UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise da proteína hnRNP K nas linhagens celulares NB4 e NB4-R2 de leucemia promielocítica aguda com ênfase na patogênese e na diferenciação celular pelo ácido *all-trans* retinoico

Karina Stringhetta Padovani

**Ribeirão Preto
2017**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise da proteína hnRNP K nas linhagens celulares NB4 e NB4-R2 de leucemia promielocítica aguda com ênfase na patogênese e na diferenciação celular pelo ácido *all-trans* retinoico

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

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Karina Stringhetta Padovani

Orientadora: Prof. Dra. Andréia Machado
Leopoldino

Versão corrigida da Tese de Doutorado Direto apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia no dia 20/03/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP*.

Ribeirão Preto
2017

RESUMO

STRINGHETTA-PADOVANI, K. **Análise da proteína hnRNPK nas linhagens celulares NB4 e NB4-R2 de leucemia promielocítica aguda com ênfase na patogênese e na diferenciação celular pelo ácido *all-trans* retinoico**. 2017. 104f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A ribonucleoproteína heterogênea nuclear K (hnRNP K) e o inibidor endógeno da fosfatase 2A (SET) são superexpressos e propostos como marcadores prognósticos em leucemia mieloide aguda e crônica. O objetivo do estudo foi caracterizar a participação das proteínas hnRNP K e SET na leucemogênese da leucemia promielocítica aguda (LPA), assim como na diferenciação celular induzida pelo ácido *all-trans* retinóico (ATRA). Os resultados iniciais de qRT-PCR demonstram que os níveis de RNAm de HNRNPK e SET estão aumentados em pacientes ao diagnóstico de LPA em comparação com amostras de indivíduos saudáveis e diminuem após indução e durante a manutenção do tratamento. Os resultados foram validados por Western blot, sugerindo hnRNP K e SET como marcadores diagnóstico e de resposta ao tratamento. O knockdown de hnRNP K e SET foi realizado em células de LPA sensível, NB4, e resistente ao ATRA, NB4-R2, utilizando RNA de interferência. Ambas as proteínas também foram testadas como alvo terapêutico com a utilização de inibidores de hnRNP K (U0126) e SET (OP449 e FTY720). A diminuição de hnRNP K nas células levou ao aumento da diferenciação celular granulocítica em ambas as células, principalmente na presença de ATRA, e portanto, foi capaz de reverter o fenótipo de resistência ao ATRA das células NB4-R2. O knockdown de hnRNP K, assim como o tratamento com U0126, levou a perda de viabilidade dessas células por indução de apoptose acompanhada da clivagem da proteína SET. O knockdown de SET em células LPA confirmou que a indução de apoptose em células com knockdown de hnRNP K ocorreu por clivagem e não pela diminuição da proteína SET nas células. Além disso, demonstrou também que SET prejudica a atuação do ATRA no processo de diferenciação celular. O modelo in vivo utilizando transplante de NB4-R2 em camundongos nude confirmou que o trióxido de arsênio (ATO) combinado a U0126 tem um maior potencial contra a progressão tumoral quando comparado ao tratamento isolado com ATO. FTY720 e OP449 tiveram efeito anti-leucêmico significativo com redução da viabilidade celular. Quando em associação, FTY720 e OP449, apresentaram efeito sinérgico significativo em NB4-R2 (CID<0,7). Concluímos que a superexpressão de hnRNP K e SET contribui para o bloqueio da diferenciação celular em promielócitos e prejudicam a atuação do ATRA no tratamento da LPA e, portanto, hnRNPK em associação com a proteína SET representam alvo terapêutico em potencial para terapia anti-leucêmica da LPA, principalmente para pacientes resistentes ao ATRA.

Palavras-chave: hnRNP K, SET, LPA, ATRA e Diferenciação Celular.

ABSTRACT

STRINGHETTA-PADOVANI, K. **Analysis of hnRNPK protein in cell lines NB4 and NB4-R2 of acute promyelocytic leukemia with emphasis in pathogenesis and cell differentiation by *all-trans* retinoic acid.** 2017. 104f. Thesis (Doctorate). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) and endogenous inhibitor of phosphatase 2A (SET) are overexpressed and proposed as prognostic markers in acute and chronic myeloid leukemia. The study aim was to characterize the hnRNP K and SET proteins involvement in acute promyelocytic leukemia (APL) leukemogenesis as well as *all-trans* retinoic acid (ATRA) induced cell differentiation. Initial qRT-PCR results demonstrate that HNRNPK and SET mRNA levels are increased in patients diagnosed with APL compare to samples from healthy donors and decrease after induction and during maintenance of treatment. The results were validated by Western blot, suggesting hnRNP K and SET as diagnostic and response to treatment markers. The knockdown of hnRNP K and SET was performed on sensitive, NB4, and ATRA-resistant, NB4-R2, LPA cells using interfering RNA. Both proteins were also tested as a therapeutic target with a use of hnRNP K (U0126) and SET inhibitors (OP449 and FTY720). The decrease of hnRNP K in cells led to increased granulocyte cell differentiation in both cells, especially in the presence of ATRA, and thus was able to reverse the NB4-R2 cells resistance to ATRA phenotype. The hnRNP K knockdown, as well as the treatment with U0126, had a loss of cell viability by induction of apoptosis accompanied by cleavage of the SET protein. The SET knockdown in APL cells confirmed that an induction of apoptosis in cells with hnRNP K knockdown occurred by cleavage and not by the SET protein decrease in the cells. Furthermore, it has also shown that SET impairs the ATRA's performance in the cellular differentiation process. The in vivo model using NB4-R2 transplant in nude mice confirmed that arsenic trioxide (ATO) combined with U0126 has a greater potential against tumor progression compared to the treatment isolated with ATO. FTY720 and OP449 have significant anti-leukemic effect reducing cell viability. When in combination, FTY720 and OP449, they had a significant synergistic effect on NB4-R2 (CDI <0.7). We conclude that overexpression of hnRNP K and SET contributes to block cell differentiation in promyelocytes and impair the performance of ATRA in the treatment of APL and therefore hnRNPK in association with a SET protein represent a potential therapeutic target for anti-leukemic therapy of APL, mainly for patients resistant to ATRA.

Key Words: hnRNP K, SET, APL, ATRA and Cell Differentiation.

ABSTRACTO

STRINGHETTA-PADOVANI, K. **Análisis de proteínas hnRNP K en líneas de células NB4 y NB4-R2 leucemia promielocítica aguda con énfasis en la patogénesis y la diferenciación de las células por el ácido *all trans*-retinoico.** 2017. 104f. Tesis (Doctorado). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto - Universidad de Sao Paulo, Ribeirão Preto de 2017.

La ribonucleoproteína heterogénea nuclear K (hnRNP K) y el inhibidor endógeno de la fosfatasa 2A (SET) son superexpresados y propuestos como marcadores pronósticos en leucemia mieloide aguda y crónica. El objetivo del estudio fue caracterizar la participación de las proteínas hnRNP K y SET en la leucemogénesis de la leucemia promielocítica aguda (LPA), así como en la diferenciación celular inducida por el ácido *all-trans* retinoico (ATRA). Los resultados iniciales de qRT-PCR demuestran que los niveles de RNAm de HNRNPK y SET se incrementan en pacientes con el diagnóstico de LPA en comparación con muestras de individuos sanos y disminuyen después de la inducción y durante el mantenimiento del tratamiento. Los resultados fueron validados por Western blot, sugiriendo hnRNP K y SET como marcadores diagnósticos y de respuesta al tratamiento. El knockdown de hnRNP K y SET fue realizado en células de LPA sensible, NB4, y resistente al ATRA, NB4-R2, utilizando RNA de interferencia. Las dos proteínas también se probaron como objetivo terapéutico con el uso de inhibidores de hnRNP K (U0126) y SET (OP449 y FTY720). La disminución de hnRNP K en las células llevó al aumento de la diferenciación celular granulocítica en ambas células, principalmente en la presencia de ATRA, y por lo tanto fue capaz de revertir el fenotipo de resistencia al ATRA de las células NB4-R2. El knockdown de hnRNP K, así como el tratamiento con U0126, llevó la pérdida de viabilidad de estas células por inducción de apoptosis acompañada de la división de la proteína SET. El knockdown de SET en células LPA confirmó que la inducción de apoptosis en células con knockdown de hnRNP K ocurrió por clivaje y no por la disminución de la proteína SET en las células. Además, demostró también que SET perjudica la actuación del ATRA en el proceso de diferenciación celular. El modelo in vivo utilizando trasplante de NB4-R2 en los ratones nude confirmó que el trióxido de arsénico (ATO) combinado con la U0126 tiene un mayor potencial contra la progresión tumoral en comparación con el tratamiento aislado con ATO. FTY720 y OP449 tuvieron un efecto anti-leucémico significativo con reducción de la viabilidad celular. Cuando en combinación, FTY720 y OP449, presentaron un efecto sinérgico significativo en NB4-R2 (CID <0,7). Concluimos que la superexpresión de hnRNP K y SET contribuye al bloqueo de la diferenciación celular en promielocitos y perjudican la actuación del ATRA en el tratamiento de la LPA y por lo tanto hnRNPK en asociación con la proteína SET representan un potencial terapéutico para terapia anti-leucémica del LPA, principalmente para pacientes resistentes al ATRA.

Palabras clave: hnRNP K, SET, LPA, ATRA y Diferenciación Celular.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leucemia

Durante a hematopoese, as células tronco hematopoéticas (CTH) sofrem divisão assimétrica, processo pelo qual é capaz de formar uma nova CTH e uma célula progenitora hematopoética (CPH) de origem linfoide ou mieloide. As CPHs são células com potencial de proliferação intenso, e dão origem as células maduras do sangue periférico (Kondo et al., 2003). Da mesma forma que na hematopoese normal, na leucemia há uma condição de hierarquia na qual uma subpopulação de células leucêmicas, as células tronco leucêmicas, iniciam e mantém a doença dando origem a clones malignos (Riether, Schürch e Ochsenbein, 2015). A classificação das leucemias leva em consideração a origem da linhagem comprometida e, portanto pode ser classificada em: leucemia mieloide ou linfoide (Hossfeld et al., 2002). Ainda de acordo com o grau de maturidade celular acometido pode ser classificada em aguda, quando acomete células indiferenciadas, ou crônica, quando acomete células maduras do sangue. Levando em consideração parâmetros como a morfologia celular, imunofenotipagem, citoquímica, alterações genéticas e as características clínicas encontradas, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a leucemia em diferentes entidades de doenças a fim de estabelecer grupos bem definidos com terapias específicas aumentando a chance de sucesso terapêutico (Vardiman et al., 2009; Arber et al., 2016).

No ano de 2012 foram estimados 351.965 novos casos no mundo, e a estimativa para 2020 é ainda maior, totalizando 412.017 novos casos de leucemia (<http://globocan.iarc.fr/Pages/online.aspx>). No Brasil, em 2016, foram estimados 10.070 novos casos de leucemia, sendo 5.540 homens e 4.530 mulheres. Apesar dos esforços para o aperfeiçoamento da classificação das leucemias assim como do procedimento terapêutico adequado a mortalidade ainda é alta, de forma que no Brasil, em 2013, foram constatadas 6.316 mortes, sendo 3.439 homens e 2.877 mulheres(<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/>).

1.1.1. Leucemia Mieloide Aguda

A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é uma doença heterogênea na qual ocorre expansão clonal de uma célula progenitora mielóide da medula óssea. Esse clone leucêmico prolifera intensamente na medula óssea, culminando na inibição da produção de células sanguíneas normais (Heerema-McKenney e Arber, 2009). As diferentes anormalidades citogenéticas presentes na LMA levam a cariótipos complexos, os quais apresentam prognósticos variados (Marchesi et al., 2011). O objeto de estudo da tese de Doutorado Direto foi um sub-tipo de LMA, a Leucemia Promielocítica Aguda (LPA).

1.1.1.1. Leucemia Promielocítica Aguda

A LPA representa cerca de 10% a 15% dos casos de LMA dos adultos (Bassi e Rego, 2012). E apresenta menor incidência em países desenvolvidos, 4% a 15%, quando comparado a países de colonização latina e regiões da Espanha, 20% a 28% (Estey e Döhner, 2006; Jácomo, Figueiredo-Pontes, e Rego, 2008). A LPA é classificada pelo grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) como Mieloide 3 (M3) com base, principalmente, nas características morfológicas e imunofenotípicas encontradas (Bennett et al., 1976). Pela OMS é classificada como leucemia mielóide aguda com anormalidades genéticas recorrentes (Vardiman et al., 2009). A principal alteração citogenética é a translocação recíproca entre os cromossomos 15 e 17, t(15,17) (q22,11-12), encontrada em 98% dos pacientes com LPA (Rowley, Golomb, e Dougherty, 1977; Grignani et al., 1994). Esta translocação cromossômica gera uma fusão gênica aberrante entre os genes codificadores da Proteína Leucêmica Promielocítica (PML), localizado no cromossomo 15, e o receptor α de ácido retinoico (RAR α), localizado no cromossomo 17, dando origem ao oncogene PML-RAR α , o qual retém a maioria dos domínios funcionais das proteínas parentais (Heerema-McKenney e Arber, 2009; De Thé et al, 1991; Borrow et al, 1990; Melnick e Licht, 1999).

PML-RAR α codifica um receptor de ácido retinoico mutante que contribui para a leucemogênese da LPA por interferir no processo de diferenciação celular levando a parada do mesmo no estágio de promielócitos (Bennett et al., 1976; De The et al., 1991). Dessa maneira, a LPA é caracterizada pelo acúmulo de promielócitos na

medula óssea (MO), o que compromete o desenvolvimento da série mieloide granulocítica e leva a neutropenia no paciente. Ao diagnóstico, o hemograma pode evidenciar pancitopenia e leucocitose. Sintomas inespecíficos, tais como hipertermia, astenia, hiporexia e perda de peso podem estar presentes no paciente. Aproximadamente 60% dos pacientes diagnosticados com LPA apresentam coagulopatias importantes e o controle da mesma faz parte do protocolo de tratamento, de modo que as plaquetas devem ser mantidas acima de $30 \times 10^3/\mu\text{L}$ para evitar sangramentos (Jácomo, Figueiredo-Pontes, e Rego, 2008; Rego et al., 2013). O mielograma revela infiltração maciça da medula óssea por promielócitos, que morfológicamente podem se revelar na forma hipergranular (FAB M3 subtipo clássica), caracterizada pela intensa presença de bastonetes de Auer, ou na forma variante (FAB M3 subtipo hipogranular) (Heerema-McKenney e Arber, 2009). A técnica de coloração citoquímica para peroxidase (por reatividade a mieloperoxidase e a marcação por Sudan Black) auxilia na identificação da LPA como uma leucemia mieloide, uma vez que células mielóides são positivas para ambas as reações. Ainda na investigação diagnóstica, a marcação imunofenotípica evidencia a presença de marcadores mielóides precoces (CD117, CD13 e CD33) e ausência ou baixa expressão de marcadores de maturidade celular (CD11b, CD15) (Heerema-McKenney e Arber, 2009; Orfao et al., 1999). A técnica de imunofluorescência (IF) utilizando anticorpo para PML é uma ferramenta importante no diagnóstico rápido da LPA, pois associado aos achados morfológicos indicativos de LPA, possibilita o início precoce do tratamento caso o resultado seja positivo. Na análise da IF para PML, as amostras positivas para PML-RAR α apresentam padrão microparticulado de marcação versus um padrão pontual das amostras normais (Figura 1). Esse fato ocorre porque a proteína de fusão prejudica o arranjo da proteína PML em corpos nucleares (CN) (Rego et al., 2013; Gupta et al., 2010). O diagnóstico definitivo é estabelecido somente após detecção do oncogene PML-RAR α por PCR em tempo real ou a identificação da t(15,17) por hibridação *in situ* (Jácomo, Figueiredo-Pontes, e Rego, 2008; Rego et al., 2013).

Figura 1. Imunofluorescência utilizando anticorpo anti-PML em células NB4 não tratadas (A) e após 48 horas de tratamento com ATRA (B) e 4 horas com As_2O_3 (C). Fonte: Müller S, Matunis, M J e Dejean A. Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. The EMBO Journal, v.17, n.1 p.61–70, 1998.

Com menor frequência, $\text{RAR}\alpha$ se funde a outros genes, incluindo Promyelocytic Leukemia Zinc Finger (PLZF), Nucleofosmina (NPM), aparelho mitótico nuclear (NuMA) ou ao transdutor de sinal e ativador de transcrição 5b (STAT 5b), de maneira que pacientes LPA com essas fusões gênicas apresentam sensibilidade variável ao ATRA (Melnick e Licht, 1999).

A Proteína Leucêmica Promielocítica (PML) se organiza em estruturas nucleares ligadas a matriz nuclear conhecidas como CN (Lallemand-Breitenbach e de Thé, 2009). No ambiente celular, a proteína PML atua em diversas funções, (Lallemand-Breitenbach e de Thé, 2010) tais como regulação da apoptose, ao sequestrar fatores de transcrição importantes como p53 (Bellodi et al., 2006), senescência celular, inibição da proliferação celular e na manutenção da estabilidade genética (Bernardi e Pandolfi, 2007; Salomoni e Pandolfi, 2002). Portanto, a perda de função da proteína PML compromete várias funções celulares importantes nas células leucêmicas (Bernardi and Pandolfi, 2007). A oncoproteína $\text{PML-RAR}\alpha$ é capaz de ligar-se à proteína PML nativa, deslocando-a dos CN interferindo de forma dominante negativa na função de PML (Jácomo, Figueiredo-Pontes e Rego, 2008).

O ácido retinoico (AR), derivado da vitamina A, é de extrema importância no processo de diferenciação celular mielóide durante a hematopoese e, atua em células progenitoras mielóides por meio dos receptores nucleares (RARs) e retinóides X (RXR), de modo que esses receptores modulam o efeito biológico do AR (Altucci e Gronemeyer, 2001). $\text{RAR}\alpha$ pertence a uma superfamília de receptores nucleares, cujos membros são fatores de transcrição (Chambon, 1994; P Chambon

1996). Em relação a sua estrutura é dividido em 6 domínios, nos quais os domínios A, B e E possuem atividade transcricional, e o domínio C é capaz de ligar elementos de resposta ao ácido retinoico (RAREs) (Melnick e Licht, 1999). Os receptores podem se apresentar separadamente ou na forma de heterodímero (RXR/RAR). Na presença do AR o receptor α associa-se ao seu ligante e migra do citoplasma ao núcleo. No núcleo RAR α dimeriza-se ao RXR e juntos atuam na região promotora de genes importantes para a diferenciação mielóide. A modulação da transcrição ocorre por ligação dos RARs a co-fatores. Os RARs se unem a co-repressores na ausência do AR. Já na presença do seu ligante há uma mudança conformacional do heterodímero promovendo a liberação dos co-repressores e recrutamento dos co-ativadores (Chen e Evans, 1995; Zhu et al, 1995; Voegel et al; 1996). De acordo com o modelo clássico da fisiopatologia da LPA, o oncogene (PML-RAR α) possui menor sensibilidade ao ácido *all-trans* retinoico (ATRA) em doses fisiológicas e, dessa forma, bloqueia a diferenciação celular ao reprimir a transcrição de genes alvo de RAR α de modo dominante negativo. Segundo esse modelo o AR em doses terapêuticas é capaz de promover uma mudança conformacional no complexo PML-RAR α , causando a liberação de co-repressores (NCoR, DNMT, HDAC) e o recrutamento de co-ativadores, resultando no reestabelecimento da ativação da transcrição de genes alvos de RAR α , antes reprimidos pela proteína de fusão (Jácomo, Figueiredo-Pontes, e Rego, 2008; Zhu et al, 1995; Grignani et al. 1993). Além de promover a diferenciação granulocítica restaurando a ativação transcricional dos genes alvo de RAR α , o AR também causa a degradação de PML-RAR α . Porém, a terapia isolada com ATRA leva à remissão transitória da doença (Lallemant-Breitenbach et al, 1999), sugerindo o envolvimento de outros mecanismos na auto-renovação da LPA. Outras alterações moleculares, tais como em C/EBP α e em MYC concomitantes a ocorrência de PML-RAR α , já foram demonstradas na LPA e associadas a leucemogênese desse tipo de leucemia (Santana-Lemos et al., 2011; Jones et al., 2010).

A introdução do ATRA no tratamento da LPA ocorreu aproximadamente em 1985, representando um grande avanço no tratamento e prognóstico da doença, pois elevou as taxas de remissão completa de 90% para 95% quando em associação com quimioterapia. Além disso, a taxa de sobrevida (> 6 anos) alcançou 74% dos pacientes tratados apenas com ATRA e 86% quando associado a quimioterapia (Jobe et al., 2014). Dessa forma, a escolha de primeira linha no

tratamento da LPA, quando não há disponibilidade do trióxido de arsênio (ATO), é a associação do ATRA a quimioterápicos antracíclicos, a qual alcança 80% de cura (Melnick e Licht, 1999; Cicconi e Lo-Coco, 2016).

O trióxido de arsênio (ATO) promove a degradação da proteína de fusão PML-RAR α ao interagir com a mesma através de PML, promovendo a sumoilação da oncoproteína e degradação por ubiquitinação via proteassoma. (Geoffroy et al, 2010). Porém, nem sempre está disponível na rede pública de saúde para o protocolo de tratamento. As opções terapêuticas para LPA são descritas em protocolos terapêuticos bem estabelecidos pelo Programa Espanhol de Tratamento em Hematologia (PETHEMA) e pelo Grupo Italiano para Doenças Hematológicas em Adultos (GIMENA) (Rego et al, 2013; Cicconi e Lo-Coco, 2016; Crespo-Solis et al., 2016; Testi et al., 2005).

Entre as complicações mais comuns relacionadas ao tratamento da LPA utilizando ATRA estão: a síndrome de diferenciação (SD), pseudotumor cerebral, alteração ventricular (prolongamento de QTc, causado pelo trióxido de arsênio), toxicidade hepática e leucocitose. Independentemente do tipo, todas as complicações devem ser identificadas e tratadas precocemente, principalmente a síndrome de diferenciação, pois é potencialmente fatal (Cicconi e Lo-Coco, 2016). Além disso, as coagulopatias estão presentes em 60% a 80% dos pacientes ao diagnóstico e representam o principal entrave ao tratamento, pois são a principal causa de óbito dos pacientes no início do tratamento (Rego et al., 2013; Breen, Grimwade e Hunt 2012).

Levando em consideração tanto a ocorrência de pacientes refratários e/ou resistentes ao ATRA, quanto o fato de que a terapia isolada com ATRA leva à remissão transitória da doença (Lallemand-Breitenbach et al, 1999), a necessidade de estudo de novos alvos terapêuticos para a LPA, assim como, da elucidação dos mecanismos da auto-renovação da LPA, são de extrema importância para o aperfeiçoamento do tratamento da LPA. Dessa forma, o acúmulo da proteína hnRNP K e da proteína SET já foi descrito na LPA, mas o papel de ambas as proteínas no processo de leucemogênese da LPA e na diferenciação celular induzida pelo ATRA ainda não é completamente conhecido e foram alvo de estudo.

O Consórcio Internacional Sobre Leucemia Promielocítica Aguda (IC-APL) foi criado em 2005 por iniciativa dos hematologistas membros do Comitê Internacional da Sociedade Americana de Hematologia (IMC-ASH), brasileiros, mexicanos e

jordanianos. O principal objetivo desse consórcio foi criar uma rede de instituições de países em desenvolvimento que trocassem experiências e dados, além de receber o apoio de grupos cooperativos bem estabelecidos nos Estados Unidos e na Europa. O IC-APL, baseados no protocolo LPA2005 e PETHEMA, formulou diretrizes de tratamento baseadas em protocolos de ensaios clínicos bem sucedidos nos países em desenvolvimento e os adaptaram às condições e recursos locais. Segundo essas diretrizes o paciente portador de leucemia promielocítica aguda deve ser submetido à coleta de medula óssea periodicamente, incluindo os tempos de 30 dias e superior a 150 dias do tratamento, tempos utilizados no presente projeto de doutorado para análises de RNA e proteínas de interesse (Jácomo, Figueiredo-Pontes e Rego, 2008; Rego et al., 2013).

1.2. Ribonucleoproteína heterogênea nuclear K

A ribonucleoproteína heterogênea nuclear K (hnRNP K), com 65 kDa, é um membro da família das ribonucleoproteínas heterogêneas nucleares, que interage diretamente com DNA e RNA por meio do domínio homólogo K, e pode funcionar também como uma plataforma de acoplamento de proteínas regulada por ácido nucleico (Bomsztyk, Denisenko e Ostrowski, 2004; Leopoldino et al., 2007). hnRNP K é uma proteína multifuncional encontrada no núcleo, no citoplasma e nas mitocôndrias e está envolvida com a regulação da expressão gênica atuando no processo de transcrição, splicing e transporte de RNA, tradução e reparo de DNA. Além disso, o splicing alternativo do transcrito do gene *HNRNPK* leva a formação de 2 isoformas da proteína hnRNP K: a variante 1 e 3 codificam a isoforma maior (a), e a variante 2 codifica a isoforma menor (b) (Bomsztyk, Denisenko e Ostrowski, 2004). hnRNP K pode ainda sofrer modificação pós traducional pela fosforilação nos resíduos de aminoácidos Ser116 e Ser284 (Kimura et al. 2010).

hnRNP K tem sido encontrada superexpressa e proposta como um importante marcador de prognóstico em diversos tipos de câncer, incluindo câncer epidermóide de cabeça e pescoço (CECP), câncer colorretal e leucemia mielóide crônica (LMC) (Matta et al., 2009; Wang et al., 2012; Du et al., 2010; Zhang et al., 2011). Os estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa corroboram com a literatura que tem demonstrado a existência de uma relação entre altos níveis de hnRNPK e

pior prognóstico em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (Matos-Silva, 2009).

Em leucemias a proteína hnRNP K tem sido associada à leucemogênese da LMC e LMA devido a sua superexpressão nessas leucemias (Zhang et al, 2011; Harris, et al., 2004). Du et al relataram a superexpressão de hnRNPK em Leucemia Mielóide Crônica (LMC), propondo que a mesma é regulada pelas vias de sinalização de BCL-ABL e Ras-MAPK, e segundo os autores essa condição de superexpressão pode promover a progressão da LMC, caracterizando a proteína como um potencial alvo terapêutico e marcador para a evolução da LMC. Porém, a literatura envolvendo hnRNP K e LPA é escassa. Nesse âmbito, além da superexpressão de hnRNP K em LPA, um estudo proteômico revelou que hnRNP K sofre regulação pós transcricional durante a diferenciação celular induzida pelo ATRA em células NB4 (sensíveis ao ATRA), de modo que apenas os níveis de proteicos de hnRNP K diminuem após tratamento com ATRA sem que ocorra alteração dos níveis de RNAm (Harris et al., 2004).

Em relação à diferenciação de precursores mielóides, foi relatado que hnRNP K participa na maturação de pré-reticulócitos em reticulócitos maduros, regulando a tradução de 15-lipoxigenase (Ostareck et al., 1997; Ostareck-Lederer e Ostareck 2004; Naarmann-de Vries et al., 2013).

As proteínas ERK1/2 (quinases reguladas por sinal extracelular) pertencem a família de MAPK (proteína quinase induzida por mitógeno) e regulam a ativação de inúmeros processos celulares tais como proliferação, diferenciação celular e sobrevivência e, são ativados por inúmeros ligantes mitógenos. A via de MAPK, frequentemente, apresenta-se desregulada no câncer, e por isso os componentes dessa cascata têm sido sugeridos como alvo na terapia contra o câncer (Wagner e Nebreda, 2009). A interação da proteína hnRNP K com outras proteínas é regulada via (MAPK) e ERK, a qual regula a fosforilação de hnRNP K (Habelhah et al., 2001).

Estas evidências associadas a escassez de estudos na área despertaram o interesse em compreender o papel da proteína hnRNP K no processo de leucemogênese da LPA e no processo de diferenciação celular induzida pelo ATRA uma vez que essa proteína já foi descrita superexpressa em LPA.

Além disso, recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que há interação entre hnRNP K e SET no câncer de cabeça e pescoço contribuindo para a sobrevivência celular das células tumorais e controle de expressão de Bcl-xL

(Almeida et al., 2014), que está envolvida em controle de apoptose (Clem et al., 1998; Revil et al., 2009). Dessa forma, tanto a hnRNP K quanto a SET foram alvos de estudo do presente projeto de doutorado.

1.3. Inibidor 2 da proteína fosfatase 2A (SET ou I2PP2A ou TAF1 β)

Codificada pelo gene *SET*, originalmente foi identificada como componente do gene de fusão SET-CAN em leucemia indiferenciada aguda (Adachi, Pavlakis e Copeland, 1994). O transcrito do gene SET pode formar 4 isoformas da proteína SET, de forma que a variante 1 codifica a isoforma maior (42 kDa), e a variante 2 codifica a isoforma menor (39 kDa) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6418>). A proteína SET, é um inibidor endógeno da proteína fosfatase 2A (PP2A) e, o mecanismo de inibição está associado a capacidade de ligação de SET à subunidade C catalítica de PP2A (Li, Makkinje e Damuni 1996). PP2A é uma fosfatase Serina/Treonina, constituída por uma subunidade scaffold (A), uma subunidade regulatória (B), e uma subunidade catalítica (C) (Stone, Hofsteenge e Hemmings 1987) (Khew-Goodall e Hemmings 1988) (Eichhorn e Creighton 2009). PP2A participa de diversos processos celulares incluindo a regulação do ciclo celular, atuando como gene supressor tumoral. E frequentemente apresenta-se inativada em câncer, como no caso da LMA, na qual a superexpressão do inibidor endógeno SET, leva a perda de função de PP2A (Cristóbal et al 2012).

A fosforilação reversível de proteínas é uma forma importante de regulação do funcionamento das proteínas celulares, essa reversibilidade possibilita a regulação da expressão gênica, da proliferação e diferenciação celular. É o mecanismo mais importante envolvido na resposta celular a sinais extracelulares (Lechward, K. et al. 2001). SET está localizada no núcleo e quando fosforilada na serina 9 é translocada para o citoplasma, fração subcelular na qual SET age inibindo PP2A (Yu G et al. 2013).

A superexpressão e alteração da fosforilação de SET foi descrita na doença de Alzheimer (Tanimukai e Grundke-iqbal, 2005; Yu et al., 2013) e a clivagem dessa proteína tem sido associada a indução de apoptose (Madeira et al., 2005). Independente da sua ação como inibidora de PP2A, SET tem outras funções descritas, tais como a regulação da acetilação de histonas (Seo et al., 2001), resposta ao stress oxidativo (Leopoldino et al, 2012), autofagia (Almeida et al.,

2012), reparo ao dano do DNA (Madeira et al., 2005), apoptose (ten Klooster et al., 2007), migração celular (Lam, Anthony e Hordijk, 2013), controle do ciclo celular (Leung et al., 2011) e remodelamento da cromatina (Pippa et al., 2014). A SET é superexpressa em leucemias (Christensen et al., 2011; Cristóbal et al., 2012) e outros tipos de câncer como o câncer de cabeça e pescoço por exemplo (Sobral et al., 2014; Almeida et al., 2015). E assim como a hnRNP K, a superexpressão de SET está associada a pior prognóstico em LMC (Neviani et al., 2005; Christensen et al., 2011).

Estudos demonstram que SET age inibindo PP2A e induz a atividade de proto-oncogenes, como c-Jun e AP-1 (Al-Murrani, Woodgett e Damuni, 1999). Há evidências de que SET pode contribuir para a leucemogênese da LMA por se fundir com nup214 e interferir diminuindo a regulação normal de PP2A (Neviani et al., 2005).

Dessa forma, SET tem sido estudada e proposta como alvo terapêutico em câncer (Switzer et al., 2011; Saddoughi et al., 2012; Pippa et al., 2014). Nesse âmbito, as ceramidas são uma classe de esfingolipídeos, capazes de ativar PP2A (Chalfant et al., 1999; Ogretmen e Hannun, 2004) por meio da inibição de SET (Figura 2). Esse fato deve-se a capacidade dessas ceramidas interagir diretamente com SET promovendo a liberação e restabelecimento da função de PP2A como supressor tumoral (Mukhopadhyay et al., 2009). Pesquisadores demonstraram que a interação entre o peptídeo COG112 e I2PP2A/SET inibe a associação de SET com a subunidade catalítica da proteína supressora tumoral PP2A e com o gene supressor metastático nm23-H1 possibilitando o funcionamento normal de ambos. Inibe ainda a associação de SET com Rac-1 diminuindo invasão e migração celular (Switzer et al., 2011). Assim a utilização de outros inibidores de SET, tais como o peptídeo OP449 e o esfingolipídeo sintético FTY720, vem sendo explorados e tem-se demonstrado resultados positivos na terapia para leucemias, como diminuição da proliferação celular e aumento da sensibilidade de células leucêmicas a quimioterápicos (Agarwal et al., 2014, Pippa et al., 2014).

Figura 2. Mecanismo de fosforilação de SET na Serina 9 via PI3K e acúmulo citoplasmático de SET (A), inativação de PP2A após interação de SET à subunidade catalítica C da fosfatase e, interação do esfingolípídeo sintético FTY720 à SET restabelecendo a função de PP2A (C). Adaptado de: Arriazu, E.; Pippa, R.; Odero, M.D. Protein Phosphatase 2A as a Therapeutic Target in Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers in oncology*, v.6, p. 78, Abr 2016.

Já em relação a participação da proteína SET na diferenciação celular induzida pelo ATRA há pouco reportado na literatura. Porém, aparentemente a proteína SET parece ter relevância no processo de resistência ao medicamento. Células HL60 resistentes ao ATRA quando submetidas ao tratamento apresentam um aumento na expressão de SET (Liu, Chen e Wang, 2014). Enquanto que o tratamento com tetra sulfeto de tetra arsênio (AS₄S₄), que leva a degradação da oncoproteína, em linhagem celular NB4R1 resistente ao ATRA, leva a rápida redução da expressão de SET e perda de viabilidade devido apoptose (Qi et al., 2010). Dessa forma, a determinação da função da SET na LPA assim como no processo de diferenciação celular induzido pelo ATRA também foram alvo de estudo desse projeto.

Dessa forma, a hipótese foi de que as proteínas hnRNP K e SET participam da leucemogênese da LPA contribuindo para a parada da diferenciação celular em promielócitos e desfavorecendo a atuação do ATRA no tratamento. Por isso, ambas foram testadas como alvos terapêuticos, utilizando não só a ferramenta de RNA de interferência, mas também inibidores de hnRNP K (U0126) e SET (OP449 e FTY720).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O projeto proposto teve como objetivo geral analisar a expressão gênica de *HNRNP K* e *SET* e o comportamento molecular da proteína hnRNP K e da proteína SET nas amostras de medula óssea de paciente com LPA e nas linhagens celulares humana de LPA, NB4 e NB4-R2, com finalidade de elucidar uma possível participação dessas proteínas no processo de leucemogênese da LPA e na diferenciação celular induzida pelo ATRA.

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos estão listados abaixo:

- a)** Analisar a expressão gênica de *HNRNPK* e *SET* nas amostras de medula óssea saudável (MO), e de pacientes nas seguintes fases: ao diagnóstico (FD), após a indução (FI) e durante a manutenção do tratamento (FM);
- b)** Analisar o perfil da proteína hnRNP K e SET nas amostras de MO, e de pacientes nas fases: FD, FI e FM do tratamento;
- c)** Analisar o perfil da proteína hnRNP K e SET em células NB4 e NB4-R2 tratadas e não tratadas por ATRA;
- d)** Analisar a viabilidade, diferenciação, proliferação celular e vias de sinalização celular alteradas em células NB4 e NB4-R2 após o *knockdown* por shRNA de hnRNP K;
- e)** Analisar o efeito do inibidor de quinases MEK 1/2 (U0126), responsável pela fosforilação de hnRNP K, na viabilidade celular;
- f)** Avaliar *in vivo* o efeito antitumoral do composto U0126 utilizando o modelo de xenoenxerto NB4-R2 em camundongo atímico Balb/C nude.
- g)** Analisar a viabilidade, diferenciação, proliferação celular e vias de sinalização celular alteradas em células NB4 e NB4-R2 após o *knockdown* por shRNA de SET;
- h)** Analisar o efeito de FTY720 e OP449, como inibidores da SET, na viabilidade celular;

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitem as seguintes conclusões:

- a) As proteínas hnRNPK e SET estão superexpressas em pacientes com LPA e reduzem durante o tratamento, assim como o seus respectivos RNAs, constituindo bons marcadores diagnóstico.
- b) hnRNP K e SET participam da granulopoese.
- c) O acúmulo da proteína hnRNP K e da proteína SET nas linhagens com t(15,17) de LPA participa do processo de leucemogênese da LPA contribuindo para o bloqueio da diferenciação celular em promielócitos. Além disso, a diminuição de ambas evidencia sua participação no processo de diferenciação celular induzido pelo ATRA.
- d) O *knockdown* de hnRNP K diminui a proliferação e viabilidade celular e aumenta a diferenciação celular, via sinalização SET- MEK-ERK-hnRNP K. Consequentemente, estas proteínas representam novos alvos terapêuticos potenciais para o tratamento da LPA resistente ao ATRA.
- e) O *knockdown* de SET promoveu o aumento da diferenciação celular mediante o tratamento com ATRA, principalmente pela diminuição da oncoproteína PML-RAR α para células NB4 e NB4-R2. E foi capaz de diminuir hnRNP K em células NB4 favorecendo a diferenciação celular.
- f) O tratamento combinado de U0126 com ATO representa uma potencial alternativa terapêutica para pacientes com LPA resistente ao ATRA.
- g) O tratamento com OP449 e FTY720 representam medidas terapêuticas em potencial no tratamento da LPA, principalmente para as células NB4-R2 quando associados, por apresentarem efeito sinérgico significativo (CID<0,7).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI Y.; PAVLAKIS G.N.; COPELAND T.D. Identification and Characterization of SET, a Nuclear Phosphoprotein Encoded by the Translocation Break Point. **J Biol Chem**, v.269, n.3, p.2258–2262, Jul 1994. ISSN: 0021-9258. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8294483>>.

AGARWAL A. et al. Antagonism of SET Using OP449 Enhances the Efficacy of Tyrosine Kinase Inhibitors and Overcomes Drug Resistance in Myeloid Leukemia. **Clin Cancer Res**, v.20, n.8, p.2092–2103, April 2014. ISSN: 15573265. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3989420/>>.

ALMEIDA, L.O. et al. Accumulated SET Protein up-Regulates and Interacts with hnRNPK, Increasing Its Binding to Nucleic Acids, the Bcl-xS Repression, and Cellular Proliferation. **Biochem Biophys Res Commun**, v.445, n.1, p. 196–202, Feb 2014. ISSN: 1090-2104. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24508256>>.

ALMEIDA, L.O. et al. SET Overexpression Decreases Cell Detoxification Efficiency: ALDH2 and GSTP1 Are Downregulated, DDR Is Impaired and DNA Damage Accumulates. **FEBS Journal**, v.279, n.24, p.4615–4628, Dec 2012. ISSN: 1742464X 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23106910>>.

ALMEIDA, L.O. et al. SET Overexpression in HEK293 Cells Regulates Mitochondrial Uncoupling Proteins Levels within a Mitochondrial Fission/reduced Autophagic Flux Scenario. **Biochem Biophys Res Commun**, v.458, n.2, p.300-306, Mar 2015. ISSN 0006291X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25656576>>.

AL-MURRANI, S.W.K.; WOODGETT J.R.; DAMUNI, Z. Expression of I2PP2A, an Inhibitor of Protein Phosphatase 2A, Induces c-Jun and AP-1 Activity. **Biochem J**, v.341 (Pt 2), p.293–298, Jul 1999. ISSN: 0264-6021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10393085>>

ALTUCCI, L.; GRONEMEYER H. The Promise of Retinoids to Fight against Cancer. **Nat Rev Cancer**, v.1, n.3, p. 181–193, Dec 2001. ISSN: 14741768. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11902573>>.

AMATI, B. et al. The c-Myc Protein Induces Cell Cycle Progression and Apoptosis through Dimerization with Max. **EMBO J**, v.12, n.13, p. 5083–5087, Dec 1993. ISSN: 0261-4189. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC413769/>>.

ARBER, D.A. et al. The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia. **Blood**, v.127, n.20, p.2391-2405, May 2016. ISSN: 0006-4971. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27069254>>.

ARRIAZU, E.; PIPPA, R.; ODERO, M.D. Protein Phosphatase 2A as a Therapeutic Target in Acute Myeloid Leukemia. **Frontiers in oncology**, v.6, n. 78, Abr 2016. ISSN: 2234-943X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27092295>>.

ARTEAGA, M.F. et al. Epigenetics in Acute Promyelocytic Leukaemia Pathogenesis and Treatment Response: A Transition to Targeted Therapies. **Br J Cancer**, v.12, n.1, p.5083-5087, Sep 2014. ISSN:0261-4189. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25247321>>.

BASSI, S.C.; REGO, E.M. Molecular Basis for the Diagnosis and Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia." **Rev Bras de Hematol Hemotn**, v.34, n.2, p.134–139. Jan 2012, ISSN: 1516-8484. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3459394/>>.

BELLODI, C. et al. 2006. A Cytoplasmic PML Mutant Inhibits p53 Function. **Cell Cycle**, v.5, n.22, p.2688–2692, Dec 2006. ISSN: 15384101. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17172828>>.

BENNETT, J.M. et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias. French-American-British (FAB) Co-Operative Group. **Br J Haematol**, v.33, n.4, p. 451–458, Aug 1976. ISSN: 0007-1048. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/188440>>.

BERNARDI, R.; PANDOLFI, P.P. Structure , Dynamics and Functions of Promyelocytic Leukaemia Nuclear Bodies. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.8, n.12, p.1007–1016, Dec 2007. ISSN: 1471-0080. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17928811>>.

BOMSZTYK, K.; DENISENKO, O.; OSTROWSKI, J. hnRNP K: one protein multiple processes. **Bioessays**, v. 26, n. 6, p. 629-38, Jun 2004. ISSN 0265-9247 (Print). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15170860>.

BORROW, J. et al. Molecular Analysis of Acute Promyelocytic Leukemia Breakpoint Cluster Region on Chromosome 17. **Science**. v.249, n.4976, p.1577–1580. Sep

1990. ISSN: 0036-8075. Disponível em:<
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2218500>>.

BRASSESCO M.S. et al. Cytogenetic Findings in Pediatric Radiation-Induced Atypical Meningioma after Treatment of Medulloblastoma: Case Report and Review of the Literature. **J Neurooncol**, v.110, n.397, p.397-402, Dec 2012. ISSN: 0167-59X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23076602>>.

BREEN, K.A., GRIMWADE, D.; HUNT B.J. The Pathogenesis and Management of the Coagulopathy of Acute Promyelocytic Leukaemia. **Br J Haematol**, v.156, n.1,p. 24–36, Jan 2012. ISSN: 00071048. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22050876>>.

CHALFANT, C.E. et al. Long Chain Ceramides Activate Protein Phosphatase-1 and Protein Phosphatase-2A. **J Biol Chem**, v.274, n.29, p.20313-20317, Jul 1999. ISSN: 10400653. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10400653>>.

CHAMBON, PIERRE. The Retinoid Signaling Pathway: Molecular and Genetic Analyses. **Semin Cell Biol**, v.5, n.2, p.115–125, Apr 1994. ISSN:10434682. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8068884>>.

CHAMBON, P. A Decade of Molecular Biology of Retinoic Acid Receptors. **FASEB J**, v.10, n.9, p.940–954, Jul 1996. ISSN: 0892-6638. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8801176>>.

CHANG, J.S..et al. High Levels of the BCR/ABL Oncoprotein Are Required for the MAPK-hnRNP-E2-Dependent Suppression of C/EBPa-Driven Myeloid Differentiation. **Blood**, v.110, n.3, p.994–1003, Aug 2007. <Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475908>>.

CHEN, G. I.; GINGRAS, A. C. Affinity-purification mass spectrometry (AP-MS) of serine/threonine phosphatases. **Methods**, v. 42, n. 3, p. 298-305, Jul 2007. ISSN 1046-2023. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17532517> >.

CHEN, J.D.; EVANS,R.M. A Transcriptional Co-Repressor That Interacts with Nuclear Hormone Receptors. **Nature**, v.377, n.6548,p.454–57, Oct 1995.ISSN: 0028-0836. Disponível em:<<http://www.nature.com/doi/10.1038/377454a0>>.

CHOU, T. C et al. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. **Cancer Res**, v.70, n.2, p. 440–46, Jan 2010. ISSN: 0028-0836. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20068163>>.

CHRISTENSEN, D.J. et al. 2011. SET Oncoprotein Overexpression in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia and Non-Hodgkin Lymphoma: A Predictor of Aggressive Disease and a New Treatment Target. **Blood**, v.118,n.15, p. 4150–4158, Oct 2011. ISSN: 00064971. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21844565>>.

CICCONI, L.; Lo-COCO F. Current Management of Newly Diagnosed Acute Promyelocytic Leukemia. **Ann Oncol**, v.27, p.1474-1481, Apr 2016. ISSN: 0923-7534. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27084953>>.

CLEM, R.J. et al. Modulation of Cell Death by Bcl-XL through Caspase Interaction. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95,n.2,p.554–559, Jan 1998. ISSN: 00278424. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9435230>>.

CRESPO-SOLIS, E.et al. Survival and Treatment Response in Adults with Acute Promyelocytic Leukemia Treated with a Modified International Consortium on Acute Promyelocytic Leukemia Protocol. **Rev Bras de Hematol Hemoter**, v.38, n.4, p.285-290, Oct 2016. ISSN: 00278424. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5119665/>>.

CRISTÓBAL, I. et al. Overexpression of SET Is a Recurrent Event Associated with Poor Outcome and Contributes to Protein Phosphatase 2A Inhibition in Acute Myeloid Leukemia. **Haematologica**, v.97, n.4, p.543–550, Apr 2012. ISSN: 03906078. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22133779>>.

dos SANTOS, G.A.S. et al. (+) α -Tocopheryl succinate inhibits the mitochondrial respiratory chain complex I and is as effective as arsenic trioxide or ATRA against acute promyelocytic leukemia in vivo. **Leukemia**, n.26, p.451-460, Ago 2012. ISSN: 0887-6924/12. Disponível em: <<http://www.nature.com/leu/journal/v26/n3/abs/leu2011216a.html>>.

DU, Q. et al. The Role of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K in the Progression of Chronic Myeloid Leukemia. **Med Oncol**, v. 27, n.3, p.673–679, Sep 2010. ISSN: 13570560. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19653139> >.

EICHHORN, P.J.; CREYGHTON, M.P.; BERNARDS, R. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. **Biochim Biophys Acta**, v.795, n.1, p.1–15, Jan 2009. ISSN: 0304419X. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18588945>>.

ESTEY, E.; DÖHNER, H. Acute Myeloid Leukaemia. **Lancet**, v.368, n.9550, p.1894–1907, Nov 2006. ISSN: 01406736. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17126723>>.

EVANS, J.R. et al. Members of the Poly (rC) Binding Protein Family Stimulate the Activity of the c-Myc Internal Ribosome Entry Segment in Vitro and in Vivo. **Oncogene**, v.22, n.39, p.8012–8020, Apr 2003. ISSN: 0950-9232. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12970749>>.

FIEDLER, K.; BRUNNER, C. The Role of Transcription Factors in the Guidance of Granulopoiesis. **Am J Blood Res**, v.2, n.1, p.57–65, Jan 2012. ISSN: 0950-9232. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3301437/>>.

GALLARDO, M. et al. HnRNP K Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor That Regulates Proliferation and Differentiation Programs in Hematologic Malignancies. **Cancer Cell**, v.28, n.4, p.486–499, Oct 2015. ISSN: 18783686. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26412324>>.

GAO, R. et al. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K (hnRNP-K) Promotes Tumor Metastasis by Induction of Genes Involved in Extracellular Matrix, Cell Movement, and Angiogenesis. **J Biol Chem**, v.288, n.21, p.15046–15056, May 2013. ISSN: 00219258. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23564449>>.

GEOFFROY, M.C. et al. Arsenic induced SUMO-dependent recruitment of RNF4 into PML nuclear bodies. **Mol Biol Cell**, v.21, n.23, p.4227–4239, Dez 2010. ISSN: 1059-1524. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20943951>>.

GRIGNANI, F et al. The Acute Promyelocytic Leukemia-Specific PML-RAR Alpha Fusion Protein Inhibits Differentiation and Promotes Survival of Myeloid Precursor Cells. **Cell**. 74: 423–31, Aug 1993. ISSN: 0092-8674. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8394219>>.

———. Acute Promyelocytic Leukemia: From Genetics to Treatment. **Blood**, v.83, n.1, p.10–25, Jan 1994. ISSN: 0006-4971. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8274729>.

GUPTA, S.K. et al 2010. Evaluation of PG-M3 Antibody in the Diagnosis of Acute Promyelocytic Leukaemia. **Eur J Clin Invest**, v.40, n.10, p.960–962, Oct 2010. ISSN: 00142972. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20701624>>.

HABELHAH, H. et al. ERK Phosphorylation Drives Cytoplasmic Accumulation of hnRNP-K and Inhibition of mRNA Translation. **Nat Cell Biol**, v.3, n.3, p.325–30, Mar 2001. ISSN: 1465-7392. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11231586>>.

HARRIS, M.N. et al. Comparative Proteomic Analysis of All-Trans-Retinoic Acid Treatment Reveals Systematic Posttranscriptional Control Mechanisms in Acute Promyelocytic Leukemia. **Proteomics**, v.104, n.5, p.1314–1323, Sep 2004, ISSN:0006-4971. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15142884>>.

HEEREMA-MCKENNEY, A., ARBER, D.A. Acute Myeloid Leukemia. **Hematol Oncol Clin North Am**, v.23, n.4,p.633-654, 2009 Aug. ISSN: 08898588. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19577162>>.

HOEMME, C. et al. Chromatin Modifications Induced by PML-RAR α Repress Critical Targets in Leukemogenesis as Analyzed by ChIP-Chip Chromatin Modifications Induced by PML-RAR α Repress Critical Targets in Leukemogenesis as Analyzed by ChIP-Chip. **Blood**, v.111, n.5, p.2887–2895, Mar 2008. ISSN: 0006-4971. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18024792>>.

HOSSFELD D. K.; JAFFE E.S., HARRIS N.L., STEIN H., VARDIMAN J.W. (eds). World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. **Ann Oncol**, v.13, n.3, p.490-491, Mar 2002. ISSN: 09237534. Disponível em: <<https://academic.oup.com/annonc/article/13/3/490/130181/E-S-Jaffe-N-L-Harris-H-Stein-J-W-Vardiman-eds>>.

Instituto Nacional de Câncer- INCA. Tipos de Câncer: Leucemia. Disponível em:<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/>>. Acessado em dezembro de 2016.

International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012- Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/DataSource_and_methods.aspx>. Acessado em dezembro de 2016.

ITO, M. et al. Synergistic growth inhibition of anaplastic large cell lymphoma cells by combining cellular ALK gene silencing and a low dose of the kinase inhibitor U0126. **Cancer Gene Therapy**, v.17, n.9, p.633-644, Maio 2010. ISSN: 0929-1903. Disponível em: <<https://www.nature.com/doi/10.1038/cgt.2010.20>>.

JÁCOMO, R.H; FIGUEIREDO-PONTES, L.L.; REGO, E.M. Do Paradigma Molecular Ao Impacto No Prognóstico: Uma Visão Da Leucemia Promielocítica Aguda. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.54, n.1, p.82–89, Fev 2008. ISSN: 0104-4230. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302008000100026>.

JING, Y. The PML-RAR a Fusion Protein and Targeted Therapy for Acute Promyelocytic Leukemia. **Leuk Lymphoma**, v.45, n.4, p. 639–648, Apr 2004. ISSN: 1041-8194. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15160934>>

JOBÉ, S.M. et al. 2014. Critical Role for the Mitochondrial Permeability Transition Pore and Cyclophilin D in Platelet Activation and Thrombosis. **Blood**, v.111, n.3, p.1257–1265. ISSN: 0006-4971. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17989312> >.

JONES, L. et al. Gain of MYC Underlies Recurrent Trisomy of the MYC Chromosome in Acute Promyelocytic Leukemia. *Journal Exp Med*, v.20, n.12, p. 2581–2594, Nov 2010. ISSN: 0022-1007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21059853> >.

KHEW-GOODALL, Y.; HEMMING, B.A. Tissue-specific expression of mRNAs encoding alpha- and beta-catalytic subunits of protein phosphatase 2A. **FEBS Lett**, v.238, n.2, p.265–268, Oct 1988. ISSN: 0014-5793. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2844601>>.

KIMURA, Y. et al. Characterization of Multiple Alternative Forms of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K by Phosphate-Affinity Electrophoresis. **Proteomics**, v.10, n.21, p.3884–3895, Nov 2010. ISSN: 16159853 . Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20960454> >.

KLOOSTER, J.P. et al. Rac1-Induced Cell Migration Requires Membrane Recruitment of the Nuclear Oncogene SET. **EMBO J**, v.26, n.2, p.336–345, Jan 2007. ISSN: 0261-4189. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17245428>>.

KONDO, M. et al. Biology of Hematopoietic Stem Cells and Progenitors: Implications for Clinical Application. **Annu Rev Immunol**, v.21, n.1, p.759–806, 2003. ISSN: 0732-0582. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615892>>.

LALLEMAND-BREITENBACH, V. et al. Retinoic Acid and Arsenic Synergize to Eradicate Leukemic Cells in a Mouse Model of Acute Promyelocytic Leukemia. **J Exp Med**, v.189, n.7, p.1043–1052, Apr 1999. ISSN: 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10190895> >.

LALLEMAND-BREITENBACH, V.; de THÉ, H. PML Nuclear Bodies Introduction. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v.2, n.5, p.a000661, May 2010. ISSN: 1943-0264. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2857171/>>.

LAM, B.L. et al. Cytoplasmic Targeting of the Proto-Oncogene SET Promotes Cell Spreading and Migration. **FEBS Lett**, v.587, n.2, p.111–119, Jan 2013. ISSN: 00145793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23195690> >.

LANOTTE, M. et al. NB4, a Maturation Inducible Cell Line with t(15;17) Marker Isolated from a Human Acute Promyelocytic Leukemia (M3). **Blood**, v.77, n.5, p.1080–1086, Mar 1991. ISSN: 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1995093> >. 8.

LECHWARD, K. et al. Protein phosphatase 2A: Variety of forms and functions. **Acta Biochimica Polonica**, v.48, p.921-933, n.4, p.921-933, Out 2001. Disponível em:< https://www.actabp.pl/pdf/4_2001/921-933s.pdf>.

LEOPOLDINO, A.M. et al. Sequence and Transcriptional Study of HNRPK Pseudogenes, and Expression and Molecular Modeling Analysis of hnRNP K Isoforms. **Genome**, v.50, n.5, p.451–462, May 2007. ISSN: 08312796. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17612614>>.

LEOPOLDINO, A.M. et al. SET Protein Accumulates in HNSCC and Contributes to Cell Survival: Antioxidant Defense, Akt Phosphorylation and AVOs Acidification. **Oral Oncology**, v.48, n.11, p.1106–1113, Nov 2012. ISSN: 13688375. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22739068>>.

LEUNG, J.W. et al. SET Nuclear Oncogene Associates with Microcephalin/MCPH1 and Regulates Chromosome Condensation *. **J Biol Chem**, v.286, n.24, p.21393–21400, Jun 2011. ISSN: 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3122199/>>.

LI, M.; MAKKINJE A.; DAMUNI, Z. The Myeloid Leukemia- Associated Protein SET Is a Potent Inhibitor of Protein Phosphatase 2A *. **J Biol Chem**, v.271, n.19, p.1059-1062, May 1996. ISSN: 0021-9258. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8626647>>.

LIU, S.M.; CHEN W.; WANG J. Distinguishing between Cancer Cell Differentiation and Resistance Induced by All-Trans Retinoic Acid Using Transcriptional Profiles and Functional Pathway Analysis. **Sci Rep**, v. 4; p.5577, Jul 2014. ISSN: 2045-2322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24993014>>.

MADEIRA, A et al. SET Protein (TAF1beta, I2PP2A) Is Involved in Neuronal Apoptosis Induced by an Amyloid Precursor Protein Cytoplasmic Subdomain. **FASEB J**, v.19, n.13; p.1905–1907, Nov 2005. ISSN: 0892-6638. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16162853>>.

MANZ, M.G.; BOETTCHER, S. Emergency Granulopoiesis. **Nat Rev Immunol**, v.14, n.5, p.302–314, Apr 2014. ISSN: 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24751955>>.

MARCHESI, F. et al. Cytogenetic Abnormalities in Adult Non-Promyelocytic Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. **Crit Rev Oncol Hematol**, v.80, n.3, p.331-346. Dec 2011. ISSN: 10408428. Disponível em: < <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040842810002635>>.

MARTENS, J.H. et al. 2010. PML-RARalpha/RXR Alters the Epigenetic Landscape in Acute Promyelocytic Leukemia. **Cancer Cell**, v.17, n.2, p.73-85, Fev 2010. ISSN: 15356108. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20159609>>.

MATOS-SILVA, F. A. Estudos Das Proteínas hnRNP K, SET E MARK3 Como Potenciais Marcadores de Prognóstico Em Câncer Epidermóide de Cabeça E Pescoço (HNSCC). (Dissertação (Mestrado), Dez 2009. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

MATTA, A. et al. Heterogeneous Ribonucleoprotein K Is a Marker of Oral Leukoplakia and Correlates with Poor Prognosis of Squamous Cell Carcinoma. **Int J Cancer**, v.125, n.6, p.1398-1406, Sep 2009. ISSN: 00207136. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19548310>>.

MELNICK, Ar.; LICHT, J.D. Deconstructing a Disease: RARalpha, Its Fusion Partners and Their Rols in Pathogenesis of Acute Promyelocytic Leukemia. **Blood**, v.93, n.10, p.3167, May 1999. ISSN: 0006-4971. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10233871>>.

Ministério da Ciência Tecnologia e Informação (MCTI). Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal/ Resolução Normativa nº13 de 20 de setembro de 2013. Disponível em: http://www.mct.gov.br/upd_blob/0228/228451.pdf. Acessado em dezembro de 2016.

Ministério da Ciência Tecnologia e Informação (MCTI). Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA-RN13. Disponível em: http://www.mct.gov.br/upd_blob/0226/226746.pdf. Acessado em dezembro de 2016.

MUKHOPADHYAY, A. et al. 2009. Direct Interaction between the Inhibitor 2 and Ceramide via Sphingolipid-Protein Binding Is Involved in the Regulation of Protein Phosphatase 2A Activity and Signaling. **FASEB J**, v.23, n.3:, p.751–763, Mar 2009. ISSN: 0892-6638. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19028839>>.

MÜLLER, S.; MATUNIS, M.J.; DEJEAN A. Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. **The EMBO J**, v.17 n.1 p.61–70, Jan 1998. ISSN: 14602075. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9427741>>.

NAARMANN-DE VRIES, I.S. et al. Caspase-3 Cleaves hnRNP K in Erythroid Differentiation. **Cell death dis**,v.4, n.3, p.e5482013, Mar 2013. ISSN: 2041-4889. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23519117>>.

NEVIANI, P. et al. The Tumor Suppressor PP2A Is Functionally Inactivated in Blast Crisis CML through the Inhibitory Activity of the BCR/ABL-Regulated SET Protein. **Cancer Cell**, v.8, n.5, p.355–368, Nov 2005.ISSN: 15356108. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16286244>>.

NIKA, E. et al. hnRNP K in PU.1-Containing Complexes Recruited at the CD11b Promoter: A Distinct Role in Modulating Granulocytic and Monocytic Differentiation of AML-Derived Cells.**Bioch J**, v.463, n.1, p.115–122, Oct 2014. ISSN: 0264-6021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25005557>>.

NOTARI, M. et al. A MAPK / HNRPK Pathway Controls BCR / ABL Oncogenic Potential by Regulating MYC mRNA Translation. **NEOPLASIA**, v.107, n.6, p.2507–2516, Mar 2006. ISSN: 0006-4971 . Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16293596>>.

ORFAO, A. et al. The Flow Cytometric Pattern of CD34, CD15 and CD13 Expression in Acute Myeloblastic Leukemia Is Highly Characteristic of the Presence of PML-RARalpha Gene Rearrangements. **Haematologica**, v.84, n.5, p.405–412, May 1999. ISSN: 0390-6078. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10329918>>.

OGRETMEN, B.; HANNUN, Y.A. Biologically Active Sphingolipids in Cancer Pathogenesis and Treatment. **Nat Rev Cancer**, v.4, p.604–616, Aug 2004. ISSN: 1474-175X. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrc/journal/v4/n8/full/nrc1411.html>>.

OSTARECK, D.H. et al. mRNA Silencing in Erythroid Differentiation : hnRNP K and hnRNP E1 Regulate 15-Lipoxygenase Translation from the 3'End. **Cell**, v.89, n.4, p.597–606, May 1997. ISSN: 0092-8674. Disponível em: <[http://www.cell.com/abstract/S0092-8674\(00\)80241-X](http://www.cell.com/abstract/S0092-8674(00)80241-X)>.

OSTARECK-LEDERER, A.; Ostareck, D.H. Precision Mechanics with Multifunctional Tools: How HnRNP K and HnRNPs E1/E2 Contribute to Post-Transcriptional Control of Gene Expression in Hematopoiesis. **Curr Protein Pept Sci**, v.13, n.4, p.391–400, Jun 2012. ISSN: 1875-5550. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22708489>>.

OSTARECK-LEDERER, A.; Ostareck, D.H. Control of mRNA Translation and Stability in Haematopoietic Cells: The Function of hnRNPs K and E1/E2. **Biol Cell**, v.96, n.6, p.407–411, Aug 2004. ISSN: 0248-4900. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15384226>>.

PERROTTI, D; NEVIANI, P. From mRNA Metabolism to Cancer Therapy: Chronic Myelogenous Leukemia Shows the Way. **Clin Cancer Res**, v.13, n.6, p.1638–1642, Mar 2007. ISSN: 1078-0432. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17363515>>.

PIPPA, R et al. Effect of FTY720 on the SET–PP2A Complex in Acute Myeloid Leukemia; SET Binding Drugs Have Antagonistic Activity. **Leukemia**, v.28, n.9, p.1915–1918, Sep 2014. ISSN: 0887-6924. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24781014>>.

QI, J. et al. Comparative Proteome Study of Apoptosis Induced by As 4 S 4 in Retinoid Acid Resistant Human Acute Promyelocytic Leukemia NB4-R1 Cells. **Leukemia Res**, v.34, p.1506–1516, Nov 2010. ISSN: 01452126. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20403635>>.

REGO, E.M. et al. Improving Acute Promyelocytic Leukemia (APL) Outcome in Developing Countries through Networking, Results of the International Consortium on APL. **Blood**, v.121, n.11, p.1935–1943, Mar 2013. ISSN: 0006-4971. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23319575>>.

REVIL, T. et al. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K Represses the Production of pro-Apoptotic Bcl-xS Splice Isoform. **J Biol Chem**, v.284, n.32, p. 21458–21467, Aug 2009. ISSN: 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19520842>>.

RIETHER, C.; SCHÜRCH C.M.; OCHSENBEIN, A.F. Regulation of Hematopoietic and Leukemic Stem Cells by the Immune System. **Cell Death Differ**, v.22, n.2, p.187–198, Feb 2015. ISSN: 1476-5403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4291501/>>.

ROSENAUER, A. et al. Molecular Cytogenetics of the Acute Promyelocytic Leukemia-Derived Cell Line NB4 and of Four All-Trans Retinoic Acid – Resistant Subclones. **Genes Chromosomes Cancer**, v.35, n.3, p.261-270, Nov 2002. ISSN: 1045-2257 . Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12353268>>.

ROUSSEL, M.J.; LANOTTE, M. Maturation Sensitive and Resistant t(15;17) NB4 Cell Lines as Tools for APL Physiopathology: Nomenclature of Cells and Repertory of Their Known Genetic Alterations and Phenotypes. **Oncogene**, v.20, n.49, p.7287–7291, Oct 2001. ISSN: 0950-9232. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11704857>>.

ROWLEY, J.D.; GOLOMB, H.M.; DOUGHERTY, C. 15/17 Translocation, a Consistent Chromosomal Change in Acute Promyelocytic Leukaemia. **Lancet**, v.309, n.8010, p.549–550, Mar 1977. ISSN: 0140-6736 . Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/65649>>.

SADDOUGHI, S.A. et al. Sphingosine Analogue Drug FTY720 Targets I2PP2A/SET and Mediates Lung Tumour Suppression via Activation of PP2A-RIPK1- Dependent Necroptosis. **EMBO Mol Med**, v.5, n.1, p.105–121, Jan 2012. ISSN: 17574676. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23180565>>.

SALOMONI, P.; PANDOLFI, P.P. The Role of PML in Tumor Suppression. **Cell**, v.108, n.2, p.165–70, Jan 2002. ISSN: 0092-8674. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11832207>>.

SANTANA-LEMOS, B.A. et al. The CEBPA Gene Is down-Regulated in Acute Promyelocytic Leukemia and Its Upstream Promoter, but Not the Core Promoter, Is Highly Methylated. **Haematologica**, v.96, n.4, p. 617–620, Apr 2011. ISSN: 0390-6078. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21134977>>.

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative CT Method. **Nat Protoc**, v.3, n.6, p.1101-1108, 2008. ISSN: 1750-2799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18546601>>.

SEO, S.B.et al. Regulation of Histone Acetylation and Transcription by INHAT, a Human Cellular Complex Containing the Set Oncoprotein. *Cell*, v.104, n.1, p.119–130, Jan 2001. ISSN: 11163245. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/011163245>>.

SMITH, L.T. et al. PU.1 (Spi-1) and C/EBPalpha Regulate the Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor Promoter in Myeloid Cells. **Blood**, v.88, n.4, p.1234–1247, Aug 1996. ISSN: 0006-4971. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8695841>>.

SOBRAL, L.M. et al. Stable SET Knockdown in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Promotes Cell Invasion and the Mesenchymal-like Phenotype in Vitro, as Well as Necrosis, Cisplatin Sensitivity and Lymph Node Metastasis in Xenograft Tumor Models. **Molecular cancer**, v.13, p.32, Feb 2012. ISSN: 1476-4598. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24555657>>.

STONE, S.R.; HOFSTEENGE J.; HEMMING, B.A. Molecular cloning of cDNAs encoding two isoforms of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. **Biochemistry**, v.26, n.23, p.7215–7220, Nov 1987. ISSN: 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2827745>>.

SUN, M. et al. Nitidine Chloride Induces Apoptosis, Cell Cycle Arrest, and Synergistic Cytotoxicity with Doxorubicin in Breast Cancer Cells. **Tumour Biol**, v.35, n.10, p.10201–10212, Oct 2014. ISSN: 1010-4283. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25027404>>.

SWITZER, C.H. et al. Targeting SET/I(2)PP2A Oncoprotein Functions as a Multi-Pathway Strategy for Cancer Therapy. **Oncogene**, v.30, n.22, p.2504–2513, Jun 2011.ISSN: 0950-9232. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21297667>>.

TAKIMOTO, M. et al. Specific Binding of Heterogeneous Ribonucleoprotein Particle Protein K to the Human c-Myc Promoter, in Vitro. **J Biol Chem**, v.268, n.24, p.18249–18258, Aug 1993. ISSN: 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8349701>>.

TANIMUKAI, H.; GRUNDKE-IQBAL, I. Up-Regulation of Inhibitors of Protein Phosphatase- 2A in Alzheimer ' S Disease. **Am J Pathol**, v.166, n.6, p.1761–1771,

Jun 2005. ISSN: 00029440. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15920161>>.

TESTI, A.M. et al. GIMEMA-AIEOP AIDA Protocol for the Treatment of Newly Diagnosed Acute Promyelocytic Leukemia (APL) in Children. **Blood**, v.106, n.2, p.447-453, Jul 2005. ISSN: 0006-4971. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15677559>>.

DE THÉ, H. et al. 1991. PML-RAR α Fusion mRNA Generated by the t(15;17) Translocation in Acute Promyelocytic Leukemia Encodes a Functionally Altered RAR. **Cell**, v.66, n.4, p.675–664, Aug 1991. ISSN: 0092-8674. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1652369>>.

TRAKHTENBERG, E.F. et al. The N-Terminal Set- β Protein Isoform Induces Neuronal. **J Biol Chem**, v.290, n.21, p.13417–13426, May 2015. ISSN: 1083-351X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4505589/>>.

VARDIMAN, J.W. et al. The 2008 Revision of the World Health Organization (WHO) Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia: Rationale and Important Changes. **Blood**, v.114, n.5, p.937–951, Jul 2009. ISSN: 0006-4971. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19357394>>.

VOEGEL, J.J. et al. TIF2, a 160 kDa Transcriptional Mediator for the Ligand-Dependent Activation Function AF-2 of Nuclear Receptors. **EMBO J**, v.15, n.14, p.3667–3675, Jul 1996. ISSN: 0261-4189. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8670870>>.

WAGNER, E.F.; NEBRED, A.R. Signal Integration by JNK and p38 MAPK Pathways in Cancer Development. **Nat Rev Cancer**, v.9, n.8, p.537–549, Aust 2009. ISSN: 1474-175X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19629069>>.

WANG, F. et al. Immunohistochemical Detection of HSP27 and hnRNP K as Prognostic and Predictive Biomarkers for Colorectal Cancer. **Med Oncol**, v.29, n.3, p.1780–1788, Sep 2012. ISSN: 1357-0560. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21861207>>.

WONG, F. C. et al. The Anti-Cancer Activities of Vernonia Amygdalina Extract in Human Breast Cancer Cell Lines Are Mediated through Caspase-Dependent and p53-Independent Pathways. **Plos One**, v.8, n.10, p.e78021, Oct 2013. ISSN: 1932-6203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24205071>>.

XIA, B. et al. C-Myc Plays Part in Drug Resistance Mediated by Bone Marrow Stromal Cells in Acute Myeloid Leukemia. **Leuk Res**, v.39, n.1, p.92–99, Jan 2015. ISSN: 01452126. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25443862> >.

YU, G. et al. Ser9 Phosphorylation Causes Cytoplasmic Detention of I2PP2A/SET in Alzheimer Disease. **Neurob Aging**, v.34, n.7, p.1748–1758, Jul 2013. ISSN: 01974580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23374587> >.

ZHANG, J. et al. Analysis of Altered Proteins Related to Blast Crisis in Chronic Myeloid Leukemia by Proteomic Study. **Int J Lab Hematol**, v.34, n.3, p.267–273, Jun 2011. ISSN: 17515521. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22145801>>.

Zhang, L. et al. 2014. Catechins induced acute promyelocytic leukemia cell apoptosis and triggered PML-RAR α oncoprotein degradation. **J Hematol & Oncol**, v.7, n.75, p.1-9, Out 2014. Disponível em: <<http://www.jhoonline.org/content/7/1/75>>.

ZHENG, C. et al. ERK1/2 activity contributes to gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells. **J Internat Medical Res**, v.41, n.2, p.300-306, Fev 2013. ISSN: 0300-0605. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0300060512474128>>.

ZHU, J et al. Effect of Retinoic Acid Isomers on Proliferation, Differentiation and PML Relocalization in the APL Cell Line NB4. **Leukemia**, v.9, n.2, p.302–309, 1995. ISSN: 0887-6924. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7869768>>.