UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Expressão dos genes da via de sinalização celular Hippo e Aurora
quinases na Leucemia Mielóide Crônica**

Ana Paula Zambuzi Cardoso Marsola

Ribeirão Preto
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Expressão dos genes da via de sinalização celular Hippo e Aurora
quinases na Leucemia Mielóide Crônica**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à
Farmácia para obtenção do Título de **Doutor em
CIÊNCIAS**

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia

Orientada: Ana Paula Zambuzi Cardoso Marsola

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia no dia 07/05/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Marsola, Ana Paula Zambuzi Cardoso

Expressão dos genes da via de sinalização celular Hippo e Aurora quinases na Leucemia Mielóide Crônica. Ribeirão Preto, 2018
112p.: il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia
Orientadora: de Castro, Fabíola Attié

1. Leucemia Mielóide Crônica 2. via Hippo 3. Aurora quinase 4. Inibidores de tirosina quinases

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Ana Paula Zambuzi Cardoso Marsola

Título do trabalho: Expressão dos genes da via de sinalização celular Hippo e Aurora quinases na Leucemia Mielóide Crônica

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A Maria Aparecida Zambuzi Cardoso, minha mãe, *in memoriam*, com amor, admiração, gratidão e muita saudade, pois sei que apesar da ausência sempre esteve ao meu lado, e a meu filho Vinícius por sua existência.

Agradecimento

Agradeço, primeiramente, a Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro por todo seu conhecimento, experiência e todo auxílio a mim dispensado para a completa elaboração deste trabalho.

Agradeço ao meu marido Fabio por todo amor, paciência e compreensão, por ser meu companheiro nessa vida.

Agradeço a todos os meus amigos pelo apoio, é uma honra tê-los ao meu lado todas as horas, sempre.

Agradeço a todos os meus familiares, especialmente meu pai Valter, que de alguma forma contribuíram para a minha caminhada neste trabalho.

Agradeço a todos os funcionários do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, em especial à Profa. Dra. Belinda Pinto Simões, Dr. Leonardo Palma e aos médicos residentes por todo auxílio dispensado ao meu trabalho.

Agradeço aos meus professores da FCFRP-USP e funcionários que auxiliaram na execução deste trabalho e à própria instituição pela oportunidade de aperfeiçoar meu conhecimento e vida profissional com ensino de qualidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e FAPESP pelo apoio financeiro destinado a essa pesquisa.

Epígrafe

“O futuro tem muitos nomes. Para os fracos é o inalcançável.
Para os temerosos, o desconhecido. Para os valentes, a oportunidade.”

Victor Hugo

RESUMO

MARSOLA, A.P.Z.C. **Expressão dos genes da via de sinalização celular hippo e aurora quinases na leucemia mielóide crônica**. 2018. 112f. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa resultante da expansão clonal de células mielóides positivas para o cromossomo *Philadelphia*. A patogênese da LMC está associada à expressão do oncogene *BCR-ABL1*, que codifica a proteína Bcr-Abl com constitutiva atividade da tirosina quinase, promovendo a mieloproliferação exacerbada e a resistência à apoptose das células leucêmicas. Os pacientes com LMC são tratados principalmente com inibidores de tirosina quinase (TKI), mas a resistência aos inibidores e a refratariedade tem sido relatada em alguns pacientes na fase crônica e na maioria dos pacientes em fases avançadas da doença. Assim sendo, continua a ser de suma importância a elucidação da patogênese da LMC e a busca de novos alvos terapêuticos, como os membros da via de sinalização Hippo e reguladores do ciclo celular, da família Aurora quinase. O presente estudo quantificou o nível de expressão de genes que codificam componentes da via de sinalização Hippo (*MST1*, *MOB1B*, *MOBKL1B*, *LATS1*, *LATS2*, *YAP* e *TAZ*) e Aurora quinases A e B em: 1) pacientes com LMC em diferentes fases da doença, resistentes ou sensíveis à terapia com mesilato de imatinibe (MI), em indivíduos saudáveis e 2) linhagens celulares HL-60, HL-60.Bcr-Abl tratadas com TKI (imatinibe, dasatinibe e nilotinibe), KCL22 e LAMA84 resistentes e sensíveis ao MI. Os níveis de expressão dos genes alvo foram correlacionados com o índice de prognóstico de Sokal. Os principais resultados revelaram que há alteração nos genes *MST1*, *MOB1B*, *MOBKL1B*, *LATS1*, *LATS2*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB* em pacientes com LMC em relação aos controles. Não houve correlação entre o índice de Sokal e a expressão gênica dos genes da via Hippo, *MST1*, *MOB1B*, *MOBKL1B*, *LATS1*, *LATS2* e *TAZ*, assim como os genes Aurora quinases A e B. Pacientes com LMC em fases avançadas apresentaram maiores valores de expressão dos genes *TAZ* e *AURKB*, comparado aos pacientes na fase crônica. Os pacientes resistentes ao TKI apresentaram as expressões dos genes *MST1*, *TAZ* e *AURKB*, significativamente mais elevadas, comparado aos pacientes sensíveis ao MI. Os resultados dos estudos em linhagens celulares indicaram principalmente que a expressão do gene *LATS1* pode ser modulada pela atividade de tirosina quinase Bcr-abl e que o oncogene *BCR-ABL1* induz a expressão de *AURKA*, *AURKB*, *LATS1* e *TAZ*. Em conjunto os dados obtidos revelam que a alteração da expressão dos genes da família Aurora quinase, A e B, e dos genes que codificam proteínas da via Hippo contribui para a patogênese e progressão da LMC. O desenvolvimento de fármacos e/ou a identificação de marcadores tumorais para a via de sinalização Hippo e família Aurora quinase, podem otimizar o tratamento da LMC, aumentando a susceptibilidade das células leucêmicas a apoptose e levando a um melhor prognóstico da doença.

Palavras-chave: Leucemia Mielóide Crônica; *BCR-ABL1*; Inibidores de tirosina quinase; via Hippo; Aurora quinases.

ABSTRACT

MARSOLA, A.P.Z.C. **Expression of hippo signaling pathway and aurora kinase gene in chronic myeloid leukemia**. 2018. 112p. Thesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative neoplasm resulting from clonal expansion of myeloid cells positive for the Philadelphia chromosome. The CML pathogenesis is associated with *BCR-ABL1* oncogene expression, which encodes the Bcr-Abl protein with a constitutive tyrosine kinase activity, leading to leukemic cell high proliferation and resistance to apoptosis. CML patients are mainly treated with tyrosine kinase inhibitors (TKI), but some of CML patients in chronic phase are resistant and in advanced phases are refractory to TKI. Thus, it is still relevant to elucidate the CML pathogenesis and seek to new therapeutic targets, including the Hippo signaling pathway members and cell cycle regulatory genes such as those encoding the Aurora kinase family. The present study quantified the RNA expression level of genes encoding components from the Hippo cell signaling pathway (*MST1*, *MOB1B*, *MOBKL1B*, *LATS1*, *LATS2*, *YAP*, and *TAZ*) and Aurora kinase A and B in: 1) CML patients at different stages of the disease, in CML patients resistant or sensitive to imatinib mesylate therapy, healthy individuals and 2) in cell lines HL-60, HL-60.Bcr-Abl treated with TKI (imatinib mesylate, dasatinib and nilotinib), KCL22 and LAMA84 resistant and sensitive to IM. The RNA expression levels of the target genes were also correlated to the CML Sokal's prognostic score values. The main results revealed that there are alterations in the genes *MST1*, *MOB1B*, *MOBKL1B*, *LATS1*, *LATS2*, *TAZ*, *AURKA* and *AURKB* in patients with CML in relation to the controls. There was no correlation between the Sokal index and the gene expression of the Hippo, *MST1*, *MOB1B*, *MOBKL1B*, *LATS1*, *LATS2* and *TAZ* genes, as well as the Aurora kinase genes A and B. Patients with advanced phase CML had higher values of expression of the *TAZ* and *AURKB* genes, compared to the patients in the chronic phase. Patients resistant to TKI had significantly higher *MST1*, *TAZ* and *AURKB* gene expression compared to MI-sensitive patients. The results of the studies in cell lines indicated primarily that the expression of the *LATS1* gene can be modulated by the Bcr-abl tyrosine kinase activity and the *BCR-ABL1* oncogene induces the expression of *AURKA*, *AURKB*, *LATS1* and *TAZ*. Together, the data show that altered expression of Aurora kinase family genes, A and B, and genes coding for Hippo pathway proteins contribute to the pathogenesis and progression of CML. The development of drugs and/or identification of tumor markers for the Hippo signaling pathway and the Aurora kinase family can optimize CML treatment by enhancing the susceptibility of leukemic cells to apoptosis and leading to a better disease prognosis.

Keywords: Chronic myeloid leukemia; *BCR-ABL1*; Tyrosine kinase inhibitors; Hippo pathway; Aurora kinases.

RESUMEN

MARSOLA, A.P.Z.C. **Expresión de genes de la vía de señalización hippo y de aurora quinasa en la leucemia mieloide crónica.** 2018. 112f. Tesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

La Leucemia Mielóide Crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa resultante de la expansión clonal de células mieloides positivas para el cromosoma *Philadelphia*. La patogénesis de la LMC está asociada a la expresión del oncogene *BCR-ABL1*, que codifica la proteína Bcr-Abl con constitutiva actividad de la tirosina quinasa, promoviendo la mieloproliferación exacerbada y la resistencia a la apoptosis de las células leucémicas. Los pacientes con LMC se tratan principalmente con inhibidores de tirosina quinasa (TKI), pero la resistencia a los inhibidores y la refracción ha sido reportada en algunos pacientes en la fase crónica y en la mayoría de los pacientes en fases avanzadas de la enfermedad. Por lo tanto, sigue siendo de gran importancia la elucidación de la patogénesis de la LMC y la búsqueda de nuevos objetivos terapéuticos, como los miembros de la vía de señalización Hippo y reguladores del ciclo celular, de la familia Aurora quinasa. El presente estudio cuantificó el nivel de expresión de genes que codifican componentes de la vía de señalización Hippo (*MST1*, *MOB1B*, *MOBKL1B*, *LATS1*, *LATS2*, *YAP* y *TAZ*) y Aurora quinasas A y B en: 1) pacientes con LMC en diferentes fases de la enfermedad, resistentes o sensibles a la terapia con mesilato de imatinib (MI), en sujetos sanos y 2) en linajes celulares HL-60, HL-60.Bcr-Abl tratados con TKI, KCL22 y LAMA84 resistentes y sensibles al MI. Los niveles de expresión de los genes de destino se correlacionaron con el índice de pronóstico de Sokal. Los principales resultados revelaron que hay alteraciones en los genes *MST1*, *MOB1B*, *MOBKL1B*, *LATS1*, *LATS2*, *TAZ*, *AURKA* y *AURKB* en pacientes con LMC en relación con los controles. No hubo correlación entre el índice de Sokal y la expresión génica de los genes de la vía Hippo, *MST1*, *MOB1B*, *MOBKL1B*, *LATS1*, *LATS2* y *TAZ*, así como los genes Aurora quinasas A y B. Los pacientes con LMC en fases avanzadas presentaron mayores valores de la expresión de los genes *TAZ* y *AURKB*, comparado a los pacientes en la fase crónica. Los pacientes resistentes al TKI presentaron las expresiones de los genes *MST1*, *TAZ* y *AURKB*, significativamente más elevadas, comparado a los pacientes sensibles al MI. Los resultados de los estudios en linajes celulares indicaron principalmente que la expresión del gen *LATS1* puede ser modulada por la actividad de tirosina quinasa Bcr-abl y que el oncogene *BCR-ABL1* induce la expresión de *AURKA*, *AURKB*, *LATS1* y *TAZ*. En conjunto los datos obtenidos revelan que la alteración de la expresión de los genes de la familia Aurora quinasa, A y B, y de los genes que codifican proteínas de la vía Hippo contribuye a la patogénesis y progresión de la LMC. El desarrollo de fármacos y / o la identificación de marcadores tumorales para la vía de señalización Hippo y para la familia Aurora quinasa pueden optimizar el tratamiento de la LMC, aumentando la susceptibilidad de las células leucémicas a la apoptosis y llevando a un mejor el pronóstico de la enfermedad.

Palabras clave: Leucemia mieloide crónica; *BCR-ABL1*; Inhibidores de tirosina quinasa; vía Hippo; Aurora quinasas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22, resultando na formação do cromossomo <i>Philadelphia</i>	2
Figura 2. Esquema de diagnóstico da LMC.....	4
Figura 3. Região central da via de sinalização Hippo e modo de ação de seus componentes em mamíferos.....	11
Figura 4. Distribuição e deslocamento de localização celular da Aurora quinase A e B na mitose.....	16
Figura 5. Análise comparativa da expressão gênica de <i>MST1</i> , <i>MOBKL1B</i> , <i>MOB1B</i> , <i>LATS1</i> , <i>LATS2</i> , <i>TAZ</i> , <i>AURKA</i> e <i>AURKB</i> em pacientes resistentes (R) ou sensíveis (S) ao MI e seus respectivos CTRL.....	34
Figura 6. Análise comparativa entre grupos nas fases crônica (C) e avançada (A) da LMC e seu respectivo grupo controle (CTRL).....	39
Figura 7. Expressão dos genes <i>LATS1</i> , <i>LATS2</i> , <i>TAZ</i> , <i>AURKA</i> e <i>AURKB</i> na linhagem HL60.Bcr-Abl, tendo como controle a linhagem HL60, ambas sem tratamento com TKI.....	43
Figura 8. Expressão dos genes <i>LATS1</i> , <i>LATS2</i> , <i>TAZ</i> , <i>AURKA</i> e <i>AURKB</i> em linhagens celulares HL-60 após 4h e 8h de tratamento com TKI comparado ao seu controle.....	47
Figura 9. Expressão dos genes <i>LATS1</i> , <i>LATS2</i> , <i>TAZ</i> , <i>AURKA</i> e <i>AURKB</i> em linhagens celulares HL-60.Bcr-Abl após 4h e 8h de tratamento com TKI comparado ao seu controle.....	48
Figura 10. Expressão dos genes <i>LATS1</i> , <i>LATS2</i> , <i>TAZ</i> , <i>AURKA</i> e <i>AURKB</i> em linhagens celulares KCL22 S, KCL22 R, LAMA84 S e LAMA84 R.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mutações mais comuns de Bcr-Abl e sua sensibilidade relativa aos TKI (<i>in vitro</i>).....	6
Tabela 2. TKI e outros potenciais agentes terapêuticos no tratamento da LMC.....	7
Tabela 3. Componentes da via Hippo em <i>Drosophila</i> e humanos, relevantes para o presente estudo, e respectivas funções.....	11
Tabela 4. Dados sociodemográficos dos pacientes com LMC e controles.....	21
Tabela 5. Definições e avaliação da resposta de pacientes com LMC ao tratamento de primeira linha com MI segundo as recomendações da <i>LeukemiaNet</i>	24
Tabela 6. Relação de pacientes submetidos à análise de correlação Índice de Sokal e expressão gênica.....	30
Tabela 7. Correlação entre o Índice prognóstico de Sokal e a expressão gênica de membros da via de sinalização Hippo e Aurora quinases em pacientes com LMC.....	32
Tabela 8. Correlação entre o Índice prognóstico de Sokal e a expressão gênica de membros da via de sinalização Hippo e Aurora quinases em pacientes com LMC sem tratamento medicamentoso.....	32
Tabela 9. Análise estatística de pacientes com LMC que são resistentes (R) ou sensíveis (S) ao MI e respectivos grupo controle (CTRL).....	35
Tabela 10. Estimativa de progressão da LMC segundo análise comparativa de expressão dos genes <i>LATS1</i> , <i>LATS2</i> , <i>TAZ</i> , <i>AURKA</i> e <i>AURKB</i> em pacientes e grupo controle com relação a resistência ou sensibilidade TKI.....	37
Tabela 11. Dados das análises estatísticas da expressão dos genes alvo em pacientes com LMC nas fases crônica (C) e avançada (A) da doença e grupo controle (CTRL).....	38
Tabela 12. Estimativa de progressão da doença (LMC) segundo análise comparativa de expressão dos genes <i>LATS1</i> , <i>LATS2</i> , <i>TAZ</i> , <i>AURKA</i> e <i>AURKB</i> em pacientes e grupo controle com relação à fase da LMC (crônica ou avançada).....	41
Tabela 13. Mediana de URE da expressão gênica de <i>LATS1</i> , <i>LATS2</i> , <i>TAZ</i> , <i>AURKA</i> e <i>AURKB</i> das linhagens (triplicata) HL60 controle e HL60.Bcr-Abl controle.....	42

Tabela 14. Expressão de genes da via Hippo e Aurora quinases (*Fold change*) nas linhagens HL60 e HL60.Bcr-Abl, em triplicata, após tratamento com TKI, imatinibe (G), dasatinibe (B) e nilotinibe (A) por 4 e 8h de exposição à droga..... 45

Tabela 15. Análise dos valores de *fold change* da expressão gênica de *LATS1*, *LAST2*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB*, para avaliação do tratamento da linhagem HL-60.Bcr-Abl após 4 e 8h, comparado a linhagem CTRL..... 46

Tabela 16. Análise dos valores de *fold change* da expressão gênica de *LATS1*, *LATS2*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB*, para avaliação do tratamento da linhagem HL-60 após 4 e 8h, comparado a linhagem CTRL 46

Tabela 17. Mediana de URE da expressão gênica de *LATS1*, *LATS2*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB* das linhagens (triplicata) KCL22 e LAMA84, Resistentes (R) e Sensíveis (S)..... 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A - avançada
Abl1 – *Abelson1*
ACC – anormalidade cromossômica clonal
AKI603 - Aurora A Kinase Inhibitor 603
AMN / A - nilotinibe
ANOVA - análise de variância
ATP – adenosina trifosfato
AURKA – Aurora quinase A
AURKB – Aurora quinase B
AURKC – Aurora quinase C
Bcr - *Breakpoint Cluster Region*
BMS / B - dasatinibe
C – crônica
CD34+ - *Cluster of Differentiation 34*
cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar
cr – cromossomo
Ct - *threshold cycle*
CTMmo - células-tronco mesenquimais da medula óssea
CTRL / CT - controle
DNA - ácido desoxirribonucleico
ELTS – EUTOS *long-term survival*
ENESTnd - Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials–Newly Diagnosed patient Study
EUTOS - *European Treatment and Outcome Study*
FA – fase acelerada
FB - fase blástica
FDA - *Food and Drug Administration*
FISH-DF – hibridização fluorescente *in situ* com sonda de dupla fusão
h – hora
HDAC6 – gene que codifica a enzima histona deacetilase 6
Hippo – proteína quinase
HLA - *Human Leukocyte Antigen*

IC50 – concentração inibitória de 50%

LATS - *Large Tumor Suppressor*

LLA - Leucemia Linfóide Aguda

LMA – Leucemia Mielóide Aguda

LMC - Leucemia Mielóide Crônica

LNH –B - Linfoma não Hodgkin de células B

M - masculino

μM – micromol

mg – miligrama

Mats - *Mps One Binder Kinase*

máx. - máximo

MCAK - *Mitotic centromere-associated kinesin*

MCL-1 - *Myeloid cell leukemia -1*

Med – mediana

mg – miligrama

MI - mesilato de imatinibe

mín. – mínimo

MOB - *Mps One Binder Kinase*

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

MST - *Mammalian STE20-like protein kinase 1*

n – número amostral

nm - nanômetro

nM - nanoMol

NP – sem progressão da doença

OMS – Organização Mundial da Saúde

P – progressão da doença

p – valor significativo

Ph - *Philadelphia*

pH – potencial hidrogeniônico

Quinase – enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas

r – coeficiente de correlação de Spearman

R - resistente

RASSF1A - *Ras Association Domain Family Member 1A*

RCC – Resposta Citogenética Completa
RCMe – Resposta Citogenética Menor
RCP - Resposta Citogenética Parcial
RHC - Resposta Hematológica Completa
RMM - Resposta Molecular Maior
RNA – ácido ribonucleico
RNAi - ácido ribonucleico de interferência
RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*
RT-PCR - *reverse transcription polimerase chain reaction*
RUNX - *Runt-related transcription factor*
S - sensível
SAV - *Salvador Family WW Domain*
SMADs - *Mothers Against Decapentaplegic Homolog gene (Drosophila)*
ST – sem tratamento
TAZ - *transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*
TBX-5 - *T-box transcription factor 5*
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEAD - *Transcriptional Enhancer Factor*
TK - *tyrosine kinase*
TKI - *tyrosine kinase inhibitor*
TMO – transplante de medula óssea
TNF - *Tumor Necrosis Factor*
TRAIL - *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*
URE – Unidade Relativa de Expressão
WW45 - *Salvador Family WW Domain*
YAP - *Yes Associated Protein*

LISTA DE SÍMBOLOS

$>$ maior que

$<$ menor que

$\leq$ menor ou igual

$=$ igual

$+$ positivo

$\bar{x}$ média

$\%$ percentagem

® registrado

$\times$ multiplicação (vezes)

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Resumen.....	iii
Lista de figuras.....	iv
Lista de tabelas.....	v
Lista de abreviaturas e siglas.....	vii
Lista de símbolos.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Leucemia Mielóide Crônica: definição, dados epidemiológicos e fisiopatologia.....	2
1.2 Via de sinalização celular Hippo: definição, componentes e associação com tumorigênese.....	9
1.3 Aurora quinases A e B: definição, via de sinalização e associação com tumorigênese.....	14
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. CASUÍSTICA E METODOLOGIA.....	20
3.1 Pacientes e controles.....	21
3.2 Isolamento das células mononucleares de pacientes e controles.....	24
3.3 Linhagens celulares e cultivo com TKI.....	25
3.4 Extração de RNA e síntese de cDNA das amostras.....	25
3.5 Quantificação dos genes alvos por RT-PCR em tempo real.....	26
3.6 Análise estatística.....	26
4. RESULTADOS.....	28
4.1 Dados sociodemográficos dos pacientes e controles.....	29

4.2 Correlação entre o valor do Índice de Sokal e os dados de expressão dos genes da via de sinalização Hippo e Aurora quinase A e B.....	29
4.3 Análise da expressão dos genes da via Hippo e Aurora quinases em pacientes com LMC resistentes e sensíveis ao MI e grupo controle.....	33
4.4 Análise da expressão gênica dos membros da via Hippo e Aurora quinases em pacientes com LMC em diferentes fases da doença e grupo controle.....	37
4.5.1 Análise da expressão gênica da via Hippo e Aurora quinases em linhagens celulares HL-60 e HL-60.Bcr-Abl, sem tratamento com TKI e após tratamento de 4 e 8h com TKI, imatinibe (G), dasatinibe (B) e nilotinibe (A).....	41
4.5.2 Expressão gênica dos componentes da via Hippo e Aurora quinase A e B em linhagens KCL22 S, KCL22 R, LAMA84 S e LAMA84 R.....	49
5. DISCUSSÃO.....	53
5.1 Discussão dos resultados obtidos da expressão dos genes da via de sinalização Hippo e Aurora quinases em pacientes portadores de LMC e controle.....	54
5.2 Discussão dos resultados obtidos da expressão dos genes da via de sinalização Hippo e Aurora quinases em linhagens celulares.....	59
6. CONCLUSÕES.....	63
7. REFERÊNCIAS.....	65
ANEXOS.....	82
1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP	
2. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da HCFMRP-USP	
3. Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes	
4. Termo de consentimento livre e esclarecido para controles	
5. Ficha de Identificação dos pacientes para compilação de dados	

1. Introdução

1.1 Leucemia Mielóide Crônica: definição, dados epidemiológicos e fisiopatologia

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa, caracterizada pela expansão clonal da célula hematopoética com anormalidade citogenética característica, o cromossomo *Philadelphia* (Ph) (MELO et al., 2007). Esta anormalidade cromossômica possui essa denominação porque foi descoberta em 1959 por dois cientistas, da Filadélfia e Pensilvânia, Peter Nowell da Universidade da Pensilvânia e David Hungerford do Centro de tratamento e pesquisa para o câncer Fox Chase Câncer Center (FOX CHASE CANCER CENTER FORWARD, 2009). Esse marcador citogenético origina-se da translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22, levando a justaposição dos genes da região do ponto de quebra do cromossomo BCR (*Breakpoint Cluster Region*) e dos genes que codificam a enzima tirosina quinase *Abelson1* (*ABL1*), culminando com a geração do oncogene de fusão *BCR-ABL1* (DEININGER et al., 2000; SCORE et al., 2010) (Figura 1).

Figura 1. Esquema demonstrando a translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22, resultando na formação do cromossomo *Philadelphia* – Ph1. O Ph1 é característico da Leucemia Mielóide Crônica. O cromossomo Ph está presente entre 85-90% dos indivíduos portadores de LMC. Essa mudança resulta na produção de uma proteína de fusão, chamada Bcr-Abl, que impulsiona a produção exagerada de glóbulos brancos, uma característica da LMC. **Fonte:** National Cancer Institute (2017).

O *BCR-ABL1* codifica a proteína Bcr-Abl com constitutiva atividade enzimática de tirosina-quinase (TK), que é a principal responsável pela transformação da célula-tronco hematopoiética normal em leucêmica, por meio de pelo menos três mecanismos: adesão celular alterada a nível de estroma medular e à matriz extracelular, aumento do potencial mitogênico e resistência a apoptose (DEININGER et al., 2000; PERROTTI et al., 2007).

A LMC apresenta incidência de um a dois casos para cada 100 mil habitantes por ano, correspondendo de 15% a 20% de todos os tipos de leucemias, com maior frequência em adultos, na faixa etária acima de 40 anos e principalmente do sexo masculino (BORTOLHEIRO et al., 2008; HOGLUND et al., 2015).

A LMC possui estágios de evolução distintos que incluem as fases crônica (FC), acelerada (FA) e blástica (FB). Cerca de 90% dos pacientes com LMC são diagnosticados na FC e apresentam leucocitose periférica e medular, desvio a esquerda não escalonado, neutrofilia, basofilia, eosinofilia e menos de 10% de blastos no sangue periférico e medula óssea. O paciente pode permanecer na FC por vários anos, mas a LMC pode progredir para as fases acelerada ou blástica, quando o tratamento empregado na FC é ineficaz (HEHLMANN et al., 2007).

A FA pode aparecer em meses ou anos após o diagnóstico da doença, dependendo da resposta do paciente ao tratamento instituído na FC, e é caracterizada pela presença de 10 a 19% de blastos no sangue periférico e medula óssea ou mais que 20% de basófilos no sangue periférico. A caracterização da FB se dá pela presença de >20% de blastos na medula óssea e sangue periférico, além de leucocitose, anemia e/ou trombocitopenia (HEHLMANN et al., 2007).

Os métodos empregados no diagnóstico da LMC são: exames hematológicos, análises citogenética para detecção do cromossomo Ph (cariótipo e/ou hibridização *in situ* por fluorescência - FISH), molecular para detecção do *BCR-ABL1* (RT-PCR em tempo real) e monitoramento do curso da doença e resposta à terapia). São importantes também as análises de mutações no domínio *BCR-ABL1* quinase nos casos de falha ou perda de resposta ou progressão da doença para fases avançadas (NCCN, 2018) (Figura 2).

Figura 2. Esquema de diagnóstico da LMC. Os métodos citogenéticos e moleculares utilizados para caracterização da LMC são cariótipo por bandeamento Giemsa (G) de medula óssea (MO), FISH-DF (hibridização fluorescente *in situ* com sonda de dupla fusão), PCR-RT (reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa). Ph: cromossomo *Philadelphia*. **Fonte:** Chauffaille (2008).

A biópsia da medula óssea é importante ao diagnóstico para avaliar a presença de fibrose, que é pouco frequente nessa fase, mas pode surgir com a progressão da doença. A reticulina pode estar aumentada em 40% dos pacientes e, geralmente, se relaciona à hiperplasia megacariocítica, acentuada esplenomegalia e maior intensidade de anemia (CORTES et al., 2003; BAIN, 2005; BORTOLHEIRO et al., 2008).

Historicamente, a LMC era tratada com agentes quimioterápicos e imunoterapêuticos, tais como hidroxycarbamida (hidroxiuréia), busulfano, interferon-alfa, interferon associado à citarabina e transplante de medula óssea (TMO) (FADERL et al., 2000 e KALIDAS et al., 2001).

A única terapia curativa é o TMO, e diversos fatores interferem no êxito do procedimento como idade, fase da doença, compatibilidade do antígeno leucocitário humano (HLA), tempo do diagnóstico da doença ao transplante, presença de reação de enxerto *versus* hospedeiro e de enxerto *versus* a própria doença (leucemia) (FADERL et al., 2000 e KALIDAS et al., 2001). Em caso de recidiva da doença na FC pós-TMO, os pacientes podem ser submetidos à infusão de linfócitos do doador

que induz a alta percentagem de remissão da doença (LEVENGA et al., 2007; BHATIA, 2017).

Contudo, em 2001, os inibidores de tirosina-quinase (TKI) foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) como terapia para LMC, o que melhorou drasticamente as taxas de sobrevida de pacientes com LMC, elevando a sobrevida para mais de 8 anos. Os TKI utilizados mais frequentemente, mesilato de imatinibe (MI), dasatinibe e nilotinibe têm como alvo a atividade enzimática da tirosina-quinase de Bcr-Abl, indução de morte das células leucêmicas e visam o reestabelecimento dos processos fisiológicos de proliferação, sobrevida e maturação celular nos pacientes com LMC (MELO et al., 2007; HEHLMANN et al., 2007).

O MI inibe as proteínas tirosina-quinases, como a Abl e Bcr-Abl e diminui a taxa de progressão dos pacientes com LMC para as FA e FB. O primeiro TKI que recebeu aprovação para o tratamento de primeira linha de LMC foi imatinibe em 2002, após isso, a melhoria da eficácia foi observada no estudo IRIS comparando imatinibe com IFN-alfa mais citarabina (O'BRIEN et al., 2003). O braço de imatinibe apresentou a melhor taxa estimada de 10 anos de sobrevida global de 83% e a melhor taxa de resposta molecular maior observada em 93% (HOCHHAUS et al., 2016; HOCHHAUS et al., 2017). Apesar dessas altas taxas de remissão, o uso contínuo pode promover resistência das células leucêmicas. A resistência ao TKI MI é observada nas fases avançadas da LMC e em 7% dos pacientes na FC (VAN ETEN, 2004).

O aparecimento de resistência das células ao MI está associado primeiramente aos mecanismos de resistência *BCR-ABL1* dependentes (BARNES et al. 2005), e na maioria dos casos, ligado ao surgimento de mutações no sítio catalítico da enzima Bcr-Abl, duplicação do cr Ph e aumento da expressão do gene *BCR-ABL1* (GORRE et al. 2001; SHAH et al. 2002; SHERBENOU et al. 2007). O nível de expressão de *ABL*, por exemplo, se correlaciona diretamente com a resistência *in vitro* de linhagens celulares de LMC ao MI.

As mutações no *BCR-ABL-1* são detectadas em 30% a 90% dos pacientes com resistência ao MI e mais de 100 mutações diferentes já foram identificadas (SOVERINI et al. 2011; ERNST e HOCHHAUS et al. 2012) (Tabela 1).

Tabela 1. Mutações mais comuns de Bcr-Abl e sua sensibilidade relativa aos TKI (*in vitro*)

Mutação	Localização	Sensibilidade/IC50		
		Imatinibe	Nilotinibe	Dasatinibe
T315I	Região ligadora de ATP	>24,6	>153,9	>250
T315A	Região ligadora de ATP	R	R	S
Y253F	P-loop	13,4	9,6	1,8
Y253H	P-loop	>24,6	34,6	1,6
E255K	P-loop	20	15,4	7
E255V	P-loop	>24,6	33,1	13,8
M351T	Domínio catalítico	3,4	1,2	1,4
G250E	P-loop	5,2	3,7	2,3
F359V	Domínio catalítico	7	13,5	2,8
H396P	A-loop	3,3	3,1	0,8
H396R	A-loop	6,7	3,2	1,6

IC50: concentração inibitória de 50%; ATP: adenosina trifosfato. **Fonte:** Adaptado de Guia da Sociedade Argentina de Hematologia 2012 (http://sah.org.ar/docs/203-230.4.SAH_GUIA2012_LeucemiaCronica.pdf)

A sobrevida global é o critério mais importante para a seleção dos agentes terapêuticos de primeira linha para qualquer tipo de câncer; outros fatores adicionais como idade, prognóstico, segurança, ou a possibilidade de alcançar a remissão sem tratamento são também relevantes. O TKI é a primeira linha de tratamento para a terapia de LMC e os hematologistas seguem diretrizes específicas que definem os indicadores de resposta e procedimentos específicos para monitoramento do tratamento, especialmente para garantir a escolha oportuna dos TKI de segunda linha (GOLDMAN et al., 2004; BACCARANI et al., 2009), dasatinibe e nilotinibe, além dos novos TKI disponíveis, como bosutinibe (LOPES et al., 2009).

Além desses fármacos, outros agentes com perspectiva ou efetiva atuação na LMC podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. TKI e outros potenciais agentes terapêuticos no tratamento da LMC.

Classe	Agente	Mecanismo de ação
TKI	Bosutinibe	Atua semelhante à atividade do dasatinibe e nilotinibe
	Bafetinib (INNO-406)	Inibidor de tirosino quinase, sendo um duplo inibidor Bcr-Abl e Lyn.
	Ponatinib (AP24534)	Atividade contra uma variedade de quinases diferentes, multi-alvo.
Inibidores de Aurora quinase	XL-228	Potente inibidor de IGF1R, Src e Bcr-Abl.
	AT9283	Inibidor de JAK2 e JAK3
	Danuseritinib (PHA-739358)	Inibidor de BCR-ABL, incluindo mutantes T315I e Aurora quinase. Tratamento de terceira linha de TKI.
	KW-2449	Inibidor de multiquinase. Suprime o crescimento de células de leucemia com mutações FLT3 ou T315I.
Inibidores de bolso de troca	Rebastinib (DCC-2036)	Inibidor de múltiplas quinases não ATP-competitivo, que se liga a resíduos de quinase ABL importantes para que a molécula mude da forma inativa para o estado ativado.
Modulador de apoptose	Omacetaxina	Inibe a síntese proteica e libera enzimas pró-apoptóticas da mitocôndria e liberação de CYT C. Ativo em mutações T315I em até 60% dos pacientes.

Fontes: Crawley et al. (2005); Lopes et al. (2009); Bixby et al. (2009); Shiotsu et al. (2009); Faderl et al. (2010); Gontarewicz et al. (2010); Eide et al. (2011); Zhang et al. (2016).

Dasatinibe, da segunda geração de TKI, foi inicialmente aprovado em 2006 para o tratamento de pacientes com LMC em fase acelerada ou blástica que são resistentes / intolerantes à terapia anterior (que incluiu imatinibe), seguido de aprovação de primeira linha em 2010. Os resultados do estudo de fase III DASISION demonstraram alta eficácia e tolerabilidade do dasatinibe em pacientes com LMC recentemente diagnosticada (CORTES et al., 2016).

Nilotinibe é um TKI de segunda geração que recebeu aprovação para o tratamento de LMC avançado resistente / intolerante à terapia anterior (que incluiu imatinibe) em 2007 e foi aprovado para o tratamento de primeira linha da LMC em 2010. A aprovação de nilotinibe para o tratamento de primeira linha ocorreu após resultados positivos do estudo ENESTnd, onde pacientes recentemente

diagnosticados com LMC foram tratados com nilotinibe ou imatinibe (SAGLIO et al., 2010; HOCHHAUS et al., 2016).

Os TKI dasatinibe e nilotinibe possibilitam a indução da remissão hematológica e citogenética em grande parcela dos pacientes com resistência primária ou resistência adquirida na FC da LMC. Entretanto, nas fases avançadas e na presença na leucemia linfoblástica aguda (LLA) cr Ph positiva as respostas são mais limitadas e a remissão é pouco frequente (MAURO, 2006).

Atualmente, o prognóstico dos pacientes com LMC está principalmente associado à resposta aos TKI, especialmente ao MI.

Para predizer do prognóstico dos pacientes, os hematologistas utilizam ainda índices de prognósticos como o EUTOS (*European Treatment and Outcome Study*), Hasford e Sokal para estratificar a LMC. Os índices de prognóstico foram estabelecidos em diferentes épocas de terapia com LMC, como uso de quimioterápicos, interferon e MI, com implicações para o prognóstico e o desfecho da doença. Os índices de Sokal e Hasford discriminam os pacientes entre grupos de alto risco, risco intermediário e baixo risco, enquanto que o índice EUTOS discrimina pacientes de alto risco e baixo risco (HASFORD et al., 1998; HASFORD et al., 2011; HU et al., 2014).

O índice de Sokal, descrito em 1984 (SOKAL et al, 1984; HU et al., 2014), foi o primeiro índice de prognóstico empregado para pacientes com LMC e ainda pode ser usado para predizer a resposta de pacientes que usam os TKI (MI, dasatinibe e nilotinibe), contudo seu poder de predição é baixo no caso de pacientes de riscos “baixo e intermediário”, até 3,5 anos de uso de MI. O cálculo do índice de Sokal é feito ao diagnóstico, antes do início do tratamento e classifica os pacientes como baixo, intermediário ou alto risco com base na porcentagem de blastos no sangue periférico, contagem de plaquetas, tamanho do baço (medida em centímetros abaixo da margem costal) e idade do paciente. O índice de Sokal identifica pacientes com LMC com probabilidades significativamente menores de resposta à terapia e aumento das probabilidades de progressão, indicando aos médicos o potencial subconjunto de pacientes que requerem maior observação e intervenção potencialmente precoce (HU et al., 2014). Esse índice ainda hoje permanece amplamente utilizado na prática clínica, sendo facilmente calculado por meio do sítio de web *European LeukemiaNet* (BACCARANI et al., 2009).

A medida de Hasford foi projetada com base em dados de pacientes tratados com interferon-alfa (HASFORD et al., 1998). Foi desenvolvido para prever a probabilidade de sobrevivência global de 10 anos em pacientes no grupo de risco (HASFORD et al., 2005).

O índice EUTOS foi bem-sucedido para prever a probabilidade de resposta citogenética completa dentro de 18 meses de início do tratamento e sobrevida livre de progressão (SLP) para pacientes que receberam MI (HASFORD et al., 2011).

Nenhum desses índices é perfeito para prever a resposta molecular dos pacientes ao medicamento, portanto, atualmente, o prognóstico dos pacientes com LMC está associado à resposta aos TKI, especialmente ao MI.

O TKI é o tratamento de primeira linha para os pacientes com LMC, pois induz altos índices de remissão citogenética e aumenta a sobrevida global dos pacientes, entretanto, alguns pacientes são resistentes a essa terapia. Além disso, apesar dos conhecimentos sobre o efeito do *BCR-ABL1* na transformação celular, os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela instalação e progressão da doença para as FA e FB ainda não foram completamente esclarecidos (DEININGER et al., 2000).

Nesse sentido, persiste a importância de melhor elucidar a patogênese e buscar novas terapias alvos para a LMC. Novos estudos dos componentes da via de sinalização Hippo e dos genes reguladores do ciclo celular como as Aurora quinases A e B em pacientes com LMC contribuem para o desenvolvimento de terapias alternativas (XU et al., 1995; JUSTICE et al., 1995; TAO et al., 1999).

1.2 Via de sinalização celular Hippo: definição, componentes e associação com tumorigênese

A via Hippo foi foco de estudos nas últimas décadas por suas funções estarem associadas ao controle do tamanho de órgãos em *Drosophila* e a sobrevida e proliferação das células em mamíferos. Nos mamíferos, a via de sinalização Hippo compreende um conjunto de proteínas quinases Mst1/2, Lats1/2 e proteínas WW45 (Sav em *Drosophila*), Mob (Mats em *Drosophila*) e Yap/Taz (proteína associada à Yes / co-ativador transcrricional com sítio de ligação PDZ (STRANO et al. 2013; MA et al., 2015) (Tabela 3).

A ativação e regulação da via de sinalização Hippo ocorrem por meio de diferentes mecanismos, como pode ser observado, resumidamente, na Figura 3.

A sinalização da cascata de quinases na via Hippo é mediada e regulada por complexos de proteínas transmembranas apicais e de proteínas envolvidas no controle da polaridade celular (STRANO et al., 2013).

Como peça central da via de sinalização Hippo, LATS1/2 têm como função modular os co-ativadores transcricionais *YAP*, oncogene que atua na transformação maligna celular; e *TAZ*, que é parálogo ao *YAP* estimulando a proliferação, migração e invasão celular (OVERHOLTZER et al, 2006; HAO et al., 2008; LEI et al., 2008).

Quando a via está ativada, a proteína quinase Mst1 ou Mst2 fosforila WW45 (Sav) e juntos fosforilam as quinases Mob1a (MOBKL1B), Mob1b e Lats1/2, que então fosforilam os co-ativadores de transcrição Yap e Taz. A não fosforilação de *YAP/TAZ*, a nível nuclear, desencadeia a ativação de fatores de transcrição como, por exemplo, TEAD, RUNX, entre outros. Quando fosforilados, Yap e Taz, são retidos no citoplasma ou enviados à degradação proteassomal. Lats fosforila e inativa a transcrição de Yap, limitando o crescimento do órgão (CHAN et al., 2005; PRASKOVA et al., 2008).

A ativação de Lats ocorre pela formação de complexos com as quinases Mst1/2. As ações fosforilativas de Mst1/2 atuam na regulação da função de Lats, a qual é potencializada pela presença de Mob1 (Mob1A e/ou Mob1B) que a estabiliza pela inibição do seu processo de ubiquitinação (HERGOVICH et al., 2006).

A Tabela 3 indica os principais componentes da via Hippo e suas funções mais características enquanto a Figura 3 demonstra a cascata da via de sinalização Hippo ativada e inativada com seus componentes focos do trabalho.

Tabela 3. Componentes da via Hippo em *Drosophila* e humanos e respectivas funções.

<i>Drosophila melanogaster</i>	Humanos	Função na via de sinalização Hippo
Hippo (Hpo)	MST1, MST2	Fosforila e ativa Lats.
Salvador (Sav)	WW45/SAV1	Facilita a fosforilação de Lats.
Warts (Wts)	LATS1, LATS2	Fosforila e inativa Yap
Mob (Mats)	MOBKL1A, MOBKL1B	Associa-se com Lats para potencializar a sua atividade catalítica.
Yorkie (Yki)	YAP, TAZ	Co-ativador transcricional, a forma não fosforilada ativa a expressão de alvos transcricionais que promovem o crescimento e proliferação celular, e impede a apoptose.
Scalloped (Sd)	TEAD1, 2, 3, 4	Fator transcricional que se liga a Yap/Taz regulando a expressão de genes alvos

Figura 3. Região central da via de sinalização Hippo e modo de ação de seus componentes em mamíferos. Quando a via está ativada a proteína quinase Mst1 ou Mst2 fosforila Sav e juntos fosforilam as quinases Mob1A, Mob1B, Lats1 e Lats2, que então fosforilam os co-ativadores de transcrição Yap e Taz. Fosforilados, Yap e Taz, são retidos no citoplasma pela proteína 14-3-3 ou enviados à degradação proteossomal. Dessa maneira, o fator de transcrição TEAD não atua na expressão de genes alvo (supressão). Quando a via Hippo está desativada, as quinases Mst1/2, Lats1/2 ficam inativas, assim Yap e Taz não são fosforilados e se acumulam no núcleo formando complexos com fatores de transcrição como o TEAD, promovendo a expressão de genes alvo. **Fonte:** Adaptado de Gumbiner e Kim (2014).

Vários estudos têm demonstrado que *YAP/TAZ* são oncogenes e que os demais membros da via Hippo são potenciais genes supressores tumorais (MA et al., 2015). A atividade da via Hippo na tumorigênese tem sido descrita e explorada por diferentes autores (ZHAO et al., 2010; MOROISHI et al., 2015).

O gene supressor de tumor *LATS*, relatado originalmente em *Drosophila melanogaster*, é uma serina-treonina quinase com atuação no controle da proliferação celular (XU et al., 1995; JUSTICE et al., 1995). *LATS* foi detectado em leveduras, *Caenorhabditis elegans* (cLats), camundongos (*LATS1*, *LATS2*) e humanos (*LATS1* e *LATS2*), como gene supressor de tumor (TAO et al., 1999; HORI et al., 2000; YABUTA et al., 2000). Esta descoberta proporcionou a descrição da via de sinalização Hippo, cuja função está associada ao ciclo, migração e sobrevivência celular (EDGAR et al., 2006; PAN et al., 2007).

A proteína Lats interage com os membros da via extrínseca da apoptose, e é ativada por receptores específicos, incluindo, principalmente, TNF, Fas–FasL e ou receptores TRAIL. Estes receptores ligam-se também as moléculas efetoras da via extrínseca, tais como a pró-caspase-8 para induzir a ativação da apoptose celular (JIN e EL-DEIRY, 2005). Neste contexto, a atividade de Lats é aumentada pela estimulação do receptor de morte Fas e pela interação das vias de *RASSF1A* e *MST2* (VISSER e YANG, 2010). Estudos mostraram que *RASSF1A* favorece a associação física entre Mst2 e Lats1 concomitantemente, portanto, levando a fosforilação de Yap1 e realocação nuclear onde se liga a p73 e potencializa sua atividade apoptótica. Além disso, o receptor ativo Fas induz *RASSF1A* a competir com RAF1 na ligação ao Mst2, promovendo assim a formação do complexo Lats1. Isso resulta na translocação de Yap do citoplasma para o núcleo (MATALLANAS et al., 2007).

A desregulação do estado de fosforilação de efetores de sinalização Hippo, especialmente Taz, tem sido associada ao aumento da taxa de auto renovação e capacidade proliferativa das células-tronco, que promove o aparecimento de um ambiente “pró-cancerígeno” e instabilidade genética (CORDENONSI et al., 2011; BARTUCCI et al., 2015). Na sequência de reações de fosforilação que ocorrem na cascata da via de sinalização Hippo, Taz atua como um co-ativador transcricional; em seu estado não fosforilado, ativa a expressão de alvos transcricionais,

promovendo crescimento e proliferação celular, e impede a apoptose (REUVEN et al., 2013; SASI et al., 2017).

Como descrito abaixo, muitos estudos recentes têm descrito a expressão desregulada de vários componentes da via Hippo em neoplasias sólidas e hematológicas. A expressão anormal de *YAP* foi relatada em síndromes mielodisplásicas e leucemias agudas (MACHADO-NETO et al., 2014; SAFARI et al., 2014). Ainda nesse contexto, a expressão desregulada de *YAP* e altos níveis de expressão de *TAZ* também foi associada ao pior prognóstico de câncer colo retal (YUEN et al., 2013).

O aumento dos níveis de expressão e da atividade da proteína Yap, analisados por meio da expressão de mRNA por PCR e Western Blot, respectivamente, tem sido detectado em tumores sólidos como colangiocarcinoma, hepatoblastoma, câncer de ovário e carcinoma epidermóide oral (ZENDER et al. 2006; XU et al. 2009, KOWALIK et al. 2011; ZHANG et al. 2011; LI et al. 2012). No carcinoma hepatocelular, o oncogene *YAP* está amplificado e a superexpressão da proteína Yap associada ao mau prognóstico dos pacientes (ZHOU et al., 2009).

A presença de mutações ou a expressão reduzida dos genes codificantes das *LATS1/2* têm sido descritas em leucemias linfoblásticas aguda, tumores de próstata, cerebrais, sarcoma de tecidos moles e carcinoma de pulmão (POWZANIUK et al. 2004; ROMAN-GOMEZ et al. 2004; TAKAHASHI et al. 2005; JIMENEZ-VELASCO et al. 2005; STRAZISAR et al. 2009).

Na leucemia linfoblástica aguda, a expressão de *LATS2* foi o fator de prognóstico mais importante para predizer a sobrevida livre de doença e sobrevida global dos pacientes (JIMENEZ-VELASCO et al. 2005). Além disso, a ausência de expressão de *LATS2* foi associada à resistência de linhagens de células leucêmicas à apoptose, como a KG-1a (KOEFFLER et al. 1980) e ED-40515+ (MAEDA et al. 1985), aos quimioterápicos, doxorrubicina e etoposídeo (KAWAHARA et al. 2008). Esse dado sugere que a expressão de *LATS2* pode ter relevância como marcador biológico de resposta ao tratamento das leucemias agudas.

LATS2 pode promover a apoptose em resposta tanto ao estresse mitótico quanto a ativação oncogênica (AYLON et al., 2006), devido a sua provável atuação na ativação de p53, em situações de estresse, na regulação da formação do fuso mitótico, na regulação negativa de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xl quando

superexpressa, além da regulação negativa da CiclinaE/CDK2 e em supressão de tumores (KE et al., 2004; LI et al., 2003; ABE et al., 2006; AYLON et al., 2006).

Pelo exposto, os membros da via Hippo participam de importantes vias de sinalização reguladoras da sobrevivência e divisão celular, e, portanto quando desregulados contribuem para o processo de tumorigênese e progressão de tumores.

Essas observações nos induziram a avaliar, nessa tese, a expressão dos componentes da via Hippo em pacientes com LMC em diferentes fases da doença, responsivos e resistentes ao mesilato de imatinibe.

1.3 Aurora quinases A e B: definição, via de sinalização e associação com tumorigênese

A fase M do ciclo celular é caracterizada pela divisão do núcleo (mitose) e a separação física em duas células-filha, passando pelas subfases prófase, metáfase, anáfase e telófase culminando com a citocinese. Nessa fase, atuam, portanto, os reguladores do ciclo celular, como os membros da família Aurora quinase. (Figura 4) (FARAG, 2011). A importância da família Aurora se dá visto que a ocorrência de uma mitose anormal pode levar a perda da correta divisão celular e formação de células geneticamente instáveis progredindo para o surgimento de tumores malignos (FARAG, 2011; YABUTA et al., 2011).

As Aurora quinases são serina / treonina quinases altamente conservadas que regulam o alinhamento e segregação cromossômica durante a mitose e a meiose. As Auroras A, B e C são constituídas por 403, 344 e 309 aminoácidos, respectivamente. As proteínas contêm um domínio N-terminal composto de 39 a 129 resíduos, um domínio proteína quinase e um domínio C-terminal de 15 a 20 resíduos (GOLDENSON e CRISPINO, 2014). As Auroras quinases atuam no processo de proliferação celular como reguladores da divisão celular da fase G2 para M, na fase de formação do fuso mitótico, maturação e separação do centrôssomo e citocinese (FARAG, 2011).

As Auroras A e B possuem domínio quinases altamente homólogos com cerca de 70% de identidade e são expressas em células normais, entretanto, diferem-se na localização e atividade durante o ciclo celular (SU et al., 2004).

As Aurora quinases mostram pouca variabilidade na sua sequência de aminoácidos e isso é muito importante para a interação com diferentes substratos específicos para cada Aurora quinase e para suas diferentes localizações subcelulares (ADAMS et al., 2001). O sítio ativo de ligação ao ATP em todas as Aurora quinases é revestido por 26 resíduos e três variantes (Leu215, Thr217, R220) são específicas para Aurora A (AURKA). Aurora A, B (AURKB) e C (AURKC) compartilham sequências idênticas em seu sítio ativo (BROWN et al., 2004).

Aurora quinases estão envolvidas em múltiplas funções de mitose. A Aurora A está envolvida na entrada mitótica, separação dos pares de centríolos, montagem precisa do fuso bipolar e alinhamento dos cromossomos na metáfase e conclusão da citocinese (MARUMOTO, et al., 2003). Aurora A localiza-se dentro dos centrossomas a partir do momento da duplicação dos centrômeros até a saída mitótica (CARMENA e EARNSHAW, 2003). A Aurora A é encontrada, portanto, nos centrossomas, polos do fuso mitótico, no fuso desde a prófase até a metáfase, mas predominantemente ao fuso durante a telófase (BISCHOFF et al., 1998).

A Aurora B, conhecida como proteína cromossômica passageira, localiza-se em cinetocores, desde a prófase até a metáfase, na zona média durante a anáfase e, eventualmente, no corpo médio da citocinese (BISCHOFF et al., 1998). Aurora C localiza-se em centrossomas de anáfase até citocinese (KIMURA et al., 1999).

Portanto, Aurora A controla eventos pré-metáfase, tais como a formação do fuso mitótico, com Aurora B e C direcionando os eventos de metáfase e pós-metáfase, incluindo a citocinese (HONDA et al., 2003; TERADA et al, 2001; FARAG, 2011; YABUTA et al., 2011) (Figura 4).

Figura 4. Distribuição e deslocamento de localização celular da Aurora quinase A e B na mitose. AURKA localiza-se nos centrôssomos duplicados desde o início da fase S e desloca-se para os microtúbulos do fuso bipolar durante a mitose, finalmente, move-se para os conteúdos perinucleares da célula filha no final da mitose. Já AURKB começa no início do G2 e localiza-se nos cromossomos na prófase, no centrômero na prometáfase e metáfase, no fuso central na anáfase e no corpo médio na citocinese **Fonte:** Adaptado de Tang et al. (2017).

AURKB e AURKC foram, posteriormente, designadas responsáveis pela fosforilação mitótica maciça da serina 10 na histona H3 *in vivo* (WALTER et al., 2000; FERRARI et al., 2005), que se acredita auxiliar na condensação e separação da cromatina (GOTO et al., 2002).

A AURKB participa da fosforilação das proteínas da cromatina, como a histona H3, auxiliando na condensação de cromossomos mitóticos e contribui para o ponto de verificação do fuso. A AURKB fosforila a cinesina, uma polimerase ligada aos microtúbulos (MCAK) para direcioná-la aos cinetocores, corrigindo assim potenciais erros de formação do fuso mitótico (LAN et al., 2004; OHI et al., 2004; ANDREWS et al., 2004).

A AURKB também é essencial para o funcionamento adequado da citocinese e na sua ausência, as duas células filhas permanecem ligadas por pontes de

citoplasma (HONDA et al., 2003; TERADA et al, 2001; LAN et al., 2004; OHI et al., 2004; ANDREWS et al., 2004) o que impede a separação. É um dos principais componentes do complexo cromossômico de passagem, que é uma estrutura mitótica funcional, está envolvida na bi-orientação cromossômica, regulando a associação de microtúbulos com cinetocores e citocinese (ADAMS et al., 2001).

As três Aurora quinases apresentam elevada expressão em diferentes tipos de neoplasias (DAMODARAN et al., 2017), como LMC, leucemia mieloide aguda (LMA), mieloma múltiplo, leucemia linfoblástica (LLA), linfoma agressivo não Hodgkin e linfoma de Hodgkin, indicando que inibidores das Aurora quinases são potenciais alvos para terapia em neoplasias hematológicas (FARAG, 2011).

Dentre as interações funcionais importantes entre a via Hippo e as Aurora quinases ressalta-se a fosforilação de Lats2 por Aurora A, para reforçar o recrutamento de Lats2 para o centrossoma o que conduziria a maturação do centrossoma (TOJI et al., 2004).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Quantificar a expressão de genes membros da via de sinalização Hippo e das Aurora quinases A e B na LMC.

2.2 Objetivos específicos

1) Quantificar em pacientes com LMC, em diferentes fases da doença e conforme *status* da resposta ao mesilato de imatinibe a expressão gênica de:

- Componentes da via Hippo: *MST1*, *MOB1B*, *MOBKL1B* (*MOB1A*), *LATS1*, *LATS2*, *YAP* e *TAZ*.
- Aurora quinases A e B (*AURKA* e *AURKB*).

2) Verificar se a expressão de *MST1*, *MOB1B*, *MOBKL1B* (*MOB1A*), *LATS1*, *LATS2*, *YAP*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB* está associada a expressão de *BCR-ABL1* utilizando as linhagens celulares HL-60 e HL-60.Bcr-Abl e a resposta ao MI nas linhagens LAMA84 e KCL22 sensíveis e resistentes ao MI;

3) Determinar a potencial correlação entre o índice de Sokal e a expressão dos genes estudados nos pacientes ao diagnóstico.

3. Casuística e metodologia

3.1 Pacientes e controles

Os pacientes e controles que participaram desse estudo foram esclarecidos e orientados quanto à realização da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido – TCLE (ANEXO 3).

A colheita de 30 ml de sangue periférico do braço dos participantes do estudo foi realizada no Ambulatório de Hematologia do HCFMRP-USP e os indivíduos controle na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP-USP. Foi estudado o sangue periférico de 67 adultos com LMC em diferentes fases da doença, Fase Crônica (FC), Acelerada (FA) e Blástica (FB), responsivos ou resistentes ao MI e indivíduos sadios (grupo controle).

No entanto, as análises foram realizadas efetivamente em 62 pacientes, devido à exclusão de pacientes pela insuficiência ou ausência de dados clínicos para a completa análise.

Os pacientes foram provenientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-HCFMRP-USP, enquanto que o grupo controle foi composto por estudantes e funcionários do campus da USP-Ribeirão Preto. A Ficha de Identificação (ANEXO 5) foi elaborada pelo pesquisador para compilação dos dados adquiridos dos prontuários médicos. Os perfis sociodemográficos dos pacientes com LMC e indivíduos controles analisados no trabalho estão listados na Tabela 4.

Tabela 4. Dados sociodemográficos dos pacientes com LMC e indivíduos controles

<i>Pacientes</i>	<i>Gênero</i>	<i>Idade</i>	<i>Controles</i>	<i>Idade</i>	<i>Cor da pele</i>
1	F	41	C27	43	Branca
2	M	32	C33	31	Branca
3	F	46	C35	43	Amarela
5	M	37	C21	36	Branca
6	F	63	C44	60	Branca
7	M	55	C45	55	Branca
8	M	39	C46	36	Branca
9	F	32	C18	31	Branca
11	M	51	C47	51	Branca
12	F	57	C48	59	Branca
14	M	29	C34	30	Mulato
15	M	58	C49	58	Branca
16	F	39	C50	33	Mulato
17	M	23	C31	22	Branca

18	F	40	C25	39	Branca
19	M	44	C10	46	Branca
20	M	22	C29	20	Branca
21	M	50	C36	50	Branca
22	F	27	C19	25	Branca
23	M	34	C21	36	Branca
24	M	56	C51	58	Branca
25	F	38	C52	35	Branca
26	F	60	C53	58	Branca
27	M	33	C2	31	Branca
28	M	27	C54	30	Branca
29	F	64	C55	66	Branca
30	M	52	C7	53	Branca
31	F	66	C56	68	Branca
32	M	30	C23	29	Branca
33	M	52	C12	53	Branca
34	M	64	C57	65	Mulato
35	F	26	C17	25	Branca
36	M	62	C58	65	Branca
37	F	45	C59	50	Mulato
38	M	34	C32	34	Mulato
39	F	35	C22	32	Branca
40	M	63	C1	65	Branca
41	M	50	C30	51	Branca
42	F	56	C24	53	Branca
43	M	61	C60	59	Branca
44	F	30	C61	30	Branca
45	M	44	C62	45	Branca
46	M	48	C63	46	branca
47	F	21	C26	21	branca
49	M	45	C37	45	amarela
50	F	36	C64	35	branca
51	F	42	C65	44	branca
52	M	64	C40	67	branca
53	F	77	C66	76	branca
55	F	53	C28	53	branca
56	F	39	C67	41	branca
57	F	41	C68	44	branca
58	M	51	C69	52	branca
59	F	59	C70	56	branca
60	M	35	C38	35	branca
61	M	30	C39	28	branca
62	M	45	C41	43	branca
63	M	82	C71	80	branca
64	F	48	C72	47	branca

65	M	54	C43	50	branca
66	M	64	C73	60	branca
67	M	34	C42	32	branca

M=masculino; F=feminino.

Os critérios de inclusão dos pacientes foram: indivíduos adultos com LMC diagnosticados pela presença do cromossomo Philadelphia e do gene *BCR-ABL1* e sem uso de medicações imunossupressoras. Os critérios de exclusão dos pacientes foram indivíduos portadores de doença autoimunes, neurodegenerativas, imunodeficiências, viroses, infecções, micoses, neoplasias sólidas e hematológicas diferentes da LMC. Os critérios de inclusão dos controles foram indivíduos adultos, sem uso de medicamentos, de doença autoimunes, metabólicas, endocrinológicas, genéticas, neurodegenerativas, imunodeficiências, viroses, infecções, micoses, neoplasias sólidas e hematológicas.

Pacientes com LMC nas diferentes fases da doença foram selecionados, e sua resposta citogenética completa (RCC), parcial (RCP) ou resistência (R) foi obtida após tratamento com IM (400 mg/dia) após 12 meses de tratamento. O estudo adotou as definições das fases da LMC estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (SWERDLOW et al., 2008), e as definições de resposta hematológica, citogenética, molecular, assim como resposta subótima e falha no tratamento estabelecidas pelo grupo *LeukemiaNet* (BACCARANI et al., 2009) conforme consta na Tabela 5.

Tabela 5. Definições e avaliação da resposta de pacientes com LMC ao tratamento de primeira linha com IM segundo as recomendações da *LeukemiaNet*.

Resposta Hematológica			Resposta Citogenética		Resposta Molecular	
Plaquetas < 450x10 ⁹ /L; Leucócitos < 10x10 ⁹ /L; Contagem diferencial sem granulócitos imaturos e com menos de 5% de basófilos; Baço não palpável.			Completa (RCC): Ph+ 0%; Parcial (RCP): Ph+ 1%-35%; Menor: Ph+ 36%-65%; Mínima: Ph+ 66%-95%; Ausente: >95%		Completa: Transcritos não detectáveis; Maior: razão entre BCR-ABL ≤ 0,1% na escala internacional	
Tempo de avaliação	Resposta ótima		Resposta subótima		Falha	Alertas
Diagnóstico	NA		NA		NA	Alto risco; ACC nas células Ph+*
3 meses	RHC e pelo menos RCMe (Ph+ ≤ 65%)		Sem RC (Ph+ > 95%)		Menos que RHC	NA
6 meses	Pelos menos RCP (Ph+ ≤ 35%)		Menos que RCP (Ph+ > 35%)		Sem RC (Ph+ > 95%)	NA
12 meses	RCC		RCP (Ph+1 – 35%)		Menos que RCP (Ph+ > 35%)	Menos que RMM
18 meses	RMM		Menos que RMM		Menos que RCC	NA
Qualquer tempo de tratamento	RMM estável ou melhorando		Perda de RMM; Mutações		Perda de RHC; Perda de RCC; Mutações; ACC nas células Ph+	Aumento dos níveis de transcritos; ACC em células Ph-

NA: não aplicável; ACC: anormalidade cromossômica clonal; Ph: cromossomo Philadelphia; RHC: resposta hematológica completa; RCMe: resposta citogenética menor; RC: resposta citogenética parcial; RCC: resposta citogenética completa.

Os dados de mielograma, hemograma e índice de prognóstico de Sokal foram coletados dos prontuários médicos de cada paciente com LMC.

O estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética da FCFRP-USP (ANEXO 1), número 329, e do HCFMRP-USP (ANEXO 2).

3.2 Isolamento das células mononucleares de pacientes e controles

As células mononucleares do sangue periférico de pacientes e controles foram separados pelo método Ficoll-Hypaque[®] 1,077 (Sigma-Aldrich[®]) segundo as especificações do fabricante. Após isolamento, as células foram lavadas com

tampão salina-fosfato (pH=7.4), contadas e armazenadas em Trizol[®] (Invitrogen Life Technologies[®]) para extração de RNA.

3.3 Linhagens celulares e cultivo com TKI

A linhagem HL-60 é uma linhagem celular de Leucemia Promielocítica Aguda (ATCC[®] 2014) imortalizada independente de fatores de crescimento e com características mieloides (GALLAGHER et al., 1979). Já a linhagem HL-60.Bcr-Abl é oriunda da infecção de células HL-60 selvagens com retrovírus recombinante, que possui o gene *BCR-ABL1*. A linhagem HL-60.Bcr-Abl é resistente à morte celular induzida por diferentes indutores de apoptose, se comparado a HL-60 (BRUMATTI et al., 2003).

LAMA84 é uma linhagem celular oriunda de sangue periférico de paciente portador de LMC em crise blástica, carrega a t(9,22) e LAMA 84 R apresenta-se altamente resistente a MI, e possui em seu transcrito a junção a3b2 (DSMZ, 2017a). Já KCL22 é uma linhagem de efusão pleural de paciente portador de LMC em crise blástica, Ph+, com t(9,22) e mutação p53, sendo que KCL22 R é uma linhagem de elevada resistência ao MI. Apresenta em seu transcrito a junção a2b2 (DSMZ, 2017b; ROSENHAHN et al., 2007). LAMA 84 R e KCL22 R são resistentes ao MI.

As linhagens HL-60 e HL-60.Bcr-Abl, LAMA 84 (S e R ao MI), KCL22 (S e R), foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies[®]) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de glutamina, 1% de penicilina e 1% de estreptomicina (Gibco[®]). As células HL-60 e HL-60.Bcr-Abl numa quantidade de 3×10^6 foram tratadas com o MI (10 μ M/poço), Dasatinibe (5nM/poço) e Nilotinibe (5nM/poço) em placa de 12 poços pelos períodos de 4 e 8 horas. Todas as linhagens celulares foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Gustavo P. Amarante-Mendes do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Para as linhagens celulares KCL22 (S e R) e LAMA 84 (S e R), não tratadas, o Ct das linhagens sensíveis foi considerado como calibradores.

3.4 Extração de RNA e síntese de cDNA das amostras

Células mononucleares do sangue periférico de pacientes e controles e das linhagens celulares cultivadas, na concentração de 5×10^6 , foram submetidas à extração de RNA pelo método de Trizol[®] (Invitrogen Life Technologies[®]) segundo as

especificações do fabricante. A concentração de RNA total obtida e a qualidade das amostras foram avaliadas por análise espectrofotométrica a 260 nm e a 280 nm e por meio de eletroforese em gel de agarose 2%. As reações de transcrição reversa foram realizadas com um micrograma de RNA por meio do kit *High Capacity cDNA reverse transcription*[®] (Applied Biosystems[®]).

3.5 Quantificação dos genes alvos por RT-PCR em tempo real

Os níveis de expressão dos genes da via Hippo, *MST1*, *MOB1B*, *MOBKL1B*, *LATS1*, *LATS2*, *YAP* e *TAZ*, assim como os genes reguladores de ciclo celular *AURKA* e *AURKB* foram quantificados por *real time* PCR nas amostras de cDNA de pacientes com LMC, controles e linhagens. Os genes endógenos (referência) da reação foram os genes *BETA-ACTINA* e *GAPDH*. Para os ensaios de PCR em tempo real foi empregado sondas TaqMan inventoriadas (Applied Biosystems[®]). A expressão gênica foi expressa em URE (Unidade Relativa de Expressão) no caso de pacientes e controles e *Fold change* para linhagens em triplicatas, como segue a fórmula abaixo:

Delta Ct= Ct do gene alvo – média geométrica dos Ct dos genes de referência

$$\text{URE} = 10000/2^{\text{deltaCt}}$$

dDelta Ct = deltaCt amostra – deltaCt controle

$$\text{Fold change} = 2^{-\text{dDeltaCt}}$$

3.6 Análise estatística

Os resultados da expressão gênica foram comparados entre os grupos controles e de pacientes; pacientes em diferentes fases e entre pacientes sensíveis e resistentes ao MI pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (U). Esse mesmo teste foi utilizado também nas análises comparativas das linhagens KCL22 R e S e LAMA84 R e S, assim como na comparação entre HL60 e HL60.Bcr-Abl.

As análises de correlação entre o índice de Sokal e os níveis de expressão dos genes alvo foram realizadas pelo teste não paramétrico de Spearman.

O teste de ANOVA foi empregado para análise da expressão dos genes alvo das triplicatas das linhagens celulares (*fold change*) tratadas com TKI. Todos os

testes foram realizados com o auxílio dos programas *GraphPad Prism* 5.0 e Excel. As diferenças foram significantes quando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Características sociodemográficas dos pacientes e controles

Foram analisados 62 pacientes e respectivos controles como se observa na Tabela 4. A diferença de números de indivíduos que é observada entre as análises se deu devido à insuficiência de dados.

O perfil epidemiológico dos pacientes foi idade média de 45,7 anos (mín. = 21; máx. = 82) e para o grupo controle a média de idade foi de 45,3 anos (mín.= 20; máx. = 80). 88,7% (55 pacientes) eram da raça branca e 58% (36 pacientes) do sexo masculino.

Os pacientes sem tratamento medicamentoso, participantes do estudo, não tiveram seus dados incluídos para as análises de Resposta ao mesilato de imatinibe. Assim como, os pacientes com informações insuficientes para o cálculo do Índice de Sokal e aqueles que não apresentaram o pareamento necessário a indivíduos controles.

MI foi utilizado por 57,3% dos pacientes analisados, 26,2% de Dasatinibe, 6,5% de Nilotinibe e 9,8% não faziam tratamento medicamentoso (ST).

O gene *YAP* foi expresso em somente 5 pacientes de um total de 62 (8,0%) e 9 indivíduos controle (14,5%), não foi possível obter o pareamento adequado com grupo controle desses poucos pacientes e, portanto as análises desse gene não foram realizadas.

4.2 Correlação entre o valor do Índice de Sokal e os dados de expressão dos genes da via de sinalização Hippo e Aurora quinase A e B

A análise do índice de Sokal foi realizada nos pacientes que apresentaram os dados suficientes para o cálculo (Tabela 6). O índice de Sokal foi calculado com base na fórmula preconizada pelo sítio de web europeu *LeukemiaNet* que utiliza dados como idade, tamanho do baço (centímetro abaixo da margem costal), número de plaquetas ($\times 10^9/L$) e o número de blastos (%) dos pacientes ao diagnóstico.

O índice de Sokal classifica os pacientes em Baixo risco: valor $<0,8$; risco Intermediário 0,8-1,2 e Alto risco $>1,2$. A maioria dos pacientes analisados no estudo se enquadraram no grupo de risco baixo e intermediário (72,1%), sendo a minoria do grupo de risco alto (27,8%), como demonstra a Tabela 6.

Tabela 6. Relação de pacientes submetidos à análise de correlação entre o Índice de Sokal e a expressão gênica.

<i>Pacientes</i>	<i>Gênero</i>	<i>Raça</i>	<i>Idade</i>	<i>Fase (coleta)</i>	<i>Droga</i>	<i>Resposta</i>	<i>Índice</i>	<i>Risco</i>
1	F	branca	30	A	DASA	Resistente	7,32	Alto
2	M	branca	32	A	DASA	Resistente	2,53	Alto
3	F	amarela	46	C	DASA	Resistente	2,6	Alto
5	M	branca	37	C	MI	RCC	1,01	Intermediário
6	F	parda	63	C	ST	-	1,59	Alto
7	M	branca	45	C	MI	RCC	0,96	Intermediário
8	M	branca	39	C	NILO	Resistente	1,05	Intermediário
9	F	branca	33	C	MI	RCC	1,47	Alto
11	M	branca	51	C	MI	RCC	1,08	Intermediário
12	F	branca	50	C	MI	RCC	0,8	Intermediário
14	M	mulato	25	C	MI	RCC	0,52	Baixo
15	M	branca	46	C	MI	RCC	0,69	Baixo
16	F	mulato	35	C	MI	RCP/RMM	1,21	Alto
17	M	branca	23	C	MI	RCP/RMP	0,71	Baixo
18	F	branca	35	C	MI	RCC	0,77	Baixo
19	M	branca	29	C	MI	RCC	0,7	Baixo
20	M	branca	19	C	MI	RCC	0,99	Intermediário
21	M	branca	44	C	DASA	Resistente	0,94	Intermediário
22	F	branca	22	C	MI	RCC	0,65	Baixo
23	M	branca	27	FB	DASA	Resistente	1,18	Intermediário
24	M	branca	47	C	MI	RCC	1,3	Alto
25	F	branca	28	C	MI	RCC	1,17	Intermediário
26	F	branca	56	C	DASA	Resistente	0,81	Intermediário
27	M	branca	23	C	MI	RCC	0,55	Baixo
28	M	branca	21	C	NILO	Resistente	0,53	Baixo
29	F	branca	52	A	NILO	Resistente	3,11	Alto
30	M	branca	45	A	DASA	Resistente	0,78	Baixo
31	F	branca	51	A	DASA	Resistente	0,83	Intermediário
32	M	branca	28	FB	DASA	Resistente	581,81	Alto
33	M	branca	45	FB	DASA	RCC	1,39	Alto
34	M	mulato	54	C	MI	RCP/RMM	0,94	Intermediário
35	F	branca	17	C	MI	RCC	0,62	Baixo
36	M	branca	57	C	MI	RCC	0,82	Intermediário
37	F	mulato	40	C	MI	RCC	1,53	Alto
38	M	mulato	31	C	DASA	Resistente	0,78	Baixo
39	F	branca	34	C	MI	RCC	0,63	Baixo
40	M	branca	64	C	MI	RCC	1,15	Intermediário
41	M	branca	38	C	MI	RCC	1,07	Intermediário
42	F	branca	56	C	ST	-	0,6	Baixo
43	M	branca	61	FB	MI	Resistente	6,3	Alto
44	F	branca	30	C	DASA	RCC	0,54	Baixo

45	M	branca	44	C	DASA	RCC	1,03	Intermediário
46	M	branca	48	C	ST	-	0,73	Baixo
47	F	Branca	21	C	ST	-	1,7	Alto
49	M	amarela	45	C	MI	RCC	0,61	Baixo
50	M	branca	64	C	DASA	RCC	5,3	Alto
51	F	branca	77	A	MI	Resistente	1,13	Intermediário
53	F	branca	36	C	DASA	Resistente	0,85	Intermediário
54	F	branca	42	C	MI	RCC	0,58	Baixo
55	F	branca	53	C	ST	-	0,27	Baixo
56	F	branca	39	FB	DASA	Resistente	0,91	Intermediário
57	F	branca	41	C	ST	-	1,1	Intermediário
58	M	branca	51	C	MI	RCC	0,77	Baixo
59	F	branca	59	FB	MI	Resistente	2,13	Alto
61	M	branca	35	C	MI	RCC	0,7	Baixo
62	M	branca	30	FB	MI	Resistente	13,93	Alto
64	F	branca	48	C	MI	RCP	0,93	Intermediário
65	M	branca	54	A	NILO	Resistente	1,06	Intermediário
66	M	branca	64	C	MI	RCC	0,7	Baixo

RCP=resposta citogenética parcial = 1-34% + de Ph1; RCC=resposta citogenética completa; RMC=resposta molecular completa; RMM=resposta molecular maior. Índice de Sokal: Baixo risco=<0,8; Risco intermediário= 0,8-1,2; Alto risco=>1,2. DASA= dasatinibe; MI=mesilato de imatinibe; NILO=nilotinibe; ST=sem tratamento no dia da coleta. A=fase acelerada; C=fase crônica; FB=fase blástica.

A análise de correlação foi obtida calculando o coeficiente de correlação de Spearman, a medida estatística da força de uma relação linear entre dados emparelhados, variando de -1 a +1, sendo que valores próximos de zero demonstram não correlação. A análise de correlação baseou-se no Índice de Sokal e nos valores de expressão dos genes. A análise de correlação entre o Índice de Sokal e os valores de expressão dos genes não revelou intervalo de confiança satisfatório para todos os genes focos do estudo (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7. Correlação entre o Índice prognóstico de Sokal e a expressão gênica de membros da via de sinalização Hippo e Aurora quinases em pacientes com LMC.

Genes	<i>n</i>	Sokal ($\bar{x}$)	URE ($\bar{x}$)	<i>p</i>	Spearman <i>r</i>
<i>MST1</i>	57	0,94	114,3	0,11	0,1646
<i>MOB1B</i>	59	0,94	55,1	0,26	0,0844
<i>MOBKL1B</i>	59	0,94	13538,8	0,35	0,0492
<i>LATS1</i>	57	0,94	193,3	0,27	0,0810
<i>LAST2</i>	58	0,95	359,8	0,13	0,1499
<i>TAZ</i>	59	0,94	139,3	0,11	0,1518
<i>AURKA</i>	58	0,94	45,8	0,29	0,0720
<i>AURKB</i>	58	0,95	10,9	0,35	0,0483

$\bar{x}$ =média; URE= Unidade relativa de expressão; *p*= significância; *r*= coeficiente de correlação de Spearman; valor significativo=*p*<0,05.

Os resultados mostraram que todos os dados correlacionados, de todos os genes do estudo, apresentaram o coeficiente de Spearman tendendo a zero, o que revela não correlação entre os dados, além de um intervalo de confiança >95%.

Avaliando isoladamente os pacientes antes do início do tratamento medicamentoso com TKI versus o índice de Sokal ao diagnóstico, foram obtidos os resultados mostrados na Tabela 8.

Tabela 8. Correlação entre o Índice prognóstico de Sokal e a expressão gênica de membros da via de sinalização Hippo e Aurora quinases em pacientes com LMC sem tratamento medicamentoso

Genes	<i>n</i>	Sokal ($\bar{x}$)	URE ($\bar{x}$)	<i>p</i>	Spearman <i>r</i>
<i>MST1</i>	6	0,88	333,3	0,24	0,37
<i>MOB1B</i>	6	0,88	2125,1	0,20	0,42
<i>MOBKL1B</i>	6	0,88	27889,1	0,20	0,42
<i>LATS1</i>	5	0,95	146,8	0,22	0,50
<i>LAST2</i>	6	0,88	1858,4	0,45	0,08
<i>TAZ</i>	6	0,88	290,0	0,24	0,37
<i>AURKA</i>	6	0,88	91,6	0,28	0,31
<i>AURKB</i>	6	0,88	98,8	0,50	0,02

$\bar{X}$ =média; URE= Unidade relativa de expressão; p= significância; r= coeficiente de correlação de Spearman; valor significativo= $p<0,05$.

Observa-se na Tabela 8 que os genes da via de sinalização Hippo e da família Aurora quinase também não puderam ser correlacionados ao valor do índice de prognóstico de Sokal em pacientes sem tratamento medicamentoso para a LMC, visto que todos os valores do coeficiente de correlação de Spearman tenderam a zero e com $p>0,05$.

Os resultados revelam que o Índice de Sokal não esteve correlacionado com os valores de expressão dos genes *MST1*, *MOB1B*, *MOBKL1B*, *LATS1*, *LATS2*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB* na LMC (Tabelas 7 e 8).

4.3 Análise da expressão dos genes da via Hippo e Aurora quinases em pacientes com LMC resistentes e sensíveis ao MI e grupo controle

Para analisar a resposta ao tratamento com o TKI MI, a expressão gênica foi avaliada nos grupos CTRL e em (i) pacientes que usaram o MI de primeira linha e respondiam ao fármaco; e (ii) pacientes que apresentaram resistência ao uso do inibidor de primeira linha e foram conduzidos ao uso de TKI de segunda linha, como dasatinibe ou nilotinibe, dependendo da avaliação médica de cada caso.

Determinou-se a variação dos níveis de expressão de genes entre pacientes e CTRL pelo teste de Mann-Whitney (U), que avalia dois grupos de valores com discrepância predominante.

A Figura 5 e Tabela 9 destacam os níveis de expressão dos genes alvos e dados estatísticos, em pacientes resistentes (R) ou sensíveis (S) ao MI e seus respectivos CTRL.

Figura 5. Análise comparativa da expressão gênica de *MST1*, *MOBKL1B*, *MOB1B*, *LATS1*, *LATS2*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB* em pacientes resistentes (R) ou sensíveis (S) ao MI e seus respectivos CTRL. CTRL: grupo controle. URE: Unidade relativa de expressão. *: valor significativo $p < 0,05$.

Tabela 9. Análise estatística de pacientes com LMC que são resistentes (R) ou sensíveis (S) ao MI e seu respectivo grupo controle (CTRL)

Genes	Grupo	<i>n</i>	URE (mediana)	U	<i>p</i>
<i>MST1</i>	CTRL x R	17	49,2 x 163,2	35	<0,05
	CTRL x S	35	43,0 x 93,7	396	<0,05
	R x S	17 x 35	163,2 x 93,7	189	<0,05
<i>MOB1B</i>	CTRL x R	19	294,9 x 703,5	118	<0,05
	CTRL x S	34	296,1 x 490,2	489	0,13
	R x S	19 x 34	703,5 x 490,2	286	0,24
<i>MOBKL1B</i>	CTRL x R	19	21,2 x 31350	0	<0,05
	CTRL x S	35	21,1 x 12030	0	<0,05
	R x S	19 x 35	31350 x 12030	289	0,21
<i>LATS1</i>	CTRL x R	18	99,7 x 261,8	100	<0,05
	CTRL x S	34	110,8 x 173,7	444	0,05
	R x S	18 x 34	261,8 x 173,7	264	0,21
<i>LAST2</i>	CTRL x R	18	298,8 x 395,9	117	0,07
	CTRL x S	35	314,8 x 335,9	611	0,49
	R x S	18 x 35	395,9 x 335,9	266	0,18
<i>TAZ</i>	CTRL x R	19	113,3 x 287,4	90	<0,05
	CTRL x S	32	88,9 x 113,2	426	0,12
	R x S	19 x 32	287,2 x 113,2	231	<0,05
<i>AURKA</i>	CTRL x R	19	24,3 x 65,9	91	<0,05
	CTRL x S	34	19,1 x 40,3	401	<0,05
	R x S	19 x 34	65,9 x 40,3	251	0,09
<i>AURKB</i>	CTRL x R	19	5,8 x 22,3	85	<0,05
	CTRL x S	33	5,3 x 6,3	436	0,08
	R x S	19 x 33	22,3 x 6,3	189	<0,05

URE= Unidade relativa de expressão; U= teste de Mann Whitney; R=resistente ao MI; S=sensível ao MI; CTRL= grupo controle; med.=mediana; n=número amostral; valor significante= *p* <0,05.

A figura 5 apresenta a análise comparativa da expressão gênica de *MST1*, *MOB1B*, *MOBKL1B*, *LATS1*, *LATS2*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB* em pacientes

resistentes ou sensíveis ao MI e seus respectivos CTRL, usando o teste de Mann-Whitney (U). Observam-se nos pares destacados com asteriscos as análises que demonstraram intervalo de confiança favorável ($p < 0,05$).

A análise de expressão gênica revelou que pacientes R ao MI exibiram: (i) maior nível de expressão para os genes *MST1* (med.:163,2, $p < 0,05$), *MOB1B* (med.: 703,5, $p < 0,05$), *MOBKL1B* (med.: 31350, $p < 0,05$), *LATS1* (261,8, $p < 0,05$), *TAZ* (med.: 287,4, $p < 0,05$), *AURKA* (med.: 65,9, $p < 0,05$), *AURKB* (med.: 22,3, $p < 0,05$), em relação ao grupo CTRL (medianas: 49,2; 249,9; 21,2; 99,7; 113,3; 24,3; 5,8, respectivamente) (Figura 5); (ii) alta expressão de *TAZ* em R comparado ao grupo S ao MI (med.: R x S: 287,4 x 113,2, respectivamente). A expressão do gene *LATS2* em pacientes dos grupos R (med.: 395,9, $p = 0,07$) e S (med.: 335,9, $p = 0,49$) foi similar ao grupo controle (med.=298,8 e 314,4; respectivamente).

Os níveis de expressão de *TAZ* (med.: 287,4, $p < 0,05$), *MST1* (med.: 163,2; $p < 0,05$) e *AURKB* (med.: 22,3; $p < 0,05$) estavam elevados em relação ao grupo de pacientes S (med.: 113,2; 93,7 e 6,3 respectivamente; $p < 0,05$). Esses achados indicam a associação entre resistência ao MI e altos níveis de *TAZ*, *MST1* e *AURKB*.

Os níveis de expressão de *MOB1B*, *MOBKL1B*, *LATS1*, *LATS2* e *AURKA* no grupo de pacientes R não foi diferente aos valores obtidos no grupo de pacientes S.

A estimativa de progressão da doença foi baseada nos níveis de expressão gênica (*LATS1*, *LATS2*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB*), no comportamento desses genes durante o curso da doença, segundo o que se conhece na literatura, e contagem de leucócitos. Essa análise nos revela que os pacientes do grupo R, com os maiores níveis para *TAZ*, *AURKA* e *AURKB*, se enquadrariam na relação de pacientes mais propensos à progressão da LMC. Para calcular a percentagem de pacientes com LMC com maior propensão para progredir para fases avançadas da doença, o número total de leucócitos no sangue periférico (leucocitose) e os dados de expressão gênica dos genes alvo de cada paciente foram analisados considerando os valores de referência (normal) obtidos do grupo controle (Tabela 10).

Tabela 10. Estimativa de progressão da doença (LMC) segundo análise comparativa de expressão dos genes *LATS1*, *LATS2*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB*, em pacientes e grupo controle com relação à resistência ou sensibilidade ao TKI.

Genes	Grupos	<i>n</i>	% de Progressão da doença
<i>LATS1</i>	CTRL x R	18	33,3
	CTRL x S	34	41,1
<i>LATS2</i>	CTRL x R	18	38,9
	CTRL x S	35	54,3
<i>TAZ</i>	CTRL x R	19	73,7
	CTRL x S	32	65,6
<i>AURKA</i>	CTRL x R	19	73,7
	CTRL x S	34	67,5
<i>AURKB</i>	CTRL x R	19	78,9
	CTRL x S	33	66,7

% de Progressão= comparativo entre os valores absolutos de URE (unidade relativa de expressão) de cada paciente dos grupos controle e grupos Resistente e Sensível ao TKI usado para o tratamento da LMC.

4.4 Análise da expressão gênica dos membros da via Hippo e Aurora quinases em pacientes com LMC em diferentes fases da doença e grupo controle

Para a análise da potencial associação da expressão dos genes da via Hippo e as fases da doença em pacientes com LMC considerou-se: (i) Fase Crônica (C) e (ii) Fase Avançada (A) (somatória dos pacientes em fases acelerada e crise blástica devido ao número amostral baixo dos grupos separadamente).

Dentre os pacientes estudados 75,4% estavam na fase crônica da doença, fato observado corriqueiramente na clínica devido ao surgimento dos TKI, como o IM. Essa classe de medicamentos foi marco no tratamento dos pacientes com LMC que hoje apresentam resposta muito satisfatória a esse tratamento, raramente progredindo em curto espaço de tempo para as fases mais graves da doença. Desta forma, analisamos os grupos C e A e respectivos grupos CTRL como mostrado na Tabela 11 e representado graficamente na Figura 6.

Tabela 11. Dados das análises estatísticas da expressão dos genes alvo em pacientes com LMC nas fases crônica (C) e avançada (A) da doença e grupo controle (CTRL).

Genes	Grupos	<i>n</i>	URE (med.)	U	<i>p</i>
<i>MST1</i>	CTRL x C	47	41,5 x 107,4	631	<0,05
	CTRL x A	11	60,7 x 163,2	18	<0,05
	C x A	47 x 11	107,4 x 163,2	177	0,054
<i>MOB1B</i>	CTRL x C	46	269,8 x 490,2	846	<0,05
	CTRL x A	13	302,5 x 703,5	61	0,11
	C x A	46 x 13	490,2 x 703,5	277	0,34
<i>MOBKL1B</i>	CTRL x C	47	5580 x 12230	831	<0,05
	CTRL x A	13	8769 x 19800	74	0,30
	C x A	47 x 13	12230 x 19800	288	0,38
<i>LATS1</i>	CTRL x C	45	101 x 182,5	759	<0,05
	CTRL x A	13	193,3 x 145,2	62	0,12
	C x A	45 x 13	182,5 x 145,2	241	0,17
<i>LAST2</i>	CTRL x C	46	306,8 x 408,3	974	0,19
	CTRL x A	14	328,3 x 358,4	93	0,41
	C x A	46 x 13	408,3 x 358,4	309	0,36
<i>TAZ</i>	CTRL x C	43	89,3 x 135,6	710	<0,05
	CTRL x A	14	119,8 x 249,5	63	<0,05
	C x A	43 x 14	135,6 x 249,5	242	<0,05
<i>AURKA</i>	CTRL x C	46	22,7 x 41,5	685	<0,05
	CTRL x A	14	25,2 x 59,3	62	<0,05
	C x A	46 x 14	41,5 x 59,3	260	0,13
<i>AURKB</i>	CTRL x C	45	5,4 x 7,6	739	<0,05
	CTRL x A	14	7,6 x 28,4	42	<0,05
	C x A	45 x 14	7,6 x 28,4	171	<0,05

URE= Unidade relativa de expressão; U= teste de Mann Whitney; C=fase crônica; A= fase avançada; CTRL= grupo controle; med.=mediana; n=número amostral; valor significante= $p < 0,05$.

Figura 6. Análise comparativa entre grupos nas fases crônica (C) e avançada (A) da LMC e seu respectivo grupo controle (CTRL). URE: Unidade relativa de expressão. *: Valor significativo $p < 0,05$.

LATS1, *MST1*, *MOB1B*, *MOBKL1B*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB* (med.: 182,8; 107,4; 490,2; 12230; 135,6; 41,5; 7,6, $p < 0,05$; respectivamente), estavam mais expressos nos pacientes com LMC na fase crônica do que no grupo controle (med.: 101; 41,5; 269,8; 5580; 89,3; 22,7; 5,4, $p < 0,05$; respectivamente).

Pacientes nas fases avançadas da doença apresentaram maior expressão de *MST1*, *TAZ* e *AURKB* (med.: 163,2; 249,5; 28,4, $p < 0,05$; respectivamente) do que o grupo controle (med.: 60,7; 119,8; 7,6, $p < 0,05$; respectivamente).

Observa-se ainda que os níveis de expressão dos genes *TAZ* e *AURKB* apresentaram maior expressão em pacientes na fase avançada da LMC, indicando que os níveis de expressão desses genes podem estar associados à progressão da doença no grupo de pacientes analisados.

A expressão dos genes *LATS1*, *LATS2*, *MST1*, *MOB1B*, *MOBKL1B* e *AURKA* foi similar entre pacientes nas fases crônica e avançada (med.: 182,5 x 145,2, $p=0,17$; 408,3 x 358,4, $p=0,36$; 107,4 x 163,2, $p=0,054$; 490,2 x 703,5, $p=0,34$; 12230 x 19800, $p=0,38$; 41,5 x 59,3, $p=0,13$; respectivamente) da LMC.

Os genes *MST1*, *TAZ* e *AURKB* mostraram-se mais expressos nos pacientes com LMC em ambas as fases, crônica e avançada, em relação ao grupo CTRL.

Pacientes com LMC em fases avançadas apresentaram maiores valores de expressão dos genes *TAZ* e *AURKB*, em relação à fase crônica (med.: 135,6 x 249,5; 7,6 x 28,4, $p < 0,05$; respectivamente).

Para calcular a porcentagem de pacientes com LMC com maior propensão para progredir para fases avançadas da doença, o número total de leucócitos no sangue periférico (leucocitose) e os dados de expressão gênica dos genes alvo de cada paciente foram analisados considerando os valores de referência (normal) obtidos do grupo controle (Tabela 12).

Tabela 12. Estimativa de progressão da doença (LMC) segundo análise comparativa de expressão dos genes *LATS1*, *LATS2*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB*, em pacientes e grupo controle com relação à fase da LMC (crônica ou avançada).

Genes	Grupos	<i>n</i>	% de Progressão da doença
<i>LATS1</i>	CTRL x C	47	37,8
	CTRL x A	11	53,8
<i>LATS2</i>	CTRL x C	46	45,6
	CTRL x A	13	57,1
<i>TAZ</i>	CTRL x C	47	67,4
	CTRL x A	13	64,3
<i>AURKA</i>	CTRL x C	45	73,9
	CTRL x A	13	64,2
<i>AURKB</i>	CTRL x C	46	68,8
	CTRL x A	14	78,5

% de Progressão= comparativo entre os valores absolutos de URE (unidade relativa de expressão) de cada paciente dos grupos controle e grupos fase crônica e fase avançada da LMC.

A estimativa da análise de progressão da doença, baseada nos níveis de expressão gênica (*LATS1*, *LATS2*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB*) e no comportamento desses genes durante o curso da doença segundo o que se sabe na literatura atual, nos revela que os pacientes do grupo de fase avançada, com pior prognóstico, com os maiores níveis para *TAZ*, *AURKA* e *AURKB*, se enquadrariam na relação de pacientes mais propensos a uma situação de progressão da LMC, visto que é de conhecimento na literatura que esses genes, quando superexpressos, desencadeiam um processo de proliferação celular exacerbada, apoptose alterada e tumorigênese, agravando o quadro da doença e podendo levar a uma progressão.

4.5.1 Análise da expressão gênica da via Hippo e Aurora quinases em linhagens celulares HL-60 e HL-60.Bcr-Abl, sem tratamento com TKI e após tratamento de 4 e 8h com TKI, imatinibe (G), dasatinibe (B) e nilotinibe (A).

Para a análise dos genes da via Hippo e Aurora quinases, em linhagens celulares, foram considerados somente os genes *TAZ*, *LATS1*, *LATS2*, *AURKA* e *AURKB*.

As linhagens celulares analisadas no estudo (HL-60, HL-60.Bcr.Abl, KCL22 R e S, LAMA84 R e S) foram cultivadas e processadas em triplicata para análise estatística posterior. A expressão gênica dos componentes da via Hippo e Aurora quinase A e B na linhagem HL-60.Bcr-Abl, comparado a linhagem HL-60, ambos sem tratamento com TKI, pode ser observada na Tabela 13 e Figura 7.

Tabela 13. Mediana de URE da expressão gênica de *LATS1*, *LATS2*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB* das linhagens (triplicata) HL60 e HL60.Bcr-Abl, sem exposição aos TKI

Genes	HL60 x HL60.Bcr-Abl URE (mediana)	U	<i>p</i>
<i>LATS1</i>	47,81 x 122,5	0	<0,05
<i>LATS2</i>	5264 x 7219	2	0,2
<i>TAZ</i>	33,91 x 106,6	0	<0,05
<i>AURKA</i>	379 x 917,9	0	<0,05
<i>AURKB</i>	5368 x 28420	0	<0,05

URE= Unidade relativa de expressão; U= teste de Mann Whitney; valor significante= $p < 0,05$.

Figura 7. Expressão dos genes *LATS1*, *LATS2*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB* na linhagem HL60.Bcr-Abl, tendo como controle a linhagem HL60, ambas sem tratamento com TKI. URE=unidade relativa de expressão; *: Valor significativo $p < 0,05$.

A Figura 7 nos revela que os genes da via de sinalização Hippo, *LATS1* e *TAZ*, e os da família Aurora quinase, *AURKA* e *AURKB*, foram mais expressos na linhagem HL60.Bcr-Abl, em comparação a linhagem HL-60.

Na Tabela 14 observa-se a relação de *fold change* obtida das linhagens HL-60 e HL-60.Bcr.Abl, que foram submetidas ao tratamento com TKI, MI (G), dasatinibe (B) e nilotinibe (A), por um intervalo de tempo de 4h e 8h de exposição às drogas.

Nas figuras 8 e 9 observa-se, graficamente, o comportamento dos genes analisados no trabalho em duas linhagens celulares (HL-60 e HL-60.Bcr-Abl)

comparado a sua respectiva linhagem controle (CT) e a Tabela 15 e 16 remete os valores da análise estatística (ANOVA) para as linhagens tratadas HL-60.Bcr-Abl e HL-60.

A ferramenta estatística utilizada para analisar os dados obtidos das linhagens HL-60.Bcr-Abl e HL-60, tratadas com TKI, foi a análise de variância (ANOVA) que é um procedimento utilizado para comparar três ou mais grupos.

Tabela 14. Expressão de genes da via Hippo e Aurora quinases (*Fold change*) nas linhagens HL60 e HL60.Bcr-Abl, em triplicata, após tratamento com TKI, imatinibe (G), dasatinibe (B) e nilotinibe (A) por 4 e 8h de exposição à droga.

Linhagens	$2^{\Delta\Delta Ct}$														
	TAZ			LATS1			LATS2			AURORA A			AURORA B		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
HL60.Bcr-Abl G 4H	0,2988	1,4668	1,3490	0,3066	0,9716	0,7656	0,3510	0,7238	0,8499	0,3025	0,7507	0,7920	0,5237	1,1009	1,0149
HL60.Bcr-Abl G 8H	0,3776	0,5985	3,0019	0,1869	0,2357	0,1515	0,5487	0,5010	0,5148	0,3818	0,3879	0,2728	0,2625	0,2498	0,1859
HL60.Bcr-Abl B 4H	0,3049	0,6315	1,2997	0,2350	0,6466	0,3539	0,4538	0,4825	0,4979	0,3127	0,5014	0,3594	0,3129	0,5506	0,3362
HL60.Bcr-Abl B 8H	0,2052	0,7879	3,6074	0,2953	0,0455	0,3924	0,3467	0,4265	0,6739	0,1875	0,0510	0,6367	0,0555	0,1231	0,4357
HL60.Bcr-Abl A 4H	0,2310	1,0775	2,2435	0,2064	0,6226	0,2573	0,2304	0,4559	0,3785	0,3079	0,6231	0,2228	0,3414	0,4934	0,2016
HL60.Bcr-Abl A 8H	0,3293	0,4613	1,9216	0,4679	0,1259	0,2561	0,4304	0,5428	0,5506	0,3052	0,2117	0,5372	0,4449	0,2004	0,3532
HL60 G 4H	1,1931	12,4649	0,6408	10,3223	2,5733	0,4183	0,5648	4,1511	0,6574	0,5599	11,4922	0,4359	0,1862	8,5783	0,3236
HL60 G 8H	1,1216	70,5419	0,7873	1,3636	-	0,4694	0,6875	8,9070	0,7831	0,3231	0,4679	0,5733	0,4448	1,2700	0,4108
HL60 B 4H	1,6517	3,2347	0,7582	14,1319	3,3794	0,6253	0,9222	1,6170	0,8032	1,2141	3,0313	0,6622	0,2806	2,8388	0,5559
HL60 B 8H	1,6880	0,8593	0,7541	1,1818	0,2238	0,4223	0,7197	0,9312	0,7945	0,2600	0,2364	0,5638	0,6453	1,1738	0,4038
HL60 A 4H	1,0960	3,7804	0,6041	8,8193	4,8621	0,5292	0,7959	2,1769	0,6854	0,6765	4,4907	0,5301	0,1329	5,7903	0,4021
HL60 A 8H	1,4048	1,1131	0,7650	1,8712	1,1155	0,7533	1,3945	1,1449	0,8468	0,5773	1,0195	0,7120	0,7334	1,4847	0,6242

4h: após 4h de tratamento com os inibidores de tirosina quinase mesilato de imatinibe (G), dasatinibe (B) e nilotinibe (A); 8h: após 8h de tratamento com os inibidores de tirosina quinase mesilato de imatinibe (G), dasatinibe (B) e nilotinibe (A).

Tabela 15. Análise dos valores de *fold change* da expressão gênica de *LATS1*, *LAST2*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB*, para avaliação do tratamento da linhagem HL-60.Bcr-Abl após 4 e 8h, comparado a linhagem CTRL

Genes	CTRL	MI ($\bar{x}$)	B ($\bar{x}$)	A ($\bar{x}$)	MI ($\bar{x}$)	B ($\bar{x}$)	A ($\bar{x}$)	p
	4 e 8h	4h			8h			
LATS1	1,000	0,6812	0,4118	0,3621	0,1913	0,2444	0,2833	$p<0,05$
LATS2	1,000	0,6415	0,4780	0,3549	0,5214	0,4823	0,5079	$p<0,05$
TAZ	1,000	1,0382	0,7453	1,1840	1,3259	1,5335	0,9040	0,98
AURKA	1,000	0,6150	0,3911	0,3846	0,3475	0,2917	0,3513	$p<0,05$
AURKB	1,000	0,8798	0,3999	0,3454	0,2327	0,2047	0,3328	$p<0,05$

Valor significante: $p<0,05$; $\bar{x}$ = média da expressão gênica; CTRL=controle; MI= mesilato de imatinibe; B=dasatinibe; A=nilotinibe.

Tabela 16. Análise dos valores de *fold change* da expressão gênica de *LATS1*, *LAST2*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB*, para avaliação do tratamento da linhagem HL-60 após 4 e 8h, comparado a linhagem CTRL

Genes	CTRL	MI ($\bar{x}$)	B ($\bar{x}$)	A ($\bar{x}$)	MI ($\bar{x}$)	B ($\bar{x}$)	A ($\bar{x}$)	p
	4 e 8h	4h			8h			
LATS1	1,000	4,4379	6,0455	4,7368	0,9165	0,6093	1,2466	0,37
LATS2	1,000	1,7911	1,1141	1,2193	3,4591	0,8151	1,1287	0,71
TAZ	1,000	4,7662	1,8815	1,8268	24,150	1,1004	1,0943	0,51
AURKA	1,000	4,1626	1,6358	1,8991	0,4547	0,3534	0,7695	0,62
AURKB	1,000	3,0293	1,2251	2,1084	0,7085	0,7409	0,9474	0,87

Valor significante: $p<0,05$; $\bar{x}$ = média da expressão gênica; CTRL=controle; MI= mesilato de imatinibe; B=dasatinibe; A=nilotinibe.

Figura 8. Expressão dos genes *LATS1*, *LATS2*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB* em linhagens celulares HL-60 após 4h e 8h de tratamento com TKI comparado ao seu controle. CT: controle; G: mesilato de imatinibe (MI); B: dasatinibe; A: nilotinibe.

Figura 9. Expressão dos genes *LATS1*, *LATS2*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB* em linhagens celulares HL-60.Bcr-Abl após 4h e 8h de tratamento com TKI comparado ao seu controle. CT: controle; G: mesilato de imatinibe (MI); B: dasatinibe; A: nilotinibe.

Na linhagem HL-60, no tempo de exposição de 8h ao TKI, verificou-se que os TKI foram capazes de diminuir a expressão dos genes *LATS1*, *AURKA* e *AURKB*, em todos os TKI (MI, dasatinibe e nilotinibe). MI foi o TKI que não apresentou efeito na expressão dos genes *LATS2* e *TAZ*. Em contrapartida, dasatinibe e nilotinibe apresentaram efeito de inibição na expressão de *LATS2* e *TAZ*.

Na linhagem HL-60.Bcr-Abl, todos os três inibidores utilizados no estudo foram capazes de diminuir significativamente a expressão de *LATS1*, *AURKA* e *AURKB*, e o MI modulou negativamente a expressão também de *LATS2* (tabela 15 e figura 9).

Em resumo, a expressão dos genes *LATS1*, *AURKA* e *AURKB* parecem ser dependentes da atividade quinase de Bcr-Abl na linhagem HL-60.Bcr-Abl. Não houve modulação da expressão dos genes alvo *LATS1*, *LATS2*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB* na linhagem HL-60 pelos TKI.

4.5.2 Expressão gênica dos componentes da via Hippo e Aurora quinase A e B em linhagens KCL22 S, KCL22 R, LAMA84 S e LAMA84 R.

Para determinação da potencial associação da expressão dos genes estudados com o perfil de resistência das linhagens Bcr-Abl positivas ao MI empregamos as linhagens sensíveis (KCL22 S e LAMA84 S) como linhagens de controle (referência) diante das suas resistentes. As linhagens foram cultivadas e analisadas igualmente as linhagens HL-60 e HL-60.Bcr-Abl, entretanto, sem tratamento com TKI.

Na Figura 10 e Tabela 17 estão relatados os níveis de expressão dos genes analisados no trabalho em linhagens celulares KCL22 S, KCL22 R, LAMA84 S e LAMA84 R.

Tabela 17. Mediana de URE da expressão dos genes, *LATS1*, *LATS2*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB* obtida da triplicata das linhagens KCL22 e LAMA84, Resistentes (R) e Sensíveis (S).

Genes	Linhagens	Grupos	URE (mediana)	U	<i>p</i>
<i>LATS1</i>	KCL22	S x R	134,4 x 203,5	2	0,5
	LAMA84	S x R	121,0 x 40,2	0	<0,05
<i>LATS2</i>	KCL22	S x R	9429 x 8443	4	0,5
	LAMA84	S x R	6089 x 3929	3	0,35
<i>TAZ</i>	KCL22	S x R	32,77 x 24,60	3	0,35
	LAMA84	S x R	9,12 x 9,87	4	0,5
<i>AURKA</i>	KCL22	S x R	202,6 x 290,8	2	0,2
	LAMA84	S x R	73,07 x 63,4	4	0,5
<i>AURKB</i>	KCL22	S x R	4122 x 7530	2	0,2
	LAMA84	S x R	4709 x 2135	3	0,35

URE= Unidade relativa de expressão; U= teste de Mann Whitney; R=linhagem resistente; S=linhagem sensível; med.=mediana; valor significativo= $p < 0,05$.

Figura 10. Expressão dos genes *LATS1*, *LATS2*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB* em linhagens celulares KCL22 S, KCL22 R, LAMA84 S e LAMA84 R. S: sensível (controle) ao MI; R: resistente ao MI; URE=unidade relativa de expressão; *: Valor significativo $p < 0,05$.

A análise estatística das linhagens KCL22 S, KCL22 R, LAMA84 S e LAMA84 R foi realizada através do teste de Mann-Whitney. O teste demonstrou valores de $p < 0.05$ para o gene *LATS1* na comparação da linhagem LAMA84 Sensível x

Resistente ao MI. Para os demais genes $p>0.05$, o que enfraquece a confiabilidade dos dados obtidos.

LATS1 foi único gene estudado que estava significativamente menos expresso na linhagem resistente LAMA84 em relação a sensível.

Os resultados indicaram que não houve diferença de expressão dos genes *TAZ*, *LATS2*, *AURKA* e *AURKB* entre linhagens sensíveis e resistentes ao MI.

LATS2 foi o gene mais expresso em ambas as linhagens, KCL22 e LAMA84, com mediana de URE mais elevada nas linhagens Sensíveis de ambas.

5. Discussão

5.1 Discussão dos resultados obtidos da expressão dos genes da via de sinalização Hippo e Aurora quinases em pacientes portadores de LMC e controle.

A via de sinalização Hippo é uma via de desenvolvimento altamente conservada que desempenha papel essencial no controle de tamanho de órgãos, supressão de tumores, regeneração de tecidos e autorrenovação de células-tronco (PICCOLO et al., 2014; YIMLAMAI et al., 2015; JUAN e HONG, 2016).

As Aurora quinases são serina / treonina quinases que regulam a formação do fuso mitótico e segregação de cromátides durante o processo de divisão celular. Defeitos nesta segregação podem causar instabilidade genética, comportamento altamente associado à tumorigênese (ANDREWS et al. 2003; FARAG, 2011).

Os resultados do presente trabalho demonstraram alteração da expressão de genes que codificam membros da via de sinalização Hippo e das auroras quinases em pacientes com LMC independente das fases, na fase avançada e resistentes ao MI sugerindo a participação da desregulação da via Hippo e enzimas Aurora quinases na patogênese da LMC, progressão e resistência a terapia com TKI.

Nas fases avançadas da LMC (fase acelerada + crise blástica), os genes *MST1*, *TAZ* e *AURKB* apresentaram alta expressão o que sugere uma associação com a progressão da doença.

Não foi verificada alteração da expressão do gene supressor de tumor *LATS2* em pacientes com LMC e nem na análise de associação com a resistência ao MI.

Diferentemente dos dados obtidos nesse estudo, a literatura relata que pacientes com LMC resistentes ao MI, devido à presença de mutações, apresentam elevada expressão de *LATS2* (NCCN, 2018). A regulação negativa *LATS2* foi ainda descrita em várias neoplasias e associada a mau prognóstico na leucemia linfoblástica aguda (KAWAHARA et al., 2008). Sabe-se que *LATS2* suprime a apoptose induzida por danos no DNA em meios de alta densidade celular, inibindo a Abl tirosina quinase, responsável por induzir morte celular sob o dano ao DNA (REUVEN et al., 2013). Estudos prévios evidenciaram que *LATS2* desempenha papel na apoptose independente da via de sinalização Hippo, estabilizando o p53 em células poliploides (SASI et al., 2017) ou associado a Aurora quinases (YABUTA et al., 2011) no processo de regulação do ciclo celular.

Em contraste com a literatura que mostra o papel supressor de tumor de *LATS2*, Gholami et al (2014) descreveram que esse gene estava mais expresso em pacientes com leucemia mieloide aguda e envolvido no desenvolvimento da doença. Ainda nesse contexto, Kawahara et al (2008) documentaram que a expressão de *LATS2* estava diminuída em várias leucemias altamente resistentes à quimioterapia convencional. O silenciamento da expressão de *LATS2* em células leucêmicas estudadas não alterou a taxa de crescimento celular, mas extinguiu células resistentes aos agentes indutores de danos ao DNA. As análises com co-expressão transitória de *LATS2*, *YAP2* e *p73* mostraram que *LATS2* contribuiu para a estabilidade de *YAP2* e *p73*, que dependia da função quinase de *Lats2* e *Yap2* na fosforilação da serina 127. Os resultados de Kawahara et al (2008) sugeriram ainda que *Lats2* está envolvida no destino de *p73* por meio da fosforilação de *Yap2* e na indução de genes alvo *p73* subjacentes à quimiossensibilidade de células leucêmicas.

A elevada expressão do gene *TAZ* em pacientes com LMC em fase avançada e resistentes ao MI foi um dos resultados mais interessantes obtidos, visto que altos níveis de expressão de *TAZ* foram associados a um pior prognóstico em neoplasias. *TAZ* pode exacerbar a proliferação celular, induzir tumorigênese e contribuir para a progressão de doenças (BARTUCCI et al., 2015; WANG et al., 2013; TIAN et al., 2015). No estudo com linhagem HL60.Bcr-Abl foi também observado a elevada expressão de *TAZ* o que indica a relação entre *TAZ* e *BCR-ABL1*, o que sugere que o aumento de *TAZ* na fase avançada

A alteração na via de sinalização Hippo conduz a ativação anormal de *TAZ/YAP*, o que é frequentemente observada em tumores humanos (PAN, 2010; MO et al., 2014; HARVEY et al., 2013; MOROISHI et al., 2015). Evidências definitivas sobre o papel de *TAZ/YAP* na tumorigênese e progressão da doença tem sido obtidas por meio do estudo de modelos experimentais e animais nos quais a superexpressão de *TAZ/YAP* confere as células transfectadas a ativação da proliferação, invasão e migração celular, características das células-tronco cancerígenas *in vitro*.

Por outro lado, a perda de *YAP* e/ou *TAZ* nas linhagens celulares tumorais inibe o crescimento, reduz a migração e a invasão celular e bloqueia a capacidade

de autorrenovação das células-tronco cancerígenas (OVERHOLTZER et al., 2006; ZHAO et al., 2007; ZHAO et al., 2008; CHAN et al., 2008; CORDENONSI et al., 2011; BHAT et al., 2011; LAMAR et al., 2012).

Altos níveis de *TAZ* parecem ser necessários para a transformação maligna das células mamárias, atividade metastática e quimiorresistência das células-tronco nos tumores de mama e colo retal (WANG et al., 2013; BARTUCCI et al., 2015; TIAN et al., 2015).

No caso da LMC, a literatura descreve que células leucêmicas Bcr-Abl positivas são resistentes a apoptose e que na fase blástica genes anti-apoptóticos apresentam alta expressão, especialmente o *MCL-1* (FERREIRA et al., 2015). A elevada expressão de *MCL-1* foi associada à regulação positiva de *TAZ* em gliomas metastáticos com pior prognóstico e resistência à terapia (TIAN et al., 2015).

Assim sendo, *YAP* / *TAZ* podem ser considerados potenciais alvos terapêuticos para numerosas neoplasias (JUAN e HONG, 2010).

A alta expressão de *MST1* nos pacientes com LMC em fases mais críticas da doença constitui um paradoxo a luz das observações publicadas na literatura sobre sua função de supressor de tumores. Song et al (2010) demonstraram que o aumento do fígado foi observado em camundongos nocautes para *MST1/2*. No entanto, não houve alterações discerníveis no tamanho do rim, intestinos e pulmões em ratos com inibição de expressão de *MST1/2*. Importante destacar que, a alteração na via sinalização Hippo, como a eliminação de *MST1* e *MST2* no fígado de ratos, mostrou ser suficiente para gerar a formação de tumor em camundongos.

Os outros dados relevantes obtidos nesse estudo foram: 1) a maior expressão de *AURKB* em pacientes nas fases avançadas da doença e em pacientes resistentes ao TKI e a de 2) *AURKA* em pacientes com LMC em relação ao grupo controle.

A alta expressão de *AURKA* tem sido observada em diversas neoplasias e sua inibição suprime a proliferação de células neoplásicas (KEEN et al., 2004; MALUMBRES et al., 2014) pelo desencadeando de erros mitóticos, aneuploidia, senescência e apoptose (HONDA et al., 2003; HOAR et al., 2007).

A expressão elevada de *AURKA* em células tumorais está associada à resistência a terapias convencionais, resultando em progressão da doença e uma

sobrevivência mais curta (MALUMBRES et al., 2014). A expressão aberrante das Auroras quinases A e B foi descrita na LMA e está associada a presença de anormalidades citogenéticas desfavoráveis e outros fatores adversos como a alta contagem de glóbulos brancos (YAKUSHIJIN et al., 2004; YE et al., 2009; YANG et al., 2013).

Devido à sua implicação no processo de tumorigênese, as Aurora quinases A e B são consideradas novos alvos terapêuticos para neoplasias. Alguns inibidores de Aurora quinases foram desenvolvidos ou estão em desenvolvimento clínico para LMC, LMC resistente a IM, leucemia mieloide aguda, síndrome mielodisplásica e tratamento para mielofibrose (FARAG, 2011).

A interação entre Aurora quinases e a via de sinalização Hippo foi bem documentada por Yabuta et al (2011) que relatou que a Aurora quinase A fosforila a serina 380 de Lats2 durante a mitose, e sua localização subcelular varia de acordo com o local de fosforilação. A proteína Lats2 fosforilada ocorre no fuso central associado à Aurora quinase B, que é fosforilada pela associação Lats1-Lats2. As células que expressam mutações em genes *LATS2* ou *AURKB* apresentam perda de segregação cromossômica, falha na citocinese e instabilidade genética. Os achados de Yabuta et al (2011) suportam a hipótese do presente estudo de que a alteração do complexo Aurora quinase A - Lats 1/2 - Aurora quinase B pode desempenhar um papel importante na patogênese e progressão da LMC.

Muitos trabalhos estão focados no comportamento de *AURKA* e *AURKB* como alvos de inibição de sua atuação na proliferação celular desordenada, na busca pela supressão de expressão das Aurora quinases, visando alternativas terapêuticas frente aos TKI convencionais que tem desencadeado alta percentagem de resistência dos pacientes portadores de LMC advindas, muitas vezes, de alterações genéticas (mutações).

O surgimento de resistência ao imatinibe mediado por mutações no *BCR-ABL* tornou-se um grande desafio no tratamento da LMC e estratégias terapêuticas alternativas, para substituir a LMC resistente a imatinibe, estão sendo estudadas, entre elas os inibidores de Aurora quinases.

Wang et al (2016) investigaram o efeito de AKI603, um novo inibidor de pequenas moléculas da Aurora quinase A para superar a resistência mediada pela

mutação BCR-ABL-T315I. Os resultados mostraram que AKI603 exibiu forte atividade antiproliferativa em células leucêmicas, inibindo a proliferação celular e as capacidades de formação de colônias em células LMC resistentes a imatinibe por induzir a interrupção do ciclo celular com acumulação de poliploidia. A inibição de Aurora quinase A por AKI603 induziu a senescência de células leucêmicas em células *BCR-ABL* do tipo selvagem e T315I.

Rodrigues Alves et al. (2016) analisaram os efeitos celulares da reversina, um inibidor de *AURKA* e *AURKB*, nas células *BCR-ABL1* positivas na linhagem celular K562. Os resultados indicaram que a reversina reduziu a expressão de *AURKA* e *AURKB*, levando à redução da viabilidade celular e aumento da apoptose de forma dependente da dose e do tempo, além de induzir danos mitóticos em células K562.

Em conclusão, os resultados de expressão genica aqui relatados indicam que a desregulação das vias de sinalização de Hippo e Aurora quinase contribui para a patogênese e progressão da LMC. Dado que esta de acordo com relatos de literatura sobre patogênese e prognóstico de outras neoplasias hematológicas e aurora quinase tais como leucemia linfoblástica e mielóide, síndromes mielodisplásicas, mieloma múltiplo e linfomas (BOEHRER et al., 2009; WALTERS et al., 2011; COTTINI et al., 2014; MACHADO-NETO et al., 2014; SAFARI et al., 2014).

Não foi detectado, estatisticamente, correlação entre o índice de Sokal e a expressão dos genes da via Hippo, *MST1*, *MOB1B*, *MOBKL1B*, *LATS1*, *LATS2* e *TAZ*, além das *AURKA* e *AURKB*. Sendo assim, a expressão de *TAZ*, *AURKB* e *MST1* pode, no futuro, ser avaliada em maior número amostral ou testadas por meio de análises de bioinformática destacando o potencial papel desses genes como biomarcadores de prognóstico independente do índice de Sokal em LMC.

É de grande valia que outras análises, com novos métodos de estratificação de risco e maior número de pacientes, sejam realizadas para descartar definitivamente que a via de sinalização Hippo e família Aurora quinases não podem ser associadas a um índice de prognóstico. Esse potencial índice teria marcante importância na predição da progressão da doença, na escolha do TKI e/ou auxiliando o profissional médico no melhor tratamento para cada paciente.

Atualmente, a escolha da terapia de primeira linha no tratamento da LMC pode ser difícil, já que as características, única de cada TKI e do paciente, devem

ser avaliadas para a melhor combinação. As características do paciente incluem comorbidades, medicamentos concomitantes, estilo de vida, fatores de risco, tipo de transcrição *BCR-ABL1* (por exemplo, b2a2 ou b3a2) e anormalidades cromossômicas adicionais.

Os pacientes, os efeitos colaterais, as interações medicamentosas, os planos de administração, os horários de dosagem e as despesas relacionadas ao tratamento em todos os TKI são distintos. O alinhamento de todas as características dos pacientes com o TKI adequado é a chave para o sucesso do tratamento da LMC. Mesmo com a individualização do tratamento dos pacientes e altos índices de remissão atingidos, muitos pacientes com LMC acabam evoluindo para as fases avançadas e óbito. Por essa razão faz necessário a descrição de novos marcadores de prognóstico que permitam a mudança do tratamento inicialmente instituído antes da progressão da doença.

5.2 Discussão dos resultados obtidos da expressão dos genes da via de sinalização Hippo e Aurora quinases em linhagens celulares

Na avaliação da expressão dos genes estudados em linhagens observou-se a maior expressão dos genes da via Hippo (*LATS1* e *TAZ*) e Aurora quinase (*AURKA* e *AURKB*) na linhagem HL-60.Bcr-Abl, em relação a HL-60, revelando que o gene *BCR-ABL1* modula a expressão desses genes das vias Hippo e família Aurora quinase.

Foi detectada, através das análises da mediana da URE, maior expressão dos genes *LATS1*, *LATS2*, *TAZ*, *AURKA* e *AURKB*, na linhagem KCL22 resistente, que além de ser oriunda de crise blástica indicando que esses genes contribuem para a resistência ao MI de maneira independente de *BCR-ABL1*. Esse dado contrastou com o obtido na linhagem LAMA84 resistente, onde a expressão se deu quantitativamente menor, indicando que o contexto celular é importante no perfil de resistência ao MI e na modulação da expressão dos genes estudados.

A localização dos pontos de quebra nas regiões da translocação nos cromossomos 9 e 22 pode gerar diferentes transcritos *BCR-ABL1* (JAIN et al., 2016), que são fatores de prognósticos a serem considerados durante a seleção do TKI. Os dois transcritos mais comuns em pacientes com LMC são os e13a2 (b2a2) e o

e14a2 (b3a2), expressos independentemente ou em conjunto e estão presentes em mais de 95% dos pacientes com LMC (SAGLIO e JABBOUR, 2017). A linhagem Bcr-Abl positiva KCL22 apresenta o transcrito b2a2 e a LAMA84 apresenta o b3a2, a diferença nos transcritos pode influenciar os resultados obtidos da expressão dos genes da via Hippo e Aurora quinases nessas linhagens de LMC.

KCL22 S (a2b2) apresentou alta expressão em todos os genes estudados, inclusive sua linhagem sensível ao MI apresentou baixa expressão para *LATS1* e alta para *TAZ*, o que indica pobre prognóstico já para a linhagem sensível, detectando um quadro ainda pior para a linhagem KCL22 resistente.

LAMA84 (a3b2) já se mostrou com menor expressão dos genes em relação a KCL22, e maior expressão de *LATS1* e *LATS2* na linhagem sensível, o que indicaria um melhor prognóstico em relação à linhagem LAMA84 resistente. Os resultados do presente trabalho foram condizentes ao trabalho de Jain et al. (2016) que observou que em pacientes tratados com TKI expressando apenas transcrições b3a2 contra aqueles que expressaram transcrições b2a2, revelou-se, significativamente, maior sobrevida livre de eventos e sobrevida livre de transformação para os pacientes, além de respostas citogenéticas e moleculares melhores.

LATS1 foi modulado positivamente pelos TKI, MI, dasatinibe e nilotinibe nas linhagens HL-60 e HL60.Bcr-Abl, e apresentou maior expressão na linhagem LAMA84 sensível ao MI. A principal característica de *LATS1* como gene supressor de tumor foi condizente aos resultados obtidos no presente estudo tendo em vista que sua superexpressão remete a um melhor prognóstico dos pacientes portadores de LMC, inibindo a progressão da doença para fases mais críticas como acelerada e crise blástica.

LATS1 e *LATS2* foram descritos na literatura como reguladores celulares, por agirem na modulação das funções de numerosos efetores oncogênicos ou supressores tumorais, incluindo os efetores da via Hippo, *YAP* / *TAZ*, a família Aurora quinase, a sinalização de estrógenos e o fator de transcrição supressor de tumor p53.

Enquanto as funções básicas do Lats como quinase são altamente conservada ao longo da evolução, o evento de duplicação genômico levando ao aparecimento de duas quinases intimamente relacionadas em organismos

superiores aumentou a complexidade dessa rede de sinalização. Atividades diferenciais entre as duas quinases parálogas são relatadas em muitos estudos, mas muitos convergem para caminhos e resultados semelhantes (FURTH e AYLON, 2017).

Li et al (2017) analisaram os efeitos da baixa expressão de *LATS1* sobre a ativação da via de sinalização Hippo em células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTMmo) de camundongos *in vitro*. Os autores relataram que a subexpressão de *LATS1* promoveu a diferenciação, proliferação, migração de CTMmo, por inibição da via de sinalização de Hippo.

Visser e Yang (2010) investigaram o perfil de expressão de membros da via de sinalização Hippo em células HeLa e detectaram a expressão reduzida de *LATS1* / 2. Na tentativa de elucidar o papel dessas moléculas na via Hippo, os autores usaram RNAi, tanto para *LATS1* como para *LATS2* foram substancialmente inibidos e, conseqüentemente, isso levou ao aparecimento de fenótipos celulares associados à progressão do tumor, incluindo proliferação celular aumentada, resistência à morte celular induzida por drogas e aumento da migração celular.

Yu et al (2015) publicaram que a via Hippo tem função alterada em Linfoma não Hodgkin de células B (LNH-B), especialmente em linfoma de células do manto (LCM). A expressão reduzida de *LATS1* e *LATS2* em pacientes com LCM foi associada à progressão da doença e parece ser importante fator prognóstico no LCM. O nível de expressão *LATS1* foi menor no grupo de LCM com a deleção de p53 do que o grupo de LCM sem deleção de p53. E o nível de expressão de *LATS1* foi estatisticamente menor no grupo de mau prognóstico. A sobrevida livre de progressão e sobrevida global foi significativamente maior nos pacientes com LCM com alto nível de *LATS1* do que o de outros pacientes com LCM.

Na linhagem HL60.Bcr-Abl, *LATS2* sofreu efeito inibitório somente quando exposta ao MI, não tendo inibição diante de dasatinibe e nilotinibe. A presença do gene *BCR-ABL* pareceu modular a resposta de *LATS2* visto que na linhagem HL60, MI não apresentou efeito inibitório sobre *LATS2*, mas os demais TKI, de segunda linha, sim.

Este trabalho procurou trazer novas opções potenciais de alvo terapêuticos e biomarcadores de prognósticos para serem estudados e desenvolvidos para o tratamento da LMC.

O desenvolvimento seletivo de drogas ou marcadores tumorais para a via de sinalização Hippo e os genes da família Aurora quinase, juntos ou não, podem otimizar os tratamentos com LMC, tornando as células leucêmicas mais suscetíveis à apoptose, levando a um melhor prognóstico da doença.

6. Conclusões

- 1) A via de sinalização celular Hippo está alterada na LMC;
- 2) Os genes Aurora quinases A e B possuem maior expressão gênica nos pacientes portadores de LMC, em comparação a indivíduos saudáveis;
- 3) Não houve correlação entre a expressão dos genes da via Hippo e Aurora quinases A e B com o Índice de Prognóstico de Sokal;
- 4) Os pacientes, resistentes ao TKI, apresentaram as expressões dos genes *MST1*, *TAZ* e *AURKB*, significativamente mais elevadas, comparado aos pacientes sensíveis ao MI;
- 5) Pacientes com LMC em fases avançadas apresentaram maiores valores de expressão dos genes *TAZ* e *AURKB*;
- 6) O oncogene *BCR-ABL1* parece induzir, significativamente, a expressão de *AURKA*, *AURKB*, *LATS1* e *TAZ*, sendo mais estudos necessários para confirmação dessa indução;
- 7) A expressão de *LATS1* parece ser dependente da atividade quinase Bcr-Abl na linhagem HL-60.Bcr-ABL, sendo mais estudos necessários para confirmação dessa indução;
- 8) A expressão de *LATS1* foi significativamente maior na linhagem LAMA84 sensível ao MI.

7. Referências

ABE, Y.; OHSUGI, M.; HARAGUCHI, K. et al. LATS2-Ajuba complex regulates gamma-tubulin recruitment to centrosomes and spindle organization during mitosis. **FEBS Letter**, v. 580, n. 3, p. 782-8, 6 fev. 2006.

ADAMS, R.R.; MAIATO, H.; EARNSHAW, W.C. et al. Essential Roles of Drosophila Inner Centromere Protein (INCENP) and Aurora B in Histone H3 Phosphorylation, Metaphase Chromosome Alignment, Kinetochore Disjunction, and Chromosome Segregation. **Journal of Biological Chemistry**, v.15, n.4, p.865-80, maio 2001.

ANDREWS, P.D.; KNATKO, E.; MOORE, W.J. et al. Mitotic mechanics: the Auroras come into view. **Current Opinion in Cell Biology**, v.15, n.6, p.672-83, 2003.

ANDREWS, P.D.; OVECHKINA, Y.; MORRICE, N. et al. Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. **Developmental Cell**, v.6, n.2, p.253-68, fev. 2004.

AYLON, Y.; MICHAEL, D.; SHMUELI, A. et al. A positive feedback loop between the p53 and Lats2 tumor suppressors prevents tetraploidization. **Genes & Development**, v.20, n.19, p.2687-700, 1 out. 2006.

BACCARANI, M., CORTES, J., PANE, F. et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet (LeukemiaNet) **Journal Clinical Oncology**, v.27, n.35, p. 6041-51, 2009.

BAIN, B.J. Diagnosis from the blood smear. **New England Journal Medicine**, v.353, n.5, p.498-507, 2005.

BARNES, D.J.; PALAIOLOGOU, D.; PANOUSOPOULOU, E. et al. Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. **Cancer Research**, v. 65, n.19, p.8912-9, 1 out. 2005.

GUMBINER, B.M.; KIM, N.G. The Hippo-YAP signaling pathway and contact inhibition of growth. **Journal Cell Science**, v.127, n.4, p.709-17, il., 15 fev. 2014.

BARTUCCI, M.; DATTILO, R.; MORICONI, C. et al. TAZ is required for metastatic activity and chemoresistance of breast cancer stem cells. **Oncogene**, v.34, n.6, p.681-90, 2015.

BHAT, K.P.; SALAZAR, K.L.; BALASUBRAMANIYAN, V. et al. The transcriptional coactivator taz regulates mesenchymal differentiation in malignant glioma. **Genes Development**, v. 25, n.24, p.2594–2609, 15 dez. 2011.

BHATIA, R. Novel approaches to therapy in CML. **Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program**, v. 2017, n.1, p.115-120, 8 dez. 2017.

BISCHOFF, J.R.; ANDERSON, L.; ZHU, Y. et al. A Homologue of Drosophila Aurora kinase is Oncogenic and amplified in human colorectal cancers. **EMBO Journal**, v.17, n.11, p.3052-65, 1 jun. 1998.

BIXBY, D.; TALPAZ, M. Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance. **Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program**, p.461-76, 2009.

BOEHRER, S. et al. Suppression of the DNA damage response in acute myeloid leukemia versus myelodysplastic syndrome. **Oncogene**, v.28, n.22, p.2205–18, 4 jun. 2009.

BORTOLHEIRO, T.C.; CHIATTONE, C.S. Chronic Leucemia Mielóide Crônica: história natural e classificação. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.30, suppl.1, abr. 2008.

BROWN, J.R.; KORETKE, K.K.; BIRKELAND, M.L. et al. Evolutionary relationships of Aurora kinases: Implications for model organism studies and the development of anti-cancer drugs. **BMC Evol. Biol.**, v.4, p.39, 12 out. 2004.

BRUMATTI, G.; WEINLICH, R.; CHEHAB, C.F. et al. Comparison of the anti-apoptotic effects of Bcr-Abl, Bcl-2 and Bcl-xL following diverse apoptogenic stimuli. **FEBS Letters**, v.541, n. 1-3, p.57-63, 24 abr. 2003.

CARMENA, M.; EARNSHAW, W.C. The Cellular Geography of Aurora Kinases. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v.4, n.11, p.842-54, nov. 2003.

CHAN, H.; NOUSIAINEN, M.; CHALAMALASETTY, R.B. et al. The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. **Oncogene**, v. 24, n.12, p.2076–86, 17 mar. 2005.

CHAN, S.W.; LIM, C.J.; GUO, K. et al. A role for taz in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells. **Cancer Research**, v.68, n.8, p.2592–98, 15 abr. 2008.

CHAUFFAILLE, M.L.L.F. Análise citogenética e FISH no monitoramento da LMC em tratamento com inibidores da tirosino quinase. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v.30, suppl.1, abr. 2008.

CHOW, A.; HAO, Y.; YANG, X. Molecular characterization of human homologs of yeast MOB1. **Intern. Journal of Cancer**, v.126, n.9, p.2079-89. 1 maio 2010.

CORDENONSI, M.; ZANCONATO, F.; AZZOLIN, L. et al. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. **Cell**, v.147, n.4, p.759-72, 11 nov. 2011.

CORTES, J.E.; SAGLIO, G.; KANTARJIAN, H.M. et al. Final 5-year study results of DASISION: the Dasatinib Versus Imatinib Study in treatment-naïve chronic myeloid leukemia patients trial. **Journal of Clinical Oncology**, v.34, n.20, p.2333–40, 10 jul. 2016.

CORTES, J.; KANTARJIAN, H. Advanced-phase chronic myeloid leukemia. **Seminars in Hematology**, v.40, n.1, p.79-86, 2003.

COTTINI, F. et al. Rescue of Hippo coactivator YAP1 triggers DNA damage-induced apoptosis in hematological cancers. **Nature Medicine**, v.20, n.6, p.599–606, jun. 2014.

CRAWLEY, C.; SZYDLO, R.; LALANCETTE, M. et al. Outcomes of reduced-intensity transplantation for chronic myeloid leukemia: an analysis of prognostic factors from the Chronic Leukemia Working Party of the EBMT. **Blood**, v.106, n.9, p.2969–76, 1 nov. 2005.

DAMODARAN, A.P.; VAUFREY, L.; GAVARD, O. et al. Aurora A Kinase Is a Priority Pharmaceutical Target for the Treatment of Cancers. **Trends in Pharmacological Sciences Cell Press**, v.38, n.8, p. 687-700, ago. 2017.

DEININGER, M.W.; VIEIRA, S.; MENDIOLA, R. et al. BCR-ABL1 tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. **Cancer Research**, v.60, n.7, p.2049-55, 2000.

EDGAR, B.A. From cell structure to transcription: Hippo forges a new path. **Cell**, v.124, n.2, p.267-73, 27 jan. 2006.

EIDE, C.A.; ADRIAN, L.T.; TYNER, J.W. The ABL switch control inhibitor DCC-2036 is active against the chronic myeloid leukemia mutant BCR-ABL315I and exhibits a narrow resistance profile. **Cancer Research**, v.71, n.9, p. 3189-95, 1 maio 2011.

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

FADERL, S.; KANTARJIAN, H.M. Chronic myeloid leukemia and other myeloproliferative neoplasms. **Am. College of Phys. Medicine**, p.1-19, 2010.

FADERL, S.; KANTARJIAN, H.M.; TALPAZ, M. et al. New treatment approaches for chronic myelogenous leukemia. **Seminars in Oncology**, v.27, n.5, p. 578-86, out. 2000.

FARAG, S.S. The Potential Role of Aurora Kinase Inhibitors in Haematological Malignancies. **British Journal of Haematology**, v.5, n.5, p.561-79, 2011.

FERRARI, S.; MARIN, O.; PAGANO, M.A. et al. Aurora-A site specificity: a study with synthetic peptide substrates. **Biochemistry Journal**, v.390, n. 1, p.293–302, 15 ago. 2005.

FERREIRA, A.F.; DE OLIVEIRA, G.L.; TOGNON, R. et al. Apoptosis-related gene expression profile in chronic myeloid leukemia patients after imatinib mesylate and dasatinib therapy. **Acta Haematology**, v.133, n.4, p.354-64, 2015.

FOX CHASE CANCER CENTER FORWARD. David Hungerford and the Philadelphia Chromosome. **Fox Chase Cancer Center Forward**. 20 may 2009. Disponível em: <<https://www.foxchase.org/blog/2009-05-philadelphia-chromosome>>. Acesso em 26 dez. 2017.

FURTH, N.; AYLON, Y. The LATS1 and LATS2 tumor suppressors: beyond the Hippo pathway. **Cell Death Differentiation**, v.24, n.9, p.1488-1501, set. 2017.

GALLAGHER, R.; COLLINS, S.; TRUJILLO, J. et al. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v.54, n.3, p.713-33, set. 1979.

GHOLAMI, M.; MIRFAKHRAIE, R.; MOVAFAGH, A. et al. The expression analysis of LATS2 gene in de novo AML patients. **Medical Oncology**, v.31, n.5, p.961, maio 2014.

GOLDENSON, B.; CRISPINO, J.D. The Aurora Kinases in Cell Cycle and Leukemia. **Oncogene**, v.34, n.5, p.537–45, 29 jan. 2015.

GOLDMAN, J.M. Chronic myeloid leukemia: still a few questions. **Experimental Hematology**, v.32, n.1, p.2-10, 2004.

GONTAREWICZ, A.; BRUMMENDORF, T.H. Danusertib (formerly PHA-739358)--a novel combined pan-Aurora kinases and third generation Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor. **Recent Results Cancer Research**, v.184, p.199-214, 2010.

GORRE, M.E.; MOHAMMED, M.; ELLWOOD, K. et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR–ABL gene mutation or amplification. **Science**, v.293, n.5531, p.876–80, 3 aug. 2001.

GOTO, H.; YASUI, Y.; NIGG, E.A. et al. Aurora B phosphorylates Histone H3 at serine 28 with regard to the mitotic chromosome condensation. **Genes Cells**, v.7, n.1, p.11-7, jan. 2002.

SOCIEDADE ARGENTINA DE HEMATOLOGIA (SAH) 2012. **Guia da Sociedade Argentina de Hematologia**. Disponível em: <http://sah.org.ar/docs/203-230.4.SAH_GUIA2012_LeucemiaCronica.pdf>. Acesso em: 26 dez. 2017.

HAO, Y.; CHUN, A.; CHEUNG, K. et al. Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP. **Journal of Biological Chemistry**, v.283, n.9, p.5496-509, 29 fev. 2008.

HARVEY, K.F.; ZHANG, X.; THOMAS, D.M. The hippo pathway and human cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.13, n.4, p.246–57, abr. 2013.

HASFORD, J.; BACCARANI, M.; HOFFMANN, V. et al. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. **Blood**, v.118, n.3, p.686–92, 2011.

HASFORD, J.; PFIRRMANN, M.; HEHLMANN, R. et al. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. **Journal of the National Cancer Institute**, v.90, n.11, p.850–58, 1998.

HASFORD, J.; PFIRRMANN, M.; SHEPHERD, P. et al. The impact of the combination of baseline risk group and cytogenetic response on the survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alpha. **Haematologica**, v.90, n.3, p.335–40, 2005.

HEHLMANN, R.; HOCHHAUS, A.; BACCARANI, M. Chronic myeloid leukaemia. **Lancet**, v.370, n.9584, p.342–50, 28 jul. 2007.

HERGOVICH, A. MOB control: reviewing a conserved family of kinase regulators. **Cell Signal**, v.23, n.9, p.1433–40, set. 2011.

HERGOVICH, A.; SCHMITZ, D.; HEMMINGS, B.A. The human tumour suppressor LATS1 is activated by human MOB1 at the membrane. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.345, n.1, p.50–8, 23 jun. 2006.

HOAR, K.; CHAKRAVARTY, A.; RABINO, C. et al. MLN8054, a small-molecule inhibitor of Aurora A, causes spindle pole and chromosome congression defects leading to aneuploidy. **Molecular and Cellular Biology**, v.27, n.12, p.4513–25, 2007.

HOCHHAUS, A.; LARSON, R.A.; GUILHOT, F. et al. Longterm outcomes of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia. **New England Journal Medicine**, v.376, n.10, p.917–27, 9 mar. 2017.

HOCHHAUS, A.; SAGLIO, G.; HUGHES, T.P. et al. Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5- year update of the randomized ENESTnd trial. **Leukemia**, v.30, n.5, p.1044–54, maio 2016.

HOGLUND, M.; SANDIN, F.; SIMONSSON, B. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. **Annals of Hematology**, v.94, Suppl 2, p.S241-7, abr. 2015.

HONDA, R.; KORNER, R.; NIGG, E.A. Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. **Molecular Biology of the Cell**, v.14, n.8, p.3325-41, 2003.

HORI, T.; TAKAORI-KONDO, A.; KAMIKUBO, Y. et al. Molecular cloning of a novel human protein kinase, kpm, that is homologous to warts/lats, a drosophila tumor suppressor. **Oncogene**, v.19, n.27, p.3101-9, 22 jun. 2000.

HU, B.; SAVANI, B.N. Impact of risk score calculations in choosing front-line tyrosine kinase inhibitors for patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in the chronic phase. **European Journal of Haematology**, v.93, n.3, p.179–86, 2014.

JAIN, P.; KANTARJIAN, H.; PATEL, K.P. et al. Impact of BCRABL transcript type on outcome in patients with chronic-phase CML treated with tyrosine kinase inhibitors. **Blood**, v.127, n.10, p.1269–75, 10 mar. 2016.

JIMENEZ-VELASCO, A.; ROMAN-GOMEZ, J.; AGIRRE, X. et al. Downregulation of the large tumor suppressor 2 (LATS2/KPM) gene is associated with poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v.19, n.12, p.2347-50, dez. 2005.

JIN, Z.; EL-DEIRY, W.S. Overview of cell death signaling pathways. **Cancer Biology & Therapy**, v.4, n.2, p.139-63, fev. 2005.

JUAN, W.C.; HONG, W. Targeting the Hippo Signaling Pathway for Tissue Regeneration and Cancer Therapy. **Genes**, v.7, n.9, p.E55, 30 ago. 2016.

JUSTICE, R.W.; ZILIAN, O.; WOODS, D.F. et al. The drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. **Genes Development**, v.9, n.5, p.534-46, 1 mar. 1995.

KALIDAS, M.; KANTARJIAN, H.; TALPAZ, M. Chronic myelogenous leukemia. **JAMA**, v.286, n.8, p.895-8, 22-29 ago. 2001.

KAWAHARA, M.; HORI, T.; CHONABAYASHI, K. et al. Kpm/Lats2 is linked to chemosensitivity of leukemic cells through the stabilization of p73. **Blood**, v.112, n.9, p.3856-66, 1 nov. 2008.

KE, H.; PEI, J.; NI, Z. et al. Putative tumor suppressor Lats2 induces apoptosis through downregulation of Bcl-2 and Bcl-x(L). **Experimental Cellular Research**. v.298, n.2, p.329-38, 15 ago. 2004.

KEEN, N.; TAYLOR, S. Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. **Nature Reviews of Cancer**, v.4, n.12, p.927-36, 2004.

KIMURA, M.; MATSUDA, Y.; YOSHIOKA, T. et al. Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human Aurora/ Ipl1-related protein kinase, AIK3. **Journal of Biochemistry**, v.274, n.11, p.7334- 40, 12 mar. 1999.

KOEFFLER, H.P.; BILLING, R.; LUSIS, A.J. et al. An undifferentiated variant derived from the human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1). **Blood**, v.56, n.2, p.265-73, ago. 1980.

KOWALIK, M.A.; SALIBA, C.; PIBIRI, M. et al. Yes-associated protein regulation of adaptive liver enlargement and hepatocellular carcinoma development in mice. **Hepatology**, v.53, n.6, p.2086-96, jun. 2011.

LAMAR, J.M.; STERN, P.; LIU, H. et al. The hippo pathway target, yap, promotes metastasis through its tead-interaction domain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.109, n.37, p.E2441–50, 11 set. 2012.

LAN, W.; ZHANG, X.; KLINE-SMITH, S.L. et al. Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. **Current Biology**, v.14, n.4, p.273–86, 17 fev. 2004.

LEI, Q.Y.; ZHANG, H.; ZHAO, B. et al. TAZ promotes cell proliferation and epithelial mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. **Molecular Cellular Biology**, v.28, n.7, p.2426-36, abr. 2008.

LEIBNIZ INSTITUTE DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ). **Catalogue of human and animal cell lines**. Disponível em:

<https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC168.html?tx_dsmzresources_pi%5BreturnPid%5D=192>. Acesso em: 29 dez. 2017a.

LEIBNIZ INSTITUTE DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ). **Catalogue of human and animal cell lines**. Disponível em <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC519.html?tx_dsmzresources_pi%5BreturnPid%5D=192>. Acesso em: 29 dez. 2017b.

LEVENGA, H.; WOESTENENK, R.; SCHATTENBERG, A.V. et al. Dynamics in chimerism of T cells and dendritic cells in relapsed CML patients and the influence on the induction of alloreactivity following donor lymphocyte infusion. **Bone Marrow Transplant**, v.40, n.6, p.585-92, set. 2007.

LI, L.; DONG, L.; HUI, J. et al. Under-expression of LATS1 promotes the differentiation, proliferation and migration of mesenchymal stem cells by inhibition the Hippo signaling pathway in vitro. **Chin. Crit. Care Med.**, v.29, n.8, p.731-37, ago. 2017.

LI, H.; WOLFE, A.; SEPTER, S. et al. Deregulation of Hippo kinase signalling in Human hepatic malignancies. **Liver International**, v.32, n.1, p.38-47, jan 2012.

LI, Y.; PEI, J.; XIA, H. Lats2, a putative tumor suppressor, inhibits G1/S transition. **Oncogene**. v. 22, n.28, p.4398-405, 10 jul. 2003.

LOPES, N.R.; ABREU, M.T.C.L. Inibidores de tirosino quinase na leucemia mieloide crônica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.31, n.6, p.449-53, 2009.

MA, Y.; YANG, Y.; WANG, F. et al. Hippo-YAP signaling pathway: A new paradigm for cancer therapy. **International Journal of Cancer**, v.137, n.10, p.2275-86, 2015.

MACHADO-NETO, J.A.; DE MELO, P.C. et al. YAP1 expression in myelodysplastic syndromes and acute leukemias. **Leukemia & Lymphoma**, v.55, n.10, p.2413-15, 2014.

MAEDA, M.; SHIMIZU, A.; IKUTA, K. et al. Origin of human T-lymphotrophic virus I-positive T cell lines in adult T cell leukemia. Analysis of T cell receptor gene rearrangement. **Journal of Experimental Medicine**, v.162, n.6, p.2169-74, 1 dez. 1985.

MALUMBRES, M.; PEREZ DE CASTRO, I. Aurora kinase A inhibitors: promising agents in antitumoral therapy. **Expert Opin. Ther. Targets**, v.18, n.12, p.1377-93, 2014.

MARUMOTO, T.; HONDA, S.; HARA, T. et al. Aurora-A Kinase Maintains the Fidelity of Early and Late Mitotic events in HeLa Cells. **Journal Biology Chemistry**, v.278, n.51, p.51786-95, 19 dez. 2003.

MATALLANAS, D.; ROMANO, D.; YEE, K. et al., Rassf1a Elicits Apoptosis through an MST2 Pathway Directing Proapoptotic Transcription by the p73 Tumor Suppressor Protein. **Molecular Cell**, v.27, n.6, p.962–75, 2007.

MAURO, M. Defining and managing imatinib resistance. **Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.**, p.219-25, 2006.

MELO, J.V.; BARNES, D.J. Chronic myeloid leukemia as a model of disease evolution in human cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.7, n.6, p.441-53, 2007.

MO, J.S.; PARK, H.W.; GUAN, K.L. The hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. **EMBO Report**, v.15, n.6, p.642–56, jun. 2014.

MOROISHI, T.; HANSEN, C.G.; GUAN, K.L. The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.15, n.2, p.73-9, 2015.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **National Institutes of Health (NIH)**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2017/dasatinib-fda-cml-children>>. il. color. Acesso em: 11 jan. 2017.

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK (NCCN). **Guidelines version 3.2018 Chronic Myeloid Leukemia**. Disponível em: <https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cml.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2018.

O'BRIEN, S.G.; GUILHOT, F.; LARSON, R.A. et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. **New England Journal Medicine**. v.348, n.11, p.994–1004, 13 mar. 2003.

OHI, R.; SAPRA, T.; HOWARD, J. et al. Differentiation of cytoplasmic and meiotic spindle assembly MCAK functions by Aurora B-dependent phosphorylation. **Molecular Biology of the Cell**, v.15, n.6, p.2895–2906, jun. 2004.

OVERHOLTZER, M.; ZHANG, J.; SMOLEN, G.A. et al. Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.103, n.33, p.12405-10, 15 aug. 2006.

PAN, D. Hippo signaling in organ size control. **Genes Development**, v.21, n.8, p.886-97, abr. 2007.

PERROTTI, D.; NEVIANI, P. From mRNA metabolism to cancer therapy: chronic myelogenous leukemia shows the way. **Clinical Cancer Research**, v.13, n.6, p.1638-42, 2007.

PICCOLO, S.; DUPONT, S.; CORDENONSI, M. The biology of yap/taz: Hippo signaling and beyond. **Physiological Review**., v.94, n.4, p.1287–1312, out. 2014.

POWZANIUK, M. The LATS2/KPM tumor suppressor is a negative regulator of the androgen receptor. **Molecular Endocrinology**, v.18, n.8, 2011-23, ago. 2004.

PRASKOVA, M.; XIA, F.; AVRUCH, J. MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation. **Current Biology** v.18, n.5, p.311–21, 11 mar. 2008.

REUVEN, N.; ADLER, J.; MELTSER, V. et al. The Hippo pathway kinase Lats2 prevents DNA damage-induced apoptosis through inhibition of the tyrosine kinase c-Abl. **Cell Death and Differentiation**, v.20, n.10, p.1330–40, out. 2013.

RODRIGUES ALVES, A.P.; MACHADO-NETO, J.A.; SCHEUCHER, P.S. et al. Reversine triggers mitotic catastrophe and apoptosis in K562 cells. **Leukemia Research**, v.48, p.26-31, set. 2016.

ROMAN-GOMEZ, J. et al. Promoter hypermethylation of cancer-related genes: a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v.104, n.8, p.2492–98, 2004.

ROSENHAHN, J.; WEISE, A.; MICHEL, S. et al. Cytogenetic characterisation and proteomic profiling of the Imatinib-resistant cell line KCL22-R. **Int. Journal of Oncology**, v.31, n.1, p.121-8, jul. 2007.

SAFARI, S.; MOVAFAGH, A.; ZARE-ADOLLAHI, D. et al. MST1/2 and YAP1 gene expression in acute myeloid leukemia. **Leukemia Lymphoma**, v.55, n.9, p.2189-91, 2014.

SAGLIO, G.; KIM, D.W.; ISSARAGRISIL, S. et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. **New England Journal Medicine**, v.362, n.24, p.2251–59, 17 jun. 2010.

SAGLIO, G.; JABBOUR, E. First-line therapy for chronic phase CML: selecting the optimal BCR-ABL1-targeted TKI. **Leukemia & Lymphoma**, v.3, p.1-16, out. 2017.

SASI, N.K.; BHUTKAR, A.; LANNING, N.J. et al. DDK Promotes Tumor Chemoresistance and Survival via Multiple Pathways. **Neoplasia**, v.19, n.5, p.439–50, maio 2017.

SCORE, J. et al. Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR-ABL indicate distinct mechanisms of formation. **Leukemia**, v.24, n.10, p.1742-50, out. 2010.

SHAH, N.P.; NICOLL, J.M.; NAGAR, B. et al. Multiple BCR–ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. **Cancer Cell**, v.2, n.2, p.117–25, ago. 2002.

SHERBENOU, D.W.; WONG, M.J.; HUMAYUN, A. et al. Mutations of the BCR–ABL kinase domain occur in a minority of patients with stable complete cytogenetic response to imatinib. **Leukemia**, v.21, n.3, p.489–93, mar. 2007.

SHIOTSU, Y.; KIYOI, H.; ISHIKAWA, Y. et al. KW-2449, a novel multikinase inhibitor, suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations or T315I-mutated BCR/ABL translocation. **Blood**, v.114, n.8, p.1607-17, 20 ago. 2009.

SOKAL, J.E.; COX, E.B., BACCARANI, M., et al. Prognostic discrimination in 'good-risk' chronic granulocytic leukemia. **Blood**, v.63, n.4, p.789–99, 1984.

SONG, H.; MAK, K.K.; TOPOL, L. et al. Mammalian mst1 and mst2 kinases play essential roles in organ size control and tumor suppression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.107, n.4, p.1431–1436, 26 jan. 2010.

SOVERINI, S.; GNANI, A.; DE BENEDITTIS, C. et al. Low-level Bcr-Abl mutations are very rare in chronic myeloid leukemia patients who are in major molecular response on first-line nilotinib. **Leukemia Research**, v.35, n.11, p.1527-9, nov 2011.

STRANO, S.; FAUSTI, F.; DI AGOSTINO, S. et al. PML Surfs into HIPPO Tumor Suppressor Pathway. **Front Oncology**, v.3, p.36, 1 mar. 2013.

STRAZISAR, M.; MLAKAR, V.; GLAVAC, D. LATS2 tumour specific mutations and down-regulation of the gene in non-small cell carcinoma. **Lung Cancer**, v.64, n.3, p.257-62, jun. 2009.

SU, A.I.; WILTSHIRE, T.; BATALOV, S. et al. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. **Proc. Nat. Acad. Sci. U S A**, v.101, n.16, p.6062–67, 20 abr. 2004.

SWERDLOW, S.H.; CAMPO, E.; HARRIS, N.L. et al. WHO Classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: **World Health Organization (WHO)/IARC**, Lyon, 4th. ed., 2008, 439p.

TAKAHASHI, Y.; MIYOSHI, Y.; TAKAHATA, C. et al. Downregulation of LATS1 and LATS2 mRNA expression by promoter hypermethylation and its association with biologically aggressive phenotype in human breast cancers. **Clin Cancer Res.**, v.11, n.4, p.1380-5, 15 fev. 2005.

TANG, A.; GAO, K.; CHU, L. et al. Aurora kinases: novel therapy targets in cancers. **Oncotarget**, v.8, n.14, p.23937-54, il. color., 2017.

TAO, W.; ZHANG, S.; TURENCHALK, G.S, et al. Human homologue of the Drosophila melanogaster Lats tumor suppressor modulates CDC2 activity. **Nat Genet.**, v.21, n.2, p.177-81, fev. 1999.

TERADA, Y. Role of chromosomal passenger complex in chromosome segregation and cytokinesis. **Cell Struct Funct.**, v.26, n.6, p.653–57, dez. 2001.

TIAN, T.; LI, A.; LU, H. *et al.* TAZ promotes temozolomide resistance by upregulating MCL-1 in human glioma cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.463, n.4, p.638-43, 2015.

TOJI, S.; YABUTA, N.; HOSOMI, T. *et al.* The centrosomal protein Lats2 is a phosphorylation target of Aurora-A kinase. **Genes Cells**, v.9, n.5, p.383-97, maio 2004.

VAN ETTEN, R.A. Mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene: new perspectives in the post-imatinib era. **Leukemia Research**, v.28, Supl 1, p. S21-8, maio 2004.

VISSER, S.; YANG, X. Identification of LATS transcriptional targets in HeLa cells using whole human genome oligonucleotide microarray. **Gene**, v.449, n.1-2, p.22-9. 1 jan 2010.

VISSER, S.; YANG, X. LATS tumor suppressor: a new governor of cellular homeostasis. **Cell Cycle**, v.9, n.19, p.3892-903, out. 2010.

WALTER, A.O.; SEGHEZZI, W.; KORVER, W. *et al.* The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. **Oncogene**, v.19, n.42, p.4906–16, 5 out. 2000.

WALTERS, D.K. *et al.* Evidence for ongoing DNA damage in multiple myeloma cells as revealed by constitutive phosphorylation of H2AX. **Leukemia**, v.25:1344–53, 2011.

WANG LX, WANG JD, CHEN JJ. *et al.* Aurora A Kinase Inhibitor AKI603 Induces Cellular Senescence in Chronic Myeloid Leukemia Cells Harboring T315I Mutation. **Scientific Report**, v.6, p.35533, 8 nov. 2016.

WANG, L.; SHI, S.; GUO, Z. *et al.* Overexpression of YAP and TAZ is an independent predictor of prognosis in colorectal cancer and related to the proliferation and metastasis of colon cancer cells. **PLoS One**, v.8, n.6, p. e65539, 2013.

XU, M.Z.; YAO, T.J.; LEE, N.P. et al. Yes-associated protein is an independent prognostic marker in hepatocellular carcinoma. **Cancer**, v.115, n.19, p.4576-85, out. 2009.

XU, T.; WANG, W.S.; STEWART, R.A. et al. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: The drosophila lats gene encodes a putative protein kinase. **Development**, v.121, n.4, p.1053-63, abr. 1995.

YABUTA, N.; FUJI, T.; COPELAND, N.G. et al. Structure, expression and chromosome mapping of LATS2, a mammalian homologue of the drosophila tumor suppressor gene lats/warts. **Genomics**, v.63, n.2, p.263-70, 15 jan. 2000.

YABUTA, N.; MUKAI, S.; OKADA, N. et al. The tumor suppressor Lats2 is pivotal in Aurora A and Aurora B signaling during mitosis. **Cell Cycle**, v.10, n.16, p.2724-36, 15 ago. 2011.

YAKUSHIJIN, Y.; HAMADA, M.; YASUKAWA, M. The expression of the aurora-A gene and its significance with tumorigenesis in non-Hodgkin's lymphoma. **Leukemia & Lymphoma**, v.45, n.9, p.1741-6, set. 2004.

YANG, J.; IKEZOE, T.; NISHIOKA, C. et al. CD34/CD38 acute myelogenous leukemia cells aberrantly express Aurora kinase A. **Int. Journal of Cancer**, v.133, n.11, p.2706-19, 1 dez. 2013.

YE, D.; GARCIA-MANERO, G.; KANTARJIAN, H.M. et al. Analysis of Aurora kinase A expression in CD34(+) blast cells isolated from patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. **Journal of Hematopathology**, v.2, n.1, p.2-8, mar. 2009.

YIMLAMAI, D.; FOWL, B.H.; CAMARGO, F.D. Emerging evidence on the role of the hippo/yap pathway in liver physiology and cancer. **Journal of Hepatology**, v.63, n.6, p.1491-1501, dez. 2015.

YU, Z.; YI, S.; ZHANG, Y. et al. Expression of LATS mRNA in mantle cell lymphoma and its clinical significance. **Chinese Journal of Medicine**, v.95, n.40, p.3285-8, out. 2015.

YUEN, H.F.; MCCRUDDEN, C.M.; HUANG, Y.H. et al. TAZ Expression as a Prognostic Indicator in Colorectal Cancer. **PLoS One**, v.8, n.1, p. e54211, 2013.

ZENDER, L.; SPECTOR, M.S.; XUE, W. et al. Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach. **Cell**, v.125, n.7, p.1253-67, 30 jun. 2006.

ZHANG, Y.K.; ZHANG G.N; WANG, Y.J. et al. Bafetinib (INNO-406) reverses multidrug resistance by inhibiting the efflux function of ABCB1 and ABCG2 transporters. **Scientific Report**, v.6, p.25694, 9 maio 2016.

ZHANG, L.; YE, D.X.; PAN, H.Y. et al. Yes-associated protein promotes cell proliferation by activating Fos Related Activator-1 in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v.47, n.8, p.693-7, ago. 2011.

ZHAO, B.; LI, L.; LEI, Q. et al. The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. **Genes Development**, v.24, n.9, p.862-74, 2010.

ZHAO, B.; WEI, X.; LI, W. et al. Inactivation of yap oncoprotein by the hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. **Genes Development**, v.21, n.21, 2747–61, 1 nov. 2007.

ZHAO, B.; LEI, Q.Y.; GUAN, K.L. The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer. **Current Opinion Cell Biology**, v. 20, n.6, p.638-46, dez. 2008.

ZHOU, D.; CONRAD, C.; XIA, F. et al. Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene. **Cancer Cell**, v.16, n.5, p.425–38, 6 nov. 2009.

Anexos

ANEXO 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 038/2014
kms

Ribeirão Preto, 5 de agosto de 2014.

À pós-graduanda
Ana Paula Zambuzi Cardoso Marsola
Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro
FCFRP/USP

Prezada Pós-graduanda,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DA VIA LATS EM CÉLULAS BCR-ABL1: ASSOCIAÇÃO COM RESISTÊNCIA À APOPTOSE E FISIOPATOLOGIA DA LEUCEMIA MIELOÍDE CRÔNICA”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 329, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP em sua 128ª Reunião Ordinária realizada em 14/04/2014.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá “ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local”.

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP/FCFRP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Segue anexa a Declaração da instituição co-participante.

Atenciosamente,

PROFª. DRª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
Coordenadora do CEP/FCFRP

Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre - CEP 14040-903 - Ribeirão Preto - SP
Comitê de Ética em Pesquisa - cep@fcrfp.usp.br
Fone: (16) 3602-4213 ou 3602-4216 - Fax: (16) 3602-4892

ANEXO 2. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da HCFMRP-USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 21 de Julho de 2014

Projeto de pesquisa: "ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DA VIA LATS EM CÉLULAS Bcr-Abl1: ASSOCIAÇÃO COM RESISTÊNCIA À APTOSE E FISIOPATOLOGIA DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA"

Pesquisador responsável: Ana Paula Zambuzi Cardoso Marsola e Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP

"O CEP do HC e da FMRP-USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/12. Diante disso, o HCFMRP-USP, como instituição co-participante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas co-responsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos desta pesquisa, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar".

Ciente e de acordo:

Dr^a Marcia Guimarães Villanova Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - HCFMRP-USP	Prof. Dr. José Alexandre de Souza Crippa Coordenador Técnico Científico da Unidade de Pesquisa Clínica - HCFMRP-USP
---	---

Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil/CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO 3. Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****(Participante de Pesquisa: Paciente)****Nome do Paciente:** _____ **Idade:** _____**Responsável Legal (se necessários):** _____**RG do paciente:** _____

Título do Projeto de pesquisa: “Análise da expressão de moléculas da via LATS em células Bcr-Abl1+: Associação com resistência à apoptose e fisiopatologia da Leucemia Mielóide Crônica”.

Responsável Clínico pelo Projeto: Profa. Dra. Belinda Pinto Simões, Docente de Hematologia da FMRP-USP e responsável pelo ambulatório de Hematologia.

Pesquisadoras responsáveis:

Doutoranda: Ana Paula Zambuzi Cardoso Marsola (telefone: 016-36024163/ 016-981179041)
Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP (telefone: 016-36020657 e 011-981829203)

Justificativa, Objetivos e Procedimentos do Projeto:

Você foi admitido no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto para tratamento de sua doença chamada Leucemia Mielóide Crônica que leva a um aumento do número de células brancas e vermelhas do sangue. Esse aumento de células deixa o sangue mais grosso, de modo que esse passa a circular nas veias do nosso corpo com maior dificuldade, prejudicando sua função adequada. As causas do aparecimento desta doença são desconhecidas. Por isso essa pesquisa quer estudar quais são as alterações nas células do sangue que causam essa doença. O conhecimento sobre essa doença poderá ajudar os pesquisadores a desenvolverem melhores formas de tratamento, beneficiando no futuro pessoas com essa doença.

Queremos convidá-lo a participar dessa pesquisa. Caso você aceite, você doará 30 mL (aproximadamente 3 colheres de sopa) de sangue que será colhido de suas veias. As suas células do sangue serão usadas para estudar algumas proteínas e pedaços do seu DNA, que

controlam a vida e o número de células do sangue. A colheita de seu sangue será realizada por profissionais de saúde com experiência, como enfermeiros, biomédicos ou farmacêuticos, com material descartável para que não haja riscos de contaminação. Os riscos dessa colheita serão mínimos, existindo uma pequena chance de você sentir dor, de aparecer inchaços roxos ou apenas inchaços em seu braço no local da colheita de sangue.

Se aceitar participar dessa pesquisa, as células, algumas proteínas, DNA, RNA e o plasma (parte líquida do sangue) serão guardados sob a responsabilidade da Prof^a Fabíola Attié de Castro na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Se aceitar participar dessa pesquisa você está também permitindo que nós pesquisadores consultemos seu prontuário do hospital para coletarmos informações sobre os resultados dos exames laboratoriais realizados no HCFMRP-USP e que foram utilizados para fazer o diagnóstico de sua doença. Você tem a liberdade de aceitar ou não que seu sangue seja usado nessa pesquisa, sem risco de qualquer prejuízo ao seu tratamento.

Além disso, gostaríamos de saber se você autoriza que a sua amostra de seu sangue seja guardada para ser usada em outras pesquisas sobre a mesma doença (Leucemia Mielóide Crônica). Qualquer pesquisa nova com seu sangue guardado precisará ser aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa e nós pesquisadores pediremos para você autorizar ou não o uso de seu sangue que estará guardado.

Somente os resultados da pesquisa serão divulgados, seu nome ficará em segredo. As amostras do seu sangue e seus dados serão guardados em segredo. As amostras do seu sangue serão identificadas por números e somente os pesquisadores terão acesso. Se você quiser, podemos lhe informar os resultados das pesquisas sempre que desejar, tendo a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de quaisquer dúvidas sobre os procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa. Você também poderá procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) - USP.

Você não terá nenhuma despesa a mais por participar dessa pesquisa e você não será pago por doar o sangue para a pesquisa. Sua doação será voluntária. Os resultados dessa pesquisa não lhe trarão, nesse momento, vantagem em seu tratamento, mas no futuro poderão contribuir para o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes para o tratamento da Leucemia Mielóide Crônica.

Caso não aceite participar dessa pesquisa não haverá prejuízos para o seu atendimento e tratamento no HCFMRP-USP. Você poderá desistir em qualquer momento, se assim desejar, mas para isso precisará avisar os pesquisadores pelos telefones que aparecem no início deste papel.

Eu, _____, RG: _____, declaro que concordo em ser voluntário e autorizo a retirada de 30 mL (aproximadamente 3 colheres de sopa) do meu sangue para a realização da pesquisa. Fui devidamente informado pelos responsáveis dessa pesquisa sobre os meus direitos, que o volume de sangue retirado não me causará danos, que esta pesquisa ajudará a entender a causa do aumento do número de células do sangue nos pacientes com Leucemia Mielóide Crônica e que meu nome não será divulgado.

Este documento será assinado em duas vias, uma via do pesquisador e uma via do paciente/controle.

Endereço: _____ Telefone: _____

Nome do doador: _____

Assinatura: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Nome do pesquisador responsável pelo estudo: _____

Assinatura: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Se o paciente não puder assinar:

Nome do representante: _____

Assinatura: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Informações importantes:

Telefone do Comitê de ética da FCFRP-USP: Fone: (16) 3602-4213. Fax: (16) 3602-4892.
Endereço: FCFRP-USP, Av. do Café, s/n – Campus Universitário – Monte Alegre – Ribeirão Preto, CEP: 14049-903.

Telefone do Comitê de ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto: Fone: (16) 3602-2228. Fax: (16) 3633-1144. Endereço: HCFMRP-USP, Av. Bandeirantes, 3.900 - Campus Universitário - Monte Alegre – Ribeirão Preto, CEP: 14.048-900

ANEXO 4. Termo de consentimento livre e esclarecido para controles.**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Controle**

Nome : _____ Idade: _____

Responsável Legal (se necessário): _____

RG do**paciente:** _____

Título do Projeto de pesquisa: “Análise da expressão de moléculas da via LATS em células Bcr-Abl1: associação com resistência a apoptose e fisiopatologia da Leucemia Mielóide Crônica”.

Responsável Clínico pelo Projeto: Profa. Dra. Belinda Pinto Simões, Docente de Hematologia da FMRP-USP e responsável pelo ambulatório de Hematologia.

Pesquisadoras responsáveis:

Doutoranda: Ana Paula Zambuzi Cardoso Marsola (telefone: 016-36024163/ 016-981179041)

Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP (telefone: 016-36020657 e 011-981829203).

Justificativa, Objetivos e Procedimentos da Pesquisa

Queremos convidá-lo a participar da pesquisa de nome “Análise da expressão de moléculas da via LATS em células Bcr-Abl1: associação com resistência a apoptose e fisiopatologia da Leucemia Mielóide Crônica”. Esse estudo pretende investigar quais são as alterações da “via LATS” nas células do sangue dos pacientes com leucemia mieloide crônica. A leucemia mieloide crônica é uma doença do sangue dos pacientes que apresentam um aumento do número de células brancas e vermelhas do sangue. Esse aumento de células deixa o sangue mais grosso, de modo que esse passa a circular nas veias do nosso corpo com maior dificuldade, prejudicando sua função adequada. As causas do aparecimento desta doença são desconhecidas. Por isso essa pesquisa quer estudar quais são as alterações nas células do sangue que causam essa doença. O conhecimento sobre essa doença poderá ajudar os pesquisadores a desenvolverem melhores formas de tratamento, beneficiando no futuro pessoas com essa doença.

Você foi convidado para participar dessa pesquisa por ser saudável e sadio e caso você aceite, doará 30 mL (aproximadamente 3 colheres de sopa) de sangue que será colhido de suas veias. As suas células do sangue serão usadas para estudar algumas proteínas e pedaços do seu DNA, que controlam a vida e o número de células do sangue. Você fará parte do grupo controle dessa pesquisa. Os dados obtidos com as células dos indivíduos saudáveis (controle) dessa pesquisa serão comparados aos dados dos pacientes com leucemia mieloide crônica.

A colheita de seu sangue será realizada por profissionais de saúde com experiência, como enfermeiros, biomédicos ou farmacêuticos, com material descartável para que não haja riscos de contaminação. Os riscos dessa colheita serão mínimos, existindo uma pequena chance de você sentir dor, de aparecer inchaços roxos ou apenas inchaços em seu braço no local da colheita de sangue.

Se aceitar participar dessa pesquisa, as células, algumas proteínas, DNA, RNA e o plasma (parte líquida do sangue) serão guardados sob a responsabilidade da Prof^a Fabíola Attié de Castro na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Você tem a liberdade de aceitar ou não que seu sangue seja usado nessa pesquisa não haverá prejuízos para você.

Além disso, gostaríamos de saber se você autoriza que a amostra de seu sangue seja guardada para ser usada em outras pesquisas sobre a mesma doença (Leucemia Mielóide Crônica). Qualquer pesquisa nova com seu sangue guardado precisará ser aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa e nós pesquisadores pediremos para você autorizar ou não o uso de seu sangue que estará guardado.

Somente os resultados da pesquisa serão divulgados, sem que seu nome apareça. As amostras do seu sangue e os seus dados serão guardados em segredo pelas pesquisadoras responsáveis. As amostras e componentes de seu sangue serão identificados por números e somente os pesquisadores terão acesso. Se você quiser, podemos lhe informar sobre os resultados das pesquisas sempre que desejar, tendo a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de quaisquer dúvidas sobre os procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa. Você também poderá procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) - USP.

Você não terá nenhuma despesa por participar dessa pesquisa e você não será pago por doar o sangue para a pesquisa. Sua doação será voluntária. Os resultados dessa pesquisa não

Ihe trarão, nesse momento, vantagens, mas no futuro poderão contribuir para o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes para o tratamento da Leucemia Mielóide Crônica.

Caso não aceite participar dessa pesquisa não haverá prejuízos para você. Você poderá desistir em qualquer momento, se assim desejar, mas para isso precisará avisar os pesquisadores pelos telefones que aparecem no início deste papel.

Eu, _____, RG: _____, declaro que concordo em ser voluntário e autorizo a retirada de 30 mL (aproximadamente 3 colheres de sopa) do meu sangue para a realização da pesquisa. Fui devidamente informado em detalhes pelos responsáveis dessa pesquisa sobre os meus direitos, que o volume de sangue retirado não me causará danos, que esta pesquisa ajudará a entender o que causa o aumento do número de células do sangue nos pacientes com Leucemia Mielóide Crônica e que meu nome não será divulgado.

Este documento será assinado em duas vias, uma via do pesquisador e uma via do paciente/controle.

Endereço: _____ Telefone: _____

Nome do doador: _____

Assinatura: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Nome do pesquisador responsável pelo estudo: _____

Assinatura: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Se o paciente não puder assinar:

Nome do representante: _____

Assinatura: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Informações importantes:

Telefone do Comitê de ética da FCFRP-USP: Fone: (16) 3602-4213. Fax: (16) 3602-4892

Endereço: FCFRP-USP, Av. do Café, s/n – Campus Universitário – Monte Alegre – Ribeirão Preto, CEP: 14049-903 Telefone do Comitê de ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto: Fone: (16) 3602-2228. Fax: (16) 3633-1144

Endereço: HCFMRP-USP, Av. Bandeirantes, 3.900 - Campus Universitário - Monte Alegre – Ribeirão Preto, CEP: 14.048-900

ANEXO 5. Ficha de Identificação dos pacientes para compilação de dados

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DE PACIENTE		Nº _____
NOME PACIENTE:		
SEXO: () F () M	REGISTRO HC:	
COR/RAÇA:	DATA DE NASCIMENTO:	
CONTATO (TEL./EMAIL):	PROCEDÊNCIA:	
DATA DA COLHEITA:	DATA DIAGNÓSTICO:	
FASE LMC:	TRATAMENTO:	
HEMOGRAMA (DIAGNÓSTICO) HE: HT: Hb: GB:	DIFERENCIAL:	
PLAQUETAS:	MIELOGRAMA:	
BAÇO (US - cm):		
Bcr-ABL (QUANTIF):		
Ph1:		

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DE PACIENTE		Nº _____
NOME PACIENTE:		
SEXO: () F () M	REGISTRO HC:	
COR/RAÇA:	DATA DE NASCIMENTO:	
CONTATO (TEL./EMAIL):	PROCEDÊNCIA:	
DATA DA COLHEITA:	DATA DIAGNÓSTICO:	
FASE LMC:	TRATAMENTO:	
HEMOGRAMA (DIAGNÓSTICO) HE: HT: Hb: GB:	DIFERENCIAL:	
PLAQUETAS:	MIELOGRAMA:	
BAÇO (US - cm):		
Bcr-ABL (QUANTIF):		
Ph1:		