Silvia Elena Sánchez Mendoza

**Estudo do efeito da associação do ácido all-trans
retinoico (ATRA) com inibidores do FLT3 em modelos
de leucemia mieloide aguda com mutações internas em
tandem no gene *FLT3***

Ribeirão Preto – SP
Janeiro – 2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE ONCOLOGIA CLÍNICA, CÉLULAS TRONCO E
TERAPIA CELULAR

Silvia Elena Sánchez Mendoza

**Estudo do efeito da associação do ácido all-trans
retinoico (ATRA) com inibidores do FLT3 em modelos
de leucemia mieloide aguda com mutações internas em
tandem no gene *FLT3***

Orientador
Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego

Ribeirão Preto – SP
Janeiro – 2019

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.

Sánchez Mendoza, Silvia Elena

Estudo do efeito da associação do ácido all-trans retinoico (ATRA) com inibidores do FLT3 em modelos de leucemia mieloide aguda com mutações internas em tandem no gene *FLT3*. Ribeirão Preto, 2019.

45 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Oncohematologia.

Orientador: Rego. Eduardo Magalhães.

Nome: SANCHEZ MENDOZA, Silvia Elena

Título: Estudo do efeito da associação do ácido all-trans retinoico (ATRA) com inibidores do FLT3 em modelos de leucemia mieloide aguda com mutações internas em tandem no gene *FLT3*.

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

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof(a) Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*A todos aqueles que acompanharam
meu caminhar nestes 5 anos de desafios.*

Aos que acompanharam de longe.

Aos que acompanharam de perto.

Aos que foram embora muito cedo.

Agradecimentos

*Primeiramente quero agradecer imensamente minha família: minha mãe **María Gloria**, meu pai **Carlos Alberto** e minha irmã **María Amália**. Sem o apoio de vocês, este caminho que eu escolhi na vida simplesmente não seria possível.*

*A meu orientador **Prof. Eduardo Magalhães Rego**, pela confiança depositada e o acompanhamento tanto do ponto de vista científico como humano. O senhor, além de ser autoridade na sua área, tem um grande coração e essa combinação não é sempre fácil de achar.*

*A toda equipe do Prof. Rego e colaboradores: **Ana Silvia, Adriana, Priscila e Ana Paula Lange**. Sem vocês no dia a dia do laboratório, este trabalho não teria sido possível.*

*A todos os alunos do Prof. Rego: **Virginia, Luciana, Diego, César, Isabel, Mariane e Adriane**. Obrigada pelo acompanhamento e pelo suporte neste tempo tudo. Agradeço especialmente a Virginia, não só por dividir o tempo no laboratório, mas também por me abrir as portas da sua casa e dividir tristezas e alegrias no dia a dia junto com o Boris.*

*A **Cleide** e toda a equipe do Laboratório de Estudos Experimentais em Animais: **Mônica, Aline, Larissa, Geovani, Paulo, Thamires e Taisa**. Sem vocês não teria sido possível levar para frente toda a parte relacionada com experimentos animais. Agradeço especialmente a Cleide pelo suporte técnico e também pelo suporte emocional desde que eu cheguei em Ribeirão.*

*A todos os alunos de pós-graduação do Laboratório de Hematologia que ainda continuam ou que já foram embora: **Thiago, Izabela, Talita, Leticia, Amanda, João Paulo, André, Gustavo, Florencia, Raquel, Flavia, LÍlian, Fernanda, João, Juan, Jaqueline, Renata, Ana Paula Nunes, Fernanda Borges, Bruna e Raíza**.*

*A todos os funcionários do Laboratório de Hematologia: **Aglair, Denise, Josie, Amelia, Marta, Julia, Claudia, Barbara, Joana e Fabiana**.*

*À **Dalvinha** por tudo o suporte que você me deu neste tempo tudo em Ribeirão.*

*À **Dra. Jussara**, minha psicóloga: Sem o teu acompanhamento eu não seria a Silvia que eu sou hoje.*

*À **Vanessa, Gabriela e Rafael** pela amizade e todos os momentos divididos e compartilhados. Espero que a vida nos junte de novo.*

*À equipe café da manhã: **João, Fábio e Tum**. Obrigada pelos risos e sorrisos que vocês mi tiraram a cada café da manhã compartilhado no bandex.*

*À **Dra. Mojgan Djavaheri Mergny** por ter aberto as portas do laboratório na unidade INSERM U1218 durante meu estágio em Bordeaux e a sua aluna, **Jennifer Beauvarlet** por ter me acolhido com a maior paciência, carinho e entusiasmo em todo esse tempo.*

*À l'équipe Bordeaux-Paraguay: **Nathalia, Diego, Olga, Jazmín, Doña Eusebia e Don Juan**. Vocês foram meu pedacinho de casa longe de Assunção e longe de Ribeirão.*

*À **Rebeca, Amanda, Arthur** e a galera toda do Club de escalada de Ribeirão. Com vocês descobri uma paixão que vou levar para sempre comigo.*

*À **Hugo**: onde seja que você esteja, sempre vou levar teu sorriso comigo.*

*“Caminante, son tus huellas
el camino y nada más;
caminante, no hay camino,
se hace camino al andar”
Antonio Machado*

Lista de Figuras

Figura 1: Morte celular mediada pela sonda TMRM (Pagina 13).

Figura 2: Analise do sinergismo nas linhagens MV4-11 e MOLM-13 e resultados de morte celular (Pagina 20 e 21).

Figura 3: Western blot dos alvos do receptor FLT3 mutado (Pagina 23).

Figura 4: Efeito da inibição do fluxo autofágico na linhagem MOLM-13 (Pagina 25).

Figura 5: Western blot do fator de transcrição Stat3 nas linhagens MV4-11 e MOLM-13 (Pagina 26).

Figura 6: Resultados *in vivo* (Pagina 27).

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificação da Organização Mundial de Saúde das Leucemias Mieloides Agudas com anormalidades genéticas recorrentes (Pagina 5).

Tabela 2: Concentrações de AC220 e ATRA junto com as combinações utilizadas nos ensaios de morte celular (Pagina 18).

Sumário

Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução	4
1.1. Leucemias Mieloides Agudas e sua classificação	4
1.2. Importância Clínica das mutações no gene <i>FLT3</i>	6
1.3. Inibidores de tirosina quinase do FLT3	6
1.4. Resultados clínicos dos inibidores de tirosina quinase do FLT3	7
1.5. O ácido trans-retinóico (ATRA) no tratamento de LMAs	7
1.6. Justificativa	8
2. Objetivos	10
2.1. Objetivo geral	10
2.2. Objetivos específicos	10
3. Material e Métodos	12
3.1. Linhagens celulares	12
3.2. Drogas	12
3.3. Ensaio de morte celular TMRM	12
3.4. Ensaio de morte celular Anexina V e Iodeto de Propídio (PI)	13
3.5. Western Blot	14
3.6. Fracionamento porção citoplasmática	15
3.7. Análise de sinergismo	15
3.8. Experimentos <i>in vivo</i>	16
4. Resultados	18
4.1. ATRA e FLT3-TKIs em combinação induzem de forma precoce a morte celular quando comparado com o tratamento com FLT3-TKIs em linhagem celular MOLM-13 e MV4-11	18
4.2. ATRA não apresenta efeito na fosforilação do receptor FLT3-ITD	22
4.3. A inibição do fluxo autofágico favorece a morte celular no tratamento com inibidores de tirosina quinase do FLT3 e no tratamento combinado com ATRA	24
4.4. O tratamento com o FLT3-TKI AC220 aumenta a fosforilação do Stat3 mas o ATRA e o tratamento combinado não apresentam aumento na fosforilação do Stat3	25
4.5. Resultados <i>in vivo</i>	26
5. Discussão	29
6. Bibliografia	32
7. Anexos	35

Estudo do efeito da associação do ácido all-trans retinoico (ATRA) com inibidores do FLT3 em modelos de leucemia mieloide aguda com mutações internas em tandem no gene *FLT3*.

Resumo

A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é uma neoplasia originada a partir da expansão clonal de blastos da linhagem mieloide em medula óssea, sangue periférico e outros tecidos. Entre as mutações mais frequentemente detectadas nas LMAs, se encontra a mutação do tipo duplicação interna em tandem (*FLT3-ITD*) que é detectada em aproximadamente 25% dos pacientes adultos. Esta mutação no receptor de tirosina quinase *FLT3* é uma inserção de 3 a 400 pares de base na região juxtamembrana do receptor, a qual é responsável pelo controle da atividade enzimática dos domínios tirosina quinase. Quando esta mutação se encontra presente, a região juxtamembrana perde a capacidade de controlar a ativação dos domínios tirosina quinase e o receptor fica constitutivamente ativo conferindo uma vantagem proliferativa ao clone leucêmico. Esta mutação é considerada de mal prognóstico e já foram desenvolvidos inibidores de tirosina quinase específicos para o receptor *FLT3* (*FLT3 TKI*). Porém, os resultados dos primeiros ensaios clínicos não apresentaram a efetividade esperada e continua a busca de novas combinações de drogas que contribuam a aumentar a efetividade destes inibidores. É por isso que este trabalho teve por objetivo testar a combinação de *FLT3 TKIs* com o ácido trans-retinoico (ATRA) já aplicado no tratamento da Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) com *PML-RARA*. A combinação de *FLT3 TKIs* com ATRA induziu a morte celular programada de forma precoce tanto na linhagem de LMA MV4-11 como na MOLM-13. Esta morte celular observada foi inibida com pré-tratamento com inibidor de caspases QVD. O tratamento combinado *in vivo* em camundongos *Nod Scid Gamma* (NSG) transplantados com células MOLM-13, aumentou a sobrevivência dos animais e diminuiu a percentagem de células CD45 humanas em medula óssea, baço e sangue periférico. No seu conjunto, nossos dados sugerem que o ATRA aumenta o efeito citotóxico dos *FLT3-TKIs*. Este achado poderá ser relevante para o tratamento de pacientes com LMA portadores de mutações ITD no gene *FLT3*.

Palavras chaves: Leucemia Mieloide Aguda, *FLT3-ITD*, *FLT3-TKIs*, ATRA.

Study of the effect of the combination of all-trans retinoic acid (ATRA) with FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia models with internal tandem duplications in the *FLT3* gene.

Abstract

Acute Myeloid Leukemia (LMA) is hematological disease that arises from the clonal expansion of a myeloid blast in bone marrow, peripheral blood and other tissues. Among LMAs mutations most frequently detected, 25% of adult patients carry the *FLT3-ITD* mutation. This mutation is a pair base insertion of 3 to 400 in the juxtamembrane domain of the receptor and leads to the constitutive activation of the kinase domains. It gives the leukemic clone a proliferative advantage and it is associated with a bad prognosis. FLT3 tyrosine kinase inhibitors (FLT3 TKI) were already developed in order to improved patients' treatment. However, results from the first clinical trials were not as promising as expected. Therefore, there is still room for testing new drug combinations that could improve FLT3 TKIs efficacy. The main objective of this work was to test FLT3 TKIs in combination with all-trans retinoic acid (ATRA) already used in Acute Promyelocytic Leukemia (APL) with *PML-RARA* treatment. The combination of FLT3-TKIs and ATRA induced early programmed cell death in both the MV4-11 and MOLM-13 LMA lines. This early cell death was inhibited with QVD caspase inhibitor pre-treatment. *In vivo* combined treatment in *Nod Scid Gamma* (NSG) mice transplanted with MOLM-13 cells, increased animals survival and decreased the percentage of human CD45 cells in bone marrow, spleen and peripheral blood. Taken together, our data suggest that ATRA increases the cytotoxic effect of FLT3-TKIs. This finding may be relevant for the treatment of patients with AML with ITD mutations in the *FLT3* gene.

Keywords: Acute Myeloid Leukemia, *FLT3-ITD*, FLT3-TKIs, ATRA.

Introdução

1. Introdução

1.1. Leucemias Mieloides Agudas e sua classificação

A Leucemia Mielóide Mieloide Aguda (LMA) é uma neoplasia originada a partir da expansão clonal de blastos da linhagem mieloide em medula óssea, sangue periférico e outros tecidos (1). Inicialmente, a classificação Franco-Americana-Britânica (FAB) proposta em 1976 dividiu as LMAs de acordo com o tipo de diferenciação (granulocítica, monocítica ou eritróide) e o grão de maturidade do blasto mieloide. Assim surgiram as seguintes categorias de LMAs: a) Leucemia mieloblástica aguda com mínima maturação (M1), b) Leucemia mieloblástica aguda com maturação (M2), c) Leucemia promielocítica aguda (M3), d) Leucemia mielomonocítica aguda (M4), e) Leucemia monocítica aguda (M5) e f) Leucemia eritróide aguda (2). Posteriormente, com base na caracterização imunofenotípica das células leucêmicas foram incluídas as categorias de Leucemia mieloblástica aguda indiferenciada (M0) e Leucemia megacarioblástica aguda (M7)(3).

Em 1999, a Organização Mundial da Saúde (OMS), além das características morfológicas e imunofenotípicas já contempladas na classificação FAB, inclui pela primeira vez informação citogenética na classificação das LMAs. Surgem assim quatro novas entidades definidas pela presença de alterações citogenéticas como a translocação t(8;21)(q22;q22) envolvendo os genes *RUNX1* e *RUNX1T1*, a inversão inv(16)(p13.1q22) ou translocação t(16;16)(p13.1;q22) que inclui os genes *CBFB* e *MYH11*, a translocação t(15;17)(q22;q12) que origina o gene de fusão *PML-RARA* associado à leucemia promielocítica aguda e anormalidades na região 11q23 que contém o gene *MLL*(4,5).

Com a classificação da OMS de 2008, o grupo de LMAs com translocações citogenéticas recorrentes muda para LMAs com anormalidades genéticas recorrentes. Dentro deste grupo temos as *Core Binding Factor Leukaemias* como LMA com translocação t(8;21)(q22;q22) envolvendo os genes *RUNX1* e *RUNX1T1*; e LMA com inversão inv(16)(p13.1q22) ou translocação t(16;16)(p13.1;q22) que inclui os genes *CBFB* e *MYH11*. Outras alterações incluídas dentro deste grupo são a translocação t(15;17)(q22;q12) que origina o gene de fusão

PML-RARA associado à leucemia promielocítica aguda (LPA) e mutações pontuais nos genes *NPM1* e *CEBPA*(1). A continuação mostrasse a tabela (tabela 1) com a classificação da OMS atualizada em 2016.

Tabela 1. Classificação das Leucemias Mieloides Agudas com anormalidades genéticas recorrentes de acordo com a revisão atualizada da OMS em 2016 (6).

Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e neoplasias relacionadas
LMA com anormalidades genéticas recorrentes
LMA com t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
LMA com inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
LPA com <i>PML-RARA</i>
LMA com t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
LMA com t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
LMA com inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
Entidade provisória: LMA com <i>BCR-ABL1</i>
LMA com mutação <i>NPM1</i>
LMA com mutações bialélicas <i>CEBPA</i>
Entidade provisória: LMA com <i>RUNX1</i> mutado

Estas alterações genéticas não são só importantes para definir o diagnóstico mas servem também para estratificação do paciente em baixo, intermediário ou alto risco (5,7). Desta forma, leucemias *Core Binding Factor* ou LPA com *PML-RARA* são consideradas de baixo risco e o paciente recebendo uma quimioterapia possui altas chances de remissão. Por outro lado, no caso de alterações consideradas de intermédio ou alto risco, o tratamento indicado é o transplante de medula óssea pelo fato de que estes pacientes apresentam altas probabilidades de recaída após a quimioterapia.

1.2. Importância Clínica das mutações no gene *FLT3*

O gene *FLT3* codifica um receptor tirosina quinase que intervém no desenvolvimento normal dos progenitores hematopoiéticos. Em condições fisiológicas o receptor é ativado na presença do FLT3 ligando (FL) mas em aproximadamente 25% dos pacientes com LMA o receptor se encontra constitutivamente ativo conferindo uma vantagem proliferativa ao clone leucêmico. Esta atividade constitutiva está relacionada à presença de mutações neste receptor. Existem dois tipos de mutações neste receptor: 1) A mutação *FLT3 Internal Tandem Duplication (FLT3-ITD)* que decorre da inserção de 3 a 400 pares de base na região juxtamembrana do receptor responsável do controle dos dois domínios tirosina quinase 2) A mutação pontual no domínio tirosina quinase do receptor (*FLT3 TKD*)(8). Os pacientes com a mutação *FLT3-ITD* apresentam altas taxas de recaída, portanto é uma alteração genética considerada de mal prognóstico(5,7,8).

1.3. Inibidores de tirosina quinase do FLT3

Inibidores de tirosina quinase do FLT3 foram desenvolvidos com o objetivo de bloquear a ativação anormal do receptor nos pacientes com LMA portadores de mutações no receptor FLT3. Estes inibidores são moléculas que se ligam ao sítio de ligação do ATP no domínio tirosina quinase e evitam a autofosforilação e consequente ativação do receptor. Existem dois tipos de inibidores de tirosina quinase do FLT3: O tipo I (P.ex.: Midostaurim também conhecido como PKC412) reconhece preferentemente o receptor ativado na sua forma dimerizada e o tipo II reconhece a forma inativa do receptor (P.ex.: Quizartinib também conhecido como AC220). Quando o receptor se encontra na sua conformação inativa, o sítio de ligação do ATP muda sua conformação fornecendo um sítio de ligação ainda mais específico para os inibidores do FLT3 de tipo II (9,10). Além da inibição da fosforilação do receptor, outro mecanismo de atuação já descrito na literatura é a indução da mitofagia ceramida-dependente e posterior morte celular(11).

1.4. Resultados clínicos dos inibidores de tirosina quinase do FLT3

Já foram estudados alguns inibidores da tirosina quinase FLT3 (FLT3-TKI) como Lestaurtinib, Sorafenib, Semaxanib, Sunitib, Tandutinib, KW-2449 e AC220 em ensaios fase I e II. Quando usados em monoterapia, embora essas drogas tenham reduzido a massa leucêmica, a porcentagem de pacientes que atingiram remissão completa foi pequena. Aqueles pacientes que experimentaram uma melhoria na resposta hematológica mostraram uma diminuição de blastos em sangue periférico ainda menor em medula óssea. Além disso, as respostas obtidas tiveram uma duração de semanas a meses(12).

O ensaio clínico fase III RATIFY recrutou pacientes entre 18 e 59 anos de idade com diagnóstico de LMA e com mutação no receptor FLT3 (*FLT3-ITD* ou *FLT3 TKD*) e comparou a efetividade da quimioterapia e da quimioterapia combinada com o inibidor do FLT3 Midostaurin (PKC412). A taxa de sobrevida global a 4 anos achada neste estudo foi de 51,4% no grupo Midostaurin versus 44,3% no grupo placebo ($p= 0,0074$, teste log-rank) (13). Embora a diferença observada entre os dois grupos tenha sido significativa, a baixa sobrevida global observada em ambos grupos demonstra que há uma necessidade médica não atendida. Por isso se faz necessária a pesquisa de novos inibidores de tirosina quinase mais potentes ou novas combinações que possam aumentar a efetividade destes inibidores.

1.5. O ácido trans-retinóico (ATRA) no tratamento de LMAs.

O ATRA é amplamente conhecido por induzir a diferenciação granulocítica dos promielócitos na LPA com *PML-RARA*, o que torna o clone leucêmico mais sensível à morte celular induzida pela quimioterapia. O efeito benéfico do ATRA em combinação com o inibidor de tirosina quinase do FLT3 sorafenib já foi reportado em três pacientes com LMA com a mutação *FLT3-ITD* e o gene *NPM1* mutado(14). Além disso, foi demonstrado que o ATRA em combinação com o sorafenib promove a eliminação das células tronco leucêmicas *in vitro* e *in vivo*. Neste mesmo trabalho, foi demonstrada a diminuição da fosforilação do fator de transcrição STAT3 no tratamento com ATRA e combinado com

sorafenib(15). Também já foi descrito que o tratamento com ATRA diminui a fosforilação e por tanto a ativação do fator de transcrição STAT3 em modelo animal de indução de carcinoma de pele (16). Ademais, já foi descrito que o ATRA tem capacidade de induzir a autofagia durante a diferenciação granulocítica(17). Por tanto, sabendo que os inibidores do FLT3 têm capacidade de induzir a mitofagia, explorar o papel da autofagia na potencialização da morte na combinação ATRA com inibidores de tirosina quinase do FLT3 é importante.

1.6. Justificativa

Dado o fato que existe uma necessidade clínica de melhorar a efetividade antileucêmica dos inibidores de tirosina quinase do FLT3, o objetivo deste estudo é estudar a interação entre os inibidores de tirosina quinase do FLT3 com o ATRA em células de LMA portadoras de mutações internas em tandem no gene *FLT3*.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

- Determinar se há interação, e em caso afirmativo determinar o mecanismo pelo qual o ATRA potencializaria a morte celular induzida pelos inibidores de tirosina quinase do FLT3 quizartinib (AC220) e Midostaurin (PKC412) em células de LMA portadoras de mutações internas em tandem no gene *FLT3* (LMA FLT3-ITD).

2.2. Objetivos específicos

- Determinar o tipo de interação entre ATRA e quizartinib (AC220) ou Midostaurin (PKC412) no tratamento *in vitro* de células de LMA FLT3-ITD positivas.
- Determinar o efeito do ATRA nas vias de sinalização ativadas pelo receptor FLT3 em células de LMA FLT3-ITD positivas tratadas com a combinação dessas drogas.
- Determinar se tratamento combinado modifica a autofagia em células de LMA FLT3-ITD positivas tratadas com ATRA, inibidor do FLT3 ou com a combinação dessas drogas.
- Determinar se tratamento combinado modifica a ativação do fator de transcrição STAT3 em células de LMA FLT3-ITD positivas tratadas com ATRA, inibidor do FLT3 ou com a combinação dessas drogas.
- Avaliar a expressão de genes pro e anti-apoptóticos envolvidos no processo de morte celular programada em células de LMA FLT3-ITD positivas tratadas com ATRA, inibidor do FLT3 ou com a combinação dessas drogas.
- Avaliar o efeito *in vivo* da combinação de AC220 com ATRA em modelo murino de xenotransplante com células de LMA FLT3-ITD positivas.

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Linhagens celulares

Foram utilizadas as linhagens celulares MOLM-13, MV4-11 e THP-1 que foram mantidas em médio RPMI 1640 com 10% soro bovino fetal e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina.

3.2. Drogas

Os inibidores de tirosina quinase do FLT3 utilizados foram o AC220 (Selleckchem) e o PKC412 (Sigma-Aldrich). O ATRA utilizado foi adquirido da Sigma-Aldrich junto com o inibidor do fluxo autofágico Bafilomicina.

3.3. Ensaio de morte celular TMRM.

Tetramethylrhodaminemethylester (TMRM) é uma sonda fluorescente com carga global positiva que atravessa a membrana celular e é sequestrada na matriz mitocondrial das células viáveis carregada negativamente, emitindo uma fluorescência vermelha captada no canal FL-2 quando excitada com um laser de 488 nm. Ao iniciar o processo de morte celular programada, ocorre uma perda do potencial de membrana mitocondrial a causa da permeabilização da membrana interna da mitocôndria. Consequentemente, o TMRM foge da matriz mitocondrial o que se traduz numa perda da fluorescência no canal FL-2. Por tanto, a perda do potencial de membrana medido pela perda da fluorescência da sonda TMRM permite identificar a população de células no início da morte celular programada (Figura 1). A sonda TMRM foi utilizada junto com o cloridrato de verapamil a fim de bloquear as bombas responsáveis nas células viáveis de expulsar o TMRM para fora da célula. A leitura das amostras foi realizada no citometro FACS Calibur (Becton Dickinson).

Figura 1. Morte celular mediada pela sonda TMRM de células da linhagem MOLM-13 tratadas durante 18 horas com o inibidor de tirosina quinase FLT3 AC220 numa concentração de 5 nM.

3.4. Ensaio de morte celular Anexina V e Iodeto de Propídio (PI).

O ensaio de morte celular Anexina V e PI permite identificar as células que iniciaram o processo de apoptose e distingui-las daquelas células em necrose. As células viáveis apresentam o fosfolípido fosfatidilserina na camada interna da membrana celular. Uma vez iniciado o processo de apoptose, a fosfatidilserina se transloca para a camada externa da membrana celular. A Anexina V, proteína anticoagulante, apresenta uma ligação cálcio dependente de alta afinidade à fosfatidilserina e quando combinada com o fluoróforo, como fluoresceína (FITC) ou AlexaFluor 488, permite a detecção das células que iniciaram o processo de apoptose por citometria de fluxo. O Iodeto de Propídio é um composto fluorescente que liga ao DNA de células já mortas enquanto é impermeável nas células viáveis. Combinado com a Anexina V permite a identificação de células em apoptose precoce (células Anexina V positivas), células em apoptose tardia (células Anexina V e PI positivas) e células em necrose (PI positivas). Desta forma é possível avaliar efeitos das drogas e as respectivas combinações na morte celular programada. A leitura das amostras foi realizada no citometro FACS Calibur (Becton Dickinson).

3.5. Western Blot.

Para extração de proteínas foi utilizado o tampão de lise de proteína 1 % SDS, 1 mM vanadato de sódio e 10 mM Tris pH 7,4. A cada 1 mL deste tampão de lise de proteína foi agregado 20 microlitros de coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich), 40 microlitros de fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) 0,1 M (Sigma-Aldrich) e 10 microlitros de inibidor de fosfatases (Thermo Fischer Scientific). Para a quantificação de proteínas foi utilizado o kit *DC™ Protein Assay* (Biorad) junto com uma curva de diluições padrão de BSA de 0,2 mg/mL a 2 mg/mL. A corrida das proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida a 60 V durante 30 minutos e depois a 110 V durante 90 minutos. A transferência foi realizada a 200 mA durante 1 hora e 30 minutos para membrana de PVDF (GE HealthcareAmersham). Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau para conferir a presença das proteínas digitalizadas para posterior quantificação pelo software ImageJ. Posteriormente, o Ponceau foi retirado mediante lavagem e as membranas foram bloqueadas durante 1 hora em leite desnatado 5% diluída em PBS 1X-Tween 0,05%. A continuação, a incubação com anticorpos primários foi feita durante a noite e os anticorpos primários utilizados foram caspase 9 (Cell Signalling #9508), caspase 3 clivada (Cell Signalling #9664), caspase 8 (MBL #MO32-3), pFLT3 (Cell Signalling #3464), FLT3 (Cell Signalling #3462), pStat5 (Cell Signalling #9359), Stat5 (Santa Cruz #sc-836), pERK1/2 (Cell Signalling #9101), ERK1/2 (Cell Signalling #9102), p-4E-BP1 (Cell Signalling #9459), 4E-BP1 (Cell Signalling #9452), LC3 (anticorpo feito *in house*), Beclin-1 (BD Pharmingen#612112), pStat3 (Cell Signalling #9134) e Stat3 (Santa Cruz #sc-7179). Após lavagem dos anticorpos primários, foi feita a incubação com anticorpo secundário diluído em leite desnatado 5% (Jackson Immuno Research, coelho #111-035-003 ou camundongo #115-035-174, de acordo com anticorpo primário utilizado) durante 1 hora. A revelação foi feita com ECL™ (GE Healthcare Amersham) ou com Super Signal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fischer Scientific) no

FUSION FX7 (Fisher BioblockScientific). Para quantificação das bandas foi utilizado o software ImageJ.

3.6. Fracionamento porção citoplasmática

Para análise da liberação do citocromo C na porção citoplasmática, foi feita a extração de proteínas com um tampão contendo 250 mM de sacarose, 70 mM de KCl, 137 mM de NaCl, 4,3 mM de Na₂HPO₄, 1,4 mM de KH₂PO₄ (pH 7,2), 200 µg/mL de Digitonina, 2 mM de PMSF e 1% de coquetel de inibidores de proteases. Foi colocado o tampão de extração de acordo com tamanho do pellet coletado e a amostra foi colocada em gelo durante 5 minutos. A continuação, as amostras foram centrifugadas a 1000 g durante 5 minutos e a 4 °C. O sobrenadante obtido após centrifugação corresponde à fração citoplasmática. A continuação, foi feita a quantificação, corrida e transferência de proteínas da fração citoplasmática como já descrito na secção anterior (3.5. Western Blot). As membranas foram incubadas overnight com os seguintes anticorpos primários: citocromo C (BD #556433), tubulina (Sigma-Aldrich #T9026) e Tom20 (Santa Cruz #sc-11415). Após lavagem dos anticorpos primários, foi feita a incubação com anticorpo secundário diluído em leite desnatado 5% (Jackson Immuno Research, coelho #111-035-003 ou camundongo #115-035-174, de acordo com anticorpo primário utilizado) durante 1 hora. A revelação foi feita com ECL™ (GE Healthcare Amersham) ou com Super Signal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fischer Scientific) no FUSION FX7 (Fisher Bioblock Scientific). Para quantificação das bandas foi utilizado o software ImageJ.

3.7. Análise de sinergismo.

A análise do sinergismo foi feita com o programa *CompuSyn* desenvolvido por *Chou* (18). Foi calculado o índice combinatório (*Combination Index*, CI) para determinar o grau de sinergismo. Em base ao valor obtido para o CI, a combinação pode ser classificada como sinérgica (CI < 1), aditiva (CI = 1) ou antagônica (CI > 1).

3.8. Experimentos *in vivo*.

Camundongos machos *Nod Scid Gamma* (NSG) com idades entre 10 e 11 semanas foram transplantados com 1×10^6 células da linhagem MOLM-13 transfetadas com luciferase via veia caudal. Sete dias após o transplante, a presença das células transplantadas foi avaliada mediante injeção de luciferina 150 mg/kg (Caliper #122796, Perkin-Elmer) e posterior detecção do sinal de luz no equipamento IVIS. Os animais que apresentaram sinal localizados nas patas traseiras e no externo, foram classificados de acordo com o sinal medido em fótons/segundos (p/s) nas seguintes categorias: A) Sinal entre 1×10^6 e 2×10^6 p/s, B) Sinal entre 2×10^6 e 4×10^6 p/s, C) Sinal 4×10^6 e 6×10^6 p/s e D) Sinal 6×10^6 e 9×10^6 p/s. Os animais dentro de cada categoria foram randomizados por sorteio para os seguintes grupos de tratamento: A) Controle (n=5), B) AC220 (n=6), C) ATRA (n=6) e D) Combinação (n=6). O tratamento foi iniciado 9 dias após o transplante. O AC220 foi administrado via gavagem oral durante 18 dias, com pausa a cada três dias, numa concentração de 1 mg/kg diluído em 50% DMSO e 50% PBS 1X. Para facilitar a administração via oral, a ponta da sonda utilizada foi previamente submergida em óleo de oliva. O ATRA foi administrado mediante injeção via intraperitoneal durante 23 dias numa concentração de 1,5 mg/kg diluído em 16% DMSO e 84% PBS1X. O grupo controle recebeu gavagem oral e injeção via intraperitoneal com os respectivos veículos enquanto o grupo AC220 recebeu injeção intraperitoneal com veículo e o grupo ATRA recebeu gavagem oral com veículo. O seguimento foi realizado pelo IVIS e ao momento do sacrifício foram coletados sangue periférico, medula óssea e baço para medição do CD45 humano por e CD45.1 murinocitometria de fluxo. Todos os procedimentos e protocolos aplicados aos animais foram feitos com aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais (Anexo I).

Resultados

4. Resultados

4.1. ATRA e FLT3-TKIs em combinação induzem de forma precoce a morte celular quando comparado com o tratamento com FLT3-TKIs em linhagem celular MOLM-13 e MV4-11.

Células da linhagem MV4-11 e MOLM-13 foram tratadas com AC220, ATRA e a combinação das duas drogas nas concentrações descritas na Tabela 2 durante 24 horas. Posteriormente, a morte celular foi medida pelo ensaio TMRM.

Tabela 2. Concentrações de AC220 e ATRA junto com as combinações utilizadas nos ensaios de morte celular.

Concentrações AC220	Concentrações ATRA	Combinações
1 nM	1 µM	5 nM AC220 + 1 µM ATRA
2,5 nM	2,5 µM	1 nM AC220 + 1 µM ATRA
5 nM	5 µM	2,5 nM AC220 + 2,5 µM ATRA
7,5 nM		5 nM AC220 + 5 µM ATRA
10 nM		

A análise pelo CI mostrou sinergismo para todas as combinações testadas tanto na linhagem MV4-11 como na linhagem MOLM-13 (Figura 2A). A dose efetiva 50% (ED50) AC220 foi reduzida no tratamento combinado de 14,52 nM para 2,63 nM na linhagem MV4-11 e de 10,04 nM para 3,27 nM na linhagem MOLM-13. Estes resultados indicam que a combinação apresenta efeito sinérgico.

A percentagem de células mortas (citotoxicidade), medida pela perda do potencial de membrana mitocondrial, foi maior nas células tratadas com a combinação, sendo que a diferença foi significativa em todos os períodos de incubação superiores a 8 horas para a linhagem MV4-11 e maiores que 7 horas para a linhagem MOLM-13 (Figura 2B). Conforme o tempo de tratamento foi aumentando foi observada maior

frequência de morte celular na combinação tanto para a MV4-11 como para a MOLM-13 (Figura 2C).

A continuação, foi medida a liberação do citocromo C na fração citosólica por western blot. Com 14 horas de incubação, foi observada maior liberação do citocromo C nas amostras tratadas com a combinação tanto para a linhagem MV4-11 como para a MOLM-13 em relação ao tratamento só como AC220 (Figura 2D). Este aumento observado na liberação do citocromo C esteve acompanhado do aumento da caspase 3 clivada (Figura 2E). Estes resultados indicam que o tratamento combinado induz a ativação da morte celular programada de forma mais precoce que o tratamento só com AC220.

Levando em consideração que a combinação induz de forma precoce a morte celular programada mediante liberação do citocromo C e ativação da caspase 3 efetora, foi testado o efeito do inibidor de caspases QVD. Para isso, foi realizado um pré-tratamento de 2 horas com 10 μ M de QVD ou só meio (controle veículo) seguido de 18 horas de tratamento controle (DMSO 0,2%), AC220 5 nM, PKC412 50 nM, ATRA 1 μ M e as combinações dos dois FLT3 TKIs com ATRA. O pré-tratamento com QVD diminui a indução de morte celular para todos os tratamentos e principalmente para os tratamentos combinados tanto na linhagem MV4-11 como na MOLM-13 (Figura 2F). Estes resultados indicam que a ativação de caspases é importante na morte precoce observada no tratamento combinado.

Com o objetivo de determinar qual via de morte celular se encontra preferencialmente ativada nas amostras incubadas com as duas drogas foram avaliadas por western blot a ativação da caspase 9 (via intrínseca) e caspase 8 (via extrínseca). Foi observado clivagem da caspase 9 em todas as condições testadas (Figura 2G). Os tratamentos diferiram quanto a quantidade de procaspase 9, cuja diminuição foi mais acentuada nas amostras tratadas com a combinação. Esta diferença foi detectada em amostras incubadas por 6 horas ou mais tanto para MV4-11 como para a MOLM-13. Em relação ao o tratamento com ATRA, houve um aumento da procaspase 9 a partir de 14 horas de tratamento. Esse aumento foi também observado para procaspase 8. Enquanto a ativação

da caspase 8, não foi observada a clivagem desta caspase. Estes resultados serão verificados por outra metodologia com o objetivo de definir melhor qual das duas vias, intrínseca ou extrínseca, está envolvida na morte celular precoce observada para a combinação.

Figura 2. A) Análise do sinergismo nas linhagens MV4-11 e MOLM-13. B) Morte celular medida pela perda do potencial de membrana mitocondrial nas linhagens MV4-11 e MOLM-13 nos tratamentos controle (DMSO 0,2%), AC220 5 nM, PKC412 100 nM, ATRA 1 µM e as combinações de FLT3-TKIs com ATRA (Meia ± Desvio Padrão). C) Morte celular progressiva medida pela perda do potencial de membrana mitocondrial para AC220 5 nM, ATRA 1 µM e o tratamento combinado. D) Liberação do citocromo C na fração citosólica (quantificação feita pelo ImageJ em relação à tubulina) e (E) clivagem da Caspase 3 medida por Western Blot nas condições controle, AC220 5 nM, ATRA 1 µM e combinação a partir de 6 e 14 horas de tratamento. F) Morte celular medida nos diferentes tratamentos logo do pré-tratamento sem e com inibidor de caspases QVD (Meia ± Desvio Padrão). G) Western Blot das caspases 8 e 9 depois de 6 e 14 horas de tratamento nas linhagens MV4-11 e MOLM-13.

4.2. ATRA não apresenta efeito na fosforilação do receptor FLT3-ITD.

Foi avaliado por western blot a fosforilação do receptor FLT3-ITD nos diferentes tratamentos por 6 e 14 horas nas linhagens MV4-11 e MOLM-13 (Figura 3A). Como esperado, AC220 diminui a fosforilação do receptor quando usado individualmente e na combinação. Por outro lado, ATRA não apresentou efeito na diminuição da fosforilação do receptor FLT3-ITD. O fator de transcrição Stat5, alvo direto do receptor FLT3-ITD, e o ERK1/2 mostraram padrões de fosforilação similares aos achados para o receptor FLT3-ITD nos diferentes tratamentos (Figura 3B e 3C). Finalmente, a via de sinalização AKT foi avaliada através da proteína 4E-BP1 (*Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*), alvo direto do complexo mTOR1 (*mammalian target of rapamycin 1*) que por sua vez é ativado através da via de sinalização AKT. A proteína 4E-BP1 é fosforilada pelo complexo mTOR1 ativado, promovendo a dissociação desta proteína do fator eucariota de iniciação da tradução de proteínas eIF4E. Portanto, quando AKT se encontra ativado, o complexo mTOR1 também se encontra ativado e fosforila a proteína 4E-BP1(19). O tratamento só com AC220 ou em combinação diminui a fosforilação da proteína 4E-BP1 mas o tratamento com ATRA não mostrou efeito na fosforilação desta proteína (Figura 4D). Em resumo, estes resultados indicam que o efeito sinérgico observado para a combinação de ATRA com o FLT3-TKI AC220 não está relacionado com algum efeito nas vias de sinalização ativadas pelo receptor FLT3 mutado.

Figura 3. Western blot dos alvos do receptor FLT3 mutado (A): Stat5 (B), ERK1/2 (C) e 4E-BP1 (D) nas linhagens MV4-11 e MOLM-13 após 6 e 14 horas de tratamento.

4.3. A inibição do fluxo autofágico favorece a morte celular no tratamento com inibidores de tirosina quinase do FLT3 e no tratamento combinado com ATRA.

Já foi descrita a indução da mitofagia pelos inibidores de tirosina quinase do FLT3 bem como a indução da autofagia pelo ATRA durante a diferenciação granulocítica dos promielócitos da LPA. Portanto, para pesquisar o rol da autofagia no tratamento combinado foi avaliada a morte celular pelo ensaio de TMRM nos diferentes tratamentos em presença ou ausência do inibidor do fluxo autofágico bafilomicina numa concentração de 10 nM. De fato, a inibição do fluxo autofágico incrementou a morte celular principalmente no tratamento com inibidor de tirosina quinase FLT3 e no tratamento combinado (Figura 4A). Paralelamente foi realizado um western blot para avaliar a efetividade da concentração de 10 nM de Bafilomicina (Figura 4B). O aumento do LC3-II observado na presença da bafilomicina indica que existe um acúmulo de autofagossomos e que a concentração utilizada foi efetiva para inibir o fluxo autofágico. Foi também feito a análise por western blot da proteína Beclin-1, envolvida no início e regulação do processo de autofagia, nas condições controle, AC220, ATRA e tratamento combinado (Figura 4C). Foi observado um aumento da clivagem da proteína Beclin-1 na combinação em relação ao controle e aos outros tratamentos. A ativação de caspases pode mediar a clivagem de Beclin-1 promovendo a inativação da autofagia e o incremento do processo de apoptose pela via intrínseca. Portanto, a autofagia poderia estar associada à resistência ao tratamento no modelo de LMA com mutação *FLT3-ITD*.

Figura 4. A) Efeito da inibição do fluxo autofágico na linhagem MOLM-13 nas condições controle, tratamento com inibidor de tirosina quinase FLT3, ATRA e a combinação medido pela perda de potencial de membrana mitocondrial (Meia $\pm$ Desvio Padrão). B) Western blot que demonstra que a concentração de Bafilomicina 10 nM induz uma inibição do fluxo autofágico medido pelo aumento do LC3-II na linhagem MOLM-13. C) Western blot da proteína Beclin-1 na linhagem MOLM-13 nas condições controle, AC220, ATRA e combinação.

4.4. O tratamento com o FLT3-TKI AC220 aumenta a fosforilação do Stat3 mas o ATRA e o tratamento combinado não apresentam aumento na fosforilação do Stat3.

Com o objetivo de avaliar o efeito do ATRA e do tratamento combinado na fosforilação e consequente ativação do fator de transcrição Stat3, células MV4-11 e MOLM-13 foram tratadas durante duas horas com veículo (DMSO 0,2%), AC220 5 nM, ATRA 1 μ M e a combinação das duas drogas. Antes de acabar os respectivos tratamentos, foi adicionada interleucina 6 (10 ng/mL) durante 15 minutos. Após, as células foram coletadas e processadas para análise por western blot. Esta análise mostrou que o tratamento com AC220 aumenta a fosforilação do Stat3 (Figura 5). Por outro lado, o tratamento com ATRA diminui discretamente a fosforilação do Stat3 e a combinação manteve níveis de fosforilação similares aos controles. Estes resultados indicariam que na combinação do AC220 com o ATRA, o ATRA poderia estar impedindo o aumento da

fosforilação e consequente ativação do Stat3 observado no tratamento só com AC220.

Figura 5. Western blot do fator de transcrição Stat3 nas linhagens MV4-11 e MOLM-13 após 2 horas de tratamento e 15 minutos de estimulação com Interleucina 6.

4.5. Resultados *in vivo*.

Os resultados *in vivo* mostraram que o tratamento combinado aumenta a sobrevida dos animais tratados (Figura 6A). O aumento da sobrevida foi estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) e o grupo ATRA ($p < 0,01$) (Figura 6B). A análise do CD45 humano (huCD45) por citometria mostrou menor percentagem de células huCD45 positivas para o tratamento combinado tanto em medula óssea como no baço e no sangue periférico (Figura 6C). Por último, a proporção de CD45 humano em relação ao CD45.1 murino foi menor em medula óssea para o tratamento combinado em relação aos demais tratamentos (Figura 6D). Mesmo que o aumento da sobrevida do grupo tratamento combinado não foi significativo em relação ao grupo AC220, estes resultados indicam que o tratamento combinado contribui para uma desaceleração da progressão da doença.

Figura 6. Resultados *in vivo*: A) Curvas de sobrevivência para os grupos de tratamento controle, AC220, ATRA e Combinação. B) Comparação das médias de sobrevivência (média ± desvio padrão) em dias pelo teste ANOVA e post teste de Tuckey (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). C) Percentagem de células positivas para CD45 humano (huCD45) em medula óssea, baço e sangue periférico (Mediana com rango). D) Percentagem de células positivas para CD45 humano (huCD45) e CD45.1 murino (mCD45) em medula óssea, baço e sangue periférico para os grupos de tratamento controle, AC220, ATRA e combinação (média ± erro padrão da média).

Discussão

5. Discussão

A partir dos resultados obtidos, foi demonstrado que o ATRA favorece a potencialização da morte celular induzida pelos inibidores do FLT3 em modelo de LMA *FLT3-ITD*⁺ mediante uma ativação precoce da morte celular programada pela via intrínseca. Baseado nos dados disponíveis na literatura em relação a indução da mitofagia pelos inibidores do FLT3 e a indução de autofagia pelo ATRA durante a diferenciação granulocítica, foi decidido testar o efeito da inibição do fluxo autofágico na morte celular provocada pelos inibidores de tirosina quinase do FLT3 e em combinação com o ATRA afim de determinar se a autofagia seria responsável da potencialização da morte celular no tratamento combinado. Contrariamente ao esperado, a inibição do fluxo autofágico favoreceu o incremento da morte celular. Estes dados concordam com o trabalho recentemente publicado por Mansat-De Mas *et al*(20) que argumenta que a via de sinalização FLT3-ITD aumenta a autofagia basal pela via ATF4, portanto o fluxo autofágico teria um rol de sobrevivência e atuaria como mecanismo de resistência ao tratamento. Nossos dados mostram maior clivagem da proteína Beclin-1 no tratamento combinado. A clivagem da proteína Beclin-1 pela caspase-3 leva à inativação da autofagia e promove a apoptose (21). Por tanto, o tratamento combinado ao promover a ativação das caspases da via intrínseca de forma mais precoce, promove a inibição da autofagia basal e induz a morte celular. Então, dado que autofagia não está envolvida na potencialização da morte celular no tratamento combinado, foi considerada a possibilidade de que essa potencialização esteja ligada a inibição do fator de transcrição STAT3 pelo ATRA. Já foi descrito que o tratamento com ATRA diminui a fosforilação e por tanto a ativação do fator de transcrição STAT3 em modelo animal de indução de carcinoma de pele (16). O ATRA também já foi testado em combinação com o inibidor do FLT3 sorafenib e foi capaz de diminuir a fosforilação do STAT3 quando utilizado individualmente e na combinação com sorafenib(15). Porém, o resultado obtido no tratamento com AC220 e em combinação com ATRA, não mostraram de forma conclusiva o efeito do ATRA na ativação Stat3. O fato do AC220 aumentar a fosforilação do Stat3 enquanto o ATRA e o tratamento combinado conseguem manter o nível de

fosforilação similar ao o controle, precisa ser aprofundado. Por outro lado, o resgate da morte celular observado com o pré-tratamento com QVD, principalmente no tratamento combinado, leva a considerar a possibilidade de aprofundar ainda mais por outras metodologias o perfil de expressão de proteínas pro e antiapoptóticas.

Enquanto aos resultados *in vivo*, o tratamento combinado aumentou a sobrevivência dos animais e contribuiu para diminuição de células leucêmicas em medula óssea, baço e sangue periférico.

O resgate da morte celular observado no pré-tratamento com QVD indicaria que o ATRA no tratamento combinado poderia estar contribuindo na regulação de componentes pro e antipoptóticos envolvidos na morte celular programada. Para testar esta hipótese, células de modelo murino de leucemia mieloide aguda *Flt3 ITD^{wt/+} MLLPTD^{wt/+}* desenvolvidas e doadas por *Caligiuri et al*(22) da Universidade de Ohio (Anexo II: Aprovação da Comissão Interna de Biosegurança), serão tratadas e depois analisadas mediante o kit de *Apoptosis RT² Profiler PCR Array* (Qiagen) que avalia a expressão de genes envolvidos na indução de apoptose, genes anti-apoptóticos, genes que codificam para receptores com domínios de morte assim como caspases e outros reguladores da morte celular programada.

Bibliografia

6. Bibliografia

1. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th Edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008. 439 p.
2. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British Journal of Haematology*. 1976;33(4):451–8.
3. Classification of Acute Leukemias. In: *Treatment of Acute Leukemias New Directions for Clinical Research*. 1º ed New York: Humana Press; 2003. p. XVI, 562. (Ching-Hon Pui. *Current Clinical Oncology*).
4. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting—Airlie House, Virginia, November 1997. *Journal of Clinical Oncology*. dezembro de 1999;17(12):3835–49.
5. aml.pdf [Internet]. [citado 17 de julho de 2018]. Disponível em: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/aml.pdf
6. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391.
7. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* [Internet]. 2016; Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/early/2016/11/28/blood-2016-08-733196.abstract>
8. Meshinchi S, Appelbaum FR. Structural and Functional Alterations of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2009;15(13):4263.
9. Fathi A, Levis M. FLT3 inhibitors: a story of the old and the new. *Current Opinion in Hematology* [Internet]. 2011;18(2). Disponível em: https://journals.lww.com/co-hematology/Fulltext/2011/03000/FLT3_inhibitors__a_story_of_the_old_and_the_new.2.aspx
10. Chen Y, Pan Y, Guo Y, Zhao W, Ho WT, Wang J, et al. Tyrosine kinase inhibitors targeting FLT3 in the treatment of acute myeloid leukemia. *Stem Cell Investigation*; June 2017 [Internet]. 2017 [citado 1º de janeiro de 2017]; Disponível em: <http://sci.amegroups.com/article/view/15086>
11. Dany M, Gencer S, Nganga R, Thomas RJ, Oleinik N, Baron KD, et al. Targeting FLT3-ITD signaling mediates ceramide-dependent mitophagy and attenuates drug resistance in AML. *Blood*. 2016;128(15):1944.

12. Kindler T, Lipka DB, Fischer T. FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years. *Blood*. 2010;116(24):5089.
13. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med*. 2017;377(5):454–64.
14. Guenounou Sarah, Delabesse Eric, Récher Christian. Sorafenib plus all-trans retinoic acid for AML patients with FLT3-ITD and NPM1 mutations. *European Journal of Haematology*. 2014;93(6):533–6.
15. Ma HS, Greenblatt SM, Shirley CM, Duffield AS, Bruner JK, Li L, et al. All-trans retinoic acid synergizes with FLT3 inhibition to eliminate FLT3/ITD+ leukemia stem cells in vitro and in vivo. *Blood*. 2016;127(23):2867.
16. Syed Z, Cheepala SB, Gill JN, Stein J, Nathan CA, DiGiovanni J, et al. All-Trans Retinoic Acid Suppresses Stat3 Signaling during Skin Carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009;2(10):903.
17. Trocoli A, Mathieu J, Priault M, Reiffers J, Souquère S, Pierron G, et al. ATRA-induced upregulation of Beclin 1 prolongs the life span of differentiated acute promyelocytic leukemia cells. *Autophagy*. 2011;7(10):1108–14.
18. Chou T-C. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacol Rev*. 2006;58(3):621.
19. Dibble CC, Cantley LC. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends in Cell Biology*. 1º de setembro de 2015;25(9):545–55.
20. Heydt Q, Larrue C, Saland E, Bertoli S, Sarry J-E, Besson A, et al. Oncogenic FLT3-ITD supports autophagy via ATF4 in acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2017;37:787.
21. Zhu Y, Zhao L, Liu L, Gao P, Tian W, Wang X, et al. Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis. *Protein & Cell*. 2010;1(5):468–77.
22. Zorko NA, Bernot KM, Whitman SP, Siebenaler RF, Ahmed EH, Marcucci GG, et al. Mll partial tandem duplication and Flt3 internal tandem duplication in a double knock-in mouse recapitulates features of counterpart human acute myeloid leukemias. *Blood*. 2 de agosto de 2012;120(5):1130–6.

Anexos

7. Anexos

Anexo I: Aprovação Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 049/2014, sobre o projeto intitulado "*Análise do mitocan alfa-tocoferol no modelo animal de leucemia mieloide aguda associada à mutação Flt3 ITD*", sob a responsabilidade do **Professor Doutor Eduardo Magalhães Rego** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 24 de novembro de 2014.

We certify that the protocol nº 049/2014, entitled "*Analysis of mitocan alpha tocopherol in an animal model of acute myeloid leukemia associated with the Flt3 ITD mutation*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 11/24/2014.

Ribeirão Preto, 24 de novembro de 2014.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da CEUA – FMRP – USP

Anexo II: Aprovação Comissão Interna de Biossegurança (CIBio).

Fundação
Hemocentro RP

Ribeirão Preto, 05 de agosto de 2014.

O projeto de pesquisa intitulado "Análise do mitocan (+)a-Tocopherol succinato no modelo animal de leucemia mieloide aguda associada à mutação FLT3 ITD", em nome de Sílvia Elena Sánchez Mendoza, técnico principal Prof^o Dr^o Eduardo Magalhães Rego, foi avaliado por esta Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), recebendo o parecer **APROVADO** e registrado sob número de processo: **297/2014.011-01**.

Lembramos que deverá ser apresentado a CIBio, o relatório final da pesquisa.

Simone Kashima Haddad

Presidente da CIBio

Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

Ilustríssimo Senhores

Sílvia Elena Sánchez Mendoza

Prof^o Dr^o Eduardo Magalhães Rego