pelo tratamento nas linhagens sensível e resistente;

3. METODOLOGIA

3.1 LINHAGENS CELULARES

As linhagens utilizadas no presente trabalho são de células em suspensão:

- Kasumi-1
- THP-1
- MV4-11
- U-937
- OCI-AML3

3.2 CULTIVO E MANUTENÇÃO DE LINHAGENS CELULARES

Contagem de células em câmara de Neubauer

A viabilidade das células foi determinada através da diluição de 10 µL da suspensão celular em corante tripan azul ou vermelho para contagem. Para tanto, 10 µL da mistura foram aplicados em um dos quadrantes da câmara de Neubauer e em seguida todas as células foram contadas (coradas e não coradas) dos quatro quadrantes dos vértices, utilizando microscópio estereoscópico com aumento de 20x. As células coradas são não viáveis.

O cálculo para determinar a quantidade de células por ml foi realizado a partir da seguinte fórmula: n° células/ml = n° total células viáveis/ n° de quadrantes contados \times fator de diluição \times 10.000. O número 10.000 surge da seguinte dedução: 1 ml = 1 cc, logo 1 cc = 10 \times 10 \times 10 mm = 1.000 mm³ e, como na câmara de Neubauer obtemos um número de células por 0,1 mm³ é preciso multiplicar por 10, então: 10 \times 1.000 = 10.000. A viabilidade foi calculada com a seguinte fórmula:

$$viabilidade = \frac{células\ viáveis}{células\ viáveis + células\ inviáveis}.$$

Descongelamento

Para descongelar as células, previamente, foi preparado um tubo com 9 ml de meio de cultivo específico para cada linhagem. As células foram conservadas em volume final de 1 ml em tubos de 1,5 ml próprios para congelamento em nitrogênio líquido. Para descongelamento, o tubo contendo as células foi retirado, transportado em gelo seco e colocado imediatamente em banho-maria a 37°C durante aproximadamente 2 minutos até descongelamento completo. Em seguida, foi realizada assepsia do tubo com etanol 70% (ETHO 70) e colocado em ambiente estéril (cabine de fluxo laminar) onde as células foram retiradas do tubo com pipeta e despejadas no meio. Em seguida o tubo foi centrifugado a 1200 rpm por 5 min, descartado o sobrenadante e o *pellet* celular foi ressuspendido em um determinado volume de meio para manter uma densidade adequada ao cultivo em frasco ou placa. As células foram homogeneizadas e colocadas em estufa a 37°C, 5% CO₂.

Cultura celular

A cada dois ou três dias, dependendo de cada linhagem, o meio de cultivo foi retirado e colocado em tubos para separação de alíquota para contagem. Após estabelecer o número de células e a viabilidade, foram feitas novas diluições para manter em média 4×10^5 células/ml. As células Kasumi-1 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Invitrogen®, EUA) acrescido de 20% de SBF (Invitrogen®, EUA). As linhagens THP-1, MV4-11 e U937 também foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de SBF. A linhagem OCI-AML3 foi cultivada em meio ALFA-MEM (Life Technologies, E.U.A) contendo 20% de SBF. A linhagem HL-60 foi cultivada em meio IMDM (Sigma Aldrich®, E.U.A) adicionado de 20% de SBF. Todas as linhagens foram mantidas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

Congelamento

Para cada linhagem, um determinado número de células individualizadas foram ressuspendidas em 500 µL de meio de cultivo e colocadas em tubo de congelamento. A este tubo, foi adicionado mais 500 µL de DMSO 20% (Dimetilsulfóxido) em SBF, ficando o DMSO a uma concentração final de 10%. Uma vez o tubo homogeneizado este foi colocado em sistema de criopreservação *CoolCell* (Biocision) que diminui gradualmente a temperatura (1°C/min) quando conservado a - 80°C. Posteriormente, para conservação por longos períodos de tempo, as células foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C).

3.3 PREPARO DA SOLUÇÃO DE HF

Para o preparo de uma solução primária de HF na concentração de 1mg/ml, o fármaco foi diluído em solução de ácido láctico (pH 4,0-4,5) e incubado em banho-maria a 37°C por 30 minutos para facilitar a dissolução. Esta solução foi esterilizada por meio de filtro 0,22 µm e mantida a 4°C por até 30 dias. No momento do uso, esta solução foi diluída nas concentrações desejadas, nos respectivos meios de cultura estéril para cada linhagem celular, para utilização em experimentos *in vitro*, ou em solução salina (0,9% NaCl) estéril, para o tratamento dos camundongos. Todas as etapas de manipulação foram realizadas ao abrigo da luz, em decorrência da fotossensibilidade apresentada pela HF.

3.4 AVALIAÇÃO DA TAXA DE MORTE CELULAR POR APOPTOSE

A porcentagem de células em apoptose foi determinada por citometria de fluxo. Para a avaliação, o volume de 3 ml da suspensão celular na concentração de 5×10^5 células/ml foi distribuído em placas de 6 poços, e em seguida, procedeu-se ao tratamento com adição direta ao meio de cultura de 50, 100 ou 200 ng/ml de HF e veículo, para as linhagens: Kasumi-1, THP-1, U937, OCI-AML3 e HL-60. O mesmo foi feito para a linhagem MV4-11, entretanto, as doses de HF e veículo utilizadas foram de 25, 50 e 75 ng/ml. A incubação foi

realizada por 24 horas e, ao final do período, as células foram centrifugadas, a 1200 rpm por 5 minutos, e o *pellet* celular foi ressuspenso em 2 ml de tampão 1X Annexin V Binding Buffer (BD Biosciences®, EUA) e, após nova centrifugação, as células foram ressuspendidas em 100 µl do mesmo tampão e incubadas com 3 µL de Anexina V- APC (BD Biosciences®, EUA) e 5 µL de Iodeto de propídio (IP) na concentração de 50 µg/ml (Sigma-Aldrich®, EUA) por 15 minutos. Ao final da incubação, foi adicionado 200 µL de *binding buffer* 1X para a leitura do experimento. Células mantidas sob luz ultravioleta (UV) por 15 minutos e incubadas com Anexina e IP foram utilizadas como controles de apoptose. As células foram adquiridas em citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ e os dados analisados no programa FlowJo 7.6.5.

3.5 CALCULO DA DOSE EFETIVA 50 (DE₅₀)

O cálculo da DE₅₀ foi feito após os ensaios de apoptose das linhagens de LMA através do *software* Calculusyn. Para isto, o efeito foi calculado após o tratamento com HF nas doses de 50, 100 e 200 para as células das linhagens Kasumi-1 e U937. Já para as linhagens THP-1 e OCI-AML3, as doses utilizadas foram de 50, 100, 200, 500 e 1000 ng/ml e, para a linhagem MV4-11, 25, 50 e 100 ng/ml de HF.

3.6 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi determinada após marcação com IP. Cerca de 1×10^6 células das linhagens Kasumi-1 e THP-1 foram plaqueadas em 3 ml de meio RPMI suplementado com 20% e 10% de SFB respectivamente, em placas de 6 poços (Corning®). As células foram tratadas com 125ng/ml de HF e veículo, a dose correspondente à DE₅₀ da linhagem Kasumi-1, através da adição direta ao meio de cultura e incubadas *overnight* a 37°C e 5% CO₂. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e fixadas em Etanol 70% (ETOH 70%) gelado por pelo menos 1h em temperatura de -

20° C. Para a marcação das fases do ciclo celular, as células foram lavadas com PBS gelado e tratadas com 10 µg/ml de RNase (Sigma®) e coradas com 50 µg/ml de IP a 37° C durante 30 minutos. Em seguida, estas foram adquiridas em citômetro de fluxo FACSCalibur™™ (BD Biosciences®), em canal FL2. Para a determinação da porcentagem de células em cada fase do ciclo foi utilizado o programa ModFit LTTM (Verity Software House™, EUA).

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO PROTEICA

Extração de proteínas

Para extração das proteínas totais, as células Kasumi-1 e THP-1 foram lavadas com PBS gelado por 3 vezes, centrifugadas a 300 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os *pellets*, contendo as proteínas do extrato total, foram ressuspensos no tampão de extração contendo Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, Na₂EDTA 1mM, EGTA 1mM, Triton 1%, inibidores de fosfatase e proteases (Sigma®, P1860).

Foram feitos 3 ciclos de sonicação em sonicador de banho (UltraSonic Cleaner 750, Unique™, São Paulo, Brasil) a 45W por 5 minutos cada, intercalando-se a agitação em vórtex e resfriamento da amostra em banho de gelo. Não foi observado aquecimento da amostra. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20.000xg por 30 minutos a 4° C e o sobrenadante, contendo a mistura de proteínas nucleares, foi coletado e estocado em freezer -80°C.

Quantificação de proteínas

A quantificação das proteínas foi feita utilizando-se o *kit* da Bio-Rad DC (Bio-Rad, Hercules™, CA), baseado no método descrito por Bradford (1976) O ensaio foi realizado em microplacas com volume total de 220 µl por poço, com faixa de linearidade 0,5 a 2,0 µg de

proteínas. Foram utilizados 20 µl de amostra diluída em água Milli Q e 200 µl do reagente de Bradford. O volume total utilizado em cada poço da microplaca foi mantido constante (220 µl). Após 15 minutos de incubação, as absorbâncias foram lidas a 595 nm em leitor de Elisa (Versamarx Tunable Microplate Reader™, Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, Estados Unidos). Uma curva padrão com 5 pontos em triplicata correspondentes a quantidades conhecidas de BSA (0,0 a 2,0 µg) foi feita a cada ensaio realizado. A concentração das amostras foi determinada usando diferentes diluições em triplicata (1:50, 1:100, 1:200, v/v) para cada amostra. Os desvios padrões dos resultados obtidos nas triplicatas foram menores que 10%.

Western blot

Os extratos totais de proteínas separadas no gel SDS-PAGE foram eletrotransferidos para a membrana de PVDF (Hybond-P®, GE). A transferência foi realizada em tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% por 1 hora e 30 minutos ou 2 horas dependendo da concentração de acrilamida do gel a 100 V, 300 mA a 4° C. Para bloquear sítios não específicos, as membranas foram incubadas em tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1%, pH 7,6 (TBS-T) com 5% (m/v) de leite desnatado em pó por 1 hora. Depois as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos com TBS-T. Feito isso, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários na diluição adequada *overnight* a 4° C sob agitação (Tabela 1). Depois, foram novamente lavadas 4 vezes por 10 minutos com TBS-T. Em seguida, as membranas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (#7074) conjugado à peroxidase (Cell Signaling) na diluição 1:2000. A detecção foi feita através do kit ECL Prime western blotting Detection Reagents (GE HealthCare®), utilizado para a detecção baseada em sinal de quimioluminescência realizado com uma câmera CCD Chemilux (ImageQuant™, LAS 4000 mini, GE Healthcare, Suíça).

Tabela 1: Lista de anticorpos primários utilizados no estudo

| Anticorpo | Fonte | P/M(*) | Código | Peso(kDa) | Fabricante | Diluição |
|--------------------------------------|--------|--------|--------|---------------|----------------|----------|
| VIA DAS CASPASE | | | | | | |
| Caspase-3 | Coelho | P | #9662 | 17, 19, 35 | Cell Signaling | 1:1000 |
| Caspase-9 | Coelho | P | #9502 | 35, 37, 47 | Cell Signaling | 1:1000 |
| PARP | Coelho | P | #9542 | 89, 116 | Cell Signaling | 1:1000 |
| VIA DO TGF-β | | | | | | |
| SMAD3 | Coelho | P | #9513 | 52, 60 | Cell Signaling | 1:1000 |
| TGF- β Receptor II | Coelho | P | #3713 | 70-80 | Cell Signaling | 1:1000 |
| TGF- β | Coelho | P | #3711 | 12, 25, 45-65 | Cell Signaling | 1:1000 |
| CONTROLE | | | | | | |
| GAPDH | Coelho | M | #2118 | 37 | Cell signaling | 1:2000 |

(*) P.: Policlonal; M.: Monoclonal

Avaliação de proteínas fosforiladas

A análise de proteínas fosforiladas foi realizada utilizando o kit Proteome Profiler™ Array – HumanPhospho-Kinase Array Kit (Cat. nº ARY003B-R&D Systems). Foram analisados quatro grupos experimentais: controle somente com o veículo (Kasumi-1 e THP-1) (ácido e láctico) e tratados com HF (125 ng/mL), por 12 horas. O kit é composto por quatro conjuntos de duas membranas que contém 45 anticorpos contra diversas fosfo-proteínas em duplicatas, além de três duplicatas referências e duas de controle negativo. Os lisados proteicos foram quantificados, e cada conjunto de duas membranas foi adicionado o equivalente a 350 μ g totais de proteínas.

Após tratadas as células foram centrifugadas à 1200 rpm por 5 minutos e lavadas em PBS 1x por duas vezes, em seguida ao *pellet* celular foi adicionado o tampão de lise 6 do kit e as

amostras foram estocadas a -80°C até o momento do uso. O *pellet* de células foi solubilizado no tampão de lise, homogeneizado gentilmente e mantido a 4°C por 30 minutos, em seguida as amostras foram centrifugadas a $14.000 \times g$ por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. A quantificação da concentração de proteínas foi feita pelo método de Bradford descrito anteriormente e a cada conjunto de duas membranas foi adicionado o volume equivalente a $350 \mu\text{g}$ totais de proteína. Para a identificação de proteínas fosforiladas seguindo as recomendações do kit, inicialmente 1ml do tampão de bloqueio Array Buffer 1 foi adicionado a cada poço da placa de 8 poços e as partes A e B da membrana foram colocadas sobre a placa e incubadas por 1 hora sob agitação. As amostras foram então diluídas em tampão *Array Buffer* 1 resultando em volume final de 2ml . Após a incubação o tampão de bloqueio foi retirado da placa por aspiração e 1ml das amostras foram adicionados à placa e incubadas *overnight* sob agitação. As membranas foram retiradas com cuidado e colocadas em placa contendo 20ml do *1X Wash Buffer* e lavadas por 10 minutos sob agitação por 3 vezes. A placa de 8 poços foi lavada com água deionizada e seca. Para cada parte A da membrana foi adicionado 1ml do coquetel de detecção *Detection Antibody Cocktail A* diluído no tampão *1X Array Buffer* por poço e as partes A foram recolocadas sobre a placa de 8 poços. Para as partes B foi adicionado 1ml do coquetel de detecção *Detection Antibody Cocktail B* diluído no tampão *1X Array Buffer* por poço e as partes B foram recolocadas sobre a placa. Em seguida as membranas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente e lavadas novamente sendo as partes A e B lavadas separadamente. A placa de 8 poços foi lavada 1 vez com água deionizada e seca e as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos sob agitação.

Logo após, 1ml de Streptavidina-HRP diluída em tampão *1X Array Buffer* foi adicionada em cada poço da placa e as membranas foram recolocadas sobre a placa, cobertas e incubadas à temperatura ambiente sob agitação. Após as membranas foram retiradas e novamente lavadas, assim como a placa de 8 poços, posteriormente 1ml do *Chemi Reagent Mix* foi pipetado uniformemente sobre o conjunto de membranas e estas foram cobertas com

plástico protetor e incubadas por 1 minuto. Logo em seguida as membranas foram levadas para a leitura e esta foi baseada em sinal de quimiluminescência realizada com uma câmara CCD Chemilux (ImageQuant™, LAS 4000 mini, GE Healthcare). A quantificação foi feita por densitometria por meio do software UM Scan IT Gel 6.1 e os valores obtidos foram normalizados pelas marcações de referência da respectiva membrana.

Após avaliarmos a expressão de diversas fosfo-proteínas optamos por apresentar aquelas que tiveram um *fold change* maior que 1,25 ou menor que 0,75.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa GraphPad InStat (GraphPad, EUA) considerando nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As análises de apoptose e ciclo celular entre os diferentes grupos de tratamento foram realizadas por meio de teste *t* de Student ou Mann-Whitney (dependendo da distribuição dos dados, na comparação de 2 grupos).

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM HF SOBRE A TAXA DE MORTE CELULAR POR APOPTOSE

O efeito do tratamento com HF sobre a taxa de morte celular foi avaliado pela marcação com Anexina-v e Iodeto de Propídio. Após 24 horas de tratamento das células Kasumi-1, MV4-11, U937, OCI-AML3 e THP-1 com diferentes doses de HF e de AL foi verificado aumento do número de células em apoptose, de forma dose-dependente nas linhagens Kasumi-1, U937 e MV4-11. A análise estatística foi feita pelo Teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn.

Para a linhagem Kasumi-1 (**Fig. 1 A e B**), observou-se que na concentração de 50 ng/ml a HF induziu apoptose em 40,9% das células, enquanto AL induziu 19,93% de células

em apoptose. Para a dose de 100 ng/ml, HF levou à apoptose 59,2% e o controle 19,7% das células. Na concentração de 200 ng/ml, a apoptose foi induzida em 81,9% das células pela HF e em 21,42% pelo AL., O tratamento com HF resultou em taxa de apoptose significativamente maior do que aquelas detectadas no controle ($p=0,0003$). O pós-teste de Dunn somente apontou diferença significativa na comparação entre a amostra tratada com a maior concentração de HF comparada ao controle (200 ng/ml) (**Fig. 1B**). Nesta amostra, a indução de apoptose pela HF foi 3,9 vezes maior em relação ao controle.

A linhagem MV4-11 (**Fig. 1 A e B**) mostrou-se sensível ao tratamento com HF nas concentrações de 25, 50 e 100 ng/ml (**Fig. 2A**). Para a concentração de 25 ng/ml, a HF induziu a apoptose em 28,3% das células e o veículo em 17,33%. A concentração de 50 ng/ml levou 68,6% das células tratadas com HF à apoptose e 19,55% com AL., Já a concentração de 200 ng/ml induziu apoptose em 89,88% das células tratadas e em 22,29% das células tratadas com AL., O tratamento com HF resultou em taxa de apoptose significativamente maior do que aquelas detectadas no controle ($p=0,002$). Como mostrado na figura 2B, houve diferença significativa pelo Teste de Dunn para a dose de 100 ng/ml de HF na comparação entre a concentração de 100ng/ml e veículo e entre a concentração de 100 ng/ml em relação a concentração de 25 ng/ml de HF. A taxa de apoptose induzida pela maior dose de HF (100 ng/ml) foi 3,6 vezes maior em relação ao controle e 2,3 vezes superior em relação à concentração de 25 ng/ml de HF.

Para a linhagem U937 (**Fig. 3 A e B**), a apoptose induzida pela concentração de 50 ng/ml de HF foi de 36,1% e de 28,47% pelo veículo. Para a concentração de 100 ng/ml, a taxa de apoptose induzida por HF foi de 65,6% e de 31,82% pelo veículo. A concentração de 200 ng/ml levou à apoptose 89,88% das células tratadas por HF e 29,9% das células tratadas com veículo, como mostrado na figura 3A. O tratamento com HF resultou em taxa de apoptose significativamente maior do que aquelas detectadas no controle ($p < 0.0001$). O pós-teste de Dunn revelou diferença significativa na comparação entre as concentrações de 100 ng/ml e veículo e entre 200 ng/ml e veículo, sendo as taxas de apoptose 3,4 e 2,4 vezes

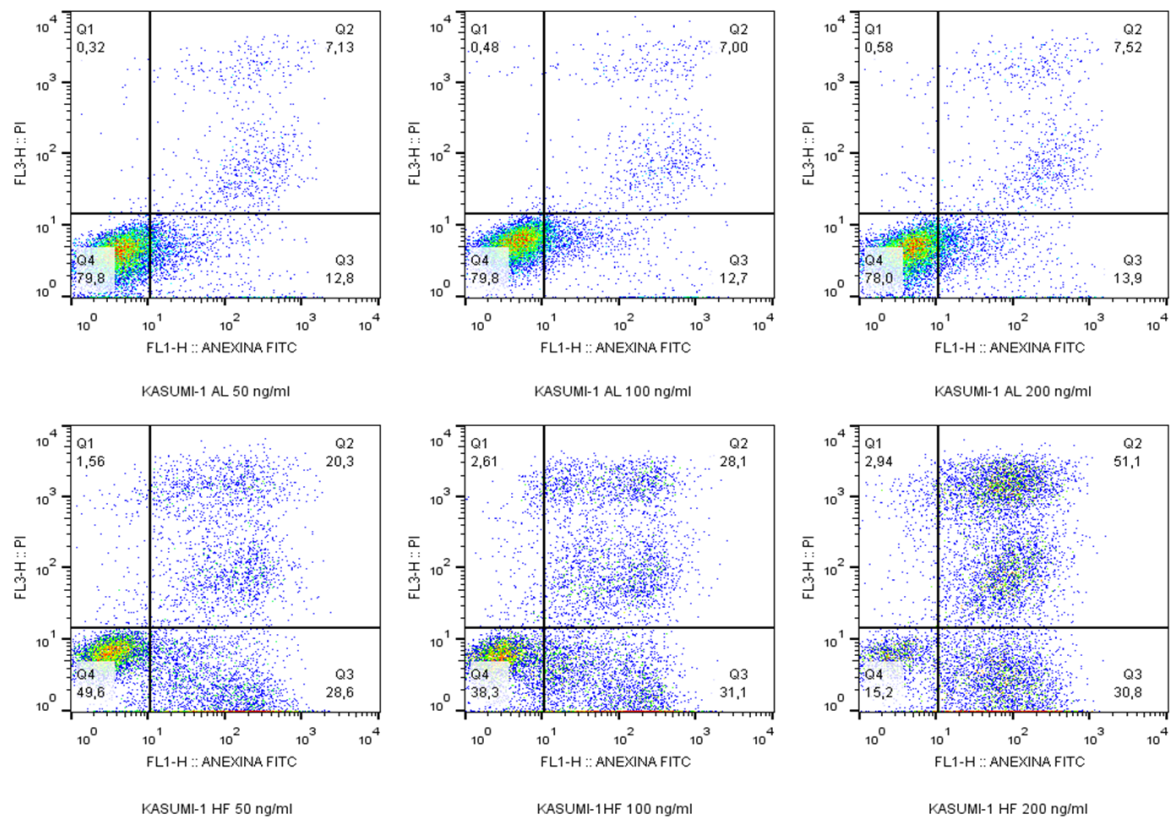
superior nas amostras tratadas com HF em relação aos controles, respectivamente (**Fig. 2B**).

Para a linhagem OCI-AML3 (**Fig. 4 A e B**) foram administradas as doses de 50, 100, 200, 500 e 1000 ng/ml de HF e do controle (**Fig. 4A**). O tratamento na concentração de 50 ng/ml resultou em taxa de apoptose de 45,6% das células, enquanto nas amostras tratadas por veículo a taxa de apoptose foi de 28,95%. A concentração de 100 ng/ml de HF levou a apoptose de 47,6% das células, enquanto que a taxa de apoptose para amostra tratada com veículo foi de 31,28%. O tratamento na concentração de 200 ng/ml induziu a apoptose em 52,5% das células, enquanto que para a amostra tratada com veículo esta taxa foi de 28,83%. O tratamento com as concentrações de 500 ng/ml e de 1000 ng/ml resultaram em taxas de apoptose iguais a 94,87% e 99,29%, respectivamente. Nas amostras controle tratadas com veículo estas taxas foram de 33,86% e 30,46%, respectivamente. O tratamento com HF resultou em taxa de apoptose significativamente maior do que aquelas detectadas no controle ($p= 0,0024$). Houve diferença significativa pelo Teste de Dunn somente para a comparação entre as taxas de apoptose detectadas nas amostras tratadas na concentração de 1000 ng/ml de HF em comparação ao controle.

No tratamento da linhagem THP-1 foram utilizadas as mesmas doses descritas para a linhagem OCI-AML3 (**Fig. 5 A e B**), A figura 5A mostra as taxas de apoptose nas diferentes concentrações utilizadas. A taxa de apoptose na amostra tratada com HF na concentração de 50 ng/ml foi igual a 30,84%, enquanto na amostra controle foi de 17,89%. O tratamento na concentração de 100 ng/ml levou à apoptose de 38,14% pela HF e em 17,4% por AL. O tratamento nas concentrações de 200 ng/ml, 500 ng/ml e 1000 ng/ml resultaram em taxas de apoptose iguais a: 41,07%, 58,33% e 67,56%, respectivamente. As taxas de apoptose observadas nas amostras controles variaram de 17,14% a 18,34. O tratamento com HF resultou em taxa de apoptose significativamente maior do que aquelas detectadas no controle ($p= 0,0003$). Como mostrado na figura 5B, ocorreu diferença significativa entre as taxas de apoptose detectadas nas amostras tratadas com HF na

concentração de 1000ng/ml e de 500 ng/ml. A dose de 1000 ng/ml foi significativa em relação ao controle e em relação às doses de 100 e 50 ng/ml. A indução de apoptose foi 2,4; 1,8 e 2 vezes, respectivamente, superior. A dose de 500 ng/ml também induziu apoptose numa taxa 2,1 vezes superior àquela induzida no controle.

A



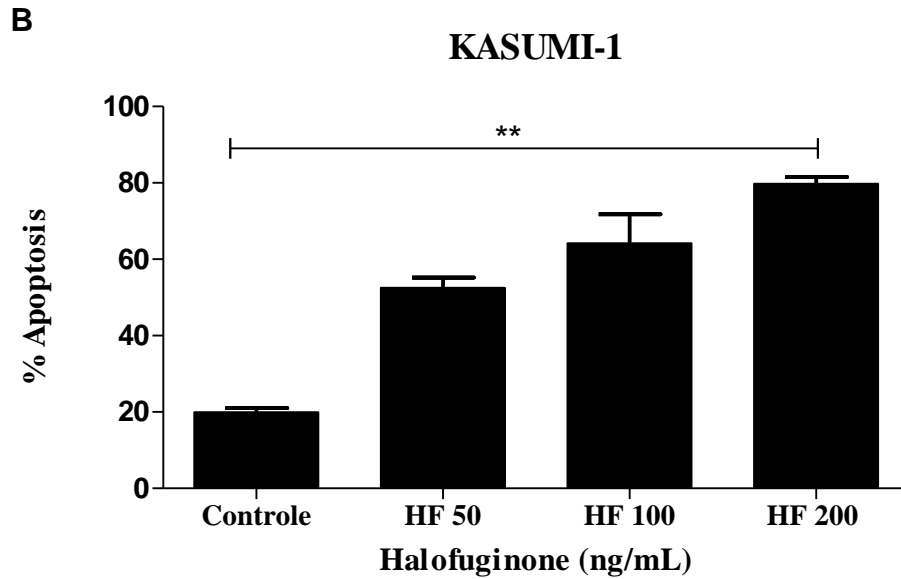


Figura 1: Ensaio de avaliação da apoptose induzida por HF em células Kasumi-1. Células apoptóticas foram identificadas pela marcação com Anexina V e IP (Anexina V positivas e IP negativas). **A)** Gráficos do tipo *dot plot* de um experimento representativo dos experimentos de apoptose de células Kasumi-1 tratadas por 24 horas com Halofuginona (HF) ou Ácido Lático (AL). Linha superior células tratadas com AL nas doses de 50, 100 e 200 ng/mL; Linha inferior células tratadas com HF nas doses de 50, 100 e 200 ng/mL indicadas abaixo do eixo x dos gráficos. **B)** Gráfico de barras mostrando a média das porcentagens de células em apoptose tratadas com HF nas concentrações de 50, 100 e 200 ng/ml. O valor de p foi igual a 0,0027 calculado no teste de Kruskal-Wallis. As barras horizontais representam diferenças significativas nas comparações entre pares de grupos. Controle (AL= 200ng/ml). *** $p < 0,0001$; ** p 0,0001 a 0,01; * p 0,01 a 0,05 e $p > 0,05$ = não significativo.

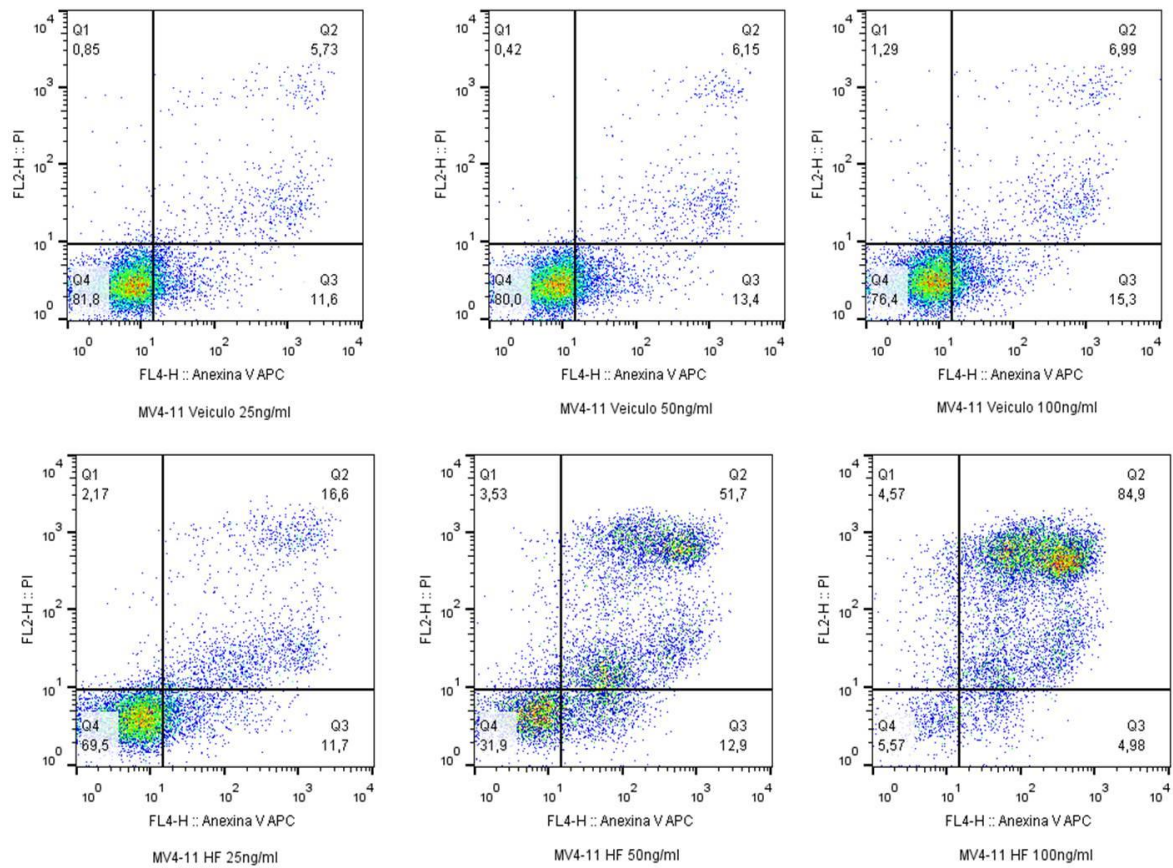
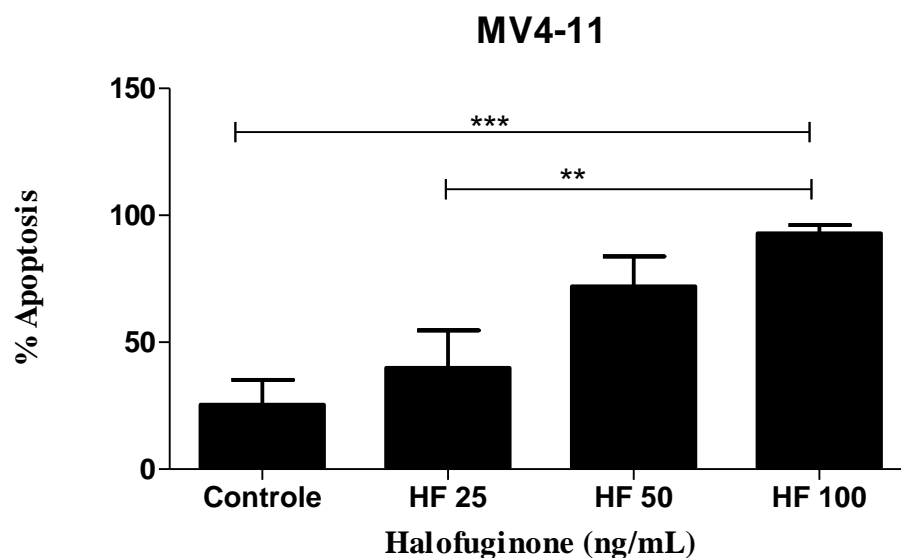
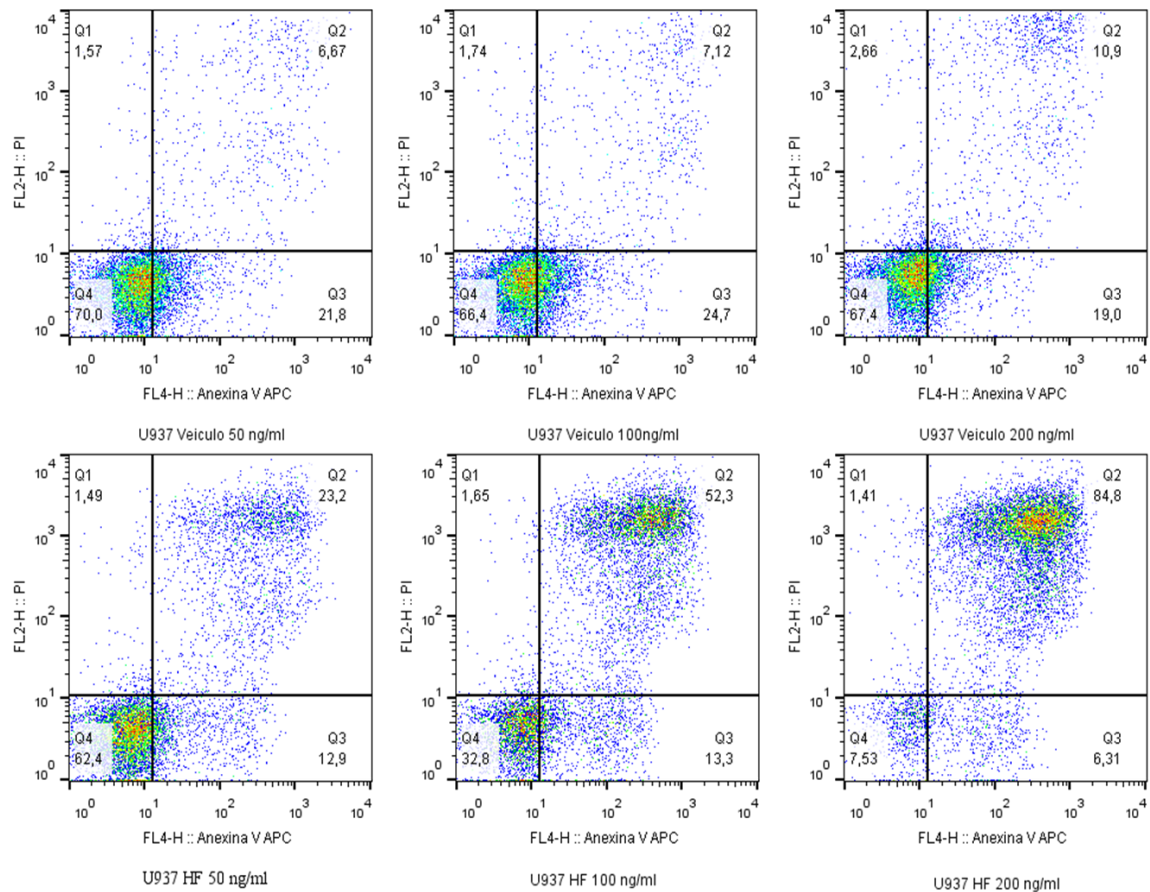
A**B**

Figura 2: Ensaio de avaliação da apoptose induzida por HF nas células MV4-11. Células apoptóticas foram identificadas pela marcação com Anexina V e PI (Anexina V positivas e PI negativas). **A)** Gráficos do tipo *dot plot* de um experimento representativo de experimentos de apoptose com células MV4-11 tratadas por 24 horas com Halofuginona (HF) ou Ácido Láctico (AL). Linha superior células tratadas com AL nas doses de 50, 100 e 200 ng/mL; Linha inferior células tratadas com HF nas doses de 50, 100 e 200 ng/mL indicadas abaixo do eixo x dos gráficos. **B)** Gráfico de barras mostrando a

média das porcentagens de apoptose de células MV4-11 tratadas com 25, 50 e 100 ng/ml de HF. O valor de p foi igual a 0,0002 calculado no teste de Kruskal-Wallis. As barras horizontais representam diferenças significativas nas comparações entre pares de grupos. Controle (AL: 100ng/ml). *** $p < 0,0001$; ** $p 0,0001$ a $0,01$; * $p 0,01$ a $0,05$ e $p > 0,05$ = não significativo.

A



B

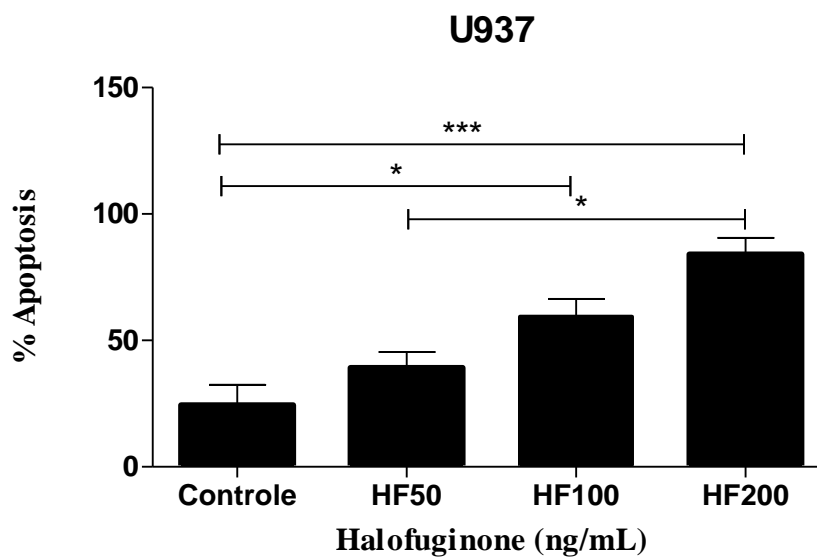
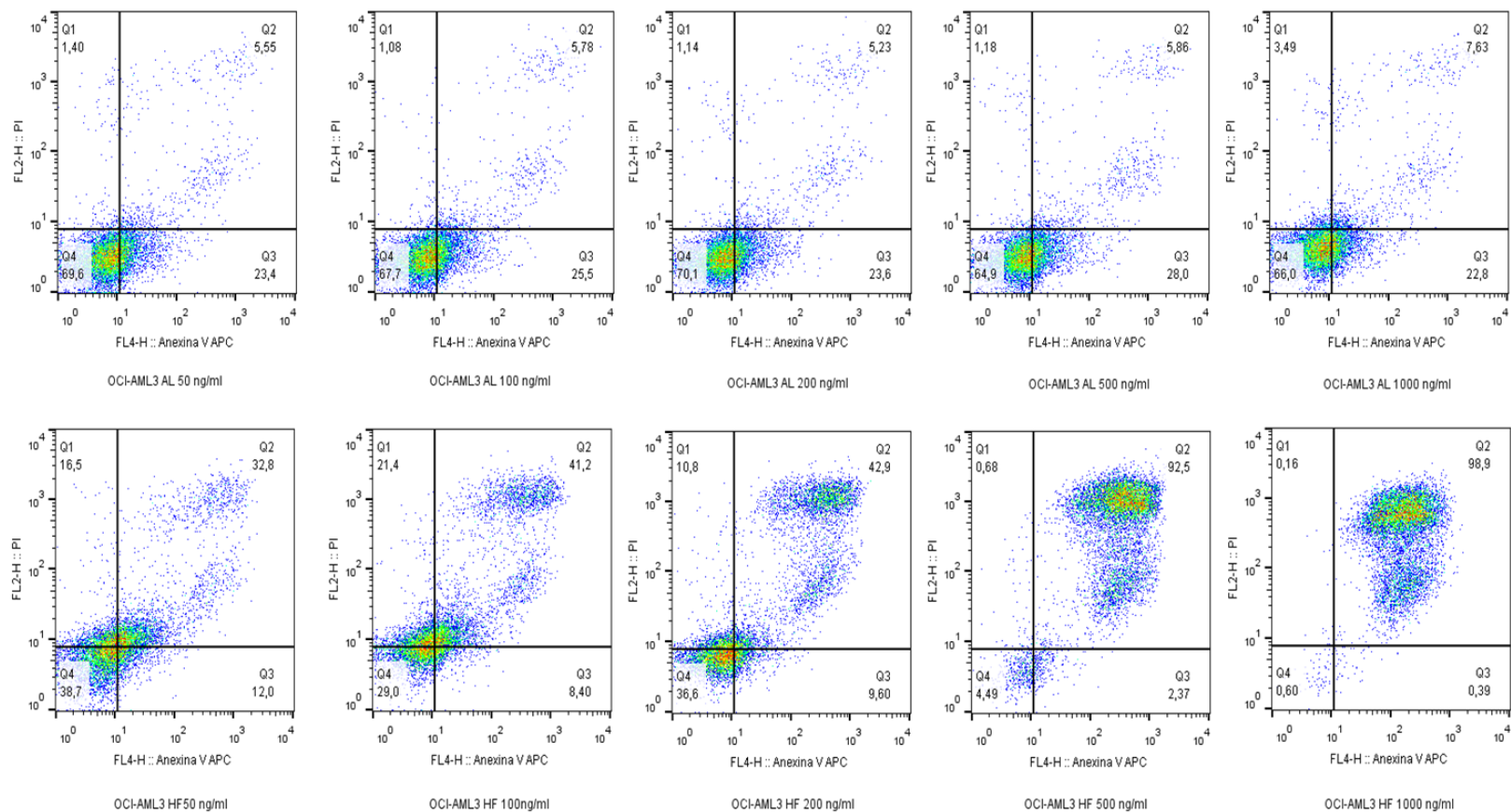


Figura 3: Ensaio de avaliação da apoptose induzida por HF nas células U937. Células apoptóticas foram identificadas pela marcação com Anexina V e PI (Anexina V positivas e PI negativas). **A)** Gráficos do tipo *dot plot* de um experimento representativo dos experimentos de apoptose com células U937 tratadas por 24 horas com HF ou AL. Linha superior células tratadas com AL nas doses de 50, 100 e 200 ng/mL; Linha inferior células tratadas com HF nas doses de 50, 100 e 200 ng/mL indicadas abaixo do eixo x dos gráficos. **B)** Gráfico de barras mostrando a média das porcentagens de apoptose (Anexina-V positivos e PI negativos) de células U937 tratadas com 50, 100 e 200 ng/ml de HF. O valor de p foi menor que 0,0001 calculado no teste de Kruskal-Wallis. As barras horizontais representam diferenças significativas nas comparações entre pares de grupos. Controle (AL: 200ng/ml). *** $p < 0,0001$; ** p 0,0001 a 0,01; * p 0,01 a 0,05 e $p > 0,05$ = não significativo.

A



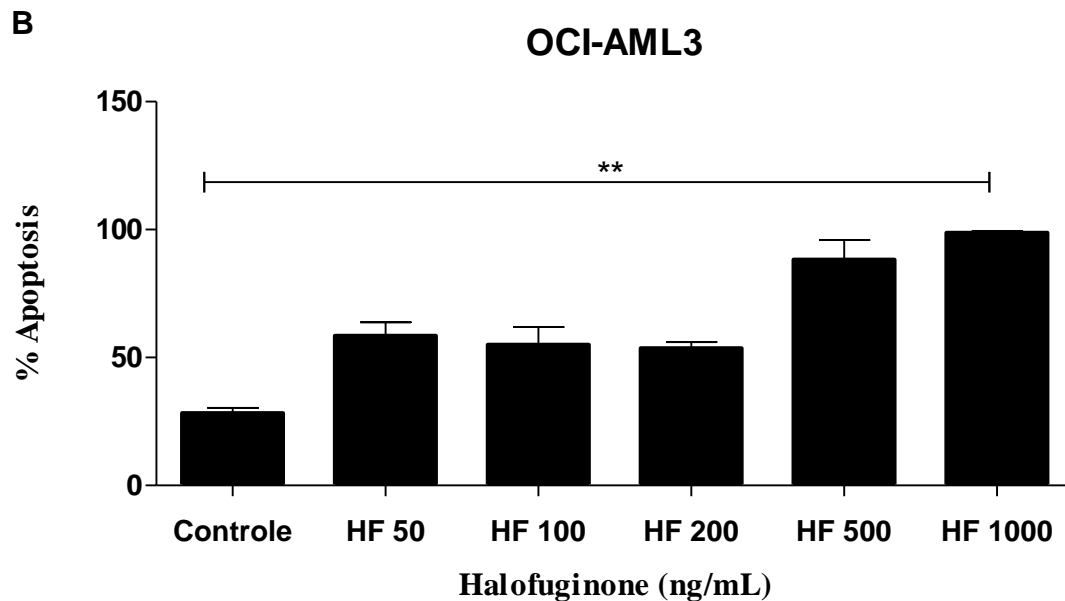
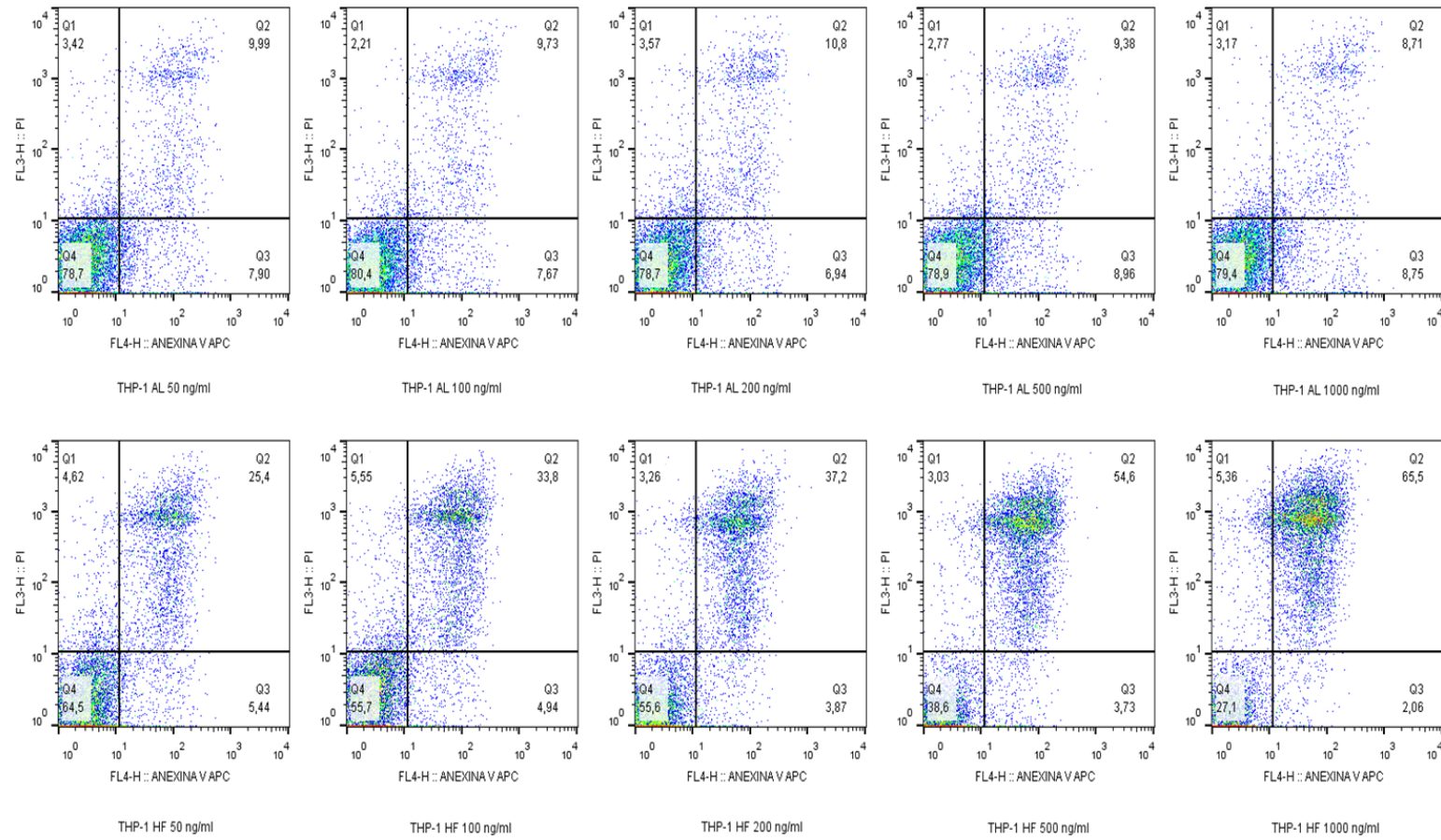


Figura 4: Ensaio de avaliação da apoptose induzida por HF em células OCI-AML3. Células apoptóticas foram identificadas pela marcação com Anexina V e PI (Anexina V positivas e PI negativas). **A)** Gráficos do tipo *dot plot* representativos dos experimentos de apoptose com células OCI-AML 3 tratadas por 24 horas com HF ou AL). Linha superior células tratadas com AL nas doses de 50, 100, 200, 500 e 1000 ng/mL; Linha inferior células tratadas com HF nas doses de 50, 100, 200, 500 e 1000 ng/mL indicadas abaixo do eixo x dos gráficos. **B)** Gráfico de barras evidenciando a média das porcentagens de apoptose (Anexina-V positivos) de células OCI-AML3 tratadas com 50, 100, 200, 500 e 1000 ng/ml de HF. O valor de p foi 0,0024 calculado no teste de Kruskal-Wallis. As barras horizontais representam diferenças significativas nas comparações entre pares de grupos. Controle (AL: 1000ng/ml). *** $p < 0,0001$; ** p 0,0001 a 0,01; * p 0,01 a 0,05 e $p > 0,05$ = não significativo.



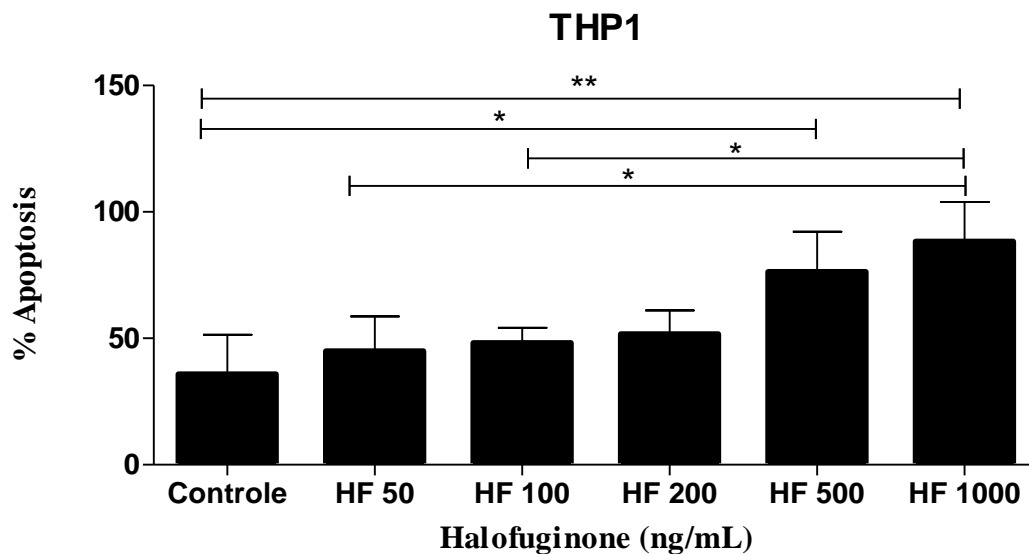


Figura 5: Ensaio de avaliação da apoptose induzida por HF nas células THP-1. Células apoptóticas foram identificadas pela marcação com Anexina V e PI (Anexina V positivas e PI negativas). **A)** Gráficos do tipo *dot plot* representativos dos experimentos de apoptose com células THP-1 tratadas por 24 horas com HF ou AL. Linha superior células tratadas com AL nas doses de 50, 100, 200, 500 e 1000 ng/mL; Linha inferior células tratadas com HF nas doses de 50, 100, 200, 500 e 1000 ng/mL indicadas abaixo do eixo x dos gráficos. **B)** Gráfico de barras mostrando a média da porcentagem de apoptose de células THP-1 tratadas com 50, 100, 200, 500 e 1000 ng/ml de HF. O valor de p foi 0,003 calculado no teste de Kruskal-Wallis. As barras horizontais representam diferenças significativas nas comparações entre pares de grupos. Controle (AL: 1000ng/ml). *** $p < 0,0001$; ** p 0,0001 a 0,01; * p 0,01 a 0,05 e $p > 0,05$ = não significativo.

4.2 DETERMINAÇÃO DA DE₅₀ DO TRATAMENTO COM HF EM LINHAGENS DE LMA

Após os ensaios de apoptose, a DE₅₀ foi calculada utilizando o programa Calcsyn, que se baseia nos métodos descritos por T. C. Chou e P. Talalaly (1983). A tabela 3 mostra os valores de DE₅₀ e do R² médio para as cinco linhagens estudadas. Para os estudos que objetivaram a comparação entre uma linhagem resistente e uma linhagem sensível à HF, optamos pelo uso das células Kasumi-1 (sensíveis) e THP-1 (resistentes).

Tabela 2: Dose efetiva 50 para as linhagens de LMA

| LINHAGEM | DE ₅₀ (ng/ml) | R ² médio |
|----------|--------------------------|----------------------|
| MV4-11 | 63,79 | 0,97 |
| Kasumi-1 | 125,58 | 0,97 |
| U937 | 155,87 | 0,98 |
| OCI-AML3 | 542,32 | 0,9 |
| THP-1 | 786,15 | 0,9 |

4.3 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

Considerando que o valor da DE₅₀ para células Kasumi-1 foi de aproximadamente 125 ng/ml, avaliamos o efeito do tratamento com HF sobre a distribuição das células nas fases do ciclo celular após 6 horas de incubação. O tratamento das células Kasumi-1 com HF na concentração de 125 ng/ml (**Fig. 6A**) resultou na diminuição da percentagem de células na fase S, em que $p = 0,004$; as demais fases quando comparadas ao controle (AL) não tiveram diferença significativa pelo teste de Mann Whitney. O tratamento das células THP-1 com HF na dose de 125 ng/ml (**Fig. 6B**) não resultou em efeito significativo para nenhuma das fases analisadas em que os valores de p obtidos no teste t pareado para as fases G0/G1 foi de 0,694; S de 0,94 e G2/M de 0,666.

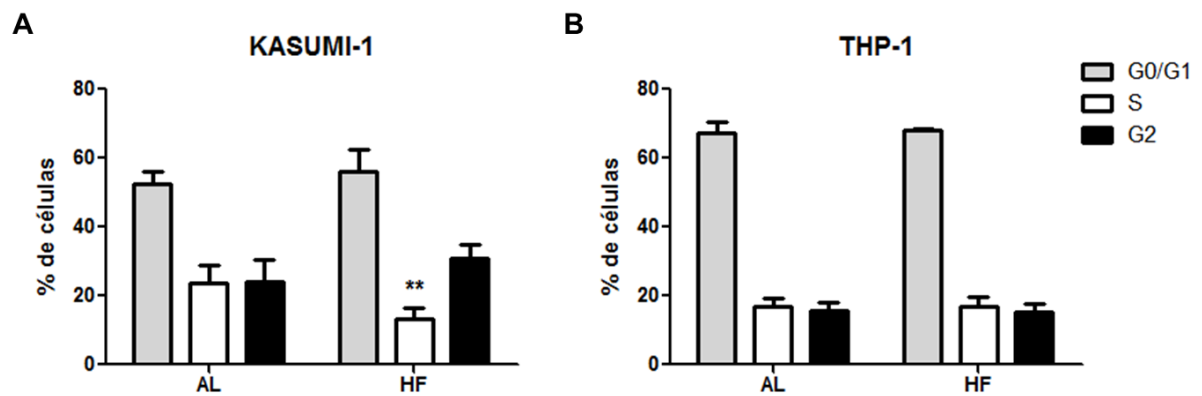


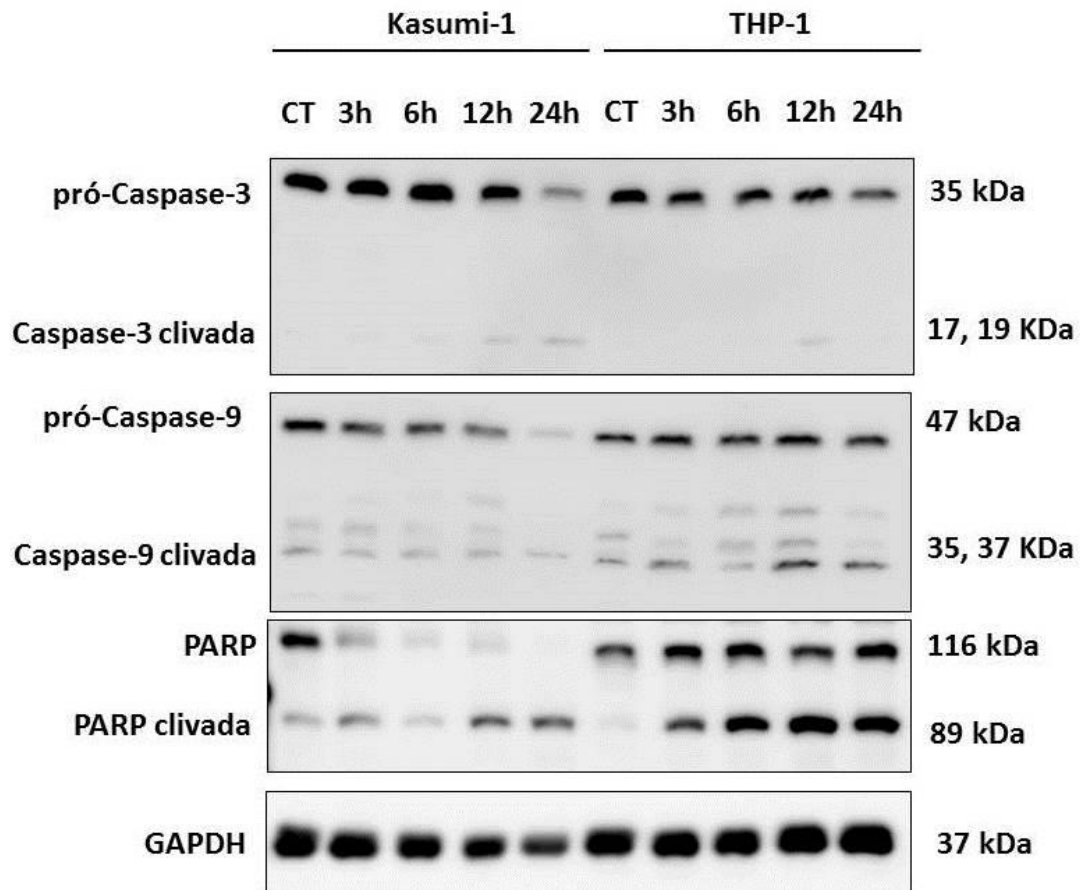
Figura 6: Efeito do tratamento com halofuginona sobre o ciclo celular nas linhagens Kasumi-1 e THP-1. **A)** Gráfico mostrando a média das percentagens de células Kasumi-1 nas fases G0/G1 (coluna cinza) S (coluna branca) G2/M (coluna preta) do ciclo celular após tratamento com HF ou AL na concentração de 125 ng/ml por 6 horas. Os valores de *p* obtidos no teste de *Mann-Whitney* para as fases G0/G1 foi de 0,39; S de 0,004 e G2/M de 0,064. **B)** Gráfico mostrando a média das percentagens de células THP-1 nas fases G0/G1 (coluna cinza), S (coluna branca), G2/M (coluna preta) do ciclo celular após tratamento com HF ou AL na concentração de 125 ng/ml. Os valores de *p* obtidos no teste t pareado para as fases G0/G1 foi de 0,694; S de 0,94 e G2/M de 0,666. As barras horizontais indicam os desvios padrões das médias.

4.4 AVALIAÇÃO DE ENZIMAS LIGADAS À APOPTOSE

A figura 7 mostra um resultado representativo da análise por *Western Blot* de extratos proteicos das linhagens Kasumi-1 e THP-1 tratadas com HF ou veículo. Nas células Kasumi-1, as bandas correspondentes à pró-caspase-3 (35 kDa) diminuíram de intensidade após 6 horas de tratamento com HF. As bandas correspondentes à caspase-3 clivada (ativada) (19 e 17 kDa) foram detectadas nos períodos de 12 e 24 horas. A banda correspondente à pró-caspase-9 (47 kDa) apresentou uma redução na intensidade após de 3 horas de tratamento. Observamos também uma redução da enzima nuclear PARP (KD) com aumento de intensidade das bandas correspondentes à forma clivada a partir de 3 horas de incubação com HF.

Para a linhagem THP-1, as bandas correspondentes à pró-caspase-3 apresentaram redução na intensidade apenas nas amostras tratadas com HF por 24 horas. As bandas correspondentes a caspase-3 clivada foram observadas somente com 12 horas de

tratamento. A incubação com HF não alterou os níveis de pró-caspase-9. Há um discreto aumento nas formas clivadas após 12 horas de incubação. A clivagem da enzima nuclear PARP foi observada a partir de 3-6 horas. A proteína GAPDH (37 kDa) foi utilizada como



controle interno, sendo que a banda foi mais intensa nas células Kasumi-1 controle e nas amostras tratadas por 3 e 6 horas em relação as amostras tratadas por 12 e 24 horas. Nas células THP-1 a banda de GAPDH foi mais intensa nas amostras tratadas por 12 e 24 horas (Figura 7).

Figura 7: Detecção por Western Blot de caspase-3, caspase-9 e PARP após o tratamento com HF (125 ng/ml) nas linhagens celulares Kasumi-1 e THP-1 por *western blot*. Células Kasumi-1 e THP-1 foram visualizadas por *western blot* as proteínas caspase-3, caspase-3 clivada, pró-caspase-9, caspase-9 clivada, PARP, PARP clivada e GAPDH.

4.5 AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS FOSFORILADAS

A figura 8 A e B mostra o resultado qualitativo da expressão de proteínas fosforiladas nas linhagens Kasumi-1 e THP-1.

Em células Kasumi-1 as proteínas que estavam reduzidas foram: p38 α , Lck, RSK 1/2/3, eNOS, STAT3 Y 705, Chk2, PYK2, AKT 1/2/3 T308, p70 S6 kinase, STAT5b, STAT5 a/b e STAT3 S727. As proteínas que estavam aumentadas foram: JNK1/2/3, GSK3 α/β , CREB, c-Jun, Src, WNK1, AKT 1/2/3 S473, Fyn, Fgr e FAK.

Já em células THP-1 as proteínas que estavam reduzidas foram: p38 α , c-Jun, Src, RSK 1/2/3, eNOS, STAT3 Y705, PYK2, p53 S46, p53 S392, TOR e p53 S15. As proteínas que estavam aumentadas foram: JNK1/2/3, GSK3 α/β , CREB, Lck, Chk2, WNK1, β -catenina e Lyn.

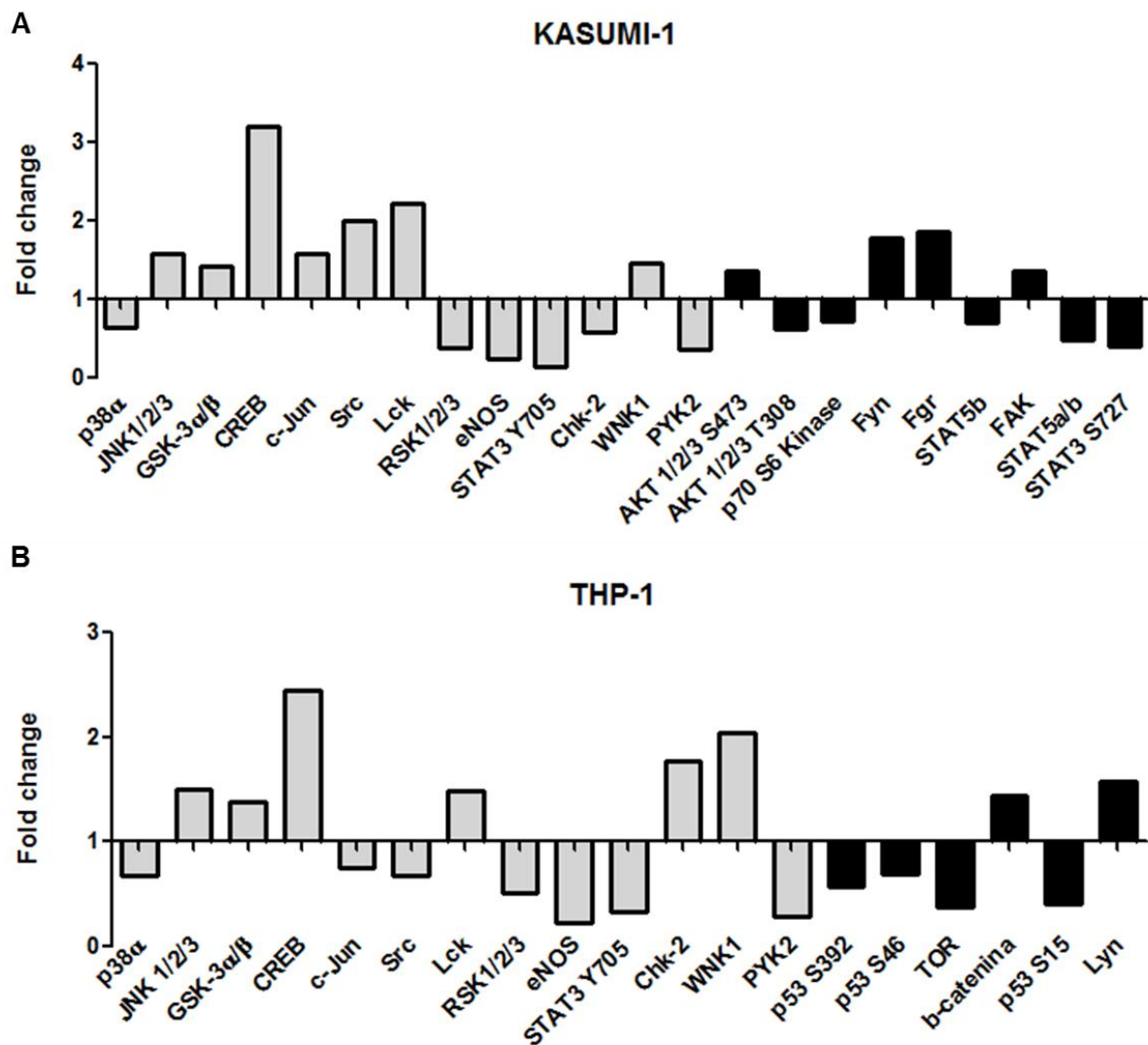


Figura 8: Avaliação de proteínas fosforiladas após o tratamento com HF (125 ng/ml) nas linhagens celulares Kasumi-1 e THP-1 por *Proteome Profiler Array*. A) Células Kasumi-1 e B) THP-1 foram tratadas com HF (125 ng/ml) *overnight* ou seu veículo (ácido láctico). O gráfico apresenta o *fold change* das proteínas que foram maiores que 1,25 ou menores que 0,75.

5. DISCUSSÃO

Os estudos dos efeitos antineoplásicos da HF foram realizados em diversos modelos de tumores sólidos, no entanto poucos trabalhos avaliaram seu papel em neoplasias hematológicas. O nosso grupo demonstrou que o tratamento de células de leucemia promielocítica aguda com HF gera efeitos antiproliferativos, próapoptóticos, antiangiogênicos e modula a expressão de genes alvos da via TGF β (de Figueiredo-Pontes *et al.*, 2011; Assis, *et al.*, 2015).

A estratégia de comparação entre linhagens celulares sensíveis e resistentes à uma droga específica é frequentemente utilizada para identificar mutações gênicas associadas à resistência. Um exemplo é a correlação entre a sensibilidade à diferentes inibidores de tirosina quinase e a presença de mutações no gene híbrido BCR/ABL em células de Leucemia Mieloide Crônica (Alikian *et al.*, 2012; Griswold *et al.*, 2006). A nossa hipótese foi que as diferenças em sensibilidade poderiam refletir a ação da droga sobre vias sinalizadoras ativadas ou inibidas de forma aberrante por oncoproteínas. Nós testamos o efeito da HF sobre 5 linhagens de LMA e verificamos que duas linhagens foram sensíveis e outras duas resistentes com base na DE₅₀.

A linhagem sensível escolhida foi a Kasumi-1 que carrega a translocação entre os cromossomos 8 e 21, a qual é a causa da fusão entre os genes RUNX1- RUNX1T1 (Asou *et al.*, 1991). A linhagem resistente escolhida foi a THP-1 que carrega a translocação entre os cromossomos 9 e 11, a qual causa a fusão entre os genes AF9 e MLL (De Braekeleer *et al.*, 2005). Esta alteração leva a um curso clínico geralmente agressivo da leucemia com recaídas frequentes e sobrevida curta (Swansbury *et al.*, 1998).

Aqui demonstramos que a HF induziu a apoptose de células da linhagem Kasumi-1 com clivagem da Caspase 3 após 3 horas de tratamento, portanto mostrando que houve ativação da via intrínseca da apoptose. Além disso, foi possível observar redução da

proteína PARP com aumento da sua forma clivada após 12 horas de tratamento com HF. Similarmente aos nossos resultados, o estudo de Leiba e colaboradores (2012) em linhagem de mieloma múltiplo demonstrou que a halofuginona induziu a apoptose através da clivagem de PARP, Caspase-3, Caspase-8 e Caspase-9 (Leiba et al., 2012). Em relação ao ciclo celular a HF inibiu a fase S das células Kasumi-1. No conjunto, podemos afirmar que a HF teve efeito pró-apoptótico e antiproliferativo nessa linhagem.

Os nossos resultados mostraram que as células THP-1 foram mais resistentes que as células Kasumi-1 à apoptose induzida por HF, sendo que a DE_{50} das células THP-1 foi 6,2 vezes maior do que a calculada para as células Kasumi-1. Além disso, nas células THP-1 não foi detectada a clivagem de caspase 3 e apenas um discreto aumento da caspase 9 clivada nas amostras tratadas por 12 horas com HF. A presença de PARP clivada foi detectada a partir de 3 horas de incubação com HF atingindo seu máximo valor com 12 horas. Em conjunto esses dados sugerem que apesar da evidente clivagem de PARP, a HF na concentração de 125 ng/ml induziu discreto aumento na apoptose das células THP-1.

Soch e colaboradores (2003) relataram que pacientes que possuem a translocação MLL/AF9 estão associados a sobrevida mais curta e maior resistência à quimioterapia (Schoch et al., 2003). O estudo de Wei e colaboradores, 2008, mostrou que células $CD34^+$ transduzidas com MLL/AF9 e transplantadas em camundongos NOD/SCID causaram leucemia aguda nesses animais. Além disso, os pesquisadores demonstraram que essas células expressam a proteína Rac1 e o uso do inibidor de Rac **NSC23766** inibiu a expressão de Rac e das proteínas Bcl-xL e Bcl-2 e isso foi correlacionado ao aumento de apoptose nas células silenciadas para Rac. Baseado nos achados de Wei e colaboradores podemos supor que a resistência das células THP-1 poderia resultar da expressão de RAC, a qual preveniria a apoptose através da indução das proteínas anti-apoptóticas Bcl-xL e Bcl-2 (Wei et al., 2008)..

Outro alvo do nosso estudo foi a avaliação de proteínas fosforiladas diferencialmente moduladas pelo tratamento com HF nas duas linhagens a fim de verificar quais as vias de sinalização celular poderiam estar envolvidas na mediação dos efeitos próapoptóticos e antiproliferativos.

No presente trabalho observamos 3 proteínas que foram moduladas de forma oposta pela HF em células Kasumi-1 e THP-1: c-Jun, Src e Chk-2. 9 proteínas foram moduladas apenas nas células Kasumi-1: Akt 1/2/3 S473, Akt 1/2/3 Thr 308, p70 S6K, Fyn, Fgr, Stat5b, Stat5a/b, Stat3 e FAK, e 6 exclusivamente na THP-1: p53 S46, p53 S392, p53 S15, β -catenina e Lyn.

Observamos que o tratamento com HF da linhagem Kasumi-1 induziu aumento da expressão da fosfoproteína c-Jun, a qual é membro da família JUN composta dos fatores c-Jun, JunB e JunD, e é componente do fator de transcrição AP-1 (do inglês Activator Protein-1). AP-1 é composto de dímeros de Fos, Jun e membros da família ATF, e se liga a elementos TRE/AP-1 no DNA regulando a expressão gênica (Jochum W, Passequé E, Wagner EF, 2001). Sinais extracelulares, como citocinas e estresse, ativam a transcrição dependente de AP-1. A atividade transcricional de c-Jun é regulada pela fosforilação nos sítios de S63 e S73 via SAPK/JNK (Hilberg F, Aguzzi A, Howells N, Wagner EF, 1993). C-Jun regula a proliferação celular induzindo a progressão da fase G-1 para S do ciclo celular em fibroblastos embrionários de camundongo (do inglês MEF) e a inibição da apoptose via diminuição de p53 em MEFs e queratinócitos (Wisdom et, al., 1999; Schreiber et, al., 1999). Elasser e colaboradores (2003) demonstraram expressão aumentada do fator c-Jun em amostras de pacientes com LMA com t(15;17) ou t(8;21) ou com inversão do cromossomo 16. Além disso, houve correlação entre a proteína quimérica RUNX1-RUNX1T1 e a expressão de c-Jun, através da ativação do promotor do fator (Elsasser et al., 2003). As células Kasumi-1 portam a proteína quimérica RUNX1-RUNX1T1, portanto o aumento observado da fosfoproteína c-Jun pode refletir a ação da oncoproteína na transcrição do seu gene.

Nas células THP-1 a expressão da fosfoproteína c-Jun foi diminuída pelo tratamento com HF. Zhou e colaboradores (2015) demonstraram que a inibição de c-Jun utilizando RNAs do tipo *short hairpin* (shRNAs) diminuiu o crescimento celular e induziu a apoptose em diversas linhagens de LMA entre elas as células Kasumi-1, THP-1, OCI-AML3 e U937 (Zhou et al., 2015). No presente trabalho foi detectada uma diminuição de 25% da quantidade da fosfoproteína c-Jun após tratamento com HF, o que pode justificar a indução da apoptose numa pequena fração de células THP-1.

Neste trabalho observamos aumento na expressão da fosfo-proteína Src na linhagem de células Kasumi-1 e diminuição da expressão na linhagem de células THP-1 após tratamento com HF. A Src é uma das proteínas da família SFK (do inglês Src family kinases), a qual inclui também as proteínas Fgr, Lyn, Fyn, Yes, Lck, Blk e Hck. Essas proteínas são importantes na regulação do crescimento e diferenciação das células eucarióticas.(Ingleby, 2008).

A atividade da Src é regulada pela fosforilação em dois diferentes sítios, mas com efeitos opostos. A fosforilação na Tyr 416 no domínio de ativação aumenta sua atividade enzimática, enquanto que a fosforilação na Tyr 527 na porção carboxi-terminal pela Csk(do inglês *C-terminal Src kinase*) leva à uma atividade diminuída. A via clássica de ativação da Src é iniciada pela desfosforilação da Tyr 530 seguida de uma alteração conformacional que permite a autofosforilação da Tyr 419 levando à sua completa ativação. Zhang e Forman (2014) demonstraram que a exposição à TGF- β aumentou a fosforilação da Src na Tyr 419 e também na Tyr 530, o que é inconsistente com a ativação canônica (Zhang; Forman , 2014). De maneira semelhante, detectamos fosforilação na Tyr 419 sugerindo que a HF leva a ativação não canônica da Src.

As proteínas Akt e Stat3 também foram moduladas pelo tratamento das células Kasumi-1 com HF, tendo sido observado um pequeno aumento da forma fosforilada em em S473 de Akt e diminuição da forma fosforilada em Thr308. Em células de carcinoma de

pulmão de não pequenas células a fosforilação na Thr308, mas não na Thr473 correlacionou-se com a atividade quinase da Akt (Vincent et al.2011). Entretanto não há comparação entre os efeitos da fosforilação nos dois sítios da Akt em células de leucemia mielóide aguda. No presente trabalho a fosfoproteína *downstream* à Akt p70 S6 foi detectada em concentrações diminuídas em células Kasumi-1 tratadas com HF. Diante deste conjunto de dados, não é possível concluir que a HF module significativamente a via de Akt nas células Kasumi-1.

Nas células THP-1 o único membro da via Akt que foi modulado por HF foi a proteína TOR, cujos níveis da forma fosforilada em S2448 foram detectados em menor quantidade nas células tratadas. A ausência de alterações na p70 S6K sugere que a modulação de TOR nas células THP-1 não resulta em citotoxicidade.

As formas fosforiladas em Y705 e S727 de Stat3 foram diminuídas nas células Kasumi-1, mas não foram detectadas nas células THP-1. Redell e colaboradores (2011) demonstraram que a fosfoproteína Stat3 é constitutivamente expressa nas linhagens de células Kasumi-1 e THP-1. O tratamento com G-SCF levou ao aumento da fosforilação de Stat3 nas células Kasumi-1, já o uso do inibidor de Stat3 levou à diminuição da sua atividade e ao aumento da apoptose nessas células (Redell et al. 2011).

O conjunto dos resultados da expressão das fosfoproteínas Src, Akt e Stat 3 sugere que o efeito de indução de apoptose nas células Kasumi-1 após tratamento com HF se deva à inibição de fosfo-Stat3 e que a expressão aumentada de fosfo-Src não está envolvida na indução da fosfo-Stat3 e fosfo-Akt nessas células.

Da família das SFKs além da Src foram moduladas pela HF a Fgr e a Fyn na Kazumi-1 e a Lyn na THP-1.

Dos Santos e colaboradores (2008) reportaram que a proteína Fgr teve expressão variável expressa em células progenitoras CD34⁺ obtidas de pacientes com LMA. Além disso, o tratamento combinado com siRNA (do inglês *small interfering RNA*) para Fgr e para outras duas quinases da família: a Lyn e Hck levou ao aumento da apoptose nestas células. O uso

do inibidor de tirosina quinases SRC PP2 inibiu de modo geral as formas ativas das RSKs totais, diminuiu a proliferação destas células e induziu apoptose com ativação de PARP e Caspase-3. Além disso, o inibidor PP2 inibiu a fosforilação dos alvos da via m-TOR, 4E-BPI e p70S6K (Dos Santos et al., 2008). Nosso estudo mostrou que o tratamento com HF das células Kasumi-1 induziu um aumento na expressão da fosfoproteína Fgr e aumento da expressão de fosfoproteína Lyn nas células THP-1. Com base no papel descrito para Lyn estar envolvida na proliferação e diferenciação celular, é possível que sua ativação confira ao menos em parte, resistência da linhagem THP-1 ao tratamento com HF observada em nosso trabalho. Ao passo que o aumento da fosfoproteína Fgr não foi capaz de contrapor os efeitos próapoptóticos da HF nas células Kasumi-1.

Similar ao observado para a fosfoproteína Fgr foi detectado aumento da fosfoproteína Fyn induzido por HF nas células Kasumi-1, mas não nas células THP-1.

Chougule e colaboradores (2016) demonstraram que o gene Fyn encontrava-se expresso em amostras de pacientes com LMA e que sua expressão foi associada a menor sobrevida dos pacientes. Eles também demonstraram que alta expressão de Fyn e de FLT3-ITD estava associada a menor sobrevida. Além disso, a expressão de Fyn foi associada a mutação FLT3-ITD induziu maior ativação da sinalização STAT5 (Chougule et al., 2016). No nosso estudo apesar do aumento de Fyn detectamos diminuição da fosfoproteína Stat5a/b, sugerindo que também a modulação deste membro da família SFK não se associou a alterações significativas de alvos *downstream* descritos para a via e tão pouco não está associada a apoptose induzida por HF.

A fosfo-proteína p-STAT5, por outro lado, foi demonstrada não estar constitutivamente expressa nas células Kasumi-1 no trabalho de Weber e colaboradores (2015). Eles também demonstraram que o silenciamento de STAT5 total com sh-RNA levou a redução da viabilidade e da proliferação destas células, sugerindo que Stat5 é importante para a sobrevivência das células Kasumi (Weber et al., 2015). Nossos resultados mostraram

redução da expressão da forma fosforilada STAT5a/b associada a morte por apoptose nas células Kasumi-1 após tratamento com HF. Portanto acreditamos que a redução da expressão de genes de sobrevivência transcritos pelas STATs 3 e 5 pode explicar, parcialmente, o efeito pró-apoptótico observado na linhagem de células Kasumi-1 após tratamento com HF.

Outra proteína estudada em nosso trabalho foi a quinase FAK. Recher e colaboradores (2004) demonstraram que a proteína FAK foi expressa assim como seu RNA mensageiro em 25 de 60 amostras de pacientes com LMA e, além disso, as células positivas para FAK tinham maior mobilidade e resistência ao tratamento com o quimioterápico Daunorrubicina (Recher et al., 2004). Sonoda e colaboradores (2000) demonstraram que a expressão aumentada de FAK na linhagem de células leucêmicas HL-60 inibiu a morte destas células por apoptose (Sonoda et al., 2000). Neste trabalho a fosfo-proteína No presente trabalho, a fosfoproteína FAK teve expressão pouco aumentada na linhagem de células Kasumi-1 após tratamento com HF, enquanto que não foi modulada nas células THP-1. Levando em consideração os estudos do grupo de Recher e do grupo de Sonoda, podemos supor que tal ativação não exerceu um papel protetor para esta linhagem.

Nossos resultados demonstraram redução da detecção da fosfoproteína Chk-2 na linhagem de células Kasumi-1 e aumento na linhagem de células THP-1. A proteína Chk-2 é um componente importante do controle do ciclo celular, em resposta ao dano ao DNA ela pode prevenir a progressão do ciclo bloqueando-o tanto na fase G1 como em G2 (Hofmann et al., 2001). Amico e colaboradores (2003) demonstraram que o tratamento das linhagens de células leucêmicas THP-1 e HL-60 com anticorpo Anti-CD33 conjugado à Caliqueamicina causou bloqueio do ciclo celular na fase G2. A inibição da atividade da Chk-2 pode influenciar no controle do ciclo celular o que, em parte, explicaria a sensibilidade das células Kasumi-1 e a resistência das células THP-1 ao tratamento com halofuginona (Amico et al., 2003).

Outra proteína verificada em nosso estudo por array foi a proteína β -catenina total, foi demonstrado que após tratamento das células THP-1 com HF houve aumento na detecção dessa proteína. O estudo de Ysebaert e colaboradores (2006) demonstrou que 61% dos 82 pacientes com LMA analisados tiveram expressão de β -catenina e essa expressão ocorreu preferencialmente em pacientes com LMA monocítica M4 e M5. A expressão de β -catenina foi correlacionada com menor tempo para recaída e também com menor tempo de sobrevida livre de doença (Ysebaert et al., 2006). Minke e colaboradores (2008) mostraram que o uso de dois inibidores da via WNT, CGP049090 e PFK115-584, nas linhagens Kasumi-1 e HL-60 e em células de pacientes com LMA, levou a diminuição da expressão do gene da β -catenina, inibiu a proliferação celular e induziu apoptose com ativação das caspases 3 e 7 e de PARP (Minke et al., 2008). Essa ativação da principal proteína efetora da via WNT, pode, em parte, contribuir para a resistência à apoptose induzida pela HF nas células THP-1.

A proteína p53 é reconhecida como “guardiã do genoma” por ter capacidade de suprimir tumores através da regulação e resposta a sinais de estresse, os quais incluem danos ao DNA, eventos oncogênicos anormais, erosão dos telômeros e hipóxia. A fosforilação de sítios específicos da p53 tem sido relacionada a funções diferentes desta proteína. A fosforilação nas serinas S15/20 reduz a afinidade da p53 pela sua proteína reguladora HDM2 e promove o recrutamento de fatores ativadores da transcrição. A fosforilação da serina S46 foi relacionada à mediação de indução de genes pró-apoptóticos, mas não à indução de parada do ciclo celular (Dai; Gu, 2011). Irish e colaboradores (2007) demonstraram que a proteína p53 total e suas formas fosforiladas nas serinas S37, S46 e S392 estão presentes nas células de pacientes com LMA. O tratamento dos blastos dos pacientes com o fármaco Idarubicina levou ao aumento da fosforilação da p53. Eles também demonstraram que os blastos de pacientes que tinham maior detecção de fosforilação nas serinas S15, S46 e S392 tinham uma maior expressão da proteína pró-apoptótica Bcl-2, esta expressão também foi correlacionada à mutação FLT3ITD (Irish et al., 2007). Nosso

estudo demonstrou que após tratamento das células THP-1 com HF a detecção das formas de p53 fosforiladas em S15, S46 e S392 foi diminuída, o que pode contribuir para a resistência destas células ao tratamento.

6. CONCLUSÕES

Concluimos que a HF induz apoptose nas células Kasumi-1 (linhagem sensível) a concentrações baixas da droga. Já a linhagem THP-1 somente é sensível a altas concentrações da molécula.

A sensibilidade das células Kasumi-1 foi associada principalmente à diminuição das formas fosforiladas de Stat5 e Stat3.

A resistência das células THP-1 esteve associada à diminuição das formas fosforiladas de p53.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arber., D.A. Prognostic impact of acute myeloid leukemia classification: importance of detection of recurring cytogenetic abnormalities and multilineage dysplasia on survival. *American Journal of Clinical Pathology*. 2003,119, 672–680.

Alikian., M. BCR-ABL1 kinase domain mutations: methodology and clinical evaluation. *Am J Hematol*. 2012. 87, 298-304.

Ashkenazi., A, Dixit ., V. M. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998, 281, 1305-8.

Austin., T. MLL-AF9-Induced Leukemogenesis Requires Co-expression of the Wild-Type Mll Allele. *Cancer Cell*, 2010. 17, 148-159.

Ban, K. BCR-ABL1 mediates up-regulation of Fyn in chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 2008, 111, 2904-2908.

Baker., B.R. An antimalarial alkaloid from Hydrangea. *J. Org. Chem*. 1952, 17, 133–137.

Byrd, J. C. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success , cumulative incidence of relapse , and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*. 2002, 100, 4325-36.

Bodmer., J. L, Schneider., P, Tschopp., J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci*. 2002, 27,19-26.

Chang., H.Y., Yang., X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000, 64, 821-46.

Cheng., F. Preclinical evaluation of WYE-687, a mTOR kinase inhibitor, as a potential anti-acute myeloid leukemia agent. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016, 470, 324-330.

Chin., D. What is transforming growth factor-beta (TGF-β)?. *British Journal of Plastic Surgery*. 2004, 57, 215–221.

- Chou T-C, Talalay P Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. *Trends Pharmacol Sci.* 1983, 4, 450-454.
- Chougule., R. A, Kazi., J. U, Rönstrand. FYN expression potentiates FLT3-ITD induced STAT5 signaling in acute myeloid leukemia. *Onco target.* 2016, 7, 9964-9974.
- Dai., C, Gu., W. p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol Med* 2010. 16, 5228-536.
- D. Grimwade, R. K. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials," *Blood*, 2010, 116, 354-365.
- De Jonge., M.J. Phase I and pharmacokinetic study of halofuginone, an oral quinazolinone derivative in patients with advanced solid tumours. *Eur. J. Cancer.* 2006, 42, 1768-1774.
- Deschler., B, Lübbert., M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer.* 2006, 107, 2099-107.
- Dos Santos., C. The Src and c-Kit kinase inhibitor dasatinib enhances p53-mediated targeting of human acute myeloid leukemia stem cells by chemotherapeutic agents. *Blood.* 2013, 122, 1900-1913.
- Dos Santos., C. A critical role for Lyn in acute myeloid leukemia. *Blood*, 2008, 111, 2269-2279.
- Dombret., H, Gardin., C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood.* 2016, 127, 53-61.
- Elkin., M. Inhibition of matrix metalloproteinase-2 expression and bladder carcinoma metastasis by halofuginone. *Clin Cancer Res.* 1999, 5, 1982-1988.
- Elkin., M. Inhibition of bladder carcinoma angiogenesis, stromal support, and tumor growth by halofuginone. *Cancer Res.* 1999, 59, 4111-4118.
- Elkin., M. Halofuginone: a potent inhibitor of critical steps in angiogenesis progression. *FASEB J.* 2000, 14, 2477-2485.
- Estey., E, H. Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management. *Am. J. Hematol.* 2013. 88, 318- 327.
- Folkman., J. Tumor angiogenesis. Holland JF, Frei E III, Bast RC Jr, et al (eds): *Cancer Medicine.* 2000, 132-152
- Folkman., J. et al. Angiogenesis, *Harrison's Principles of Internal Medicine.* 2001, 517-530.
- Forster., V. J. The leukemia-associated RUNX1/ETO oncoprotein confers a mutator phenotype. *Leukemia*, 2016. 30, 251-254.
- Gallay., N.. The level of AKT phosphorylation on threonine 308 but not on serine 473 is associated with high-risk cytogenetics and predicts poor overall survival in acute myeloid leukaemia. *Leukemia.* 2008, 23, 1029-1038.

Gurvan., M. The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. *New Phytologist*. 2010, 188, 82–97.

Griswold., I. J. Kinase domain mutants of Bcr-Abl exhibit altered transformation potency, kinase activity, and substrate utilization, irrespective of sensitivity to imatinib. *Mol Cell Biol*. 2006, 26, 6082-93.

Gross., D.J. Treatment with halofuginone results in marked growth inhibition of a von Hippel-Lindau pheochromocytoma in vivo. *Clin Cancer Res*. 2003, 9, 3788 - 3793.

Grudzien., M.M. The antifibrotic drug halofuginone inhibits proliferation and collagen production by human leiomyoma and myometrial smooth muscle cells. *Fertil. Steril*, 2010, 93,1290-8.

Hassan., K. Acute myeloid leukemia-FAB classification and its correlation with clinico-haematological features. *J Pak Med Assoc*. 1993, 43,200-3.

Hilberg., F. c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature*. 1993, 65,179-81.

Ingley., E. Src family kinases: Regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Proteins and Proteomics*, 2008. V 1784, 56–65.

Hofmann., W.K. Mutation analysis of the DNA-damage checkpoint gene CHK2 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Leukemia Research*, 2001. 25,333-8.

Iriyama., N. Lyn, a tyrosine kinase closely linked to the differentiation status of primary acute myeloid leukemia blasts, associates with negative regulation of all-*trans* retinoic acid (ATRA) and dihydroxyvitamin D3 (VD3)-induced HL-60 cells differentiation. *Cancer Cell Int*, 2016, 16-37.

Ito., T. Hyaluronan regulates transforming growth factor- β 1 receptor compartmentalization. *J. Biol. Chem*, 2004. 279, 25326-25332.

Itoh., F. The FYVE domain in Smad anchor for receptor activation (SARA) is sufficient for localization of SARA in early endosomes and regulates TGF- β /Smad signaling. *Genes Cells*, 2002. 7, 321-331.

Itoh., S, ten Dijke., P. Negative regulation of TGF- β receptor/Smad signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol*, 2007. 19, 176-184.

Jang., C. S. Pharmacology of Ch'ang Shan (*Dichroa febrifuga*), a Chinese antimalarial herb. *Nature*, 1948, 161, 400-401.

Jang., C.S. A Chinese antimalarial herb. *Science*, 1946, 103, 2663.

Jakubowiak., A, Pouponnot., C, Berguido., F. Inhibition of the transforming growth factor beta 1 signaling pathway by the AML1/ETO leukemia-associated fusion protein. *J Biol Chem*. 2000, 275, 40282-40287.

- Janus., A. Rapamycin, the mTOR kinase inhibitor, sensitizes acute myeloid leukemia cells, HL-60 cells, to the cytotoxic effect of arabinoside cytarabine. *Anti-Cancer Drugs*, 2009, 693-701.
- Jemal., A. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin.* 2007, 57, 43-66.
- Jonathan., M. Flt3 Y591 duplication and Bcl-2 overexpression are detected in acute myeloid leukemia cells with high levels of phosphorylated wild-type p53. *BLOOD*, 2007. Volume 109, number 6.
- Jochum., W, Passequé., E, Wagner., E, F. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene*. 2001, 20, 2401-12.
- Juárez., P. Halofuginone inhibits the establishment and progression of melanoma bone metastases. *Cancer Res.* 2012, 72, 6247-6256.
- Juliusson., G. Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed. *Blood*. 2012, 119, 3890-3899.
- Kanno., Y. Cytoplasmic Sequestration of the Polyomavirus Enhancer Binding Protein 2 (PEBP2)/Core Binding Factor α (CBF α) Subunit by the Leukemia-Related PEBP2/CBF β -SMMHC Fusion Protein Inhibits PEBP2/CBF-Mediated Transactivation. *Mol Cell Biol.*, 1998. 18,4252–4261.
- Kansal., R. Acute myeloid leukemia in the era of precision medicine: recent advances in diagnostic classification and risk stratification. *Cancer Biol Med.* 2016, 13, 41–54.
- Koepfli., J.B.; Mead., J.F.; Brockman., J.A., Jr. An alkaloid with high antimalarial activity from *Dichroa febrifuga*. *J. Am. Chem. Soc.* 1947, 69, 1837.
- Koon, H.B. Phase II AIDS Malignancy Consortium trial of topical halofuginone in AIDS-related Kaposi sarcoma. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2011, 56, 64-68.
- Kretzschmar., M. A mechanism of repression of TGF β / Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev.* 1999, 13, 804-16.
- Lam., K, Zhang., D. RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis. *Front Biosci.* 2012, 17, 1120–1139.
- Leiba., M. Halofuginone inhibits multiple myeloma growth in vitro and in vivo and enhances cytotoxicity of conventional and novel agents. *Br. J. Haematol.* 2012, 157, 718-731.
- Li., S. Genetic and epigenetic heterogeneity in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Genet Dev.*, 2016. 36, 100-6.
- Lo-Coco., F. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2013, 369, 111-21.
- Muntean., A, G, Hess., J.L. The Pathogenesis of Mixed-Lineage Leukemia. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2012, 7, 283-301.
- McGaha., T. Effect of halofuginone on the development of tight skin (TSK) syndrome. *Autoimmunity.* 2002, 35, 277-282.

- Massague., J, Chen., Y.G. Controlling TGF- β signaling. *Genes and Development*, 2000, 14, 627–644.
- Massague., J, Wotton., D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 2000, 19,1745-1754.
- Massague., J. TGF- β signal transduction. *Annual Review of Biochemistry* 1998,67, 753–791.
- Massagué., J., Seoane., J, Wotton., D. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 2005. 19, 2783-2810.
- Minke., K. S. Small molecule inhibitors of WNT signaling effectively induce apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *European Journal Of Haematology.* 2009, 82,165-75.
- Mpakou., V. E. Dasatinib inhibits proliferation and induces apoptosis in the KASUMI-1 cell line bearing the t(8;21)(q22;q22) and the N822K *c-kit* mutation. *Leukemia Research.* 2013, 175-182.
- Mehra., A, Wrana., J. L. TGF- β and the Smad signal transduction pathway. *Biochemistry and Cell Biology.* 2002, 80, 605-622.
- Miettinen., P, J. TGF- β -induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol.* 1994,127, 2021-2036.
- Muller-Tidow., C. Profiling of "histone H3 lysine 9 trimethylation levels predicts transcription factor activity and survival in acute myeloid leukemia," *Blood.* 2010, 116, 3564–3571.
- Nagler., A, Pines., M. Topical treatment of cutaneous chronic graft *versus* host disease (cGvHD) with halofuginone: a novel inhibitor of collagen type I synthesis. *Transplantation.* 1999, 68, 1806-1809.
- Nakao., A, Imamura., T, Souchelnytskyi., S. TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J.* 1997,16, 5353-5362.
- Narimatsu., H. Clinical characteristics and outcomes in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia in Japan. *Leukemia.* 2008, 22, 428-432.
- Otto., H. *In silico* characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribosyl)transferases (pARTs). *BMC Genomics.* 2005, 6, 139.
- Peterson., L. F, Zhang ., D. The 8;21 translocation in leukemogenesis. *Oncogene*, 2004. 23, 4255-4262.
- Pinion., J.L. The effects of halofuginone and salinomycin, alone and in combination, on live performance and skin characteristics of broilers. *Poult. Sci.* 1995, 74, 391-397.
- Pines, M, Nagler, A. Halofuginone: a novel antifibrotic therapy. *Gen. Pharmacol.* 1998, 30,445-450.
- Pleschke., J, M. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J Biol Chem.* 2000, 275, 40974-80.

- Ramos., N, R. Current Approaches in the Treatment of Relapsed and Refractory Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med.* 2015, 4, 665–695.
- Recher., C. Expression of Focal Adhesion Kinase in Acute Myeloid Leukemia Is Associated with Enhanced Blast Migration, Increased Cellularity, and Poor Prognosis. *Cancer research,* 2004, 64, 3191-3197.
- Redell., M.S. Stat3 signaling in acute myeloid leukemia: ligand dependent and –independent activation and induction of apoptosis by a novel small-molecule Stat3 inhibitor. *BLOOD.* 2011, 117.
- Reikvam., H. Acute Myeloid Leukemia with the t(8;21) Translocation: Clinical Consequence and Biological Implications. *Journal of Biomedicine and Biotechnology,* 2011.
- Remy., I, Montmarquette., A, Michnick., S.W. PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3. *Nat Cell Biol.* 2004, 4, 358-65.
- Rik ., D, Zhang., Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-b family signaling. *Nature.* 2003, 425, 577-584.
- Reynisdottir., I. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev.* 1995. 9, 1831-1845.
- Roderfeld., M. Latent MMP-9 is bound to TIMP-1 before secretion. *Biol Chem.* 2007 ,388, 1227-34.
- Rundhaug, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2005, 9, 267-285.
- Sachdeva., M. U. Role of FAB classification of acute leukemias in era of immunophenotyping. *Indian J Pathol Microbiol.* 2006. 49, 524-7.
- Sandhu., C. Transforming growth factor beta stabilizes p15INK4B protein, increases p15INK4B-cdk4 complexes, and inhibits cyclin D1- cdk4 association in human mammary epithelial cells. *Mol. Cell. Biol,* 1997, 17, 2458-2467.
- Schmierer., B, Hill., C. S. TGF β -SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2007, 8, 970-982.
- Schreiber., M. Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev.* 1999, 13 607–619.
- Shi., Y, Massague., J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003, 113: 685-700.
- Slovak., M, L. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group / Eastern Cooperative Oncology Group study. *Blood.* 2000. 96, 4075-83.
- Steven W. Differential niche and Wnt requirements during acute myeloid leukemia progression. *Blood.* 2011, 118, 2849-2856.

- Strom., S. S. De novo acute myeloid leukemia risk factors: a Texas case-control study. *Cancer*. 2012, 118, 4589-96.
- Takaya., Y. New type of febrifugine analogues, bearing a quinolizidine moiety, show potent antimalarial activity against plasmodium malaria parasite. *J. Med. Chem.* 1999, 42, 3163-3166.
- Tallman., M, S. Acute Monocytic Leukemia (French-American-British classification M5) Does Not Have a Worse Prognosis Than Other Subtypes of Acute Myeloid Leukemia: A Report From the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2004 22,1276-86.
- Taras., D. Halofuginone suppresses the lung metastasis of chemically induced hepatocellular carcinoma in rats through MMP inhibition. *Neoplasia.* 2006, 8, 312-318.
- Vardiman., J.W. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: Rationale and important changes. *Blood* 2009, 114, 937-951.
- Vaux., D. L, Silke., J. Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 304, 499-504.
- Weber., A. Stat5 Exerts Distinct, Vital Functions in the Cytoplasm and Nucleus of Bcr-Abl⁺ K562 and Jak2(V617F)⁺ HEL Leukemia Cells. *Cancers*, 2015, 7 503-537.
- Wei., J. Model of MLL-AF9 Leukemia. *Cancer Cell.* 2008. 13, 483-495.
- Wisdom., R, Johnson., R, Moore., C. c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *The EMBO Journal.* 1999, 18,188-197.
- Woodhouse., B, C, Dianov., G. L. Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery. *DNA Repair (Amst).* 2008, 1077-86.
- Xavier., S. Amelioration of radiation-induced fibrosis: inhibition of transforming growth factor-beta signaling by halofuginone. *J Biol Chem.* 2004, 279, 15167-76.
- Yu., L. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 103, 4952-7.
- Yu., S.W. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science.* 2002, 297, 259-63.
- Yuan., Y. AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98,10398-10403.
- Zhang, D.F. Anticoccidial effect of halofuginone hydrobromide against *Eimeria tenella* with associated histology. *Parasitol. Res.* 2012, 111, 695-701.
- Zhou., C. C-Jun Regulates ER Stress Signaling to Promote Chemotherapy Resistance in Acute Myeloid Leukemia. *Blood.* 2015, 126, 2464.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Média dos experimentos de apoptose das células KASUMI-1

| CONCENTRAÇÃO | MÉDIA | DESVIO PADRÃO |
|---------------------|--------------|----------------------|
| HF 50ng/ml | 52,53 | 1,87 |
| HF 100 ng/ml | 64,23 | 2,23 |
| HF 200 ng/ml | 79,78 | 2,09 |
| AL 50 ng/ml | 20,16 | 0,70 |
| AL 100 ng/ml | 19,64 | 0,33 |
| AL 200 ng/ml | 19,95 | 1,20 |

APÊNDICE B – Média dos experimentos de apoptose das células MV4-11

| CONCENTRAÇÃO | MÉDIA | DESVIO PADRÃO |
|---------------------|--------------|----------------------|
| HF 25ng/ml | 39,30 | 1,41 |
| HF 50 ng/ml | 72,02 | 0,45 |
| HF 100 ng/ml | 92,93 | 0,97 |
| AL 25 ng/ml | 25,76 | 0,73 |
| AL 50 ng/ml | 23,32 | 2,51 |
| AL 100 ng/ml | 25,39 | 2,75 |

APÊNDICE C – Média dos experimentos de apoptose das células U937

| CONCENTRAÇÃO | MÉDIA | DESVIO PADRÃO |
|---------------------|--------------|----------------------|
| HF 50ng/ml | 39,16 | 1,77 |
| HF 100 ng/ml | 59,47 | 1,67 |
| HF 200 ng/ml | 84,01 | 0,55 |
| AL 50 ng/ml | 25,52 | 1,94 |
| AL 100 ng/ml | 24,75 | 2,32 |
| AL 200 ng/ml | 24,50 | 1,65 |

APÊNDICE D – Média dos experimentos de apoptose das células OCI-AML3

| CONCENTRAÇÃO | MÉDIA | DESVIO PADRÃO |
|---------------------|--------------|----------------------|
| HF 50ng/ml | 53,15 | 2,94 |
| HF 100 ng/ml | 44,73 | 1,19 |
| HF 200 ng/ml | 51,52 | 2,27 |
| HF 500 ng/ml | 88,28 | 1,27 |
| HF 1000 ng/ml | 98,83 | 0,17 |
| AL 50 ng/ml | 36,18 | 2,05 |
| AL 100 ng/ml | 33,41 | 1,53 |
| AL 200 ng/ml | 33,25 | 2,59 |
| AL 500 ng/ml | 38,52 | 7,97 |
| AL 1000 ng/ml | 31,28 | 5,70 |

APÊNDICE E – Média dos experimentos de apoptose das células THP-1

| CONCENTRAÇÃO | MÉDIA | DESVIO PADRÃO |
|---------------------|--------------|----------------------|
| HF 50ng/ml | 44,9 | 10,9 |
| HF 100 ng/ml | 45,4 | 2,1 |
| HF 200 ng/ml | 51 | 0,7 |
| HF 500 ng/ml | 86,5 | 0,8 |
| HF 1000 ng/ml | 98,4 | 0,4 |
| AL 50 ng/ml | 48,5 | 1,8 |
| AL 100 ng/ml | 48,5 | 2,6 |
| AL 200 ng/ml | 47,8 | 5,5 |
| AL 500 ng/ml | 49,9 | 2,0 |
| AL 1000 ng/ml | 45,4 | 2,6 |

APÊNDICE F – *Fold change* das fosfoproteínas avaliadas nas linhagens KASUMI-1 e THP-1

| PROTEÍNAS | KASUMI-1 | THP-1 |
|----------------------|-----------------|--------------|
| p38 α | 0,64 | 0,68 |
| ERK1/2 | 1,03 | 0,84 |
| JNK 1/2/3 | 1,59 | 1,50 |
| GSK-3 α/β | 1,42 | 1,39 |
| EGFR | 1,02 | 1,03 |
| MSK1/2 | 0,99 | 0,94 |
| AMPK α 1 | 0,78 | 1,05 |

| | | |
|------------------------------------|------|------|
| Akt 1/2/3 S473 | 1,36 | 0,90 |
| AKT 1/2/3 T308 | 0,63 | 0,76 |
| p53 S392 | 0,96 | 0,58 |
| p53 s46 | 0,89 | 0,69 |
| p53 S15 | 0,92 | 0,41 |
| TOR | 1,02 | 0,38 |
| CREB | 3,2 | 2,45 |
| HSP27 | 1,24 | 0,98 |
| AMPKα2 | 1,15 | 1,24 |
| β-catenina | 1,20 | 1,44 |
| c-Jun | 1,58 | 0,75 |
| Src | 2,0 | 0,68 |
| Lyn | 1,19 | 1,57 |
| Lck | 2,22 | 1,48 |
| STAT2 | 1,0 | 0,91 |
| STAT5a | 0,84 | 0,98 |
| STAT6 | 0,95 | 1,06 |
| STAT5b | 0,71 | 1,08 |
| STAT3 Y705 | 0,14 | 0,33 |
| STAT5a/b | 0,48 | 1,14 |
| STAT3 S727 | 0,41 | 1,06 |
| p70 S6 Kinase T421/S424 | 0,72 | 0,76 |
| RSK1/2/3 | 0,38 | 0,51 |
| eNOS | 0,24 | 0,23 |
| Fyn | 1,79 | 0,76 |
| Yes | 1,20 | 1,22 |
| Fgr | 1,86 | 0,95 |

| | | |
|---------------------------------|------|------|
| Hck | 1,00 | 1,18 |
| Chk-2 | 0,59 | 1,77 |
| FAK | 1,36 | 1,02 |
| PDGF Rβ | 1,09 | 0,87 |
| WNK1 | 1,47 | 2,04 |
| PYK2 | 0,37 | 0,29 |
| PRAS40 | 1,00 | 1,13 |
| HSP60 | 0,87 | 0,89 |