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

JAQUELINE CRISTINA FERNANDES

**Investigação da participação do IRS1 na via de sinalização da β -catenina na
leucemia linfóide aguda**

Ribeirão Preto - SP

2016

JAQUELINE CRISTINA FERNANDES

**Investigação da participação do IRS1 na via de sinalização da β -catenina na
leucemia linfóide 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: Diferenciação Celular
Normal e Neoplásica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabíola Traina

Ribeirão Preto - SP

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

Fernandes, Jaqueline Cristina

Investigação da participação do IRS1 na via de sinalização da β -catenina na leucemia linfóide aguda - Ribeirão Preto, 2016.

92 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Área de concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica.

Orientadora: Traina, Fabíola

1.IRS1 2. β -catenina 3.Leucemia Linfóide Aguda

4.Vias de sinalização

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

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

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP
(Bolsa de mestrado - FAPESP 2013/26213-0; maio/2014 a abril/2016)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP - USP)
- Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP)
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular (INCTC)
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA - HCFMRP - USP).

Nome: FERNANDES, Jaqueline Cristina

Título: Investigação da participação do IRS1 na via de sinalização da β -catenina na leucemia linfóide aguda

Dissertação apresentada à Faculdade Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof.Dr: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof.Dr: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais, pelo incentivo constante durante toda minha vida e por toda confiança depositada em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde para realizar este trabalho e por estar comigo em todos os momentos.

À minha família, meu pai Carlos, minha mãe Silvana e minha irmã Nathália, por todo apoio e amor.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Fabíola Traina, pela confiança e oportunidade de desenvolver este trabalho. Agradeço a dedicação e todos os ensinamentos, que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos docentes do laboratório de hematologia, Prof. Dr. Roberto Passeto Falcão, Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego, Profa. Dra. Belinda Pinto Simões e Prof. Dr. Rodrigo T. Calado, agradeço a oportunidade e recursos que permitiram a realização deste projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular, em especial aos Professores Coordenadores e secretárias, pelo apoio acadêmico e serviço burocrático.

À Ana Sílvia Gouvêa, Adriana Oliveira, Amélia Góes, Josiane Schiavinato, Bárbara Santana Lemos, Priscila Scheucher e Danielle Magalhaes, pela paciência, disposição e ajuda nos experimentos.

Às amigas do laboratório de citogenética, Virgínia Lipoli, Diva Hodniki e Ivana Barizza, pela amizade, disposição e ajuda.

Aos amigos João, Renata, Ana Paula, Fernanda e Bruna, pela amizade, ensinamentos, conselhos e apoio durante essa importante etapa da minha vida.

Aos amigos do laboratório de hematologia e agregados, Fernanda, Silvia, Raquel, Flávia, Gustavo, Flor, André, João Paulo, Lílian, Diego, Juan, Mariane, Keli, pela amizade, troca de experiências, e por tornar a caminhada bem mais divertida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudo.

*“Se você encontrar um caminho sem obstáculos,
ele provavelmente não leva a lugar nenhum.”*

Frank A. Clark

RESUMO

FERNANDES, J.C. **Investigação da participação do IRS1 na via de sinalização da β -catenina na leucemia linfóide aguda.** 2016, 92f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A leucemia linfóide aguda (LLA) compreende um grupo heterogêneo de neoplasias caracterizadas por proliferação anormal e acúmulo de células imaturas na medula óssea, o que prejudica a produção de eritrócitos, leucócitos e plaquetas. O fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*insulin-like growth factor 1*; IGF1) e seu receptor (IGF1R) regulam o crescimento celular normal e contribuem para a transformação e crescimento de células malignas através da ativação de vias de sinalização intracelular. A via de sinalização do IGF1 é iniciada através da ativação de seu receptor seguido da ativação de seus substratos, incluindo o substrato 1 do receptor de insulina (*insulin receptor substrate 1*; IRS1). IRS1 é uma proteína predominantemente citosólica envolvida na transdução de sinal, e também desempenha um papel na transformação maligna, sendo altamente expresso em muitos tipos de câncer. Em fibroblastos de camundongos, *Irs1*, através da sinalização do *Igf1*, foi descoberto como uma proteína chave para a translocação nuclear da β -catenina e ativação da transcrição de seus genes alvos, como o *Myc* e a *ciclina D1*. *MYC* e *ciclina D1* podem atuar como oncogenes, contribuindo para o desenvolvimento de diversas neoplasias, inclusive as hematopoéticas. Deste modo, o objetivo deste projeto de pesquisa foi investigar a participação do IRS1 nuclear na via da β -catenina em LLA. Foram utilizadas no estudo linhagens celulares de LLA (Jurkat, MOLT4, Raji e Namalwa) e células hematopoéticas primárias de doadores normais (n=13) e de pacientes adultos com LLA (n=45) atendidos em nossa Instituição. Estudos de expressão gênica (PCRq), expressão, associação proteica (*western blotting*, imunoprecipitação) e localização celular (fracionamento subcelular e microscopia confocal) foram utilizados. Células da linhagem Jurkat foram submetidas à estimulação com IGF1 e/ou inibição farmacológica de IGF1R (OSI-906). Observamos elevada expressão gênica relativa de *IRS1*, β -catenina e *MYC* nos pacientes com LLA quando comparada aos controles normais ($p<0,05$), mas não houve diferença na expressão gênica de *ciclina D1* e *IGF1R* entre os dois grupos. Observamos uma correlação positiva entre a expressão gênica de β -catenina e *MYC* ($p=0.0004$; $r=0.50$), e entre a expressão de *IRS1* e *MYC* ($p=0.001$; $r=0.45$) na coorte de pacientes com LLA. Na análise univariada, idade e expressão de *MYC* correlacionaram-se

negativamente com a sobrevida global de pacientes com LLA; idade foi fator independente de prognóstico para a sobrevida. Em linhagens celulares de LLA (Jurkat, MOLT4, Raji e Namalwa), observamos co-localização de IRS1 e β -catenina no núcleo e no citoplasma. Em células primárias de doador normal, IRS1 e β -catenina localizaram-se predominantemente no citoplasma. Em células da linhagem celular Jurkat, observamos interação entre IRS1 e β -catenina e o estímulo com IGF1 provocou o aumento da fosforilação em tirosina de IRS1. O tratamento com OSI-906 diminuiu a fosforilação em tirosina de IGF1R, a translocação nuclear de β -catenina e a expressão proteica de MYC em células Jurkat. Em conclusão, nossos dados suportam uma relação entre a via de sinalização IGF1R/IRS1 e a ativação da β -catenina em leucemia linfóide aguda, o que pode representar um importante eixo de sinalização envolvido na fisiopatologia da doença.

Palavras-chave: IRS1, β -catenina, leucemia linfóide aguda, vias de sinalização.

ABSTRACT

FERNANDES, J.C. **Investigation of the role of IRS1 in the β -catenin signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia**. 2016, 92f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a heterogeneous group of malignancies characterized by abnormal proliferation and accumulation of immature cells in the bone marrow, which impairs the production of erythrocytes, leukocytes and platelets. Insulin-like growth factor 1 (IGF1) and its receptor (IGF1R) regulate normal cell growth and contribute to transformation and growth of malignant cells through activation of downstream signaling pathways. The IGF1 signaling pathway is initiated through activation of its receptor followed by activation of its substrates, including insulin receptor substrate 1 (IRS1). IRS1 is well known as a cytosolic protein involved in signal transduction, but also plays a role in malignant transformation, being highly expressed in many cancers. In mouse fibroblasts, *Irs1*, through *Igf1* signaling, was found to be the key protein for nuclear translocation of β -catenin and transcription activation of its target genes, such as *Myc* and *cyclin D1*. *MYC* and *cyclin D1* may act as oncogenes, contributing to the development of cancers, including hematopoietic neoplasm. Thus, the aims of this study were to investigate the role of nuclear IRS1 in the β -catenin pathway in LLA. We used in the study ALL cell lines (Jurkat, MOLT-4, Namalwa and Raji) and primary hematopoietic cells from healthy donors (n=13) and from adult patients with ALL (n=45) treated at our Institution. Studies of gene expression (qPCR), protein expression, association (Western blotting and immunoprecipitation) and cell location (subcellular fractionation and confocal microscopy) were used. Jurkat cells were submitted to IGF1 stimulation and/or IGF1R pharmacological inhibition (OSI-906). *IRS1*, β -catenin and *MYC* relative gene expression were significantly elevated in ALL patients compared to normal controls ($p<0.05$), but there was no difference in gene expression of *cyclin D1* and *IGF1R* between the two groups. A positive correlation between β -catenin and *MYC* relative expression ($p=0.0004$; $r=0.50$) and between *IRS1* and *MYC* expression ($p=0.001$; $r=0.45$) was found. Univariate analysis revealed that increasing age and elevated expression of *MYC* are factors that adversely affect the overall survival; age was an independent prognostic factor for survival. IRS1 and β -catenin co-localized in the nucleus and cytoplasm of ALL cell lines (Jurkat, MOLT4, Raji e Namalwa). In primary cell of normal donor, IRS1 and β -catenin were

found predominantly in the cytoplasm. In Jurkat cells, a constitutive IRS1 and β -catenin protein interaction was observed and IGF1 stimulation increased IRS1 tyrosine phosphorylation. OSI-906 treatment decreased IGF1R tyrosine phosphorylation, nuclear translocation of β -catenin and MYC protein expression in Jurkat cells. In conclusion, our data support a link between the signaling pathway IGF1R/IRS1 and activation of β -catenin in acute lymphoblastic leukemia, which may represent an important axis involved in the pathophysiology of the disease.

Keywords: IRS1, β -catenin, acute lymphoblastic leukemia, signaling pathway

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AKT - *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog*
APC - *Adenomatous polyposis coli*
BCR-ABL1 - *Breakpoint cluster region-abelson 1*
cDNA - *Complementary DNA*
CDK - *Cyclin dependent kinases*
CTH - *Células-tronco hematopoéticas*
CK1 - *Casein kinase 1 alpha 1*
DNA - *Desoxiribonucleic Acid*
DVL - *Dishevelled*
ERK - *Extracellular signal-regulated kinases*
ER α - *Estrogen receptor α*
ER β - *Estrogen receptor β*
FZD - *Frizzled*
GSK-3 β - *Glycogen synthase kinase 3 beta*
Grb2 - *Growth factor receptor-bound protein 2*
IGF1 - *Insulin-like growth factor 1*
IGF2 - *Insulin-like growth factor 2*
IGF1R - *Insulin-like growth factor 1 receptor*
IGHG1 - *Immunoglobulin heavy constant gamma 1*
IR - *Insulin receptor*
IRS - *Insulin receptor substrate*
IRS1 - *Insulin receptor substrate 1*
JCV - *John Cunningham virus*
LEF - *Lymphoid enhancer factors*
LLA - *Leucemia linfoide aguda*
LLC - *Leucemia linfoide crônica*
LMA - *Leucemia mieloide aguda*
LRP5/6 - *Lipoprotein receptor-related proteins*
MAPK - *Mitogen-activated protein kinases*
MLL - *Mixed Lineage Leukemia*
MYC - *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*

MO - Medula óssea
mRNA - *Messenger RNA*
mTOR - *Mechanistic target of rapamycin*
NK - *Natural killer*
NLS - *Nuclear localization sequence*
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
Ph – *Philadelphia*
PH - *Pleckstrin homology domain*
PI3K - *Phosphoinositide-3-kinase*
PPP – *Picropodophyllin*
PTB - *Phosphotyrosine binding domain*
RB - *Retinoblastoma protein*
RNA - *Ribonucleic Acid*
SP - Sangue periférico
SV40 - *Simian virus 40*
TCTH - Transplante de células tronco hematopoéticas
TCF3 - *Transcription factor 3*
TCF - *T-cell factor*
TLX1 - *T-cell leukemia homeobox 1*
TLX3 - *T-cell leukemia homeobox 3*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de sinalização IGF1R/IRS1 em células neoplásicas humanas e em fibroblastos embrionários de camundongos. (A) Em células neoplásicas humanas, a ligação do IGF1 ao seu receptor transmembrana IGF1R ativa seu substrato IRS1. IRS1 ativo atua como proteína transdutora de sinal e ativa vias de sinalização responsáveis pela síntese proteica e proliferação celular, incluindo a via da PI3K/AKT/mTOR e a via da MAPK. (B) Em fibroblastos embrionários de camundongos, o Irs1 ativo pode ligar-se à proteína de adesão β -catenina. A ligação de Irs1 a β -catenina favorecerá a translocação de ambas as proteínas para o núcleo e a adesão das mesmas a fatores de transcrição, o que induz a transcrição de genes que podem atuar como oncogenes, tais como o *MYC* e a *ciclina D1*. A Figura foi produzida utilizando *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).29

Figura 2. Via de sinalização WNT/ β -catenina. (A) Na ausência de WNT, β -catenina é degradada pelo complexo de proteínas GSK-3 β -Axina-APC-CK1, e seus genes alvos permanecem com a expressão reprimida. (B) Na presença de WNT, a degradação de β -catenina é reduzida, com consequente acúmulo da mesma no citoplasma, seguida de translocação para o núcleo, onde se liga a família de fatores de transcrição (TCF/LEF) e ativa a transcrição de genes alvos. A Figura foi produzida utilizando *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).....31

Figura 3. Δ Rn e ciclos de amplificação dos genes *IRS1* (A), *β -catenina* (B) *MYC* (C) e *ciclina D1* (D). Os genes foram amplificados eficientemente em todas as concentrações testadas. O eixo y indica o Δ Rn (intensidade de fluorescência) e o eixo x indica o número de ciclos.47

Figura 4. Curvas de dissociação dos iniciadores para *IRS1* (A), *β -catenina* (B), *MYC* (C) e *ciclina D1* (D) baseadas na temperatura de anelamento. A especificidade dos iniciadores é demonstrada por apenas um pico acentuado na curva de dissociação.48

Figura 5. Curvas de eficiência dos iniciadores para *IRS1* (A), *β -catenina* (B), *MYC* (C) e *ciclina D1* (D). A figura ilustra os 5 pontos obtidos no teste de eficiência. O eixo y indica o Ct e o eixo x a concentração do cDNA utilizado. A eficiência de cada iniciador foi calculada a partir da equação $\text{Eficiência} = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$. A eficiência de cada iniciador está indicada na figura.49

Figura 6. Expressão do RNAm de *IRS1* em células hematopoéticas de doadores normais e de pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA). PCRq foi realizado a partir de cDNA de células hematopoéticas de doadores normais (n=12) e de pacientes com diagnóstico de LLA (n=45). A expressão gênica do *IRS1* foi comparada entre os pacientes com LLA e controles (A), entre os pacientes com LLA B e LLA T (B), e entre os pacientes com LLA BCR-ABL1 negativo e LLA BCR-ABL1 positivo (C). O eixo “y” representa a intensidade de expressão do RNAm do *IRS1* relativa à expressão da β -actina. O RNAm de uma amostra de células da linhagem leucêmica Jurkat foi utilizada como amostra calibradora. As linhas horizontais representam a mediana. Como observado, a expressão do RNAm de *IRS1* foi maior nos pacientes com LLA quando comparado aos doadores normais, e maior nos pacientes com LLA BCR-ABL1 negativo quando comparado aos pacientes com BCR-ABL1 positivo. Não foram encontradas diferenças de expressão entre os subtipos LLA T versus LLA B; teste de *Mann-Whitney*.50

Figura 7. Expressão do RNAm de *IGF1R* em células hematopoéticas de doadores normais e de pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA). PCRq foi realizado a partir de cDNA de células hematopoéticas de doadores normais (n=7) e de pacientes com diagnóstico de LLA (n=45). A expressão gênica de *IGF1R* foi comparada entre os pacientes com LLA e controles (A), entre os pacientes com LLA B e LLA T (B), e entre os pacientes com LLA BCR-ABL1 negativo e LLA BCR-ABL1 positivo (C). O eixo “y” representa a intensidade de expressão do RNAm de *IGF1R* relativa à expressão da β -actina. O RNAm de uma amostra de células da linhagem leucêmica Jurkat foi utilizada como amostra calibradora. As linhas horizontais representam a mediana. Como observado, não foram

encontradas diferenças de expressão do RNAm de *IGF1R* entre os pacientes com LLA e doadores normais. Não foram encontradas diferenças de expressão entre os subtipos de LLA; teste de *Mann-Whitney*.51

Figura 8. Expressão do RNAm da β -catenina em células hematopoéticas de doadores normais e de pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA). PCRq foi realizado a partir de cDNA de células hematopoéticas de doadores normais (n=12) e de pacientes com diagnóstico de LLA (n=45). A expressão gênica da β -catenina foi comparada entre os pacientes com LLA e controle (A), entre os pacientes com LLA B e LLA T (B), e entre os pacientes com LLA BCR-ABL1 negativo e LLA BCR-ABL1 positivo (C). O eixo “y” representa a intensidade de expressão do RNAm da β -catenina relativo à expressão da β -actina. O RNAm de uma amostra de células da linhagem leucêmica Jurkat foi utilizada como amostra calibradora. As linhas horizontais representam a mediana. Como observado, a expressão do RNAm da β -catenina foi maior nos pacientes com LLA quando comparado aos doadores normais. Não foram encontradas diferenças de expressão entre os subtipos de LLA; teste de *Mann-Whitney*.52

Figura 9. Expressão do RNAm do MYC em células hematopoéticas de doadores normais e de pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA). PCRq foi realizado a partir de cDNA de células hematopoéticas de doadores normais (n=13) e de pacientes com diagnóstico de LLA (n=45). A expressão gênica do MYC foi comparada entre os pacientes com LLA e controle (A), entre os pacientes com LLA B e LLA T (B), e entre os pacientes com LLA BCR-ABL1 negativo e LLA BCR-ABL1 positivo (C). O eixo “y” representa a intensidade de expressão do RNAm do MYC relativo à expressão da β -actina. O RNAm de uma amostra de células da linhagem leucêmica Jurkat foi utilizada como amostra calibradora. As linhas horizontais representam a mediana. Como observado, a expressão do RNAm do MYC foi maior nos pacientes com LLA quando comparado aos doadores normais. Não foram encontradas diferenças de expressão entre os subtipos de LLA; teste de *Mann-Whitney*.53

Figura 10. Expressão do RNAm da ciclina D1 em células hematopoéticas de doadores normais e de pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA). PCRq foi realizado a partir de cDNA de células hematopoéticas de doadores normais (n=13) e de pacientes com diagnóstico de LLA (n=45). A expressão gênica da ciclina D1 foi comparada entre os pacientes com LLA e controles (A), entre os pacientes com LLA B e LLA T (B), e entre os pacientes com LLA BCR-ABL1 negativo e LLA BCR-ABL1 positivo (C). O eixo “y” representa a intensidade de expressão do RNAm da ciclina D1 relativa à expressão da β -actina. O RNAm de uma amostra de células da linhagem leucêmica Jurkat foi utilizada como amostra calibradora. As linhas horizontais representam a mediana. Como observado, não foram encontradas diferenças de expressão do RNAm da ciclina D1 entre os pacientes com LLA e doadores normais. A expressão de ciclina D1 foi maior nos pacientes com LLA BCR-ABL1 negativo quando comparado aos pacientes com BCR-ABL1 positivo. Não foram encontradas diferenças de expressão entre os subtipos LLA T versus LLA B; teste de *Mann-Whitney*.54

Figura 11. Correlação entre a expressão gênica da β -catenina com a expressão de MYC (A) e ciclina D1 (B) nos pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA). PCRq foi realizado a partir de cDNA de células hematopoéticas de pacientes com diagnóstico de LLA (n=45). A intensidade de expressão do RNAm dos genes representados é relativo à expressão do gene endógeno β -actina. O RNAm de uma amostra de células da linhagem leucêmica Jurkat foi utilizada como amostra calibradora. Existe uma correlação positiva entre a expressão gênica da β -catenina com a expressão do MYC. Não foi observada correlação entre a expressão de β -catenina e a expressão de ciclina D1; teste de *Spearman*.55

Figura 12. Correlação entre a expressão gênica do IRS1 com a expressão de MYC (A) e ciclina D1 (B) nos pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA). PCRq foi realizado a partir de cDNA de células hematopoéticas de pacientes com diagnóstico de LLA (n=45). A intensidade de expressão do RNAm dos genes representados é relativo à expressão do gene endógeno β -actina. O RNAm de uma amostra de células da linhagem leucêmica Jurkat foi utilizada como amostra calibradora. Existe uma

correlação positiva entre a expressão gênica de *IRS1* e a expressão de *MYC*. Não foi observada correlação entre a expressão de *IRS1* e a expressão de *ciclina D1*; teste de *Spearman*.....56

Figura 13. Expressão proteica de IGF1R, IRS1, β -catenina e MYC em linhagens de LLA. Análise por *western blotting* da expressão das proteínas IGF1R, IRS1, β -catenina e MYC em 50 μ g de extratos de linhagens de LLA (Jurkat, MOLT4, Raji e Namalwa). Extratos totais de células foram incubados com anticorpo anti-IGF1R (97 kDa), anti-IRS1(185 kDa), anti- β -catenina (92 kDa) e anti-MYC (67 kDa). Anticorpo anti-Actina (42 kDa) foi utilizado como controle da quantidade proteica aplicado no gel. Nota-se a expressão das proteínas de interesse em todas as linhagens de LLA estudadas.58

Figura 14. Fracionamento subcelular para estudo da localização de IRS1 e β -catenina em linhagens celulares de leucemia linfóide aguda (LLA) (Jurkat, MOLT4, Raji e Namalwa). Linhagens leucêmicas de LLA foram utilizadas para estudo de localização celular por fracionamento subcelular. Anticorpo anti-fibrilarina (34 kDa) foi utilizado como marcador nuclear e anticorpo anti-OP18 (19 kDa) como marcador citoplasmático. Nota-se a presença de IRS1 e β -catenina no núcleo e no citoplasma das linhagens estudadas.59

Figura 15. Microscopia confocal para estudo da localização de IRS1 e β -catenina em linhagens celulares de leucemia linfóide aguda (LLA) (Jurkat, MOLT4, Raji e Namalwa) e células mononucleares normais. Linhagens celulares de LLA e células mononucleares obtidas de sangue periférico de doador normal foram marcadas com anticorpo anti-IRS1 (verde) e anti- β -catenina (vermelho). O núcleo das células foi marcado com DAPI (azul). Merge indica a sobreposição das três imagens. Os pontos co-localizados entre as proteínas estudadas estão ilustrados em branco na coluna da direita; o valor de r corresponde ao índice de co-localização entre as proteínas IRS1 e β -catenina. Como observado, IRS1 e β -catenina estão presentes no núcleo e no citoplasma das linhagens de LLA estudadas, com um alto índice de co-localização entre os mesmos. Nas células mononucleares normais nota-se menor co-localização de IRS1 e β -catenina no núcleo, quando comparado às linhagens de LLA.....60

Figura 16. Imunoprecipitação para estudo da interação entre IRS1 e β -catenina na linhagem Jurkat. Imunoprecipitação (IP) com anti-IRS1 e *imunoblotting* com anti-IRS1 e anti- β -catenina em extrato total de células da linhagem Jurkat. Anticorpo anti-IgG foi usado como controle negativo da imunoprecipitação. Extrato total de células da linhagem Jurkat foi usado como controle positivo para o *imunoblotting*. Como observado, IRS1 e β -catenina interagem na linhagem de LLA estudada.61

Figura 17. Western blotting para estudo do efeito do IGF1 e/ou OSI-196 na expressão de MYC. Células da linhagem leucêmica Jurkat foram tratadas com IGF1(20 ng/ml) e/ou OSI-196 (dose de 20 μ M) por 24 horas e submetidas a *western blotting*. Nota-se a redução da fosforilação de IGF1R e da expressão de MYC nas células tratadas com OSI-196. Anticorpo anti-Actina (42 kDa) foi utilizado como controle da quantidade proteica aplicado no gel.62

Figura 18. Fracionamento subcelular para estudo do efeito do IGF1 e/ou OSI-906 na localização celular de β -catenina. Células da linhagem leucêmica Jurkat foram tratadas com IGF1(20 ng/ml) e/ou OSI-906 (dose de 20 μ M) por 24 horas e fracionadas para separação de núcleo e citoplasma. Anticorpos anti-fibrilarina e anti-OP18 foram utilizados como marcador nuclear e citoplasmático respectivamente. Nota-se a ausência de β -catenina no núcleo nas células tratadas com o inibidor de IGF1R/IR (OSI-196).63

Figura 19. Via de sinalização IRS1/ β -catenina em LLA. (A) A ligação do IGF1 ao seu receptor transmembrana IGF1R ativa seu substrato conhecido como IRS1. IRS1 ativo liga-se a proteína de adesão β -catenina. A ligação de IRS1 a β -catenina favorece a translocação de ambas as proteínas para o núcleo e a adesão das mesmas a fatores de transcrição, o que induz a transcrição do MYC. **(B)** A inibição farmacológica de IGF1R, com Linsitinib (OSI-906), diminui a fosforilação de IGF1R e IRS1 e a translocação nuclear de β -catenina, com consequente redução na expressão proteica de seu alvo, a

proteína MYC, que pode atuar como oncogene. A Figura foi produzida utilizando *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos pacientes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda	38
Tabela 2. Características das linhagens celulares humanas utilizadas	39
Tabela 3. Sequência dos iniciadores	41
Tabela 4. Dados da curva de eficiência e concentração escolhida dos iniciadores	49
Tabela 5. Análise univariada e multivariada da sobrevida global de pacientes com LLA ¹	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Leucemia linfóide aguda.....	22
1.2	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1R)	25
1.3	Substrato 1 do receptor de insulina (IRS1)	27
1.4	β -catenina (CTNNB1).....	29
1.5	MYC	32
1.6	Ciclina D1 (CCND1)	33
2	OBJETIVOS.....	35
2.1	Objetivo Geral.....	35
2.2	Objetivos específicos	35
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	CASUÍSTICA	37
3.1.1	Células hematopoéticas normais	37
3.1.2	Células primárias de LLA.....	37
3.1.3	Linhagens celulares	38
3.2	Tratamento com o inibidor de IGF1R/IR.....	39
3.3	Processamento das amostras	39
3.4	Extração de RNA total	39
3.5	Quantificação de ácidos nucleicos	40
3.6	Transcrição em cDNA	40
3.7	PCR quantitativo (PCRq).....	41
3.8	<i>Western Blotting</i>	41
3.9	Fracionamento subcelular	43
3.10	Microscopia confocal.....	43
4	Análise estatística.....	44
5	RESULTADOS	46
5.1	Padronização dos iniciadores para <i>IRS1</i> , β -catenina, <i>MYC</i> e <i>ciclina D1</i> para PCR quantitativo	46
5.2	Análise da expressão gênica de <i>IRS1</i> em amostras de doadores normais e de pacientes com LLA	50
5.3	Análise da expressão gênica de <i>IGF1R</i> em amostras de doadores normais e de pacientes com LLA	51

5.4	Análise da expressão gênica de <i>β-catenina</i> em amostras de doadores normais e de pacientes com LLA	52
5.5	Análise da expressão gênica de <i>MYC</i> em amostras de doadores normais e de pacientes com LLA	53
5.6	Análise da expressão gênica de <i>ciclina D1</i> em amostras de doadores normais e de pacientes com LLA	54
5.7	Correlação entre a expressão da <i>β-catenina</i> com a expressão de <i>MYC</i> e <i>ciclina D1</i> nos pacientes com LLA	55
5.8	Correlação entre a expressão de <i>IRS1</i> com a expressão de <i>MYC</i> e <i>ciclina D1</i> nos pacientes com LLA	56
5.9	Impacto da expressão de <i>IGF1R</i> , <i>IRS1</i> , <i>β-catenina</i> e <i>MYC</i> no fenótipo clínico e sobrevida dos pacientes com LLA	56
5.10	Análise da expressão proteica de IGF1R, IRS1, <i>β-catenina</i> e <i>MYC</i> em linhagens leucêmicas de LLA	57
5.11	Estudo da localização celular de IRS1 e <i>β-catenina</i>	58
5.12	Estudo da interação entre IRS1 e <i>β-catenina</i>	60
5.13	Estudo do efeito do IGF1 na localização celular de IRS1 e <i>β-catenina</i> e na expressão de <i>MYC</i>	61
6	DISCUSSÃO.....	65
7	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXOS	86
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo	87
	ANEXO B - Casuística dos pacientes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda	91

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia linfóide aguda

O processo hierárquico responsável pela formação de células sanguíneas é denominado hematopoese. A hematopoese ocorre a partir de células tronco hematopoéticas (CTH) multipotentes que possuem capacidade de auto-renovação e diferenciação em linhagens celulares progenitoras de origem mieloide e linfóide. O progenitor mieloide dá origem as células maduras da série eritrocítica, granulocítica e megacariocítica, e o progenitor linfóide origina os linfócitos B, T e células *natural killer* (NK) [1]. O desenvolvimento dos linfócitos B tem início na medula óssea, enquanto os linfócitos T iniciam a maturação na medula óssea e timo. Os linfócitos B ou T imaturos completam seu processo de diferenciação nos tecidos linfóides secundários, como baço e linfonodos [2]. O processo de hematopoese depende não apenas das CTH, mas também do microambiente da medula óssea, fatores de crescimento e vias de sinalização [3]. A aquisição de alterações moleculares nas CTH que resultam em diferenciação e proliferação anormais pode levar ao desenvolvimento de neoplasias hematológicas, como a leucemia linfóide aguda (LLA).

A LLA compreende um grupo heterogêneo de neoplasias caracterizadas por proliferação clonal aberrante e bloqueio da diferenciação de células precursoras linfóides [4]. A supressão do processo de hematopoese normal resulta em expansão e acúmulo de células blásticas (imaturas) na medula óssea, prejudicando a produção de eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Entre os sintomas mais comumente associados à LLA estão: anemia, neutropenia, trombocitopenia e infiltração de órgãos como fígado, baço e linfonodos [5].

Os mecanismos relacionados ao surgimento da LLA envolvem basicamente a aquisição de alterações genéticas que ocorrem em vias de sinalização celular que exercem funções importantes na hematopoese, sendo que a desregulação das mesmas resulta em proliferação anormal, perda da capacidade de diferenciação e resistência a apoptose, contribuindo para a transformação leucêmica [6, 7]. Alterações genéticas podem ser consideradas como eventos primários ou secundários, sendo as alterações primárias as responsáveis pela iniciação do clone pré-leucêmico e as alterações secundárias responsáveis pelo surgimento da LLA [8].

A LLA é o câncer mais comum na infância, com pico de incidência entre 2 a 5 anos de idade e responsável por um quarto de todas as neoplasias diagnosticadas antes dos 15 anos [9, 10]. Atualmente, a taxa de sobrevida global da LLA infantil é de 90% em centros especializados, embora ainda seja considerada uma importante causa de morte por câncer na infância [11]. A LLA em adultos é menos comum, correspondendo a apenas 20% das leucemias agudas e com pico de incidência acima dos 50 anos de idade, sendo associada a um pior prognóstico e com probabilidade de sobrevida a longo prazo menor que 35-40% [12-14].

O tratamento da LLA deve ser iniciado assim que o diagnóstico for confirmado, buscando alcançar remissão, com a restauração da produção normal das células sanguíneas. A terapia é direcionada de acordo com a imunofenotipagem e o risco de recaída, e consiste de quatro fases: indução da remissão, intensificação, consolidação e a fase de manutenção [15]. O transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) é uma opção terapêutica para pacientes com LLA com cromossomo *Philadelphia* e pacientes com LLA de alto risco na primeira recaída [16]. Os fatores de risco associados à LLA incluem idade, contagem de glóbulos brancos e imunofenotipagem, sendo os pacientes com maior idade e maior contagem de glóbulos brancos, e aqueles com LLA de células T, os que apresentam maior risco de recaída da doença e morte [17].

A LLA é classificada de acordo com as características imunológicas em dois grandes grupos: precursor B (LLA B) e precursor T (LLA T), sendo a LLA B o tipo mais comum, representando 75% das LLA em adultos [18]. A LLA pode ser subdividida com base nas anormalidades cariotípicas recorrentes, como translocações e aneuploidias, embora 30% dos casos de LLA não possuam alterações citogenéticas [2, 19].

Em LLA B, as anormalidades cariotípicas mais recorrentes são: hiperdiploidia de pelo menos 5 cromossomos (X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 e 21); hipodiploidia com menos de 44 cromossomos; translocações, incluindo t(12;21)(p13;q22) que codifica *ETV6-RUNX1*, t(1;19)(q23;p13) que codifica *TCF3-PBX1*, t(9;22)(q34;q11) que codifica *BCR-ABL1*, rearranjos *MLL* que envolvem a região 11q23 e rearranjos do gene *MYC*. Hiperdiploidia e o gene de fusão *ETV6-RUNX1* estão associados a uma evolução favorável, enquanto hipodiploidia e o rearranjo *MLL* estão associados a um pior prognóstico [7]. Os rearranjos cromossômicos justapõem elementos reguladores da transcrição à região codificadora de um gene, resultando no aumento da expressão e ativação dos mesmos. A translocação recíproca t(8;14)(q24.21;q32.33), associada com o linfoma de Burkitt, resulta na justaposição do gene da cadeia pesada da imunoglobulina (*immunoglobulin heavy constant gamma 1*; IGHG1)

localizado no cromossomo 14 com o gene *MYC* localizado no cromossomo 8, e tem como consequência o aumento da expressão do fator de transcrição *MYC* [20].

A LLA T é caracterizada por rearranjos de fatores de transcrição como *TLX1* (*HOX11*), *TLX3* (*HOX11L2*), *LYL1*, *TAL1* e *MLL* [21]. Alterações no gene *NOTCH1* estão presentes em mais de 50% dos casos de LLA T, resultando em ativação constitutiva da via de sinalização NOTCH1, umas das principais vias envolvidas proliferação, manutenção e sobrevivência de células leucêmicas [22]. Mutações que levam a ativação de NOTCH1 estão relacionadas com expressão aberrante de *MYC* na maioria dos casos de LLA T [23].

A anormalidade cariotípica mais frequentemente associada à LLA em adultos é o cromossomo *Philadelphia* (*Ph*). O cromossomo *Philadelphia* é o resultado da translocação recíproca entre o gene *ABL1* localizado no cromossomo 9 e o gene *BCR* localizado no cromossomo 22 [t(9;22)(q34;q11.2)], dando origem ao gene de fusão *BCR-ABL1*. O gene *BCR-ABL1* codifica a proteína *breakpoint cluster region-abelson 1* (BCR-ABL1) que apresenta atividade tirosinoquinase aumentada e atua estimulando vias de transdução de sinal, como PI3K/AKT/mTOR e MAPK/ERK, que promovem sobrevivência e proliferação celular, e inibem a apoptose. Além disso, a presença do cromossomo *Philadelphia* (*Ph*+) afeta negativamente o prognóstico de adultos e crianças com LLA, conferindo menor sobrevida e resistência à quimioterapia. [24]. O fenótipo agressivo da LLA BCR-ABL1 positivo pode estar associado com expressão elevada de genes envolvidos na adesão celular, invasão e angiogênese induzidos pelo BCR-ABL1 [25].

Proliferação, diferenciação e morte celular programada (apoptose) são processos extremamente regulados que participam do crescimento e desenvolvimento celular normal. Para realizar esse controle, os diferentes tipos celulares que constituem os tecidos utilizam vias de sinalização para interagir com o microambiente, estímulos externos e células vizinhas. Alteração ou inativação de qualquer um dos componentes das vias de sinalização, nas células normais, pode levar ao desenvolvimento do câncer [26]. Dentre as alterações que podem alterar o funcionamento dessas vias de sinalização estão: mutações pontuais, inserções virais, deleções, ativação de oncogenes, translocações cromossômicas, inativação de genes supressores tumorais, alterações epigenéticas (metilação do DNA ou modificação de histonas), expressão de micro-RNAs, entre outras [27].

A ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores tumorais induz instabilidade genômica na maioria das neoplasias adquiridas, resultando na aquisição de novas alterações moleculares que garantem a progressão da neoplasia [28, 29]. Hanahan e

Weinberg definiram as características de uma neoplasia como sendo instabilidade genômica, escape do sistema imune, manutenção da sinalização proliferativa, resistência a apoptose, indução da angiogênese e metástase, imortalidade replicativa, desregulação do metabolismo energético e inflamação [27].

Apesar dos avanços no conhecimento da fisiopatologia das neoplasias em geral, ainda existem importantes lacunas no conhecimento do mecanismo biológico de outras alterações genéticas e epigenéticas que estão relacionadas com a transformação neoplásica durante a leucemogênese. A busca pela identificação de vias de sinalização relacionadas com o desenvolvimento da LLA é muito importante, pois pode gerar novos alvos terapêuticos e possíveis marcadores de diagnóstico e/ou prognóstico.

1.2 Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1R)

O receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (*insulin-like growth factor 1* receptor; IGF1R) é uma proteína transmembrana com atividade tirosinoquinase intrínseca codificada pelo gene *IGF1R* presente no braço longo do cromossomo 15 (15q25.26) [30]. IGF1R é estruturalmente semelhante ao receptor de insulina (*insulin receptor*; IR), com 70% de homologia na sequência de aminoácidos, sendo composto por duas subunidades extracelulares α , responsáveis pela ligação com seus ligantes, e duas subunidades β , que compreendem um domínio transmembrana e um domínio catalítico com atividade tirosinoquinase [31, 32]. A ativação de IGF1R ocorre pela ligação do mesmo a seus ligantes, IGF1, IGF2 ou insulina, e subsequente ativação de seus substratos, como os substratos do receptor de insulina (*insulin receptor substrate*; IRS) [33, 34].

A via de sinalização estimulada pelo IGF1 regula o crescimento normal das células e contribui para o crescimento de células malignas [35]. IGF1 também atua na regulação da hematopoese normal e neoplásica [36]. A maioria do IGF1 circulante é produzida pelo fígado, de forma dependente ao hormônio de crescimento produzido pela glândula pituitária [37]. Produção anormal de IGF1 também pode ocorrer de forma autócrina por outros tecidos, incluindo blastos mieloides [35, 38]. Altos níveis de IGF1 circulante ou a produção autócrina de IGF1 por células neoplásicas ativam IGF1R e resultam na ativação de cascatas de sinalização que atuam na proliferação, sobrevivência, diferenciação e transformação celular.

IGF1R também desempenha uma função no desenvolvimento e manutenção das células-tronco cancerígenas, na transição epitélio mesenquimal e na regulação do ambiente tumoral [39-45].

A via de sinalização IGF1/IGF1R tem sido associada com risco e progressão para diversos cânceres, como carcinoma de próstata, mama, colón, ovário e neoplasias hematológicas. Além disso, elevada expressão de IGF1R está associado a um pior prognóstico, fenótipo agressivo e resistência a terapia [46-57]. A estimulação com IGF1 promoveu progressão do ciclo celular e aumento da proliferação em linhagens celulares de LLA B [58]. Chapius e colaboradores identificaram que a elevada sinalização de IGF1/IGF1R, resultante da produção autócrina de IGF1 e ativação constitutiva de IGF1R é responsável pela ativação da via PI3K/AKT/mTOR em LMA [46]. Células progenitoras mieloides com níveis de IGF1R reduzidos geneticamente foram menos suscetíveis a transformação leucemogênica, o que foi demonstrado utilizando um modelo murino de LMA [59]. Além disso, a inibição molecular de IGF1R induziu apoptose em blastos de amostras primárias de LMA [60]. Devido a sua participação de destaque em diversas neoplasias, IGF1R tem se tornado um importante alvo no desenvolvimento de drogas anticâncer. Inibidores de IGF1R mostraram eficácia em estudos pré-clínicos em tumores sólidos e neoplasias hematológicas, incluindo LLC, LMA e LLA T e B [46, 58, 61-63]. O inibidor OSI-906 (Linsitinib) é altamente seletivo para os receptores do tipo tirosinoquinase IGF1R e IR, e seu efeito anti-proliferativo *in vitro* foi comprovado em linhagens celulares de tumores sólidos de colorretal, mama, pulmão e pâncreas, e em células primárias de pacientes com LLC [63, 64]. OSI-906 também atua prevenindo a ativação de ERK1/2, AKT e P70S6K [65]. Medyouf e colaboradores observaram que a inibição de IGF1R por inibidores farmacológicos (BMS-536924 e α IR3) bloqueou o crescimento e a viabilidade de linhagens celulares de LLA T (ALLSIL e HPBALL), demonstrando que a inibição farmacológica da sinalização IGF1/IGF1R apresenta um papel terapêutico no tratamento e na prevenção da recaída em LLA. [66]

1.3 Substrato 1 do receptor de insulina (IRS1)

Os substratos do receptor de insulina (*insulin receptor substrate*; IRS) são proteínas citoplasmáticas adaptadoras que estão envolvidas na transdução de sinal de receptores tiosinoquinase, incluindo o receptor de insulina (*insulin receptor*; IR) e o IGF1R [67]. A família dos IRS é constituída de seis membros (IRS1-6) e responsável por conectar os sinais do meio extracelular ao intracelular, através dos receptores transmembrana [68]. Proteínas IRS regulam uma série de processos como crescimento, metabolismo, sobrevivência e proliferação celular, e respondem a diversos estímulos, tais como esteroides, citocinas, hormônios e integrinas [69-71]. Além disso, as proteínas IRS possuem expressão alterada em alguns tipos de câncer, podendo atuar como oncogenes e induzir transformação maligna [67].

A estrutura molecular dos IRS é bem caracterizada e consiste em dois domínios funcionais altamente conservados dentro de sua porção N-terminal: o domínio com homologia a plestrina (PH), e o domínio de ligação a fosfotirosina (PTB) [72]. O domínio PH atua em interações proteína-proteína e facilita o recrutamento pelos receptores e proteínas-fosfolípídeos que se localizam na membrana plasmática. O domínio PTB tem a capacidade de reconhecer resíduos fosforilados em tirosina do IGF1R e IR, fornecendo um mecanismo de acoplamento do IRS1 com essas moléculas [73].

A interação com o IGF1R/IR promove a fosforilação em resíduos de tirosina na região carboxi-terminal dos IRS, o que cria sítios de ligação para inúmeras proteínas efetoras com domínio SH2, incluindo a PI3K, FYN, GRB2, NCK, CSK E SHP2, que são capazes de ativar múltiplas vias de sinalização, incluindo as importantes PI3K/AKT/mTOR e MAPK/ERK [57, 58]. A via PI3K desempenha um papel crítico em muitos processos biológicos incluindo motilidade, metabolismo, sobrevivência e transformação celular [74]. A ativação de AKT está associada ao subgrupo de LLA com pior prognóstico e que apresenta maior resistência à quimioterápicos [75].

IRS1 foi o primeiro membro das proteínas IRS a ser identificado e está localizado no cromossomo 2 (2q36.37) com peso molecular de 185 kDa [68]. Além de sua função metabólica e promotora de crescimento, IRS1 também desempenha uma função na transformação maligna, estando frequentemente associado ao crescimento tumoral e proliferação [76-79].

Estudos demonstraram que quando os níveis de IRS1 são reduzidos por procedimentos experimentais, células cancerosas perdem seu fenótipo transformado [80, 81]. Além disso, o IRS1 é descrito como altamente expresso e constitutivamente ativo em muitos tipos de câncer, incluindo câncer de ovário, mama, próstata, pâncreas e meduloblastoma [82-86]. Em LLA BCR-ABL1 positiva, a expressão gênica do IRS1 esteve negativamente correlacionada com a sobrevida global, independente da idade e número de leucócitos no momento do diagnóstico [25]. Em células leucêmicas BCR-ABL1, a participação do IRS1 citoplasmático na interação com o BCR-ABL1 já foi identificada e elucidada por nosso grupo de pesquisa [87]. O silenciamento de IRS1 na linhagem celular BCR-ABL1 positiva, K562, resultou na diminuição da proliferação celular e clonogenicidade, além da inibição das vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e MAPK[88].

Apesar de ter sido considerado um exemplo de molécula citosólica típica durante muito tempo, IRS1, em certas circunstâncias, pode ser translocado para o núcleo, embora o mecanismo exato que promova essa translocação não é totalmente compreendido [89]. Prisco e colaboradores descreveram que o IRS1 possui seus próprios sinais de localização nuclear (NLS), um sítio localizado no domínio PH da molécula [90]. A presença deste sítio pode explicar a translocação do IRS1 para o núcleo, após sua ativação pelo IGF1R induzida pelo IGF1 [91]. Além disso, a presença de IRS1 nuclear em células que expressam antígeno-T do vírus JCV humano, antígeno-T SV40, integrinas, receptor α de estrogênio (ER α) e receptor β de estrogênio (ER β), indica que o mesmo pode ser translocado pela associação com outras proteínas equipadas com NLS [89, 90, 92-94]. Adicionalmente, nossos resultados preliminares indicaram a presença de IRS1 no núcleo de células leucêmicas da linhagem linfóide (Jurkat) [95]. Entretanto, a função do IRS1 nuclear e sua participação nos processos celulares de proliferação, sobrevivência e apoptose em leucemias agudas ainda não estão bem esclarecidas.

Publicações recentes sugerem que o IRS1 nuclear pode modular a atividade de transcrição de genes envolvidos no crescimento e na proliferação celular, o que pode contribuir indiretamente para a transformação maligna [96, 97]. Um exemplo do Irs1 nuclear trabalhando como um modulador da transcrição é a sua ligação nuclear e citosólica a β -catenina, o que foi observado em fibroblastos embrionários de camundongo [96]. Uma representação esquemática da participação do IRS1 em vias de sinalização em célula neoplásica humana e em fibroblasto embrionário de camundongo está ilustrada na Figura 1.

Figura 1. Via de sinalização IGF1R/IRS1 em células neoplásicas humanas e em fibroblastos embrionários de camundongos. (A) Em células neoplásicas humanas, a ligação do IGF1 ao seu receptor transmembrana IGF1R ativa seu substrato IRS1. IRS1 ativo atua como proteína transdutora de sinal e ativa vias de sinalização responsáveis pela síntese proteica e proliferação celular, incluindo a via da PI3K/AKT/mTOR e a via da MAPK. (B) Em fibroblastos embrionários de camundongos, Irs1 ativo pode ligar-se à proteína de adesão β-catenina. A ligação de Irs1 a β-catenina favorece a translocação de ambas as proteínas para o núcleo e a adesão das mesmas a fatores de transcrição, o que induz a transcrição de genes que podem atuar como oncogenes, tais como o *MYC* e a *ciclina D1*. A Figura foi produzida utilizando *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

1.4 β-catenina (CTNNB1)

A β-catenina é uma proteína fundamental na adesão célula-célula e na transdução de sinal durante a embriogênese e morfogênese tecidual. O gene *CTNNB1* codifica a β-catenina e está localizado no cromossomo 3p22, em uma região frequentemente alterada em uma variedade de tumores. A estrutura molecular da β-catenina é constituída por uma porção N-terminal, que possui sítios de fosforilação para GSK-3β, uma porção C-terminal, e uma porção central, que é necessária para a interação com várias proteínas, incluindo caderinas,

APC e TCF/LEF [98]. A hiperativação da β -catenina causada pelo aumento da expressão de WNT ou por uma mutação no gene *CTNNB1* é comum em carcinomas [99].

A via de sinalização WNT/ β -catenina, também conhecida como WNT canônica, regula diversos processos, incluindo proliferação, sobrevivência, diferenciação e migração celular [100-102]. A via WNT/ β -catenina é ativada a partir da ligação da proteína WNT com o receptor *Frizzled* (FZD) e co-receptor LRP5/6 (*lipoprotein receptor-related proteins*), resultando na ativação e recrutamento da proteína *Dishevelled* (DVL) para a membrana celular, onde se acopla a FZD e LRP5/6. A proteína DVL é responsável pela inibição da atividade da glicogênio sintase quinase 3 (*glycogen synthase kinase 3 beta*; GSK-3 β). A ligação de WNT com FZD-LRP5/6 também promove a degradação da Axina, mediada por LRP5/6. A inibição da atividade da GSK-3 β e a degradação da Axina bloqueia a formação do complexo de destruição intracitoplasmático formado ainda pelo produto do gene supressor de tumor, *Adenomatous polyposis coli* (APC) e pela caseína quinase 1 (*casein kinase 1 alpha 1*; CK1). O complexo proteico GSK-3 β -Axina-APC-CK1 é responsável por direcionar a β -catenina para degradação no proteossoma, e seu bloqueio leva a um acúmulo de β -catenina no citoplasma e posteriormente sua translocação para o núcleo, onde a mesma se liga a membros da família de fatores de transcrição TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancer factors*) e ativa a transcrição de genes alvos. Dentre os genes regulados pela β -catenina estão os genes que codificam MYC e ciclina D1 (*cyclin D1/CCND1*), proteínas fundamentais para progressão do ciclo celular [103, 104]. Quando mutados ou altamente expressos, MYC e ciclina D1 podem atuar como oncogenes, contribuindo para o desenvolvimento de diversas neoplasias humanas [105, 106]. Em neoplasias hematopoéticas, a alta expressão do MYC tem sido correlacionada com um pior prognóstico [107].

Na ausência da ligação da proteína WNT ao seu receptor FZD, as quinases GSK-3 β e CK1 permanecem ativadas e fosforilam, dentre outros alvos, a β -catenina. A fosforilação da β -catenina em sua porção N-terminal resulta em sua ubiquitinação e degradação pelo proteossomo, com a via permanecendo inativada [108, 109]. Uma representação esquemática da via WNT/ β -catenina está ilustrada na Figura 2.

Figura 2. Via de sinalização WNT/β-catenina. (A) Na ausência de WNT, β-catenina é degradada pelo complexo de proteínas GSK-3β-Axina-APC-CK1, e seus genes alvo permanecem com a expressão reprimida. (B) Na presença de WNT, a degradação de β-catenina é reduzida, com consequente acúmulo da mesma no citoplasma, seguida de translocação para o núcleo, onde se liga a família de fatores de transcrição (TCF/LEF) e ativa a transcrição de genes alvo. A Figura foi produzida utilizando *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

Chen e colaboradores, utilizando fibroblastos embrionários de camundongos, descreveram que o Irs1 e a β-catenina interagem no núcleo com os promotores do *Myc* e da *ciclina D1*, induzindo a transcrição destes genes. Além disso, IRS1, através da sinalização do IGF1R, foi descrito como um dos fatores que causam translocação nuclear e ativação da β-catenina [96]. Em células de câncer de mama BT-20 (que não expressam naturalmente o IRS1), a expressão induzida do IRS1 nuclear aumentou acentuadamente o fenótipo transformado dessas células, o que foi acompanhado da ativação dos promotores da ciclina D1 e do MYC pelo IRS1 [110].

1.5 MYC

O gene *MYC* (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) localizado no braço longo do cromossomo 8 (8q24), pertence à família MYC composta pelos genes *MYC* viral (*v-MYC*), *MYC* neuroblastoma (*n-MYC*) e *MYC* pulmonar (*l-MYC*), em humanos [111, 112]. MYC está envolvido em múltiplos processos como metabolismo, proliferação, adesão, motilidade, angiogênese, crescimento, diferenciação e morte celular. A ativação de MYC se dá através de diferentes eventos, incluindo translocações cromossômicas e amplificações gênicas [113].

MYC é capaz de ativar a RNA polimerase, participando da síntese proteica através dos ribossomos. Alterações no MYC estão associadas a prejuízos na biossíntese do mRNA alterando processos metabólicos que contribuem para o desenvolvimento e a manutenção de células tumorais [114]. Em células tumorais, na presença de hipóxia, MYC é ativado para aumentar a angiogênese, o suprimento de oxigênio e o metabolismo da glicose, o que permite melhores condições de sobrevivência tumoral [115]. Além disso, MYC alterado também contribui para o aumento da biossíntese de lipídeos, facilitando a formação de membranas celulares, e a síntese de nucleotídeos, utilizando a via da glutamina, o que contribui para aumentar a agressividade tumoral [116]. MYC tem a capacidade de promover a passagem das células da fase G1 para a fase S, na qual ocorre à replicação do DNA, e possibilita também o aumento da replicação mitocondrial, o que assegura a síntese energética para as novas células [114].

MYC induz transformação neoplásica na maioria das células e está ativo e altamente expresso em uma variedade de cânceres humanos. Além disso, a inativação de MYC em modelos murinos leva a regressão do tumor, através da parada da proliferação e apoptose [117-119]. MYC é um oncogene chave para o desenvolvimento da LLA T, sendo um efetivo alvo terapêutico nessa doença [120]. O papel da ativação de MYC no início do desenvolvimento da LLA T foi demonstrado em modelos de animais transgênicos, no qual a expressão induzida do mesmo resulta no desenvolvimento da LLA T com alta penetrância e baixa latência [121-123]. Em modelos murinos de LLA T, Myc aparece como um fator crítico para a iniciação, manutenção e progressão da doença, enquanto a sua inibição previne o desenvolvimento da mesma [124-126].

1.6 Ciclina D1 (CCND1)

Ciclina D1 é uma proteína de 34 kDa codificada pelo gene *CCND1*, localizado no cromossomo 11q13. A proteína ciclina D1 é essencial no controle do ciclo celular, atuando na transição da fase G1 para a fase S. Em resposta a um sinal mitogênico, ciclina D1 se associa e ativa a quinase dependente de ciclina (CDK) correspondente, promovendo a fosforilação e inativação da proteína retinoblastoma (RB), um supressor tumoral. A proteína RB desativada se dissocia parcialmente do fator de transcrição E2F permitindo que genes requeridos para a fase S sejam transcritos, com consequente progressão do ciclo celular [127].

Ciclina D1 é conhecida por seu proeminente potencial oncogênico e expressão elevada em diversas neoplasias humanas, como câncer de mama, colorretal e linfoma do manto [127, 128]. Em adição a sua função no ciclo celular, ciclina D1 desempenha uma função na regulação da transcrição gênica, promove migração celular, inibe a diferenciação e controla o balanço energético, o que contribui para seu papel na formação e manutenção do câncer [127] [129].

Uma vez que os mecanismos relacionados ao surgimento da LLA envolvem a desregulação de múltiplas vias de sinalização, o desenvolvimento de uma droga eficaz para o seu tratamento é muito complicado, o que torna necessária a busca por um maior entendimento dessas vias e de como elas afetam o processo neoplásico. A partir do conhecimento da presença da interação IRS1/ β -catenina em fibroblastos embrionários e tumores mamários de camundongos [79, 96] e tendo em vista a importância dos oncogenes *ciclina D1* e *MYC* para o desenvolvimento de inúmeras neoplasias, nós hipotetizamos que o eixo IRS1/ β -catenina poderia participar do mecanismo de atuação do IRS1 nuclear e no fenótipo leucêmico em LLA.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a participação de IRS1 nuclear na via da β -catenina em leucemia linfóide aguda.

2.2 Objetivos específicos

- Em células primárias:

- Investigar a expressão gênica de *IGF1R*, *IRS1*, β -catenina, *MYC* e *ciclina D1* em células hematopoéticas de pacientes com LLA e comparar com a expressão em células de medula óssea de indivíduos normais.
- Comparar a expressão gênica de *IGF1R*, *IRS1*, β -catenina, *MYC* e *ciclina D1* entre diferentes subtipos de LLA (LLA T *versus* LLA B e LLA BCR-ABL1 positivo *versus* LLA BCR-ABL1 negativo)
- Correlacionar a expressão gênica de *IRS1* e β -catenina com a expressão de *MYC* e *ciclina D1* em células hematopoéticas de pacientes com LLA.
- Estudar o impacto da idade, contagem de leucócitos, presença de BCR-ABL1, expressão de *IGF1R*, *IRS1*, β -catenina e *MYC* na sobrevida global de pacientes com LLA.

- Em linhagens celulares de leucemia linfóide aguda:

- Investigar a expressão proteica de IGF1R, IRS1, β -catenina e MYC.
- Investigar a localização e a associação de IRS1 e β -catenina.
- Avaliar o efeito da estimulação com IGF1 e da inibição de IGF1R com OS1-906 na localização celular de IRS1 e β -catenina, e na expressão de MYC.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) (Parecer CEP 845.854 - Anexo A).

3.1.1 Células hematopoéticas normais

Células hematopoéticas normais foram obtidas de medula óssea de doadores para transplante alogênico aparentado (n=13) do HCFMRP-USP. A mediana de idade dos controles normais foi de 29 anos (mínimo: 15 - máximo: 51).

3.1.2 Células primárias de LLA

Foram incluídos no estudo um total de 45 pacientes adultos com diagnóstico de LLA, com mediana de idade de 35 anos (mínimo: 18 - máximo: 79), atendidos no Ambulatório de Hematologia do HCFMRP-USP. Os casos foram selecionados entre as amostras coletadas para a pesquisa de rotina da presença de BCR-ABL1 e armazenados no Laboratório de Hematologia do HCFMRP-USP, de 1999 até 2015. A presença ou ausência do BCR-ABL1 foi testado através de Nested-PCR como rotina do atendimento aos pacientes do HCFMRP-USP. Apenas as amostras coletadas no momento do diagnóstico ou da recaída da doença, e que apresentaram RNA de boa qualidade no momento da realização dos experimentos, foram utilizadas neste estudo. Dispensa de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido do Comitê de Ética da HCFMRP-USP para os pacientes que morreram ou perderam seguimento no momento do estudo. Os pacientes foram classificados de acordo

com as características imunofenotípicas e moleculares conforme descrito na Tabela 1, de acordo com avaliação dos dados do prontuário médico, realizado pela orientadora do projeto. Características individuais dos pacientes incluídos no estudo estão descritas no Anexo B.

Tabela 1. Características dos pacientes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda

Parâmetros	Número
Pacientes com LLA	
Diagnóstico	40
Recidiva	5
Amostra	
MO, % blastos [mediana (intervalo)]	37 [87% (26 - 100%)]
SP, % blastos [mediana (intervalo)]	8 [68% (50 - 88%)]
Gênero	
Masculino	30
Feminino	15
Imunofenotipagem	
LLA T	10
LLA B	34
Não avaliado	1
BCR-ABL1	
Positivo	10
Negativo	35

Abreviações: MO: medula óssea; SP: sangue periférico

3.1.3 Linhagens celulares

Linhagens celulares humanas foram adquiridas da ATCC (Philadelphia, PA, EUA) e cultivadas em meio RPMI, acrescido de 1% de penicilina/estreptomicina e enriquecido com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO₂. A descrição das linhagens celulares está na Tabela 2. A autenticidade das linhagens celulares foi confirmada através de *STR matching analysis* utilizando PowerPlex® 16 HS system (Promega, Madison, WI, EUA) e ABI 3500 Sequence Detector System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), no ano de 2015.

Tabela 2. Características das linhagens celulares humanas utilizadas

Linhagem	Descrição
Jurkat	Leucemia linfoide aguda T
MOLT4	Leucemia linfoide aguda T
Raji	LLA B/Linfoma de Burkitt
Namalwa	LLA B/Linfoma de Burkitt

3.2 Tratamento com o inibidor de IGF1R/IR

OSI-906 (Linsitinib), um inibidor seletivo de IGF1R/IR, foi obtido de Selleckchem (Houston, TX, EUA). IGF1 foi obtido da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Para a estimulação com IGF1 e/ou inibição do IGF1R, células foram mantidas em meio sem soro por 24 horas, seguido da adição de IGF1 (20 ng/ml) e/ou OSI-906 (20 μ M) por 24 horas adicionais.

3.3 Processamento das amostras

Células de medula óssea ou sangue periférico foram coletadas em EDTA e submetidas à lise de hemácias com tampão contendo cloreto de amônio. A seguir, as células foram submetidas à extração de RNA. Alternativamente, células mononucleares de sangue periférico foram obtidas através do gradiente de separação Ficoll-Hypaque (Sigma, St.Louis, MO) para análise da confocal.

3.4 Extração de RNA total

O RNA foi isolado utilizando Trizol (Life Technologies, USA). Ao precipitado de células, contendo de 5×10^6 a 1×10^7 células, foi acrescentado 1mL de Trizol e a amostra foi homogeneizada até que se tornasse bastante fluida. O Trizol promove a lise dos leucócitos e

dissolve os componentes celulares, enquanto mantém a integridade do RNA. A purificação do RNA deu-se resumidamente com a adição de clorofórmio, que separa o RNA dos outros compostos orgânicos, seguido de centrifugação a 12.000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa, que contém o RNA, foi transferida para um tubo novo, no qual foi adicionado isopropanol, uma solução que precipita o RNA. O precipitado de RNA foi então lavado com etanol 70% e armazenado no freezer -80°C [130].

3.5 Quantificação de ácidos nucleicos

Para mensurar a quantidade de ácidos nucleicos extraída, alíquotas de 2µL de cada amostra foram submetidas à leitura da densidade ótica a 260nm (DO_{260}) pelo espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare, Inglaterra). Nesse comprimento de onda, os ácidos nucleicos apresentam absorvância máxima de radiação UV, de modo que as concentrações foram estimadas por meio da relação 1U de A_{260} = 40µg de RNA/mL e 1U de A_{260} = 50µg de DNA/mL. A razão entre as absorvâncias a 260 e 280 nanômetros (A_{260}/A_{280}) foi considerada como um indicativo de pureza das amostras, uma vez que a leitura a 280nm (DO_{280}) permite estimar a contaminação com proteínas. Apenas amostras apresentando razão A_{260}/A_{280} entre 1.7 e 2.0 foram utilizadas.

3.6 Transcrição em cDNA

Uma vez extraído e quantificado, o RNA total foi utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA) com o kit High-Capacity cDNA Archive (AppliedBiosystems, EUA). As reações ocorreram em volumes de 10µL, contendo 1µg de RNA total, 1µL de 10x RT Buffer, 0.4µL de dNTP Mix 100mM, 1µL 10x RT RandomPrimers, 0.5µL de MultiScribe RT (50U/µl), 0.4µL de RNasin Plus RNaseInhibitor (Promega, EUA) e H₂O livre de nucleases suficiente para completar o volume final. As reações ocorreram durante 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C.

3.7 PCR quantitativo (PCRq)

Amplificação em tempo real foi realizada no 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando-se SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). As sequências dos iniciadores para *IGF1R*, *IRS1*, β -*catenina*, *MYC*, *ciclina D1* e β -*actina* foram definidas conforme dados da literatura e trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (Tabela 3). Um controle negativo, sem adição de cDNA, foi realizado para cada par de iniciadores. A concentração dos iniciadores e das amostras foi padronizada para cada iniciador. Cada reação foi realizada em duplicata no mesmo experimento. A expressão de β -*actina* foi utilizada como controle endógeno, e uma amostra de cDNA de linhagem leucêmica Jurkat foi utilizada como amostra calibradora. A quantificação relativa da expressão dos genes de interesse foi calculada utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ [131].

Tabela 3. Sequência dos iniciadores

Genes	Sequência dos iniciadores
<i>IGF1R</i>	FW: 5' GGA CAG GTC AGA GGG TTT C 3' RW: 5' CTC GTA ACT CTT CTC TGT GCC 3'
<i>IRS1</i>	FW: 5' TGA CCA TGC AGA TGA GTT GTC C 3' RW: 5' CGC ATG TCA GCA TAG CTT ACA G 3'
β - <i>catenina</i>	FW: 5' CCT AGC TCG GGA TGT TCA CAA 3' RW: 5' TGG ATG TTT TCA ATG GGA GAA TAA 3'
<i>MYC</i>	FW: 5' GCC CCT GGT GCT CCA TGA 3' RW: 5' TTC CAC AGA AAC AAC ATC GAT T 3'
<i>Ciclina D1</i>	FW: 5' CTG GGT GTC CTA CAA ATG 3' RW: 5' AGC GGT CCA GGT AGT TCA T 3'
β - <i>actina</i>	FW: 5' AGG CCA ACC GCA AGA AG 3' RW: 5' ACA GCC TGG ATA GCA ACG TAC A 3'

3.8 Western Blotting

Ao precipitado celular (pellet) contendo 5×10^6 a 1×10^7 células foi adicionado tampão de extração de proteínas contendo: 100 mM Tris (pH 7.6); 1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 35 mg PMSF/mL; 10 mM Na_3VO_4 ; 100 mM NaF; 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ e 4 mM EDTA. As amostras foram homogeneizadas e mantidas em gelo por 1 hora, e em seguida submetidas à

centrifugação por 20 minutos a 4°C para remoção dos restos celulares. Ao produto do extrato total proteico, adicionou-se tampão de *Laemmli* contendo 100 mmol/L de ditioneitol, as amostras foram aquecidas em banho seco à temperatura de 95°C por 10 minutos e submetidas à eletroforese ou armazenadas a -80°C. Alternativamente, para produção de imunoprecipitado, ao produto do extrato proteico adicionou-se o anticorpo de interesse e proteína A-Sepharose 6MB (para anticorpos produzidos em coelho) ou proteína G-Sepharose 4MB (para anticorpos produzidos em cabra ou camundongo). Após o término da incubação e da lavagem, os precipitados foram ressuspensos em 25 µL de tampão de *Laemmli* contendo 100 mmol/L de ditioneitol e aquecidas a temperatura de 95°C por 10 minutos. Em seguida, os extratos proteicos ou as proteínas imunoprecipitadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6,5-8%-SDS-PAGE em aparelho de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca), para a separação das proteínas. A transferência das proteínas de interesse do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada durante 2 horas a 120 V (constante) em aparelho de transferência da Bio-Rad. A ligação dos anticorpos a proteínas não específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 3 horas com tampão de bloqueio (5% leite em pó, 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, e 0.02% Tween 20) a temperatura ambiente. A membrana de nitrocelulose foi incubada durante a noite a 4°C com os anticorpos de interesse diluídos em tampão de bloqueio (0.3% de leite em pó), seguido de 3 lavagens com solução basal (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, e 0.02% Tween 20). Por fim, a membrana de nitrocelulose foi incubada por 1 hora com anticorpo secundário conjugado à HRP (Horseradishperoxidase), lavada novamente por 3 vezes, e então submetida ao substrato da enzima, resultando em um produto luminescente, detectado pelo aparelho fotodocumentador. A intensidade de expressão proteica foi normalizada pela expressão da actina e a intensidade da fosforilação proteica foi normalizada pela expressão da proteína correspondente. Os anticorpos primários utilizados foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (SantaCruz, CA, EUA): anticorpos monoclonais que reconhecem MYC (sc-40), ciclina D1 (sc-8396), OP18 (sc-55531) e anticorpos policlonais que reconhecem actina (sc-1616), p-IRS1/IRS2^{Y612} (sc-17195), IRS1 (sc-559), p-IGF1R^{Y1280} (sc-293102) e IGF1R (sc-713). O anticorpo para β -catenina (610154) foi obtido da BD Bioscience (San Jose, CA, EUA) e o anticorpo para fibrilarina (C13C3) da Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EUA).

3.9 Fracionamento subcelular

Aproximadamente 1×10^7 células foram ressuspensas em tampão 1 (10 mM Hepes (pH 7.9), 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 10 mM Na_3VO_4 e 2 mM PMSF) e centrifugadas a 3.000g por 10 min a 4°C. As células foram lisadas pela adição de 0.1% de Nonidet P-40, homogeneizadas por 10 passagens em agulha de calibre 26.5 e mantidas no gelo por 15 minutos. Os extratos foram centrifugados a 12.000g por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante contendo a fração membranar e citoplasmática foi utilizado para *wester blotting*. O precipitado celular foi ressuspendido em tampão 2 (20 mM HEPES (pH 7.9), 25% Glicerol, 1.5 mM MgCl_2 , 20 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 10 mM Na_3VO_4 e 2 mM PMSF). O homogeneizado foi incubado em gelo por 30 minutos, seguido de centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante correspondeu à fração nuclear. Quantidades semelhantes de proteína foram usadas para análise de *western blotting* e anticorpos contra fibrilarina e OP18 foram usados para controle do núcleo e citoplasma, respectivamente.

3.10 Microscopia confocal

Aproximadamente 1×10^6 células de linhagem leucêmica foram aderidas às lamínulas pré-tratadas por 1 hora com poli-L-lisina (1 mg/mL), lavadas e fixadas com solução de paraformaldeído 4% por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram permeabilizadas com uma solução 0,5% Triton por 10 minutos. O bloqueio das células foi realizado com solução 3% BSA PBS por 1 hora. Os anticorpos primários anti-IRS1 e anti- β -catenina foram utilizados na diluição 1:50 em solução 3% BSA PBS e incubados com as células em câmara úmida durante a noite a 4°C. Após lavagem com PBS para retirada do anticorpo primário, os anticorpos secundários marcados com Alexa488 (Life Technologies) e Alexa546 (Life Technologies) foram adicionados na diluição de 1:200 e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. Por fim, as lamínulas foram novamente lavadas com PBS, montadas em lâminas utilizando-se o meio de montagem para fluorescência (ProLong® Gold com DAPI; Life technologies) e analisadas por escaneamento a laser em um LSM-510 montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando-se a objetiva de 63x de imersão

em água; as imagens foram adquiridas pela técnica responsável pelo microscópio Axioplan no Hemocentro de Ribeirão Preto. Para todos os experimentos foram feitos controles negativos, somente com anticorpo secundário, os quais não apresentaram fluorescência. A ferramenta do programa *ImageJ quantification* (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) “colocalization finder” utilizada para a análise de colocalização entre IRS1 e β -catenina.

4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., CA, EUA). A comparação da expressão relativa do RNAm dos genes de interesse entre os doadores normais e os pacientes, e entre os diferentes subgrupos de LLA, foi realizada através do teste estatístico de *Mann-Whitney*. A correlação entre as expressões gênicas foi realizada através da correlação de *Spearman*. As análises de sobrevida foram realizadas utilizando SAS versão 9.2 (SAS Inc, Cary, NC, USA) e foram realizadas por Mayara Piani da Consultoria Estatística e Pesquisa de Mercado ProEstat (Ribeirão Preto, SP, Brasil). Regressão de Cox foi utilizado para estimar a sobrevida global, que foi definida como o intervalo entre a data da coleta e a data do óbito ou data da última avaliação. Apenas pacientes coletados ao diagnóstico (40) foram incluídos nas análises de sobrevida. Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Padronização dos iniciadores para *IRS1*, β -*catenina*, *MYC* e *ciclina D1* para PCR quantitativo

Para a verificação da concentração ideal dos iniciadores para *IRS1*, β -*catenina*, *MYC* e *ciclina D1*, diferentes concentrações dos iniciadores (150nM, 300nM, 400nM, 600nM) foram testadas, com o objetivo de identificar a concentração que apresentasse o menor Ct (ciclo de amplificação) e o maior ΔRn (intensidade de fluorescência). Para tanto, o cDNA da linhagem leucêmica Jurkat foi utilizado como amostra referência. As curvas de amplificação com as diferentes concentrações testadas de cada iniciador estão ilustradas na Figura 3. A seguir, a menor concentração de cada iniciador que resultou na melhor curva de dissociação, ou seja, a que apresenta um pico único, foi escolhida. A concentração considerada ideal para todos os genes de interesse foi a de 300 nM. A curva de dissociação da concentração escolhida para cada gene demonstra a especificidade dos iniciadores (Figura 4). As reações de PCRq foram realizadas no 7500 Real Time PCR System (AppliedBiosystems) utilizando SybrGreen PCR Master Mix (AppliedBiosystems). Cada reação foi realizada em duplicata no mesmo experimento. A expressão de β -*actina* foi utilizada como controle endógeno, e uma amostra de cDNA de linhagem leucêmica Jurkat foi utilizada como amostra calibradora. A quantificação relativa da expressão dos genes de interesse foi calculada utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. A concentração considerada ideal para *IGF1R* e β -*actina* também foi de 300 nM, conforme já havia sido padronizado por outros membros do nosso grupo de pesquisa.

Figura 3. ΔRn e ciclos de amplificação dos genes *IRS1* (A), *β-catenina* (B) *MYC* (C) e *ciclina D1* (D). Os genes foram amplificados eficientemente em todas as concentrações testadas. O eixo y indica o ΔRn (intensidade de fluorescência) e o eixo x indica o número de ciclos.

Figura 4. Curvas de dissociação dos iniciadores para *IRS1* (A), *β-catenina* (B), *MYC* (C) e *ciclina D1* (D) baseadas na temperatura de anelamento. A especificidade dos iniciadores é demonstrada por apenas um pico acentuado na curva de dissociação.

A eficiência dos iniciadores para *IGF1R*, *IRS1*, *β-catenina*, *MYC* e *ciclina D1* foi verificada através de uma curva de diluição na ordem de 1:2 com 5 pontos. O experimento foi realizado em triplicata e a concentração inicial da amostra foi de 250 ng. A eficiência ideal é de 100 % com valores toleráveis de 10 % a mais ou a menos, com inclinação em torno de -3,32. Após análise, os iniciadores foram considerados com ótima eficiência, como demonstrado na Figura 5. Os dados da curva de eficiência e as concentrações de iniciadores escolhidas para cada gene de interesse estão indicados na Tabela 4.

Figura 5. Curvas de eficiência dos iniciadores para *IRS1* (A), *β-catenina* (B), *MYC* (C) e *ciclina D1* (D). A figura ilustra os 5 pontos obtidos no teste de eficiência. O eixo y indica o Ct e o eixo x a concentração do cDNA utilizado. A eficiência de cada iniciador foi calculada a partir da equação $\text{Eficiência} = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$. A eficiência de cada iniciador está indicada na figura.

Tabela 4. Dados da curva de eficiência e concentração escolhida dos iniciadores

Gene	Concentração	Threshold	Slope	Intercept	R ²	Eficiência
<i>IGF1R</i>	300nM	0,2	-3,217	34,04	0,98	104,57
<i>IRS1</i>	300nM	0,06	-3,145	34,80	0,99	107,94
<i>β-catenina</i>	300nM	0,093	-3,363	29,05	0,97	98,29
<i>MYC</i>	300nM	0,029	-3,438	25,91	0,99	95,37
<i>ciclina D1</i>	300nM	0,1	-3,369	39,51	0,97	98,07

5.2 Análise da expressão gênica de *IRS1* em amostras de doadores normais e de pacientes com LLA

A comparação da expressão relativa do RNAm dos genes de interesse entre os doadores normais e os pacientes, e entre os diferentes subgrupos de LLA, foi realizada através do teste estatístico de *Mann-Whitney*. O RNAm de *IRS1* apresentou-se com expressão significativamente maior nas células hematopoéticas dos pacientes com LLA (mediana: 1.00, [mínima: 0.01 - máxima: 9.96]), quando comparado aos doadores normais (0.34, [0.19 - 1.49]), ($p=0.04$) (Figura 6A). Não foi observada diferença na expressão de *IRS1* quando os pacientes foram estratificados entre LLA de origem B e T (LLA B: 0.89, [0.01 - 9.96] *versus* (vs) LLA T: 1.56, [0.05 - 7.51], $p=0.47$), (Figura 6B). O RNAm de *IRS1* foi significativamente maior nos pacientes com LLA BCR-ABL1 negativo, quando comparado aos pacientes com LLA BCR-ABL1 positivo (1.26, [0.01 - 9.96] vs 0.43, [0.03 - 2.38], $p=0.02$) (Figura 6C).

Figura 6. Expressão do RNAm de *IRS1* em células hematopoéticas de doadores normais e de pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA). PCRq foi realizado a partir de cDNA de células hematopoéticas de doadores normais (n=12) e de pacientes com diagnóstico de LLA (n=45). A expressão gênica do *IRS1* foi comparada entre os pacientes com LLA e controles (A), entre os pacientes com LLA B e LLA T (B), e entre os pacientes com LLA BCR-ABL1 negativo e LLA BCR-ABL1 positivo (C). O eixo “y” representa a intensidade de expressão do RNAm do *IRS1* relativa à expressão da β -actina. O RNAm de uma amostra de células da linhagem leucêmica Jurkat foi utilizada como amostra calibradora. As linhas horizontais representam a mediana. Como observado, a expressão do RNAm de *IRS1* foi maior nos pacientes com LLA quando comparado aos doadores normais, e maior nos pacientes com LLA BCR-ABL1 negativo quando comparado aos pacientes com BCR-ABL1 positivo. Não foram encontradas diferenças de expressão entre os subtipos LLA T versus LLA B; teste de *Mann-Whitney*.

5.3 Análise da expressão gênica de *IGF1R* em amostras de doadores normais e de pacientes com LLA

O RNAm de *IGF1R* não apresentou diferenças entre amostras de paciente com diagnóstico de LLA e controles normais (0.15, [0.001 - 1.27] vs 0.25, [0.03 - 0.70]), ($p=0.30$) (Figura 7A). Não foram observadas diferenças na expressão de *IGF1R* quando os pacientes foram estratificados entre LLA de origem B e T (LLA B: 0.16, [0.008 - 1.27] vs LLA T: 0.05, [0.001 - 0.52], $p=0.12$), (Figura 7B). Não foram observadas diferenças na expressão de *IGF1R* entre pacientes com LLA BCR-ABL1 negativo e LLA BCR-ABL1 positivo (0.15, [0.001 - 1.27] vs 0.16, [0.008 - 0.39], $p=0.88$) (Figura 7C).

Figura 7. Expressão do RNAm de *IGF1R* em células hematopoéticas de doadores normais e de pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA). PCRq foi realizado a partir de cDNA de células hematopoéticas de doadores normais (n=7) e de pacientes com diagnóstico de LLA (n=45). A expressão gênica de *IGF1R* foi comparada entre os pacientes com LLA e controles (A), entre os pacientes com LLA B e LLA T (B), e entre os pacientes com LLA BCR-ABL1 negativo e LLA BCR-ABL1 positivo (C). O eixo “y” representa a intensidade de expressão do RNAm de *IGF1R* relativa à expressão da β -actina. O RNAm de uma amostra de células da linhagem leucêmica Jurkat foi utilizada como amostra calibradora. As linhas horizontais representam a mediana. Como observado, não foram encontradas diferenças de expressão do RNAm de *IGF1R* entre os pacientes com LLA e doadores normais. Não foram encontradas diferenças de expressão entre os subtipos de LLA; teste de *Mann-Whitney*.

5.4 Análise da expressão gênica de β -catenina em amostras de doadores normais e de pacientes com LLA

O RNAm da β -catenina apresentou-se com expressão significativamente maior nas células hematopoéticas dos pacientes com LLA (0.92, [0.34 - 4.89]), quando comparado aos doadores normais (0.60, [0.26 - 1.16]), ($p=0.01$) (Figura 8A). Não foram observadas diferenças na expressão de β -catenina quando os pacientes foram estratificados entre LLA de origem B e T (LLA B: 0.92, [0.34 - 4.89] vs LLA T: 0.94, [0.61 - 1.38], $p=0.81$), (Figura 8B). Não foram observadas diferenças na expressão de β -catenina entre pacientes com LLA BCR-ABL1 negativo e LLA BCR-ABL1 positivo (0.92, [0.40 - 4.89] vs 1.07, [0.34 - 3.21], $p=0.73$) (Figura 8C).

Figura 8. Expressão do RNAm da β -catenina em células hematopoéticas de doadores normais e de pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA). PCRq foi realizado a partir de cDNA de células hematopoéticas de doadores normais (n=12) e de pacientes com diagnóstico de LLA (n=45). A expressão gênica da β -catenina foi comparada entre os pacientes com LLA e controle (A), entre os pacientes com LLA B e LLA T (B), e entre os pacientes com LLA BCR-ABL1 negativo e LLA BCR-ABL1 positivo (C). O eixo “y” representa a intensidade de expressão do RNAm da β -catenina relativo à expressão da β -actina. O RNAm de uma amostra de células da linhagem leucêmica Jurkat foi utilizada como amostra calibradora. As linhas horizontais representam a mediana. Como observado, a expressão do RNAm da β -catenina foi maior nos pacientes com LLA quando comparado aos doadores normais. Não foram encontradas diferenças de expressão entre os subtipos de LLA; teste de *Mann-Whitney*.

5.5 Análise da expressão gênica de *MYC* em amostras de doadores normais e de pacientes com LLA

O RNAm do *MYC* apresentou-se com expressão significativamente maior nas células hematopoéticas dos pacientes com LLA (1.51, [0.06 - 28.37]), quando comparada aos doadores normais (0.33, [0.13 - 1.13]), ($p=0.0006$) (Figura 9A). Não foram observadas diferenças na expressão de *MYC* quando os pacientes foram estratificados entre LLA de origem B e T (LLA B: 1.68, [0.08 - 28.37] vs LLA T: 1.25, [0.06 - 9.87], $p=0.70$), (Figura 9B). Não foram observadas diferenças na expressão de *MYC* entre pacientes com LLA BCR-ABL1 negativo e LLA BCR-ABL1 positivo (1.51, [0.06 - 28.37] vs 1.36, [0.46 - 3.01], $p=0.71$) (Figura 9C).

Figura 9. Expressão do RNAm do *MYC* em células hematopoéticas de doadores normais e de pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA). PCRq foi realizado a partir de cDNA de células hematopoéticas de doadores normais (n=13) e de pacientes com diagnóstico de LLA (n=45). A expressão gênica do *MYC* foi comparada entre os pacientes com LLA e controle (A), entre os pacientes com LLA B e LLA T (B), e entre os pacientes com LLA BCR-ABL1 negativo e LLA BCR-ABL1 positivo (C). O eixo “y” representa a intensidade de expressão do RNAm do *MYC* relativo à expressão da *β-actina*. O RNAm de uma amostra de células da linhagem leucêmica Jurkat foi utilizada como amostra calibradora. As linhas horizontais representam a mediana. Como observado, a expressão do RNAm do *MYC* foi maior nos pacientes com LLA quando comparado aos doadores normais. Não foram encontradas diferenças de expressão entre os subtipos de LLA; teste de *Mann-Whitney*.

5.6 Análise da expressão gênica de *ciclina D1* em amostras de doadores normais e de pacientes com LLA

O RNAm de *ciclina D1* não apresentou diferenças entre amostras de paciente com diagnóstico de LLA e controles normais (1.00, [0.06 - 41.09] vs 1.38, [0.25 - 2.71]), ($p=0.49$) (Figura 10A). Não foram observadas diferenças na expressão de *ciclina D1* quando os pacientes foram estratificados entre LLA de origem B e T (LLA B: 1.20, [0.10 - 41.09] vs LLA T: 0.55, [0.06 - 1.15], $p=0.05$) (Figura 10B). O RNAm da *ciclina D1* foi maior nos pacientes com LLA BCR-ABL1 positivo quando comparado aos pacientes com LLA BCR-ABL1 negativo (1.81, [0,16 - 8.83] vs 0.72, [0.06 - 41.09], $p=0.01$) (Figura 10C).

Figura 10. Expressão do RNAm da *ciclina D1* em células hematopoéticas de doadores normais e de pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA). PCRq foi realizado a partir de cDNA de células hematopoéticas de doadores normais (n=13) e de pacientes com diagnóstico de LLA (n=45). A expressão gênica da *ciclina D1* foi comparada entre os pacientes com LLA e controles (A), entre os pacientes com LLA B e LLA T (B), e entre os pacientes com LLA BCR-ABL1 negativo e LLA BCR-ABL1 positivo (C). O eixo “y” representa a intensidade de expressão do RNAm da *ciclina D1* relativa à expressão da β -actina. O RNAm de uma amostra de células da linhagem leucêmica Jurkat foi utilizada como amostra calibradora. As linhas horizontais representam a mediana. Como observado, não foram encontradas diferenças de expressão do RNAm da *ciclina D1* entre os pacientes com LLA e doadores normais. A expressão de *ciclina D1* foi maior nos pacientes com LLA BCR-ABL1 negativo quando comparado aos pacientes com BCR-ABL1 positivo. Não foram encontradas diferenças de expressão entre os subtipos LLA T versus LLA B. teste de *Mann-Whitney*.

5.7 Correlação entre a expressão da β -catenina com a expressão de *MYC* e *ciclina D1* nos pacientes com LLA

A correlação entre a expressão gênica da β -catenina com a expressão de *MYC* e *ciclina D1* foi realizada através da correlação de Spearman. A expressão gênica da β -catenina apresentou correlação positiva com a expressão gênica do *MYC* nos pacientes com LLA ($p=0.0004$, $r=0.50$) (Figura 11A). Não foi observada correlação entre a expressão da β -catenina com a expressão de *ciclina D1* nos pacientes com LLA ($p=0.74$, $r=-0.04$) (Figura 11B).

Figura 11. Correlação entre a expressão gênica da β -catenina com a expressão de *MYC* (A) e *ciclina D1* (B) nos pacientes com leucemia linfoide aguda (LLA). PCRq foi realizado a partir de cDNA de células hematopoéticas de pacientes com diagnóstico de LLA ($n=45$). A intensidade de expressão do RNAm dos genes representados é relativo à expressão do gene endógeno β -actina. O RNAm de uma amostra de células da linhagem leucêmica Jurkat foi utilizada como amostra calibradora. Existe uma correlação positiva entre a expressão gênica da β -catenina com a expressão do *MYC*. Não foi observada correlação entre a expressão de β -catenina e a expressão de *ciclina D1*, teste de Spearman.

5.8 Correlação entre a expressão de *IRS1* com a expressão de *MYC* e *ciclina D1* nos pacientes com LLA

A expressão gênica de *IRS1* apresentou correlação positiva com a expressão gênica do *MYC* nos pacientes com LLA ($p=0.001$, $r=0.45$) (Figura 12A). Não foi encontrada correlação entre a expressão de *IRS1* e *ciclina D1* nos pacientes com LLA ($p=0.26$, $r=-0.16$) (Figura 12B).

Figura 12. Correlação entre a expressão gênica do *IRS1* com a expressão de *MYC* (A) e *ciclina D1* (B) nos pacientes com leucemia linfoide aguda (LLA). PCRq foi realizado a partir de cDNA de células hematopoéticas de pacientes com diagnóstico de LLA (n=45). A intensidade de expressão do RNAm dos genes representados é relativo à expressão do gene endógeno β -actina. O RNAm de uma amostra de células da linhagem leucêmica Jurkat foi utilizada como amostra calibradora. Existe uma correlação positiva entre a expressão gênica de *IRS1* e a expressão de *MYC*. Não foi observada correlação entre a expressão de *IRS1* e a expressão de *ciclina D1*, teste de Spearman.

5.9 Impacto da expressão de *IGF1R*, *IRS1*, β -catenina e *MYC* no fenótipo clínico e sobrevida dos pacientes com LLA

Análises univariada revelou que os fatores clínicos associados significativamente com a sobrevida global em nossa coorte de pacientes com LLA foram: idade (Hazard ratio

[HR]=1.04 por ano, intervalo de confiança (IC) 1.02-1.07, $p=0.001$), e expressão de *MYC* ([HR]=1.13 por ano, intervalo de confiança (IC) 1.03-1.24, $p=0.008$). BCR-ABL1, contagem de glóbulos brancos e expressão gênica de *IGF1R*, *IRS1* e β -*catenina* não foram identificados como marcadores prognósticos na coorte de pacientes com LLA estudada. Apenas o fator idade afetou a sobrevida global na análise multivariada (Tabela 5).

Tabela 5. Análise univariada e multivariada da sobrevida global de pacientes com LLA¹

Fator	Análise univariada			Análise multivariada		
	HR ²	(95% I.C.)	<i>p</i>	HR	(95% I.C.)	<i>p</i>
Idade	1.04	1.02-1.07	0.001	1.05	1.01-1.08	0.005
BCR-ABL1 (positivo <i>versus</i> negativo)	1.00	0.40- 2.53	0.99	1.36	0.44-4.18	0.59
Contagem de glóbulos brancos	1.00	0.99-1.00	0.54	1.00	1.00-1.01	0.60
Expressão de <i>IGF1R</i>	2.97	0.76-11.63	0.12	1.88	0.30-11.66	0.50
Expressão de <i>IRS1</i>	1.11	0.94-1.31	0.20	1.16	0.90-1.49	0.24
Expressão de β - <i>catenina</i>	0.97	0.62-1.51	0.89	0.70	0.33-1.47	0.35
Expressão de <i>MYC</i>	1.13	1.03-1.24	0.008	1.15	0.98-1.35	0.08

HR=hazard ratio; IC= intervalo de confiança

¹Pacientes com LLA cujas amostras foram coletadas ao diagnóstico (n=40) foram incluídas na análise de sobrevida.

²Hazard ratios >1 indica que o fator indicado primeiro para as variáveis categóricas, ou valores crescentes para as variáveis quantitativas tem pior prognóstico.

5.10 Análise da expressão proteica de IGF1R, IRS1, β -catenina e MYC em linhagens leucêmicas de LLA

Observamos expressão proteica de IGF1R, IRS1, β -catenina e MYC em extrato total de todas as linhagens celulares de LLA estudadas (Jurkat, MOLT4, Raji e Namalwa). Como controle da quantidade proteica aplicada no gel, todas as membranas foram incubadas com anticorpo anti-Actina (Figura 13).

Figura 13. Expressão proteica de IGF1R, IRS1, β-catenina e MYC em linhagens de LLA. Análise por *western blotting* da expressão das proteínas IGF1R, IRS1, β-catenina e MYC em 50 µg de extratos de linhagens de LLA (Jurkat, MOLT4, Raji e Namalwa). Extratos totais de células foram incubados com anticorpo anti-IGF1R (97 kDa), anti-IRS1(185 kDa), anti-β-catenina (92 kDa) e anti-MYC (67 kDa). Anticorpo anti-Actina (42 kDa) foi utilizado como controle da quantidade proteica aplicado no gel. Nota-se a expressão das proteínas de interesse em todas as linhagens de LLA estudadas.

5.11 Estudo da localização celular de IRS1 e β-catenina

O estudo da localização celular de IRS1 e β-catenina foi realizado através de fracionamento subcelular, *western blotting* e microscopia confocal. O fracionamento subcelular foi realizado em linhagens celulares de LLA (Jurkat, MOLT4, Raji e Namalwa). *Western blotting* e *imunoblotting* foram realizados utilizando anticorpo anti-fibrilarina como marcador nuclear e anticorpo anti-OP18 como marcador citoplasmático. Anticorpo anti-β-catenina e anti-IRS1 foram utilizados para investigação da localização das proteínas de interesse. IRS1 e β-catenina estão presentes no núcleo e no citoplasma de todas as linhagens de LLA estudadas. A expressão proteica de β-catenina foi maior no citoplasma, enquanto a expressão de IRS1 foi maior no núcleo das linhagens de LLA T (Jurkat e MOLT4) (Figura 14).

Figura 14. Fracionamento subcelular para estudo da localização de IRS1 e β -catenina em linhagens de leucemia linfóide aguda (LLA) (Jurkat, MOLT4, Raji e Namalwa). Linhagens leucêmicas de LLA foram utilizadas para estudo de localização celular por fracionamento. Anticorpo anti-fibrilarina (34 kDa) foi utilizado como marcador nuclear e anticorpo anti-OP18 (19 kDa) como marcador citoplasmático. Nota-se a presença de IRS1 e β -catenina no núcleo e no citoplasma das linhagens estudadas.

Para a análise por microscopia confocal, aproximadamente 1×10^6 células de linhagens de LLA (Jurkat, MOLT4, Raji e Namalwa) e células mononucleares normais foram submetidas às reações com anticorpos específicos. Os núcleos foram corados utilizando DAPI (azul). As células foram marcadas com anticorpo anti-IRS1 (verde) e anti- β -catenina (vermelho). Observa-se a presença de IRS1 e β -catenina no núcleo e no citoplasma das células das linhagens leucêmicas estudadas. Nas células mononucleares normais observa-se menor co-localização de IRS1 e β -catenina no núcleo. O valor de r corresponde ao índice de co-localização entre as proteínas estudadas, quanto maior o valor de r , maior é o índice de co-localização entre as proteínas estudadas (Figura 15).

Figura 15. Microscopia confocal para estudo da localização de IRS1 e β -catenina em linhagens celulares de leucemia linfóide aguda (LLA) (Jurkat, MOLT4, Raji e Namalwa) e células mononucleares normais. Linhagens celulares de LLA e células mononucleares obtidas de sangue periférico de doador normal foram marcadas com anticorpo anti-IRS1 (verde) e anti- β -catenina (vermelho). O núcleo das células foi marcado com DAPI (azul). Merge indica a sobreposição das três imagens. Os pontos co-localizados entre as proteínas estudadas estão ilustrados em branco na coluna da direita; o valor de r corresponde ao índice de co-localização entre as proteínas IRS1 e β -catenina. Como observado, IRS1 e β -catenina estão presentes no núcleo e no citoplasma das linhagens de LLA estudadas, com um alto índice de co-localização entre os mesmos. Nas células mononucleares normais nota-se menor co-localização de IRS1 e β -catenina no núcleo, quando comparado às linhagens de LLA.

5.12 Estudo da interação entre IRS1 e β -catenina

Células da linhagem leucêmica Jurkat foram escolhidas para o estudo de imunoprecipitação, pois estas células apresentaram IRS1 predominantemente nuclear. A imunoprecipitação do extrato proteico de células Jurkat com anticorpo anti-IRS1 e

immunoblotting com anticorpo anti- β -catenina revelou que IRS1 interage com β -catenina na linhagem estudada. Anticorpo anti-IgG foi utilizado como controle negativo da imunoprecipitação (Figura 16).

Figura 16. Imunoprecipitação para estudo da interação entre IRS1 e β -catenina na linhagem Jurkat. Imunoprecipitação (IP) com anti-IRS1 e *immunoblotting* com anti-IRS1 e anti- β -catenina em extrato total de células da linhagem Jurkat. Anticorpo anti-IgG foi usado como controle negativo da imunoprecipitação. Extrato total de células da linhagem Jurkat foi usado como controle positivo para o *immunoblotting*. Como observado, IRS1 e β -catenina interagem na linhagem de LLA estudada.

5.13 Estudo do efeito do IGF1 na localização celular de IRS1 e β -catenina e na expressão de MYC

Para avaliação do efeito do IGF1 na localização celular de IRS1 e β -catenina, e na expressão de MYC, células da linhagem leucêmica Jurkat foram submetidas à privação de soro por 24 horas, seguidas de incubação com IGF1 (20 ng/ml) por 24 horas adicionais. OSI-906 na dose de 20 μ M durante 24 horas foi usado para a inibição do IGF1R. Células tratadas com IGF1 e/ou OSI-906 foram submetidas à extração proteica, fracionamento subcelular, microscopia confocal e *western blotting*. Conforme esperado, o IGF1 aumentou a fosforilação em tirosina do IGF1R e do IRS1, e o tratamento com o OSI-906 reduziu a fosforilação de ambas as proteínas. A expressão de IGF1R total não foi alterada com o tratamento com IGF1 e/ou OSI-906. O tratamento com OSI-906 induziu a uma modesta redução na expressão de IRS1 e β -catenina, e uma redução evidente na expressão de MYC (Figura 17).

Figura 17. Western blotting para estudo do efeito do IGF1 e do OSI-906 na expressão de MYC. Células da linhagem leucêmica Jurkat foram tratadas com IGF1(20 ng/ml) e/ou OSI-906 (dose de 20 μ M) por 24 horas e submetidas a *western blotting*. Nota-se a redução da fosforilação de IGF1R e da expressão de MYC nas células tratadas com OSI-906. Anticorpo anti-Actina (42 kDa) foi utilizado como controle da quantidade proteica aplicado no gel.

Quando as células foram submetidas à técnica de fracionamento subcelular, a redução na expressão de IRS1 e β -catenina provocada pelo tratamento com OSI-906 foi mais evidente. Notamos que a expressão de β -catenina no núcleo foi praticamente abolida quando as células foram tratadas com OSI-906, indicando que a inibição de IGF1R pode ter provocado uma redução da translocação de β -catenina para o núcleo, provavelmente mediado pelo IRS1. (Figura 18).

Figura 18. Fracionamento subcelular para estudo do efeito do IGF1 e/ou OSI-906 na localização celular de β -catenina. Células da linhagem leucêmica Jurkat foram tratadas com IGF1(20 ng/ml) e/ou OSI-906 (dose de 20 μ M) por 24 horas e fracionadas para separação de núcleo e citoplasma. Anticorpos anti-fibrilarina e anti-OP18 foram utilizados como marcador nuclear e citoplasmático respectivamente. Nota-se a ausência de β -catenina no núcleo nas células tratadas com o inibidor de IGF1R (OSI-906).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Beta-catenina é uma proteína envolvida na adesão celular e na transdução de sinal através da via da proteína WNT. Em sua forma citoplasmática, na ausência de anormalidades, a β -catenina é degradada por fosforilação da sua porção N-terminal. Em certas circunstâncias, por exemplo, quando ativada por WNT, β -catenina é estabilizada e transferida para o núcleo, onde se liga a membros da família de fatores de transcrição TCF/LEF, e ativa a transcrição de genes que regulam a diferenciação, a proliferação, e o ciclo celular [132]. *MYC* é um importante gene alvo na via de sinalização da β -catenina e sua alta expressão está associada a diversas neoplasias humanas, incluindo linfoma de Burkitt, neuroblastoma, meduloblastoma, câncer de mama e mieloma múltiplo [133-135]. IRS1 é uma proteína predominantemente citosólica envolvida na transdução de sinal, que também desempenha uma função na transformação maligna, sendo altamente expresso em neoplasias sólidas [82-84, 86]. IRS1, em certas circunstâncias, pode ser translocado para o núcleo [89]. Irs1, através da via do Igf1, foi identificado como um fator responsável por provocar translocação nuclear da β -catenina e ativação de seus genes alvos em fibroblastos embrionários de camundongos [96]. Entretanto, a função do IRS1 nuclear em células leucêmicas ainda não foi investigada. Deste modo, o objetivo desse trabalho foi estudar a participação do IRS1 nuclear na via da β -catenina em LLA.

Nós demonstramos que o IRS1 e a β -catenina estão localizados no núcleo e no citoplasma de todas as linhagens celulares de LLA estudadas. IRS1 nuclear foi detectado pela primeira vez em amostras clínicas de meduloblastoma. O estudo de 17 biópsias de meduloblastoma revelou que IRS1 estava presente exclusivamente no citoplasma de 6 casos, enquanto outros 6 casos apresentavam IRS1 citoplasmático e nuclear [89]. IRS1 nuclear também foi detectado em biópsias de câncer de mama, no qual sua presença foi correlacionada com um fenótipo mais diferenciado e menos metastático [83]. Além disso, pacientes com câncer de mama precoce tratados com tamoxifen e que apresentavam IRS1 nuclear tiveram maior sobrevida global e sobrevida livre de recidiva [136]. Uma alta expressão de β -catenina nuclear e citoplasmática foi observada em linhagens celulares de carcinoma gástrico transfectadas com plasmídeo expressando IRS1, em relação às células transfectadas apenas com o plasmídeo controle [137].

Nós observamos um alto coeficiente de co-localização entre IRS1 e β -catenina em linhagens celulares de LLA. Leucócitos normais mostraram uma predominância de IRS1 e β -catenina citoplasmática, sugerindo uma baixa ativação dessa via de sinalização em doadores normais. Similarmente, IRS1 é predominantemente nuclear em células de tumor cerebral, enquanto predominantemente localizado no citoplasma de células normais [138].

Nós encontramos uma associação endógena entre IRS1 e β -catenina na linhagem celular Jurkat. IRS1 também interage com β -catenina em tumores mamários de camundongo [79]. Chen e colaboradores mostraram que IRS1 e β -catenina co-imunoprecipitam no núcleo e no citoplasma de fibroblastos embrionários de camundongo, de uma maneira dependente de IGF1 [96]. Assim, decidimos investigar o efeito da estimulação de IGF1 e da inibição farmacológica de IGF1R na linhagem celular Jurkat.

Para a inibição farmacológica de IGF1R, nós usamos Linsitinib (OSI-906), que é um potente inibidor altamente seletivo para os receptores do tipo tirosinoquinase, IGF1R e IR, com efeito anti-proliferativo em uma variedade de linhagens celulares e tumores sólidos, e com efeito anti-tumoral em modelo xenográfico [64, 139]. Estudos preliminares demonstraram atividade anti-tumoral do OSI-906 em pacientes com carcinoma adrenocortical e melanoma [140-142]. Em células da linhagem celular Jurkat, a estimulação com IGF1 aumentou a fosforilação de IRS1, enquanto a inibição de IGF1R diminuiu a fosforilação de IGF1R e IRS1. A estimulação com IGF1 aumentou levemente a fosforilação do IGF1R, provavelmente porque o IGF1R já é ativo nas linhagens celulares de LLA.

A inibição de IGF1R, com HNMPA(AM)₃, levou a diminuição da fosforilação de IRS1, parada no crescimento celular e aumento de apoptose em linhagens celulares de LLA [143]. Um efeito similar foi observado usando Picropodphyllin (PPP), outro inibidor de IGF1R, em linhagens celulares de LLA T, Jurkat e MOLT4. A inibição de IGF1R nessas linhagens celulares de LLA levou a uma regulação negativa de vias de sinalização da PI3K/AKT e MAPK/ERK, o que foi associado com aumento da apoptose e parada no ciclo celular. PPP induziu morte celular mesmo nas células que foram previamente estimuladas com IGF1, indicando que a inibição ocorreu na sinalização IGF1/IGF1R [144]. A redução do crescimento e viabilidade celular pela inibição farmacológica de IGF1R em linhagens celulares de LLA-T também foi reportada por Medyouf e colaboradores [66]. Esses resultados fornecem um mecanismo molecular que justificam os efeitos anti-leucêmicos dos inibidores do IGF1R em LLA.

No presente estudo, a inibição de IGF1R diminuiu a translocação nuclear de β -catenina e a expressão proteica de MYC na linhagem celular Jurkat, provavelmente mediado por IRS1. Para confirmarmos a relevante participação do IRS1 neste fenômeno, tentamos silenciar o IRS1 através do uso de inibição mediada por lentivírus em células Jurkat. Entretanto, apesar de inúmeras tentativas, metodologicamente não foi possível obtermos células silenciadas para o IRS1 para estudos funcionais. As limitações metodológicas podem ser decorrentes a mecanismos compensatórios da célula frente a inibição do IRS1, o que dificultou a seleção de células silenciadas para o gene de interesse.

IGF1 também induziu acumulação nuclear e ativação de β -catenina em linhagens celulares de neoplasia folicular de tireoide [145]. Nas células HEK293, MCF-7 e HeLa, o tratamento com insulina ou a expressão aumentada de IRS1 aumentou os níveis de β -catenina, enquanto a inibição de IRS1 reduziu a expressão de β -catenina e comprometeu a ativação da via de sinalização WNT/ β -catenina, mesmo na presença de insulina. O aumento da expressão de IRS1 aumentou os níveis de ciclina D1 e MYC nas células MCF-7, e a inibição de IRS1 diminuiu a expressão de ciclina D1 e MYC na linhagem celular HEK293 [146]. Os níveis de RNAm de *ciclina D1* e *MYC*, dois alvos da β -catenina, estão elevados em células de carcinoma gástrico e tumores mamários de camundongos transfectados com IRS1 [79, 137].

Recente estudo demonstrou a participação de IRS1 e MYC em amostras de LLA pré-B. Utilizando um inibidor farmacológico de BCR-ABL1, GZD824, os autores observaram que a droga induziu uma redução da viabilidade celular e induziu a parada no ciclo celular e o aumento da apoptose em linhagens celulares e células primárias de LLA pré-B, independente da presença do BCR-ABL1. Interessantemente, células primárias de LLA pré-B tratadas apenas com GZD824 apresentaram maiores níveis apoptóticos do que as células tratadas com GZD824 e estimuladas com IGF1 ao mesmo tempo. O tratamento com GZD824 levou a diminuição dos níveis proteicos de IRS1 e de AKT fosforilada em linhagem celular e células primárias de LLA pré-B, o que foi revertido pela estimulação com IGF1. Além disso, o tratamento com o inibidor GZD824 também levou a redução da expressão proteica de MYC e de STAT3 fosforilada [147].

Nós encontramos elevada expressão gênica de *IRS1*, *β -catenina* e *MYC* em amostras de pacientes com LLA, quando comparado com doadores normais, enquanto a expressão de *IGF1R* e *ciclina D1* não foi significativamente diferente entre os dois grupos. Medyouf e colaboradores identificaram elevada expressão proteica de IGF1R em linhagens leucêmicas de LLA T, entretanto a expressão gênica de IGF1R não foi analisada [66]. Estudo recente,

utilizando citometria de fluxo, encontrou elevada expressão de IGF1R em células-tronco hematopoéticas e células de LMC, e baixos níveis do mesmo em células de LLA [148]. Expressão significativamente elevada do RNAm da β -catenina foi encontrado por PCRq, em 71 amostras de pacientes pediátricos com LLA T, quando comparado a células T normais. A elevada expressão gênica de β -catenina refletiu em elevada expressão proteica em pacientes com LLA quando comparado a células normais, e aumentou a translocação de β -catenina ativa para o núcleo nesses pacientes e na linhagem celular MOLT4 [149].

Não observamos diferenças significativas na expressão de *IRS1*, β -catenina, *MYC* e *IGF1R* quando os pacientes foram estratificados entre pacientes com LLA B ou T. A expressão de *ciclina D1* foi maior nos pacientes com LLA B quando comparado aos pacientes com LLA T. Quando os pacientes foram estratificados entre pacientes LLA BCR-ABL1 negativo ou BCR-ABL1 positivo, não observamos diferenças significativas na expressão de β -catenina, *MYC* e *IGF1R*. A expressão de *IRS1* foi maior nos pacientes BCR-ABL1 negativo quando comparado aos BCR-ABL1 positivo, e a expressão de *ciclina D1* foi maior nos pacientes BCR-ABL1 positivo quando comparado aos BCR-ABL1 negativo. Os resultados obtidos a partir da estratificação dos pacientes entre os diferentes subgrupos devem ser interpretados com cautela, uma vez que o número de pacientes em cada grupo é baixo. Juric e colaboradores encontraram, através de *microarray*, uma baixa expressão gênica de *IGF1R* e *IRS1* em pacientes adultos com LLA B BCR-ABL1 positivo, e a expressão gênica de *IRS1* correlacionou-se negativamente com a sobrevida dos pacientes adultos com LLA BCR-ABL1 positivo [25]. Alta expressão de *MYC* também foi correlacionada com fatores associados à LLA de alto risco, como alta contagem de glóbulos brancos, células CD33+ e baixa remissão completa [150].

Uma correlação positiva entre os níveis de mRNA de *IRS1* e β -catenina com os níveis de mRNA de *MYC* foi encontrada em nosso estudo. Zhou e colaboradores [151], usando análise de regressão, mostraram uma correlação entre a expressão de β -catenina nuclear e a expressão de *MYC* e *IRS1* em amostras de músculo esquelético de ratos. Elevada expressão de RNAm de *IRS1* também foi encontrada em adenocarcinomas de ovário com β -catenina desregulada, quando comparado com amostras sem desregulação [152]. Não foi encontrada correlação entre os níveis RNAm de *IRS1* e β -catenina com os níveis de RNAm da *ciclina D1*.

Em conclusão, nossos dados suportam uma relação entre a sinalização de IGF1R/*IRS1* e a ativação de β -catenina em leucemia linfóide aguda. A associação proteica entre *IRS1* e β -

catenina observada em linhagens celulares de LLA, junto com os dados que IGF1 modula translocação nuclear da β -catenina e expressão proteica de MYC, indicam que o eixo IRS1/ β -catenina está ativo em células de LLA. Um mecanismo molecular proposto do efeito da inibição farmacológica de IGF1R (OSI-906) em células de LLA está ilustrado na Figura 19. A identificação da ativação da via IRS1/ β -catenina em LLA pode indicar uma importante via de sinalização envolvida na fisiopatologia da LLA e representar uma nova oportunidade terapêutica para os pacientes.

Figura 19. Via de sinalização IRS1/ β -catenina em LLA. (A) A ligação do IGF1 ao seu receptor transmembrana IGF1R ativa seu substrato conhecido como IRS1. IRS1 ativo liga-se a proteína de adesão β -catenina. A ligação de IRS1 a β -catenina favorece a translocação de ambas as proteínas para o núcleo e a adesão das mesmas a fatores de transcrição, o que induz a transcrição do MYC. (B) A inibição farmacológica de IGF1R, com Linsitinib (OSI-906), diminui a fosforilação de IGF1R e IRS1 e a translocação nuclear de β -catenina, com consequente redução na expressão proteica de seu alvo, a proteína MYC, que pode atuar como oncogene. A Figura foi produzida utilizando Servier Medical Art (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

Os resultados desta dissertação de mestrado foram compilados em um manuscrito, no formato de artigo original, que está submetido e aguardando revisão.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

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

- A expressão de *IRS1*, β -catenina e *MYC* está significativamente elevada em amostras de medula óssea de pacientes com LLA em relação aos controles normais;
- Em amostras de pacientes com LLA, existe uma correlação positiva entre a expressão gênica de *MYC* com as expressões gênicas de β -catenina e *IRS1*;
- Idade e expressão de *MYC* correlacionam-se positivamente com a sobrevida global dos pacientes com LLA na análise univariada; idade foi fator preditivo independente de sobrevida;
- Elevada expressão proteica de IGF1R, *IRS1*, β -catenina e *MYC* ocorre em linhagens celulares de LLA;
- *IRS1* e β -catenina estão presentes no citoplasma de células mononucleares de doador normal. Diferentemente, *IRS1* e β -catenina co-localizam no núcleo e no citoplasma das linhagens celulares de LLA estudadas.
- Ocorre interação proteica constitutiva entre *IRS1* e β -catenina na linhagem celular Jurkat (LLA T);
- O tratamento com o inibidor de IGF1R provoca redução da translocação de β -catenina para o núcleo e redução na expressão proteica de *MYC* na linhagem celular Jurkat (LLA T).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. **Nature**, 2001. 414(6859): p. 105-11.
2. Jaffe, E.S., et al., *Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery*. **Blood**, 2008. 112(12): p. 4384-99.
3. Kaushansky, K., *Lineage-specific hematopoietic growth factors*. **N Engl J Med**, 2006. 354(19): p. 2034-45.
4. Iacobucci, I., et al., *Cytogenetic and molecular predictors of outcome in acute lymphocytic leukemia: recent developments*. **Curr Hematol Malig Rep**, 2012. 7(2): p. 133-43.
5. Cobaleda, C. and I. Sanchez-Garcia, *B-cell acute lymphoblastic leukaemia: towards understanding its cellular origin*. **Bioessays**, 2009. 31(6): p. 600-9.
6. Pui, C.H., M.V. Relling, and J.R. Downing, *Acute lymphoblastic leukemia*. **N Engl J Med**, 2004. 350(15): p. 1535-48.
7. Inaba, H., M. Greaves, and C.G. Mullighan, *Acute lymphoblastic leukaemia*. **Lancet**, 2013. 381(9881): p. 1943-55.
8. Anderson, K., et al., *Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia*. **Nature**, 2011. 469(7330): p. 356-61.
9. Pui, C.H., *Recent research advances in childhood acute lymphoblastic leukemia*. **J Formos Med Assoc**, 2010. 109(11): p. 777-87.
10. Hunger, S.P., et al., *Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group*. **J Clin Oncol**, 2012. 30(14): p. 1663-9.
11. Burkhardt, B., et al., *Impact of cranial radiotherapy on central nervous system prophylaxis in children and adolescents with central nervous system-negative stage III or IV lymphoblastic lymphoma*. **J Clin Oncol**, 2006. 24(3): p. 491-9.

12. Bassan, R., *Evolving strategies for the management of high-risk adult acute lymphoblastic leukemia*. **Haematologica**, 2005. 90(10): p. 1299.
13. Pui, C.H., L.L. Robison, and A.T. Look, *Acute lymphoblastic leukaemia*. **Lancet**, 2008. 371(9617): p. 1030-43.
14. Jemal, A., et al., **Cancer statistics**, 2006. CA Cancer J Clin, 2006. 56(2): p. 106-30.
15. Tucci, F. and M. Arico, *Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia*. **Haematologica**, 2008. 93(8): p. 1124-8.
16. Yeoh, A.E., et al., *Management of adult and paediatric acute lymphoblastic leukaemia in Asia: resource-stratified guidelines from the Asian Oncology Summit 2013*. **Lancet Oncol**, 2013. 14(12): p. e508-23.
17. Vora, A., et al., *Augmented post-remission therapy for a minimal residual disease-defined high-risk subgroup of children and young people with clinical standard-risk and intermediate-risk acute lymphoblastic leukaemia (UKALL 2003): a randomised controlled trial*. **Lancet Oncol**, 2014. 15(8): p. 809-18.
18. Campo, E., et al., *The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications*. **Blood**, 2011. 117(19): p. 5019-32.
19. Pui, C.H., et al., *Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update*. **J Clin Oncol**, 2011. 29(5): p. 551-65.
20. Frohling, S. and H. Dohner, *Chromosomal abnormalities in cancer*. **N Engl J Med**, 2008. 359(7): p. 722-34.
21. Aifantis, I., E. Raetz, and S. Buonamici, *Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma*. **Nat Rev Immunol**, 2008. 8(5): p. 380-90.
22. Weng, A.P., et al., *Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia*. **Science**, 2004. 306(5694): p. 269-71.
23. Tzoneva, G. and A.A. Ferrando, *Recent advances on NOTCH signaling in T-ALL*. **Curr Top Microbiol Immunol**, 2012. 360: p. 163-82.
24. Leoni, V. and A. Biondi, *Tyrosine kinase inhibitors in BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukemia*. **Haematologica**, 2015. 100(3): p. 295-9.

25. Juric, D., et al., *Differential gene expression patterns and interaction networks in BCR-ABL-positive and -negative adult acute lymphoblastic leukemias*. **J Clin Oncol**, 2007. 25(11): p. 1341-9.
26. Davidoff, A.M., *Pediatric oncology*. **Semin Pediatr Surg**, 2010. 19(3): p. 225-33.
27. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. **Cell**, 2011. 144(5): p. 646-74.
28. Negrini, S., V.G. Gorgoulis, and T.D. Halazonetis, *Genomic instability--an evolving hallmark of cancer*. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2010. 11(3): p. 220-8.
29. Croce, C.M., *Oncogenes and cancer*. **N Engl J Med**, 2008. 358(5): p. 502-11.
30. Ward, C.W., et al., *The three dimensional structure of the type I insulin-like growth factor receptor*. **Mol Pathol**, 2001. 54(3): p. 125-32.
31. Ullrich, A., et al., *Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity*. **EMBO J**, 1986. 5(10): p. 2503-12.
32. Annunziata, M., R. Granata, and E. Ghigo, *The IGF system*. **Acta Diabetol**, 2011. 48(1): p. 1-9.
33. LeRoith, D. and C.T. Roberts, Jr., *The insulin-like growth factor system and cancer*. **Cancer Lett**, 2003. 195(2): p. 127-37.
34. Belfiore, A., et al., *Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease*. **Endocr Rev**, 2009. 30(6): p. 586-623.
35. Pollak, M.N., E.S. Schernhammer, and S.E. Hankinson, *Insulin-like growth factors and neoplasia*. **Nat Rev Cancer**, 2004. 4(7): p. 505-18.
36. Shimon, I. and O. Shpilberg, *The insulin-like growth factor system in regulation of normal and malignant hematopoiesis*. **Leuk Res**, 1995. 19(4): p. 233-40.
37. Khandwala, H.M., et al., *The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth*. **Endocr Rev**, 2000. 21(3): p. 215-44.

38. Doepfner, K.T., O. Spertini, and A. Arcaro, *Autocrine insulin-like growth factor-I signaling promotes growth and survival of human acute myeloid leukemia cells via the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway*. **Leukemia**, 2007. 21(9): p. 1921-30.
39. Surmacz, E., *Function of the IGF-I receptor in breast cancer*. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, 2000. 5(1): p. 95-105.
40. Baserga, R., *The contradictions of the insulin-like growth factor 1 receptor*. **Oncogene**, 2000. 19(49): p. 5574-81.
41. Mauro, L., et al., *IGF-I receptor-induced cell-cell adhesion of MCF-7 breast cancer cells requires the expression of junction protein ZO-1*. **J Biol Chem**, 2001. 276(43): p. 39892-7.
42. Le Roith, D., *Regulation of proliferation and apoptosis by the insulin-like growth factor I receptor*. **Growth Horm IGF Res**, 2000. 10 Suppl A: p. S12-3.
43. Mauro, L., et al., *Role of the IGF-I receptor in the regulation of cell-cell adhesion: implications in cancer development and progression*. **J Cell Physiol**, 2003. 194(2): p. 108-16.
44. Mauro, L. and E. Surmacz, *IGF-I receptor, cell-cell adhesion, tumour development and progression*. **J Mol Histol**, 2004. 35(3): p. 247-53.
45. Seccareccia, E. and P. Brodt, *The role of the insulin-like growth factor-I receptor in malignancy: an update*. **Growth Horm IGF Res**, 2012. 22(6): p. 193-9.
46. Chapuis, N., et al., *Autocrine IGF-1/IGF-1R signaling is responsible for constitutive PI3K/Akt activation in acute myeloid leukemia: therapeutic value of neutralizing anti-IGF-1R antibody*. **Haematologica**, 2010. 95(3): p. 415-23.
47. Baserga, R., F. Peruzzi, and K. Reiss, *The IGF-1 receptor in cancer biology*. **Int J Cancer**, 2003. 107(6): p. 873-7.
48. Jenkins, P.J., et al., *Insulin-like growth factor I and the development of colorectal neoplasia in acromegaly*. **J Clin Endocrinol Metab**, 2000. 85(9): p. 3218-21.
49. Endogenous, H., et al., *Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies*. **Lancet Oncol**, 2010. 11(6): p. 530-42.

50. Lukanova, A., et al., *Circulating levels of insulin-like growth factor-I and risk of ovarian cancer*. **Int J Cancer**, 2002. 101(6): p. 549-54.
51. Renehan, A.G., et al., *Circulating insulin-like growth factor II and colorectal adenomas*. **J Clin Endocrinol Metab**, 2000. 85(9): p. 3402-8.
52. Renehan, A.G., et al., *Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis*. **Lancet**, 2004. 363(9418): p. 1346-53.
53. Rinaldi, S., et al., *Serum levels of IGF-I, IGFBP-3 and colorectal cancer risk: results from the EPIC cohort, plus a meta-analysis of prospective studies*. **Int J Cancer**, 2010. 126(7): p. 1702-15.
54. Roddam, A.W., et al., *Insulin-like growth factors, their binding proteins, and prostate cancer risk: analysis of individual patient data from 12 prospective studies*. **Ann Intern Med**, 2008. 149(7): p. 461-71, W83-8.
55. Abe, S., et al., *Increased expression of insulin-like growth factor I is associated with Ara-C resistance in leukemia*. **Tohoku J Exp Med**, 2006. 209(3): p. 217-28.
56. Dawczynski, K., et al., *Elevated serum insulin-like growth factor binding protein-2 is associated with a high relapse risk after hematopoietic stem cell transplantation in childhood AML*. **Bone Marrow Transplant**, 2006. 37(6): p. 589-94.
57. Dawczynski, K., E. Kauf, and F. Zintl, *Changes of serum growth factors (IGF-I,-II and IGFBP-2,-3) prior to and after stem cell transplantation in children with acute leukemia*. **Bone Marrow Transplant**, 2003. 32(4): p. 411-5.
58. Yamada, H., et al., *Effects of insulin-like growth factor-1 on B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia*. **Int J Hematol**, 2013. 97(1): p. 73-82.
59. Jenkins, C.R., et al., *IGF signaling contributes to malignant transformation of hematopoietic progenitors by the MLL-AF9 oncoprotein*. **Exp Hematol**, 2012. 40(9): p. 715-723 e6.
60. He, Y., et al., *The insulin-like growth factor-1 receptor kinase inhibitor, NVP-ADW742, suppresses survival and resistance to chemotherapy in acute myeloid leukemia cells*. **Oncol Res**, 2010. 19(1): p. 35-43.
61. Gombos, A., et al., *Clinical development of insulin-like growth factor receptor--1 (IGF-1R) inhibitors: at the crossroad?* **Invest New Drugs**, 2012. 30(6): p. 2433-42.

62. Mitsiades, C.S., et al., *Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors.* **Cancer Cell**, 2004. 5(3): p. 221-30.
63. Yaktapour, N., et al., *Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) as a novel target in chronic lymphocytic leukemia.* **Blood**, 2013. 122(9): p. 1621-33.
64. Mulvihill, M.J., et al., *Discovery of OSI-906: a selective and orally efficacious dual inhibitor of the IGF-1 receptor and insulin receptor.* **Future Med Chem**, 2009. 1(6): p. 1153-71.
65. Flanigan, S.A., et al., *Overcoming IGF1R/IR resistance through inhibition of MEK signaling in colorectal cancer models.* **Clin Cancer Res**, 2013. 19(22): p. 6219-29.
66. Medyouf, H., et al., *High-level IGF1R expression is required for leukemia-initiating cell activity in T-ALL and is supported by Notch signaling.* **J Exp Med**, 2011. 208(9): p. 1809-22.
67. Mardilovich, K., S.L. Pankratz, and L.M. Shaw, *Expression and function of the insulin receptor substrate proteins in cancer.* **Cell Commun Signal**, 2009. 7: p. 14.
68. Sun, X.J., et al., *Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein.* **Nature**, 1991. 352(6330): p. 73-7.
69. Cui, X., et al., *Epidermal growth factor induces insulin receptor substrate-2 in breast cancer cells via c-Jun NH(2)-terminal kinase/activator protein-1 signaling to regulate cell migration.* **Cancer Res**, 2006. 66(10): p. 5304-13.
70. Cui, X., et al., *Progesterone crosstalks with insulin-like growth factor signaling in breast cancer cells via induction of insulin receptor substrate-2.* **Oncogene**, 2003. 22(44): p. 6937-41.
71. White, M.F. and L. Yenush, *The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action.* **Curr Top Microbiol Immunol**, 1998. 228: p. 179-208.
72. Myers, M.G., Jr., et al., *YMXM motifs and signaling by an insulin receptor substrate 1 molecule without tyrosine phosphorylation sites.* **Mol Cell Biol**, 1996. 16(8): p. 4147-55.
73. Eck, M.J., et al., *Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor.* **Cell**, 1996. 85(5): p. 695-705.

74. Shepherd, P.R., D.J. Withers, and K. Siddle, *Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling*. **Biochem J**, 1998. 333 (Pt 3): p. 471-90.
75. Morishita, N., et al., *Activation of Akt is associated with poor prognosis and chemotherapeutic resistance in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia*. **Pediatr Blood Cancer**, 2012. 59(1): p. 83-9.
76. Cristofanelli, B., et al., *Cooperative transformation of 32D cells by the combined expression of IRS-1 and V-Ha-Ras*. **Oncogene**, 2000. 19(29): p. 3245-55.
77. Valentinis, B., et al., *Insulin receptor substrate-1, p70S6K, and cell size in transformation and differentiation of hemopoietic cells*. **J Biol Chem**, 2000. 275(33): p. 25451-9.
78. DeAngelis, T., et al., *Transformation by the simian virus 40 T antigen is regulated by IGF-I receptor and IRS-1 signaling*. **Oncogene**, 2006. 25(1): p. 32-42.
79. Dearth, R.K., et al., *Mammary tumorigenesis and metastasis caused by overexpression of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) or IRS-2*. **Mol Cell Biol**, 2006. 26(24): p. 9302-14.
80. D'Ambrosio, C., et al., *Transforming potential of the insulin receptor substrate 1*. **Cell Growth Differ**, 1995. 6(5): p. 557-62.
81. del Rincon, S.V., et al., *Retinoic acid mediates degradation of IRS-1 by the ubiquitin-proteasome pathway, via a PKC-dependant mechanism*. **Oncogene**, 2004. 23(57): p. 9269-79.
82. Ravikumar, S., et al., *Insulin receptor substrate-1 is an important mediator of ovarian cancer cell growth suppression by all-trans retinoic acid*. **Cancer Res**, 2007. 67(19): p. 9266-75.
83. Sisci, D., et al., *Expression of nuclear insulin receptor substrate 1 in breast cancer*. **J Clin Pathol**, 2007. 60(6): p. 633-41.
84. Hellawell, G.O., et al., *Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease*. **Cancer Res**, 2002. 62(10): p. 2942-50.
85. Bergmann, U., et al., *Increased expression of insulin receptor substrate-1 in human pancreatic cancer*. **Biochem Biophys Res Commun**, 1996. 220(3): p. 886-90.

86. Del Valle, L., et al., *Insulin-like growth factor I receptor activity in human medulloblastomas*. **Clin Cancer Res**, 2002. 8(6): p. 1822-30.
87. Traina, F., et al., *BCR-ABL binds to IRS-1 and IRS-1 phosphorylation is inhibited by imatinib in K562 cells*. **FEBS Lett**, 2003. 535(1-3): p. 17-22.
88. Machado-Neto, J.A., et al., *Knockdown of insulin receptor substrate 1 reduces proliferation and downregulates Akt/mTOR and MAPK pathways in K562 cells*. **Biochim Biophys Acta**, 2011. 1813(8): p. 1404-11.
89. Lassak, A., et al., *Insulin receptor substrate 1 translocation to the nucleus by the human JC virus T-antigen*. **J Biol Chem**, 2002. 277(19): p. 17231-8.
90. Prisco, M., et al., *Nuclear translocation of insulin receptor substrate-1 by the simian virus 40 T antigen and the activated type 1 insulin-like growth factor receptor*. **J Biol Chem**, 2002. 277(35): p. 32078-85.
91. Tu, X., et al., *Nuclear translocation of insulin receptor substrate-1 by oncogenes and Igf-I. Effect on ribosomal RNA synthesis*. **J Biol Chem**, 2002. 277(46): p. 44357-65.
92. Vuori, K. and E. Ruoslahti, *Association of insulin receptor substrate-1 with integrins*. **Science**, 1994. 266(5190): p. 1576-8.
93. Morelli, C., et al., *Nuclear insulin receptor substrate 1 interacts with estrogen receptor alpha at ERE promoters*. **Oncogene**, 2004. 23(45): p. 7517-26.
94. Urbanska, K., et al., *Estrogen receptor beta-mediated nuclear interaction between IRS-1 and Rad51 inhibits homologous recombination directed DNA repair in medulloblastoma*. **J Cell Physiol**, 2009. 219(2): p. 392-401.
95. Machado-Neto, J.A., *Caracterização da função e expressão de IRS1 e IRS2 na hematopoese normal, mielodisplásica e leucêmica*, in **Master degree dissertation**. 2011, University of Campinas: Internal Medicine.
96. Chen, J., et al., *Functional significance of type 1 insulin-like growth factor-mediated nuclear translocation of the insulin receptor substrate-1 and beta-catenin*. **J Biol Chem**, 2005. 280(33): p. 29912-20.
97. Wu, A., J. Chen, and R. Baserga, *Nuclear insulin receptor substrate-1 activates promoters of cell cycle progression genes*. **Oncogene**, 2008. 27(3): p. 397-403.

98. Nelson, W.J. and R. Nusse, *Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways*. **Science**, 2004. 303(5663): p. 1483-7.
99. Ying, Y. and Q. Tao, *Epigenetic disruption of the WNT/beta-catenin signaling pathway in human cancers*. **Epigenetics**, 2009. 4(5): p. 307-12.
100. van Amerongen, R. and R. Nusse, *Towards an integrated view of Wnt signaling in development*. **Development**, 2009. 136(19): p. 3205-14.
101. Kahn, M., *Can we safely target the WNT pathway?* **Nat Rev Drug Discov**, 2014. 13(7): p. 513-32.
102. Clevers, H., *Wnt/beta-catenin signaling in development and disease*. **Cell**, 2006. 127(3): p. 469-80.
103. He, T.C., et al., *Identification of c-MYC as a target of the APC pathway*. **Science**, 1998. 281(5382): p. 1509-12.
104. Tetsu, O. and F. McCormick, *Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells*. **Nature**, 1999. 398(6726): p. 422-6.
105. Albiñ, A., J.I. Johnsen, and M.A. Henriksson, *MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies*. **Adv Cancer Res**, 2010. 107: p. 163-224.
106. Kim, J.K. and J.A. Diehl, *Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer*. **J Cell Physiol**, 2009. 220(2): p. 292-6.
107. Nesbit, C.E., J.M. Tersak, and E.V. Prochownik, *MYC oncogenes and human neoplastic disease*. **Oncogene**, 1999. 18(19): p. 3004-16.
108. Niehrs, C., *The complex world of WNT receptor signalling*. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2012. 13(12): p. 767-79.
109. Rao, T.P. and M. Kuhl, *An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more*. **Circ Res**, 2010. 106(12): p. 1798-806.
110. Dalmizrak, O., et al., *Insulin receptor substrate-1 regulates the transformed phenotype of BT-20 human mammary cancer cells*. **Cancer Res**, 2007. 67(5): p. 2124-30.

111. Vita, M. and M. Henriksson, *The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer*. **Semin Cancer Biol**, 2006. 16(4): p. 318-30.
112. Meyer, N. and L.Z. Penn, *Reflecting on 25 years with MYC*. **Nat Rev Cancer**, 2008. 8(12): p. 976-90.
113. Dang, C.V., *MYC on the path to cancer*. **Cell**, 2012. 149(1): p. 22-35.
114. Bretones, G., M.D. Delgado, and J. Leon, *Myc and cell cycle control*. **Biochim Biophys Acta**, 2015. 1849(5): p. 506-16.
115. Soucek, L., et al., *Inhibition of Myc family proteins eradicates KRas-driven lung cancer in mice*. **Genes Dev**, 2013. 27(5): p. 504-13.
116. Liao, D.J. and R.B. Dickson, *c-Myc in breast cancer*. **Endocr Relat Cancer**, 2000. 7(3): p. 143-64.
117. Felsher, D.W. and J.M. Bishop, *Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages*. **Mol Cell**, 1999. 4(2): p. 199-207.
118. Jain, M., et al., *Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC*. **Science**, 2002. 297(5578): p. 102-4.
119. Marinkovic, D., et al., *Reversible lymphomagenesis in conditionally c-MYC expressing mice*. **Int J Cancer**, 2004. 110(3): p. 336-42.
120. Guo, W., et al., *Multi-genetic events collaboratively contribute to Pten-null leukaemia stem-cell formation*. **Nature**, 2008. 453(7194): p. 529-33.
121. Langenau, D.M., et al., *Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish*. **Science**, 2003. 299(5608): p. 887-90.
122. Gutierrez, A., et al., *Pten mediates Myc oncogene dependence in a conditional zebrafish model of T cell acute lymphoblastic leukemia*. **J Exp Med**, 2011. 208(8): p. 1595-603.
123. Smith, D.P., et al., *MYC levels govern hematopoietic tumor type and latency in transgenic mice*. **Blood**, 2006. 108(2): p. 653-61.

124. Filippakopoulos, P., et al., *Selective inhibition of BET bromodomains*. **Nature**, 2010. 468(7327): p. 1067-73.
125. King, B., et al., *The ubiquitin ligase FBXW7 modulates leukemia-initiating cell activity by regulating MYC stability*. **Cell**, 2013. 153(7): p. 1552-66.
126. Roderick, J.E., et al., *c-Myc inhibition prevents leukemia initiation in mice and impairs the growth of relapsed and induction failure pediatric T-ALL cells*. **Blood**, 2014. 123(7): p. 1040-50.
127. Hydbring, P., M. Malumbres, and P. Sicinski, *Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases*. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2016. 17(5): p. 280-92.
128. Asghar, U., et al., *The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy*. **Nat Rev Drug Discov**, 2015. 14(2): p. 130-46.
129. Casimiro, M.C., et al., *Overview of cyclins D1 function in cancer and the CDK inhibitor landscape: past and present*. **Expert Opin Investig Drugs**, 2014. 23(3): p. 295-304.
130. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. **Anal Biochem**, 1987. 162(1): p. 156-9.
131. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method*. **Methods**, 2001. 25(4): p. 402-8.
132. Eastman, Q. and R. Grosschedl, *Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals*. **Curr Opin Cell Biol**, 1999. 11(2): p. 233-40.
133. Nie, Z., et al., *c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells*. **Cell**, 2012. 151(1): p. 68-79.
134. Lin, C.Y., et al., *Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc*. **Cell**, 2012. 151(1): p. 56-67.
135. Miller, D.M., et al., *c-Myc and cancer metabolism*. **Clin Cancer Res**, 2012. 18(20): p. 5546-53.

136. Migliaccio, I., et al., *Nuclear IRS-1 predicts tamoxifen response in patients with early breast cancer*. **Breast Cancer Res Treat**, 2010. 123(3): p. 651-60.
137. Zheng, H., et al., *MicroRNA-1225-5p inhibits proliferation and metastasis of gastric carcinoma through repressing insulin receptor substrate-1 and activation of beta-catenin signaling*. **Oncotarget**, 2016. 7(4): p. 4647-63.
138. Wei, X., J. Feng, and Y. Hu, *Gene expression by simian virus 40 large T antigen-induced medulloblastomas in mice*. **Neural Regen Res**, 2012. 7(12): p. 932-7.
139. Ji, Q.S., et al., *A novel, potent, and selective insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor blocks insulin-like growth factor-I receptor signaling in vitro and inhibits insulin-like growth factor-I receptor dependent tumor growth in vivo*. **Mol Cancer Ther**, 2007. 6(8): p. 2158-67.
140. Jones, R.L., et al., *Phase I study of intermittent oral dosing of the insulin-like growth factor-I and insulin receptors inhibitor OSI-906 in patients with advanced solid tumors*. **Clin Cancer Res**, 2015. 21(4): p. 693-700.
141. Puzanov, I., et al., *A phase I study of continuous oral dosing of OSI-906, a dual inhibitor of insulin-like growth factor-I and insulin receptors, in patients with advanced solid tumors*. **Clin Cancer Res**, 2015. 21(4): p. 701-11.
142. Fassnacht, M., et al., *Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a double-blind, randomised, phase 3 study*. **Lancet Oncol**, 2015. 16(4): p. 426-35.
143. Leclerc, G.M., et al., *AMPK-induced activation of Akt by AICAR is mediated by IGF-1R dependent and independent mechanisms in acute lymphoblastic leukemia*. **J Mol Signal**, 2010. 5: p. 15.
144. Huang, Z., et al., *Inhibition of type I insulin-like growth factor receptor tyrosine kinase by picropodophyllin induces apoptosis and cell cycle arrest in T lymphoblastic leukemia/lymphoma*. **Leuk Lymphoma**, 2014. 55(8): p. 1876-83.
145. Sastre-Perona, A. and P. Santisteban, *Wnt-independent role of beta-catenin in thyroid cell proliferation and differentiation*. **Mol Endocrinol**, 2014. 28(5): p. 681-95.
146. Geng, Y., et al., *Insulin receptor substrate 1/2 (IRS1/2) regulates Wnt/beta-catenin signaling through blocking autophagic degradation of dishevelled2*. **J Biol Chem**, 2014. 289(16): p. 11230-41.

147. Ye, W., et al., *GZD824 suppresses the growth of human B cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells by inhibiting the SRC kinase and PI3K/AKT pathways.* **Oncotarget**, 2016.
148. Xie, J., et al., *IGF-IR determines the fates of BCR/ABL leukemia.* **J Hematol Oncol**, 2015. 8: p. 3.
149. Ng, O.H., et al., *Deregulated WNT signaling in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia.* **Blood Cancer J**, 2014. 4: p. e192.
150. Ge, Z., et al., *Clinical significance of high c-MYC and low MYCBP2 expression and their association with Ikaros dysfunction in adult acute lymphoblastic leukemia.* **Oncotarget**, 2015. 6(39): p. 42300-11.
151. Zhou, D., et al., *The skeletal muscle Wnt pathway may modulate insulin resistance and muscle development in a diet-induced obese rat model.* **Obesity (Silver Spring)**, 2012. 20(8): p. 1577-84.
152. Bommer, G.T., et al., *IRS1 regulation by Wnt/beta-catenin signaling and varied contribution of IRS1 to the neoplastic phenotype.* **J Biol Chem**, 2010. 285(3): p. 1928-38.

ANEXOS

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação da participação do IRS1 na via de sinalização da β -catenina na leucemia linfóide aguda

Pesquisador: Jaqueline Cristina Fernandes

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 24852714.3.0000.5440

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 845.854

Data da Relatoria: 17/10/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa de Jaqueline Cristina Fernandes com orientação de Fabíola Traina da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral do presente projeto de pesquisa é investigar a participação do IRS1 nuclear na via da β -catenina e na expressão do c-myc e da ciclina D1 em leucemia linfóide aguda. Para tanto, os objetivos específicos são: 1. Investigar e comparar a expressão gênica do IRS1, β -catenina, c-myc, ciclina D1 em células de medula óssea normal, e em pacientes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda. 2. Entre os pacientes com LLA, correlacionar a expressão gênica de IRS1 com a expressão da β -catenina, c-myc, ciclina D1.

3. Investigar a localização do IRS1 e β -catenina em linhagens celulares de LLA e células mononucleares normais. 4. Investigar a associação proteica do IRS1 e β -catenina no citoplasma e no núcleo de linhagens celulares de LLA. 5. Investigar, em linhagens de LLA, o efeito do silenciamento do IRS1 na localização celular da β -catenina e na expressão do c-myc e ciclina D1.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

-Riscos: os riscos da participação nesta pesquisa referem-se aos riscos da coleta de sangue de

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 845.854

medula óssea que é realizada simultaneamente aos exames da rotina, que inclui a dor da picada da agulha e às vezes um hematoma (mancha roxa) local da picada.

-Benefícios: é muito pouco provável que o que nós aprendermos com este estudo tenha um benefício direto para você. Estes resultados poderão ser úteis para o tratamento de pacientes no futuro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

CAUSUÍSTICA:

-Células hematopoéticas normais: células hematopoéticas normais serão obtidas de medula óssea coletadas de doadores de medula óssea para transplante de medula óssea (TMO) alogênico aparentado. Prevemos a inclusão de 10 amostras de indivíduos normais. Os doadores de medula óssea serão selecionados pela equipe de TMO do HC FRMP USP na rotina do atendimento aos pacientes. Os doadores serão informados sobre a pesquisa e recrutados para a pesquisa através da aplicação do TCLE pelo pesquisador responsável, na ocasião da internação do doador na Enfermaria de TMO do HC FMRP USP. As amostras serão coletadas no mesmo momento da coleta de medula óssea para o procedimento de doação de medula óssea para TMO alogênico aparentado.

-Células primárias de LLA: serão incluídos no estudo pacientes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda atendidos no Ambulatório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). O projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP. Solicitaremos autorização do Comitê de Ética em Pesquisa para a ausência de TCLE para os casos de

pacientes atendidos no HCFMRP-USP retrospectivamente, com diagnóstico confirmado de leucemia linfóide aguda, que já consentiram a realização da coleta e armazenamento da amostra para investigação molecular de BCR-ABL ao diagnóstico e que evoluíram a óbito (n=25) ou que perderam o seguimento nesta Instituição sem contato disponível (n=3). Observo que todos os casos selecionados retrospectivamente ou prospectivamente que estejam vivos e com contato disponível serão incluídos no estudo mediante assinatura do TCLE. Prevemos a inclusão de um total de 50 pacientes com LLA, incluindo 28 amostras do banco de amostras e 22 amostras de pacientes com LLA que estão em atendimento ambulatorial pela Hematologia ou que serão atendidos durante o desenvolvimento deste projeto. Amostras de medula óssea ou de sangue periférico coletadas ao diagnóstico ou na recidiva da doença serão incluídas no estudo.

-Linhagens celulares: linhagens celulares humanas de leucemias agudas foram adquiridas no

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

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

Continuação do Parecer: 845.854

ATCC, Philadelphia, USA. Serão utilizadas linhagens linfoides: MOLT4 (LLA T), Jurkat (LLA T), Raji (LLA B/Linfoma de Burkitt) e Daudi (LLA B/Linfoma de Burkitt).

-Processamento das amostras: As amostras de medula óssea ou sangue periférico serão submetidas à lise de hemácias com tampão contendo cloreto de amônio. A seguir, as células serão submetidas à extração de RNA, transcrição reversa e PCR quantitativo.

CRITÉRIOS:

-Critérios de inclusão para doadores sadios: Doadores de medula óssea para transplante de medula óssea alogênica aparentado que consentirem em participar do estudo. Critérios de inclusão para pacientes: indivíduos com diagnóstico confirmado de Leucemia linfóide aguda, atendidos no Ambulatório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), que consentirem em participar do estudo.

-Critérios de exclusão para pacientes: ausência de diagnóstico confirmado de LLA no serviço de Hematologia do HCFMRP-USP.

Justificativa da dispensa do TCLE para os pacientes atendidos no HCFMRP-USP com diagnóstico de leucemia linfóide aguda realizado anteriormente ao início do presente estudo, que consentiram a realização da coleta e armazenamento de amostra para investigação molecular de BCR-ABL ao diagnóstico, e que evoluíram a óbito (n=25) ou perderam o seguimento nesta Instituição (n=3). Existe um banco de amostras do Laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto aprovado pelo Comitê de Ética, de acordo com o processo HCRP nº 8723/2006. Afirmando que o professor doutor responsável pela guarda do material, consente sua utilização, salvaguardando os interesses dos doadores do material, sua imagem e sua privacidade e que todas as informações serão registradas de forma sigilosa em formulário padronizado,

que abrange dados sobre o diagnóstico, fatores prognósticos, tratamento e desfecho clínico. Afirmando que o pesquisador e a sua Chefia Imediata assumem a responsabilidade pelas informações apresentadas. Observo que todos os casos selecionados retrospectivamente ou prospectivamente que estejam vivos e com contato disponível serão incluídos no estudo mediante assinatura do TCLE. Uma carta à coordenadora do CEP solicitando a dispensa do TCLE com a devida justificativa, e a anuência do responsável pelo banco de amostras autorizando o uso das amostras (especificando tipo e quantidade) para a pesquisa (especificando o título) e nome dos pesquisadores responsáveis foi anexada na Plataforma Brasil.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 845.854

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Projeto de pesquisa Versão 3 (14/10/2014) e TCLE Versão 3 (14/10/2014) bem como o biorrepositório e TCLE para guarda de material biológico podem ser considerados aprovados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa versão 3 (14/10/2014) e TCLE versão 3 (14/10/2014) bem como o biorrepositório e TCLE para guarda de material biológico podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

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

RIBEIRAO PRETO, 27 de Outubro de 2014

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
 (Coordenador)

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

ANEXO B - Casuística dos pacientes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda

#	Data da amostra	Diagnóstico	BCR/ABL1	Situação na coleta	Data de nascimento	Idade	Gênero	GB	Última avaliação	Situação na última avaliação
1	02/02/2000	LLA T	negativo	Diagnostico	07/02/1982	18	M		13/09/2013	óbito
2	21/02/2000	LLA B	negativo	Diagnostico	21/10/1979	20	F		15/06/2015	vivo
3	28/02/2000	LLA B	negativo	Diagnostico	16/03/1920	78	M		02/03/2000	vivo
4	18/08/2000		negativo	Recidiva	13/06/1968	31	M		16/12/2000	óbito
5	06/09/2000	LLA B	negativo	Diagnostico	29/08/1961	38	M		16/03/2001	óbito
6	19/02/2001	LLA B	negativo	Diagnostico	09/05/1981	19	F	0,8	25/02/2001	óbito
7	20/03/2001	LLA B	positivo	Recidiva	17/05/1978	22	F	1,6	09/01/2002	vivo
8	10/09/2001	LLA B	negativo	Diagnostico	24/06/1971	29	F	17,5	08/04/2013	óbito
9	20/11/2001	LLA B	negativo	Diagnostico	21/09/1953	47	M	45	25/11/2001	óbito
10	28/04/2003	LLA B	negativo	Diagnostico	07/02/1982	21	M	81,5	06/11/2003	óbito
11	21/11/2003	LLA T	negativo	Diagnostico	17/12/1977	25	M	21,9	08/06/2016	vivo
12	19/02/2004	LLA T	negativo	Diagnostico	09/03/1979	24	F	10,8	21/11/2004	óbito
13	09/11/2007	LLA B	positivo	Diagnostico	29/04/1989	18	F	44,1	04/12/2008	óbito
14	21/11/2007	LLA B	positivo	Diagnostico	27/01/1984	23	M	61,8	21/05/2009	óbito
15	21/12/2007	LLA B	positivo	Diagnostico	10/11/1941	64	M	27,7	16/01/2008	óbito
16	21/12/2007	LLA B	positivo	Diagnostico	08/10/1965	41	M	6,6	06/03/2008	óbito
17	15/05/2009	LLA B	negativo	Diagnostico	31/07/1985	23	M	47,3	10/09/2011	óbito
18	15/07/2010	LLA B	negativo	Diagnostico	09/05/1979	30	F	13,6	04/01/2012	óbito
19	31/03/2011	LLA T	negativo	Diagnostico	22/07/1991	19	M	36,4	17/02/2016	vivo
20	02/06/2011	LLA B	positivo	Recidiva	23/03/1961	49	F	2,6	25/01/2012	óbito
21	23/11/2011	LLA B	negativo	Diagnostico	16/01/1990	21	M	549,5	19/07/2013	óbito
22	01/06/2012	LLA B	positivo	Diagnostico	20/01/1988	24	M	7,4	08/03/2016	vivo
23	30/07/2012	LLA B	positivo	Diagnostico	02/06/1957	54	F	10,5	15/05/2013	óbito
24	12/09/2012	LLA T	negativo	Diagnostico	08/04/1993	19	M	35,2	02/10/2012	óbito
25	11/10/2012	LLA T	negativo	Recidiva	12/04/1985	27	M	40,7	24/12/2012	óbito
26	28/11/2012	LLA B	negativo	Diagnostico	28/04/1992	20	M	13,8	29/03/2016	vivo
27	17/12/2012	LLA B	positivo	Diagnostico	04/11/1973	38	M	1,8	11/05/2014	óbito
28	04/07/2013	LLA B	negativo	Diagnostico	25/04/1993	20	M	7,3	11/03/2016	vivo
29	19/08/2013	LLA B	negativo	Diagnostico	07/05/1994	19	M	23,8	11/03/2016	vivo
30	27/08/2013	LLA B	negativo	Diagnostico	02/05/1979	33	M	23,6	15/04/2016	óbito
31	11/10/2013	LLA B	negativo	Recidiva	18/02/1986	27	F	3,2	13/04/2016	vivo
32	11/10/2013	LLA B	negativo	Diagnostico	22/04/1932	79	F	1,1	30/11/2013	óbito
33	09/12/2013	LLA B	negativo	Diagnostico	30/04/1967	45	M	22,4	13/12/2013	óbito
34	14/01/2014	LLA B	negativo	Diagnostico	27/07/1993	20	M	92,1	07/03/2014	óbito
35	11/07/2014	LLA T	negativo	Diagnostico	05/05/1994	20	M	443,1	15/04/2016	vivo
36	14/08/2014	LLA B	positivo	Diagnostico	23/05/1962	51	F	8,2	12/04/2016	vivo
37	03/09/2014	LLA B	negativo	Diagnostico	03/11/1977	36	F	4,3	15/04/2016	vivo
38	15/10/2014	LLA B	negativo	Diagnostico	26/10/1956	56	M	8,2	25/11/2015	óbito
39	13/11/2014	LLA T	negativo	Diagnostico	01/03/1964	49	M	6,7	30/01/2015	óbito
40	10/12/2014	LLA T	negativo	Diagnostico	13/01/1990	24	M	5,5	10/08/2015	óbito

#	Data da amostra	Diagnóstico	BCR/ABL1	Situação na coleta	Data de nascimento	Idade	Gênero	GB	Última avaliação	Situação na última avaliação
41	08/01/2015	LLA B	negativo	Diagnostico	26/05/1962	51	F	5,7	21/01/2015	óbito
42	16/01/2015	LLA B	negativo	Diagnostico	14/03/1990	24	M	36,8	16/02/2016	vivo
43	25/03/2015	LLA B	negativo	Diagnostico	06/03/1949	64	M	1,9	04/04/2015	óbito
44	09/10/2015	LLA T	negativo	Diagnostico	05/05/1964	50	M	8,3	10/11/2015	óbito
45	09/11/2015	LLA B	negativo	Diagnostico	07/11/1946	67	F	3,2	22/11/2015	óbito

#: número da amostra; GB: glóbulos brancos; F: feminino; M: masculino