

**JORGE ANTONIO ELIAS GODOY CARLOS**

**Investigação dos efeitos da inibição farmacológica de proteínas envolvidas na regulação do citoesqueleto e progressão do ciclo celular em leucemias agudas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo – SP

2020

**JORGE ANTONIO ELIAS GODOY CARLOS**

**Investigação dos efeitos da inibição farmacológica de proteínas envolvidas na regulação do citoesqueleto e progressão do ciclo celular em leucemias agudas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. João Agostinho Machado Neto

Versão original.

São Paulo – SP

2020

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Carlos, Jorge Antonio Elias Godoy

Investigação dos efeitos da inibição farmacológica de proteínas envolvidas na regulação do citoesqueleto e progressão do ciclo celular em leucemias agudas / Jorge Antonio Elias Godoy Carlos; orientador João Agostinho Machado Neto. -- São Paulo, 2020.

103 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Leucemias agudas. 2. Citoesqueleto. 3. Mitose. 4. Aurora quinases. 5. Stathmin 1. I. Machado Neto, João Agostinho, orientador. II. Título.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

---

Candidato: Jorge Antonio Elias Godoy Carlos

Título da Dissertação: Investigação dos efeitos da inibição farmacológica de proteínas envolvidas na regulação do citoesqueleto e progressão do ciclo celular em leucemias agudas

Orientador: Prof. Dr. João Agostinho Machado Neto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado em sessão pública realizada a...../...../....., considerou o candidato:

**Aprovado**                       **Reprovado**

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição:.....

Presidente: Assinatura: .....

Nome:.....

Instituição:.....





Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **982/2018** referente ao projeto intitulado: *“Investigação do efeito de potenciais inibidores de Stathmin 1 obtidos através de quimioinformática no fenótipo das leucemias agudas”* sob a responsabilidade de **Jorge Antonio Elias Godoy Carlos** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **João Agostinho Machado Neto**, do Departamento de Farmacologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 24 de setembro de 2018.

*Luciane Valéria Sita*

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**  
Coordenadora CEUA ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzon Dale**  
Coordenadora CEPSH ICB/USP

Esse trabalho de dissertação é dedicado aos meus pais, eles que desde meu início escolar me incentivaram a estudar, pois isso, segundo os mesmos, era algo que ninguém poderia me tirar. Dedico esse trabalho a eles, que por várias vezes deixaram de viver seus sonhos para viver os meus e sempre estiveram ao meu lado, independente se eu ganhasse ou perdesse. **Claudio Cristiano Esteves Godoy Carlos e Kênia Elias Conceição Carlos**, esse trabalho é dedicado a vocês, meus heróis, meus pais!

## **AGRADECIMENTOS ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO**

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através do processo número 2018/19372-9 (bolsa de mestrado) e foi vinculado aos projetos regulares FAPESP através dos processos 2017/24993-0 e 2019/23864-7.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## AGRADECIMENTOS

Em especial, ao Prof. João Agostinho Machado Neto, que confiou em um jovem de outro estado, com pouca experiência para estar em seu laboratório e fazer parte do seu grupo de pesquisa. Obrigado professor, por todo o ensinamento científico que me repassou e por sempre se dispor a me ensinar desde o início, com paciência, muita dedicação em cada técnica ou experimento realizado. Sou grato pela oportunidade e confiança depositadas a mim.

A todos os integrantes do Laboratório de Biologia do Câncer e Antineoplásicos, Bruna Oliveira de Almeida; Camila Hirakata; Hugo Passos Vicari; Jean Carlos Lipreri da Silva e a Keli Lima, pelas discussões científicas, pelos momentos de distração, pelos sorrisos e por cada aprendizado que cada um me ensinou ao longo deste período.

À Keli Lima, por toda dedicação e amizade. Obrigado pelos conselhos, discussões científicas, pela ajuda nos experimentos e na rotina do laboratório. Obrigado por essa grande amizade que ganhei de você.

Às minhas amigas, Ana Paula Simões Beckmann; Beatriz Maria Veloso Pereira; Larianne Santana; Larissa de Almeida; Izabella Cristina do Amaral Queiroz; Marianna Mendonça e Thayná Barbosa. Agradeço por confiarem em meu potencial e sempre me incentivarem a seguir. Em especial agradeço à Ana Paula, por mesmo de longe sempre estar presente, à Beatriz Maria, por ter me recebido com tanto carinho em São Paulo e pelas discussões científicas (e não científicas).

A todos da coordenação de Pós-Graduação, em especial à Mônica Nunes da Silva, por toda paciência e profissionalismo prestado a nós alunos.

A todos os professores, pós-doutorandos, doutorandos e colaboradores desse projeto, que nos cederam o espaço físico, expertise e equipamentos para a realização de alguns experimentos. Aos Prof.(a) Dr.(a) Leticia Veras Costa Lotufo; Fabiola Traina; Lúcia Rossetti Lopes; Luciana Biagini Lopes; Alice Cristina Rodrigues; Carlos Frederico Martins Menck; Claudio Romero Farias Marinho; Andrei Leitão. Aos colaboradores, Dra. Natália Cestari Moreno, Dra. Raquel de Melo Alves Paiva, Dr. Fábio Pires de Souza Santos, Prof. Dr. Nelson Hamerschlak e ao doutorando Juan Luiz Coelho da Silva.

Agradeço ainda aos meus avós maternos, Neide Elias Conceição (in memoriam) e Jorge Ferreira Conceição. Aos meus avós paternos, Carminda Esteves Carlos e Antonio Godoy Carlos por me apoiarem e sempre estar comigo independente de onde estiverem.

Eu agradeço em especial a meus pais, Kênia Elias Conceição Carlos e Claudio Cristiano Esteves Godoy Carlos e a minha irmã Maria Eduarda Elias Godoy Carlos, por todo o apoio e respeito a mim depositado. Obrigado por serem essa família incrível que me apóia e sempre está comigo.

Ao Cayo Felype de Sousa Danieli, pelo amor, paciência e compreensão. Por sempre estar ao meu lado, por respeitar minhas decisões e me apoiar em todos os momentos, obrigado!

E finalmente, agradeço a Deus por sempre estar com suas mãos cuidando de mim, vigiando e me protegendo de todo o mal.

A vida de quem inventa de voar é paradoxal, todo dia. É o peito eternamente dividido. É chorar porque queria estar lá, sem deixar de querer estar aqui. É ver o céu e o inferno na partida, o pesadelo e o sonho na permanência. É se orgulhar da escolha que te ofereceu mil tesouros e se odiar pela mesma escolha que te subtraiu outras mil pedras preciosas.

E começamos a viver um roteiro clássico: deitar na cama, pensar no antigo eterno lar, nos quilômetros de distância, pensar nas pessoas amadas, no que elas estão fazendo sem você, nos risos que você não riu, nos perrengues que você não estava lá para ajudar. É tentar, sem sucesso, conter um chorinho de canto e suspirar sabendo que é o único responsável por sua própria escolha. No dia seguinte, ao acordar, já está tudo bem, a vida volta a fazer sentido. Mas você sabe, você sabe que outras noites dessa virão.

Mas será que a gente aprende? A ser filho longe, a amar via videoconferência, a ver crianças crescerem por vídeos, a fingir que a mesa do bar pode ser substituída pelo grupo de Whats App, a ser amigo através de caracteres e não abraços, a rir alto com HAHAHA, a engolir choro e tocar em frente?

Será que um dia saberemos, afinal, se estamos no lugar certo? Será que há, enfim, algum lugar certo para viver essa vida que é um turbilhão de incertezas que a gente insiste em fingir que acredita controlar?

Eu sei que não é fácil. Admiro-me e admiro você que encarou e encara tudo isso, todo dia!

Ruth Manus.

## RESUMO

**CARLOS JAEG.** Investigação dos efeitos da inibição farmacológica de proteínas envolvidas na regulação do citoesqueleto e progressão do ciclo celular. 103p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2020.

**Introdução:** As leucemias agudas (LA) são neoplasias agressivas caracterizadas pela proliferação clonal com substituição e acúmulo de células hematopoéticas neoplásicas na medula óssea e outros órgãos tornando a hematopoese um processo ineficaz. Em pacientes adultos com LA as opções terapêuticas são limitadas e as taxas de remissão apresentam um decréscimo com o aumento da idade. As proteínas aurora quinases (AURKs) e stathmin 1 (STMN1) tem sido apontadas como potenciais alvos terapêuticos em neoplasias hematológicas devido a expressão aberrante desses genes/proteínas. As AURKs são essenciais para o sucesso da mitose, atuando na organização do fuso mitótico e citocinese (*AURKA* e *AURKB*). A proteína STMN1 participa na dinâmica dos microtúbulos e progressão do ciclo celular. A reversina é um fármaco que atua como inibidor multiquinase apresentando seletividade para *AURKA* e *AURKB*. O GDP366 é descrito como inibidor seletivo para STMN1 e BIRC5, enquanto o AD80 foi identificado nesse estudo como um análogo de GDP366 por quimioinformática. **Métodos:** A expressão de *AURKA*, *AURKB* e *STMN1* em amostras de pacientes foi investigada no banco de dados *Amazonia!* e/ou em um painel de linhagens celulares de LA. As células Jurkat [leucemia linfoblástica aguda (LLA)-T], Namalwa (LLA-B), NB4 [leucemia mieloide aguda (LMA)] e/ou U937 (LMA) foram utilizados em ensaios celulares e moleculares. **Resultados:** A expressão de *AURKB* foi maior em pacientes com LLA comparados aos linfócitos normais ( $p < 0.0001$ ). As linhagens LLA apresentam expressão e ativação aberrante de *AURKA* e *AURKB*. Em modelos celulares de LLA tratadas com reversina, houve redução da viabilidade celular (concentração e tempo dependente), crescimento clonal e proliferação, e aumento apoptose, organelas vesiculares ácidas e catástrofe mitótica (aumento de células em  $G_2/M$ , tamanho celular e dano em DNA) ( $p < 0.05$ ). No cenário molecular, o tratamento com reversina reduziu a atividade de *AURKB*, aumentou consumo de SQSTM1/p62, os níveis de LC3BII e  $\gamma$ H2AX em modelos celulares de LLA. Em células Namalwa, reversina

modulou 25 de 84 genes relacionados à autofagia, incluindo *BCL2*, *BAD*, *ULK1*, *ATG10*, *IRGM*, e *MAP1LC3B* indicando que o tratamento atua iniciando e mantendo o fluxo autofágico em LLA. A expressão de *STMN1* foi maior em pacientes com LMA e LLA comparados às células hematológicas normais ( $p < 0.0001$ ). GDP366 e AD80 reduziram a viabilidade celular (concentração e tempo dependente), clonogenicidade e proliferação, aumentaram a apoptose, modularam a progressão do ciclo celular em modelos de LLA e LMA ( $p < 0.05$ ). Ambos os fármacos reduziram a fosforilação de S6RP, aumentaram níveis de PARP1 clivado e  $\gamma$ H2AX. O AD80 promoveu diminuição da expressão de *STMN1* e survivina, diferente do observado em células tratadas com GDP366. Em células Jurkat, GDP366 e AD80 modularam os genes relacionados ao citoesqueleto. **Conclusão:** O tratamento com reversina inibe a atividade das auroras quinases e reduz a viabilidade celular através de múltiplos mecanismos de morte celular: apoptose, catástrofe mitótica e autofagia. O GDP366 e AD80 reduzem múltiplas características relacionadas com o fenótipo leucêmico, incluindo a proliferação excessiva e a sobrevivência celular. Nossos achados indicam que fármacos que atuam sob as auroras quinases e *STMN1* podem ser promissores no tratamento de leucemias agudas.

**Palavras-chave:** Leucemias agudas; Citoesqueleto; Mitose, Aurora quinases; Stathmin 1.



## ABSTRACT

**CARLOS JAEG.** Investigation of the effects of pharmacological inhibition of proteins involved in cytoskeleton regulation and cell cycle progression. 103p. Dissertation (Master in Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2020.

**Introduction:** Acute leukemias (AL) are aggressive neoplasms characterized by clonal proliferation with replacement and accumulation of neoplastic hematopoietic cells in the bone marrow and other organs making hematopoiesis an ineffective process. In adult AL patients, therapeutic options are limited and remission rates decrease with increasing age. The aurora kinases (AURKs) and stathmin 1 (STMN1) proteins have been identified as potential therapeutic targets in hematological neoplasms due to the aberrant expression of these genes/proteins. AURKs are essential for the success of mitosis, acting in the organization of the mitotic spindle and cytokinesis (AURKA and AURKB). STMN1 protein participates in microtubule dynamics and cell cycle progression. Reversine is a drug that acts as a multikinase inhibitor with selectivity for AURKA and AURKB. GDP366 is described as a selective inhibitor for STMN1 and BIRC5, while AD80 was identified in that study as an analog of GDP366 by chemoinformatics. **Methods:** The expression of AURKA, AURKB, and STMN1 in AL patient samples was investigated in the Amazonia database! and/or on a panel of LA cell lines. Jurkat [acute lymphoblastic leukemia (ALL)-T], Namalwa (ALL-B), NB4 [acute myeloid leukemia (AML)], and/or U937 (AML) were used in cellular and molecular assays. **Results:** AURKB expression was higher in patients with ALL compared to normal lymphocytes ( $p < 0.0001$ ). LLA cell lines show aberrant AURKA and AURKB expression and activation. In ALL cellular models, reversine reduced cell viability (in concentration- and time-dependent manner), clonal growth and proliferation, and increased apoptosis, acidic vesicular organelles, and mitotic catastrophe (increase in cells in G<sub>2</sub>/M, cell size and damage in DNA) ( $p < 0.05$ ). In the molecular scenario, reversine treatment reduced the activity of AURKB, increased consumption of SQSTM1 p62, the levels of LC3BII and  $\gamma$ H2AX in cellular models of ALL. In Namalwa cells, reversine modulated 25 of 84 autophagy-related genes, including *BCL2*, *BAD*, *ULK1*, *ATG10*, *IRGM*, and *MAP1LC3B* indicating that reversine acts by initiating and maintaining the autophagic flow in ALL. STMN1

expression was higher in patients with AML and ALL compared to normal hematological cells ( $p < 0.0001$ ). GDP366 and AD80 reduced cell viability (in concentration- and time-dependent manner), clonogenicity and proliferation, increased apoptosis, and modulated cell cycle progression in ALL and AML models ( $p < 0.05$ ). Both drugs reduced phosphorylation of S6RP, increased levels of cleaved PARP1 and  $\gamma$ H2AX. AD80 promoted a decrease in the expression of STMN1 and survivin, different from that observed in cells treated with GDP366. In Jurkat cells, GDP366 and AD80 modulated the cytoskeleton-related genes. **Conclusion:** Reversine inhibits the activity of aurora kinases and reduces cell viability through multiple mechanisms of cell death: apoptosis, mitotic catastrophe, and autophagy. GDP366 and AD80 reduce multiple characteristics related to the leukemia phenotype, including excessive proliferation and cell survival. Our findings indicate that drugs that act on aurora kinases and STMN1 may be promising in the treatment of acute leukemias.

**Keywords:** Acute leukemias; Cytoskeleton; Mitosis, Aurora kinases; Stathmin 1.

## Lista de figuras

Figura 1. Hematopoese.....	23
Figura 2. Leucemias agudas.....	24
Figura 3. Localização das proteínas aurora quinases durante a mitose do ciclo celular.....	30
Figura 4. Sinalização celular mediada por Stathmin 1.....	33
Figura 5. Os níveis de expressão gênica de <i>AURKB</i> são aumentados em amostras de pacientes com leucemia linfoblástica aguda (LLA).....	43
Figura 6. <i>AURKA</i> e <i>AURKB</i> são altamente expressas em linhagens celulares de LLA-B e LLA-T.....	44
Figura 7. Reversina induz a diminuição da viabilidade celular em linhagem Jurkat e Namalwa.....	45
Figura 8. O tratamento com reversina induz apoptose em linhagens celulares de LLA.....	46
Figura 9. O tratamento com reversina induz a apoptose de maneira tempo dependente.....	47
Figura 10. O tratamento com reversina induz parada na progressão do ciclo celular na fase G <sub>2</sub> /M.....	48
Figura 11. A exposição à reversina induz o aumento da população <sub>sub</sub> G <sub>1</sub> e poliplóide em células de LLA ao longo do tempo.....	49
Figura 12. O tratamento com reversina promove aumento no tamanho das células Jurkat e Namalwa.....	50
Figura 13. O tratamento com reversina reduz a atividade de <i>AURKB</i> e promove dano em DNA.....	51
Figura 14. O ensaio cometa evidencia dano no DNA causado por reversina em células Jurkat e Namalwa.....	51
Figura 15. O tratamento com reversina reduz a capacidade proliferativa das células Jurkat e Namalwa.....	52
Figura 16. O tratamento com reversina reduz o crescimento clonal autônomo de linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda.....	53
Figura 17. O tratamento com reversina desencadeia a formação de autofagossomos em células de LLA.....	54
Figura 18. O tratamento com reversina modula a expressão de genes relacionados à indução e sustentação do fluxo autofágico em células Jurkat e Namalwa.....	56
Figura 19. Os níveis de expressão gênica de <i>STMN1</i> são aumentados em amostras de pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) e leucemia linfoblástica aguda (LLA).....	57
Figura 20. Identificação de análogos de GDP366 por quimionformática.....	58
Figura 21. Efeitos do tratamento com GDP366 e seus análogos identificados por quimioinformática sob a viabilidade celular de linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia mielóide aguda (LMA).....	59

Figura 22. O tratamento com GDP366 reduz a viabilidade celular de forma concentração e tempo dependente em modelos celulares de leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia mielóide aguda (LMA). .....	60
Figura 23. O tratamento com AD80 reduz a viabilidade celular de forma concentração e tempo dependente em modelos celulares de leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia mielóide aguda (LMA). .....	61
Figura 24. O tratamento com GDP366 induz apoptose em linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia mielóide aguda (LMA). .....	62
Figura 25. O tratamento com AD80 induz apoptose em linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia mielóide aguda (LMA). .....	63
Figura 26. O tratamento com GDP366 reduz a clonogenicidade autônoma de linhagens celulares de leucemias agudas. ....	64
Figura 27. O tratamento com AD80 reduz a clonogenicidade autônoma de linhagens celulares de leucemias agudas. ....	65
Figura 28. O tratamento com GDP366 altera a progressão do ciclo celular em modelos de leucemias agudas. ....	66
Figura 29. O tratamento com AD80 altera a progressão do ciclo celular em modelos de leucemias agudas. ....	67
Figura 30. O tratamento com GDP366 reduz o potencial proliferativo em células Jurkat e NB4. ....	68
Figura 31. O tratamento com AD80 reduz o potencial proliferativo em células Jurkat e NB4. ....	69
Figura 32. O tratamento com GDP366 induz fosforilação de STMN1 e marcadores de morte celular. ....	70
Figura 33. O tratamento com AD80 reduz a expressão de STMN1 e induz marcadores de morte celular. ....	71
Figura 34. Genes relacionados com citoesqueleto modulados por GDP366 e AD80 em células Jurkat .....	72

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Classificação OMS 2016 das leucemias linfoblásticas agudas (LLA).....	26
Tabela 2. Classificação OMS 2016 das leucemias mieloides agudas (LMA). ....	26
Tabela 3. Anticorpos primários utilizados para Western blot.....	37
Tabela 4. Sequência e concentração dos iniciadores utilizados no PCR quantitativo .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS

7AAD	7-amino-actinomicina D
American Type Culture Collection	ATCC
AURKA	Aurora quinase A
AURKB	Aurora quinase B
AURKC	Aurora quinase C
BASO	Basófilos
BSA	Albumina sérica bovina
CAMK	Proteína quinase dependente de $Ca^{2+}$ /calmodulina
CDK	Quinase dependente de ciclina
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
Células NK	Células natural killer
CFU	Unidades formadoras de colônias
CMSP	Célula mononuclear de sangue periférico
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Eritróides
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EO	Eosinófilos
FAB	Friench American Britsch
G	Granulócito
GEMM	Granulocítica/eritróide/monocítica
GM	Granulócitos e monócitos
GMEG	Megacariócitos
GMEo	Granulócitos, monócitos e eosinófilos
HTLV-1	Vírus linfotrópico da célula t humana
INCA	Instituto Nacional de Câncer
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMA	Leucemia mielóide aguda
M	Monócitos
Mps1	Fuso monopolar
MTT	Metiltiazoletetrasolio
$Na_3VO_4$	Ortovanadato de sódio
$Na_4P_2O_7$	Pirofosfato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAK1	Serina treonina proteína quinase
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
IP	Iodeto de propídio
PKA	Proteína quinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
qPCR	Reação em cadeia da polimerase

STR  
shRNA  
STMN1  
Tris  
  
TRIzol

quantitativa  
*Short Tandem Repeat*  
Short hairpin ribonucleic acid  
Stathmin1  
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-  
propanediol  
1-bromo-3-chloropropane

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>1.1. Hematopoese normal e leucêmica</b> .....	22
<b>1.2. Leucemias agudas</b> .....	23
<b>1.2.1. Leucemia linfoblástica aguda (LLA)</b> .....	26
<b>1.2.2. Leucemia mielóide aguda (LMA)</b> .....	27
<b>1.3. Aurora quinases</b> .....	28
<b>1.4. Stathmin 1</b> .....	31
<b>2. OBJETIVO GERAL</b> .....	34
<b>2.1. Objetivos específicos</b> .....	34
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
<b>3.1. Dados de expressão gênica de <i>AURKA</i>, <i>AURKB</i> e <i>STMN1</i></b> .....	35
<b>3.2. Definição dos compostos com potencial para inibição de <i>STMN1</i> e/ou instabilidade dos microtúbulos</b> .....	35
<b>3.3. Linhagens celulares</b> .....	35
<b>3.4. Inibidores farmacológicos</b> .....	36
<b>3.5. Western blot</b> .....	36
<b>3.6. Análise do perfil de expressão gênica por PCR array</b> .....	37
<b>3.7. PCR quantitativo</b> .....	38
<b>3.8. Ensaio de viabilidade celular</b> .....	39
<b>3.9. Avaliação de proliferação por marcação com Ki-67</b> .....	39
<b>3.10. Ensaio de clonogenicidade</b> .....	40
<b>3.11. Avaliação de apoptose</b> .....	40
<b>3.12. Análises do ciclo celular</b> .....	40
<b>3.13. Análise por imunofluorescência</b> .....	41
<b>3.14. Ensaio cometa</b> .....	41



3.15. Avaliação de autofagia por marcação com laranja de acridina .....	41
3.16. Análise Estatística .....	41
4.0. RESULTADOS .....	43
4.1. Investigação dos efeitos moleculares e celulares do tratamento com reversina em modelos de LLA. ....	43
4.1.1. A expressão de AURKB é aumentada em amostras de pacientes com LLA .....	43
4.1.2. AURKA e AURKB são altamente expressas em modelos celulares de LLA	43
4.1.3. O tratamento com reversina reduz viabilidade celular em células Jurkat e Namalwa .....	44
4.1.4. Parada do ciclo celular na fase G <sub>2</sub> /M é induzida pelo tratamento com reversina .....	48
4.1.5. O tratamento com reversina reduz a atividade de AURKB e induz marcadores de dano no DNA.....	50
4.1.6. O tratamento com reversina reduz a proliferação celular e o crescimento clonal autônomo .....	51
4.1.7. O tratamento com reversina induz o fluxo autofágico em linhagens celulares de LLA .....	53
4.2. Identificação de potenciais inibidores de STMN1 e a caracterização de seus efeitos celulares em modelos de LMA e LLA .....	57
4.2.1. A expressão de <i>STMN1</i> é aumentada em amostras de pacientes com LMA e LLA.....	57
4.2.2. Análise por quimiinformática identificou análogos do composto GDP366	58
4.2.3. O tratamento com AD80 apresentou a maior potência e eficácia nos modelos celulares de LLA e LMA. ....	59
4.2.4. O tratamento com GDP366 e AD80 induz apoptose em linhagens celulares de LLA e LMA .....	61
4.2.5. O tratamento com GDP366 e AD80 inibe o crescimento clonal autônomo de células de leucemias agudas .....	63
4.2.6. O tratamento com GDP366 e AD80 induz a parada na fase G <sub>2</sub> /M do ciclo celular nas linhagens de leucemias agudas .....	65

4.2.7. O tratamento com GDP366 e AD80 reduz a proliferação celular em células Jurkat e NB4.....	67
4.2.8. O tratamento com GDP366 e AD80 inibiu a atividade/expressão STMN1 em células Jurkat e NB4 .....	70
4.2.9. GDP366 e AD80 modulam genes relacionados com citoesqueleto em células Jurkat.....	71
5.0. DISCUSSÃO .....	73
CONCLUSÃO .....	79
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	80
APÊNDICE A.....	93
APÊNDICE B.....	94
APÊNDICE C.....	96
APÊNDICE D.....	97
APÊNDICE E.....	98
ANEXOS .....	101
ANEXO A.....	101
ANEXO B.....	102

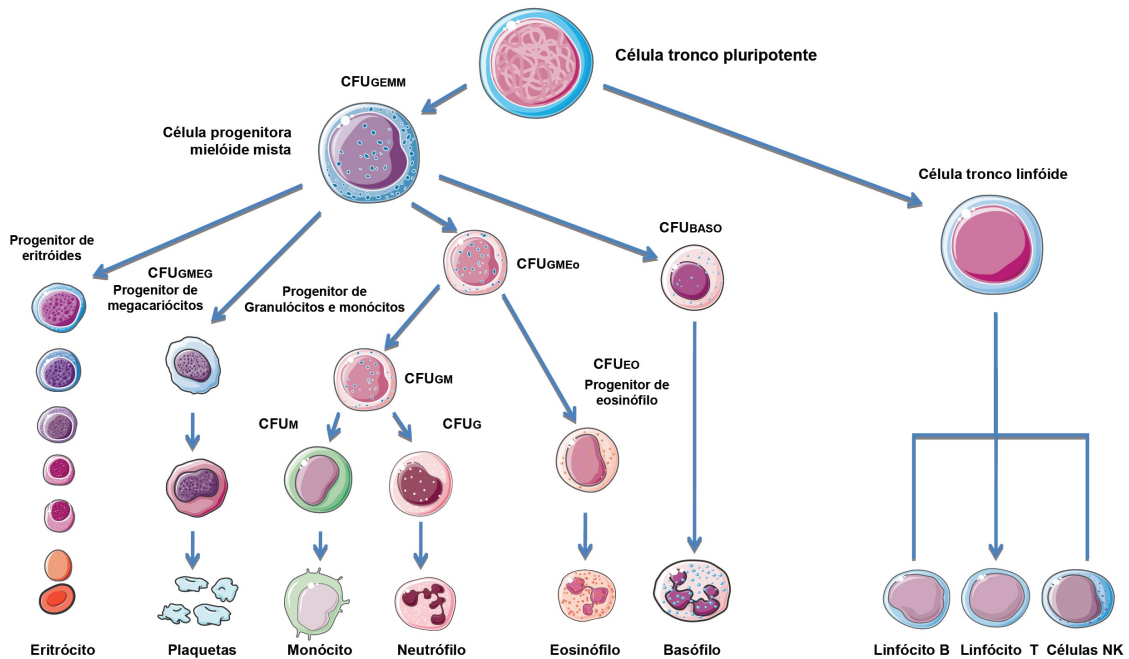
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Hematopoese normal e leucêmica

A hematopoese é um sistema altamente organizado responsável pela produção de eritrócitos, leucócitos e plaquetas. As células sanguíneas circulantes derivam de precursores imaturos reconhecidos morfologicamente devido a um sistema organizado de maneira hierárquica. Nas primeiras semanas de vida, o saco vitelino é o principal local da hematopoese. As células-tronco são observadas primeiramente na aorta dorsal e esses precursores hematopoéticos irão se aninhar no fígado, baço e medula óssea. Na fase adulta, a medula hematopoética é confinada ao esqueleto central e as proximidades proximais do fêmur e do úmero<sup>1,2</sup>. No início do processo de diferenciação, a célula pluripotente através de alocação aleatória ou estímulos recebidos, irá se diferenciar em duas linhagens diferentes na medula óssea: os precursores mielóides que vão se diferenciar em linhagens definidas (eritrócitos, plaquetas, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos) através de estímulos recebidos e os precursores linfóides que terminam seu processo de maturação e seleção em órgãos linfóides dando origem aos linfócitos B, linfócitos T e células natural killer (células NK) (Figura 1)<sup>1,3</sup>. Em indivíduos normais, a proliferação, diferenciação e maturação dessas células são controladas por uma complexa interação molecular de células com o microambiente da medula óssea<sup>4</sup>.

Em processos neoplásicos ocorre a alteração desses processos regulatórios o que leva a substituição de células-tronco hematopoética saudáveis por células-tronco leucêmicas<sup>5,6</sup>.

**Figura 1. Hematopoese.**

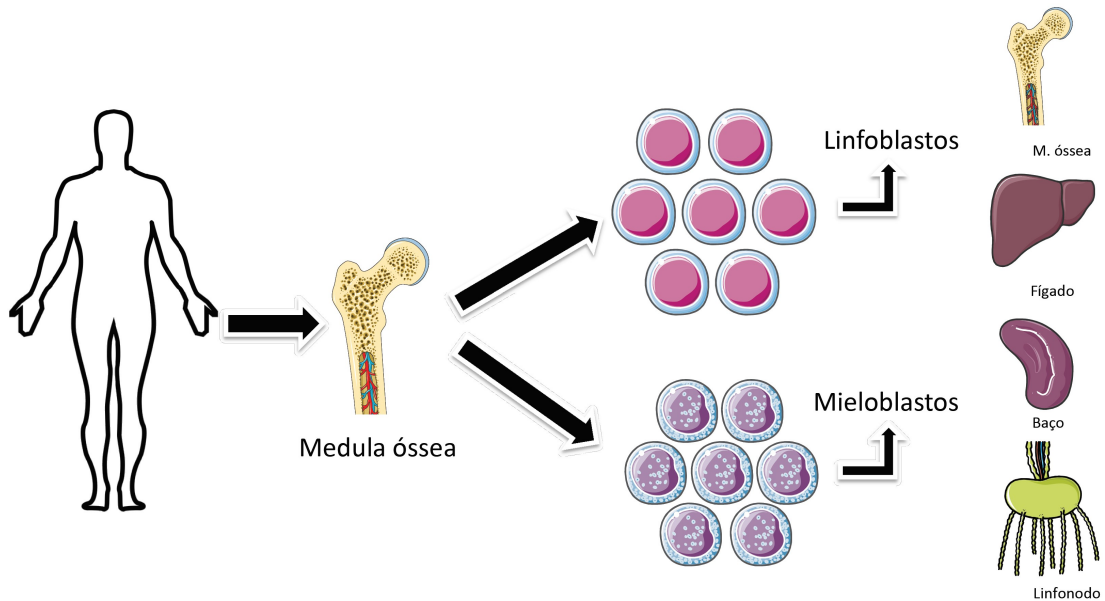


A hematopoese inicia-se a partir de uma célula tronco pluripotente que pode dar origem às distintas linhagens celulares ou autorenovar-se. A diferenciação celular a partir dessa célula tronco pode acontecer por alocação aleatória como por sinais externos recebidos dando origem às unidades formadoras de colônia (CFU) que ao passo que vão recebendo estímulos (fatores de crescimento hematopoéticos) vão se tornando mais diferenciadas (célula em sua forma final desenvolvida). Os fatores de crescimento podem causar a proliferação, diferenciação e maturação celular além de prevenir a apoptose e afetar funções da célula madura. CFU, unidade formadora de colônia; GEMM, granulocítica/eritróide/monocítica e megacariocítica; E, eritróides; GMEG, megacariócitos; GMEo, granulócitos, monócitos e eosinófilos; GM, granulócitos e monócitos; M, monócitos; G, neutrófilos; EO, eosinófilos; BASO, basófilos; Células natural killer, células NK. Fonte: autor.

## 1.2. Leucemias agudas

As leucemias agudas são neoplasias agressivas caracterizadas pela proliferação clonal com substituição e acúmulo de células neoplásicas na medula óssea, sangue periférico e podem infiltrar o fígado, baço, linfonodos e outros tecidos (Figura 2)<sup>7</sup>. Como resultado desse processo anormal, a produção de células sanguíneas maduras normais se torna ineficiente o que leva a substituição do tecido hematopoético normal pelas células neoplásicas, ou seja, infiltração da medula óssea por células leucêmicas acompanhada de neutropenia, anemia e plaquetopenia<sup>8</sup>.

**Figura 2. Leucemias agudas.**



As leucemias agudas são doenças agressivas caracterizadas pela proliferação clonal com substituição e acúmulo de células indiferenciadas (blastos) na medula óssea e sangue periférico, podendo haver a infiltração de outros órgãos e tecidos como fígado, baço e linfonodos. Os linfoblastos e os mieloblastos são células jovens que perderam sua capacidade de maturação (diferenciação). Nas leucemias agudas, observa-se então a troca de células saudáveis por clones leucêmicos linfoblásticos na leucemia linfoblástica aguda (LLA) ou os clones mielóides na leucemia mielóide aguda (LMA). Fonte: autor.

A contribuição dos eventos moleculares responsáveis pela transformação de células normais em células leucêmicas ainda são foco de muitos estudos, mas sabe-se que o resultado final consiste na proliferação de células hematopoéticas imaturas que perderam sua capacidade de diferenciação normal<sup>9</sup>. A ativação de proto-oncogenes, que são responsáveis pela produção de proteínas quiméricas e as alterações genéticas em genes supressores que regulam o ciclo celular levam a perda de mecanismos normais controladores da proliferação, diferenciação-maturação e morte celular programada culminando ao desenvolvimento da patogênese leucêmica. A perda da função de transdução de sinal de proteínas relacionadas à inibição do crescimento celular aumenta a proliferação desregulada das células anormais e isso pode acontecer devido a alterações dos genes responsáveis por essas atividades de controle do ciclo celular<sup>10</sup>. Inserções, deleções e translocações cromossômicas são alterações cromossômicas responsáveis pela supressão de genes que regulam o ciclo celular, induzindo a perda de mecanismos normais de proliferação, diferenciação maturação e morte celular programada<sup>11</sup>.

Estima-se 5.940 casos novos de leucemia em homens e 4.860 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019. Já para o ano de 2020, estima-se 5.920 casos em homens e 4.890 casos em mulheres (INCA, 04/02/2020 [encurtador.com.br/adtV0](http://encurtador.com.br/adtV0)). Os valores apontados equivalem a um risco de 5,67 casos novos a cada 100 mil habitantes e 4,56 casos novos para cada 100 mil mulheres no período de 2020/2022 (INCA, 2020). Cerca de 40% da população irá desenvolver algum tipo de câncer durante sua vida e cerca de 7% desses casos serão acometidos por algum tipo de hemopatia<sup>9</sup>.

Apesar dos avanços científicos, a etiologia das leucemias agudas ainda não é totalmente conhecida. Fatores como exposição a drogas antineoplásicas, radiação, fatores genéticos, fatores imunológicos, exposição a alguns vírus e produtos químicos podem contribuir para o desenvolvimento da mesma<sup>12</sup>.

Em 1976 um grupo de hematologistas franceses, americanos e britânicos definiu a leucemia aguda como uma infiltração de mais de 30% de blastos na medula óssea e utilizando critérios morfológicos e citoquímicos o grupo classificou as leucemias em subgrupos distintos (French-American-British - FAB)<sup>13</sup>. Com o surgimento de novas técnicas diagnósticas, a classificação e os critérios diagnósticos das leucemias agudas foram revisados em 2001 e 2008 pela Organização Mundial de Saúde (OMS) propondo uma nova classificação baseada nos aspectos citoquímicos, imunofenotípicos, citogenéticos e de biologia molecular a maneira que pudessem auxiliar na decisão terapêutica<sup>14</sup>. Com o advento das técnicas para análise de genômica em larga escala, a OMS em 2016 publicou uma nova revisão da classificação para as leucemias agudas incorporando novos aspectos moleculares que surgiram após estudos clínicos e científicos<sup>15,16</sup>. A classificação OMS de 2016 para as leucemias agudas estão descritas nas [Tabelas 1 e 2](#).

---

**Tabela 1. Classificação OMS 2016 das leucemias linfoblásticas agudas (LLA).**


---

Leucemia / Linfoma linfoblástico B NOS  
 Leucemia / Linfoma linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes  
 Leucemia / Linfoma linfoblástico B com t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1  
 Leucemia / Linfoma linfoblástico com t(v;11q23.3); rearranjo KMT2A  
 Leucemia / Linfoma linfoblástico com t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1  
 Leucemia / Linfoma linfoblástico com hiperploídia  
 Leucemia / Linfoma linfoblástico com hipoploídia  
 Leucemia / Linfoma linfoblástico com t(5;14)(q31.1;q23.3) IL3-IGH  
 Leucemia / Linfoma linfoblástico com t(1;19)(q23;q13.3); TCF3-PBX1  
 Classe provisória: Leucemia/Linfoma linfoblástico B, BCR-ABL1-Like  
 Classe provisória: Leucemia/Linfoma linfoblástico B, com lamp21  
**Leucemia / Linfoma linfoblástico T**  
 Classe provisória: Leucemia linfoblástica precursora Early T-cell  
 Classe provisória: Leucemia / Linfoma linfoblástico células Natural Killer (NK)

---

Adaptado de Arber *et al.*, 2019<sup>15</sup>

---

**Tabela 2. Classificação OMS 2016 das leucemias mielóides agudas (LMA).**


---

**Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e Neoplasias Relacionadas**  
**LMA com anormalidades genéticas recorrentes**  
 LMA com t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1 T1  
 LMA com inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11  
 LMA com PML-RARA  
 LMA com t(9;11)(p21.3;q23.3)MLLT3-KMT2A  
 LMA com t(6;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214  
 LMA com inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM  
 LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13.3;q13.3);RBM15-MKL1  
 Classe provisória: LMA com BCR-ABL1  
 LMA com mutação NPM1  
 LMA com mutações bialélicas de CEBPA  
 Classe provisória: LMA com mutação RUNX1  
 LMA com mudanças relacionadas em mielodisplasias  
 Neoplasias mielóides relacionadas à terapia  
 LMA, NOS  
 LMA com diferenciação mínima  
 LMA sem maturação  
 LMA com maturação  
 Leucemia mielomonocítica aguda  
 Leucemia monocítica/monoblástica aguda  
 Leucemia eritróide pura  
 Leucemia megacarioblástica aguda  
 Leucemia basofílica aguda  
 Mielofibrose com panmielose aguda

---

Adaptado de Arber *et al.*, 2019<sup>15</sup>

### 1.2.1. Leucemia linfoblástica aguda (LLA)

A etiologia da doença é pobremente conhecida e alguns fatores estão relacionados com o surgimento da mesma, sendo eles: aumento da idade (>70 anos), exposição à radiação, associação com vírus como Epstein-Barr, vírus linfotrófico da célula t humana (HTLV-1), vírus da imunodeficiência humana e 5% dos casos são atribuídos a síndromes genéticas<sup>17,18,19,20,21</sup>.

A LLA é a neoplasia mais comum na infância (faixa etária mais acometida é entre 2 e 5 anos de idade) e corresponde de 30-35% dos casos de câncer no segmento, o número de crianças que morrem de LLA representa uma grande parcela do total de óbitos infantis por câncer e as taxas de morbidade podem gerar sequelas devido ao tratamento agressivo em pessoas que possuem grande expectativa de vida, tornando-se necessário o entendimento da patogênese da doença que visa possibilitar a prevenção ou desenvolvimento de novos tratamentos<sup>22,23</sup>.

O tratamento é feito em um regime quimioterápico com fármacos que consiste em: indução, consolidação e manutenção da terapia, onde as taxas de cura variam entre 90% em pacientes pediátricos e 60% nos adolescentes<sup>24</sup>. Em pacientes adultos, a LLA é uma doença com mau prognóstico principalmente devido aos altos índices de recaída, maior número de comorbidades, desenvolvimento de resistência ao tratamento por quimioterápicos após recaída, observando-se que apenas 30-40% desses pacientes alcançarão remissão em longo prazo<sup>24,25</sup>. A fase de indução tem como objetivo induzir a completa remissão através da erradicação das células leucêmicas que se encontram na medula óssea, enquanto que a fase de consolidação tem como objetivo eliminar qualquer célula leucêmica restante após a fase de indução. A fase de manutenção visa prevenir a recaída e prolongar a remissão da doença<sup>24</sup>. Apesar do grande sucesso no tratamento da LLA infantil, a maioria dos pacientes adultos e idosos não é elegível ou não responde adequadamente à terapia atual, o que torna imperativo o desenvolvimento de novas opções terapêuticas.

### **1.2.2. Leucemia mielóide aguda (LMA)**

A LMA é uma doença heterogênea sendo o principal tipo de leucemia que acomete pacientes adultos (INCA 2020)<sup>26</sup> e assim como na LLA, a etiologia da LMA é pouco compreendida. A LMA pode surgir em um paciente sem nenhuma disfunção hematológica previamente estabelecida ou em outros casos pode surgir como consequência de uma terapia anterior administrada no paciente (exposição a agentes que atuam sob topoisomerase II, agentes alquilantes ou radiação)<sup>27</sup>. A patogênese da doença está diretamente ligada à proliferação clonal anormal e falha



na diferenciação de células mielóides<sup>26</sup>. Rearranjos cromossômicos e outros eventos moleculares estão implicados no desenvolvimento das LMA podendo levar a formação de proteínas quiméricas ou mutantes que alteram a maturação de células progenitoras mielóides e promovem vantagem proliferativa aos clones neoplásicos<sup>28</sup>.

Nos pacientes elegíveis ao tratamento com quimioterápicos, segue o padrão observado nos pacientes acometidos com LLA: indução, consolidação e manutenção<sup>26</sup>. Atualmente, para os pacientes idosos são oferecidos tratamentos mais brandos. O esquema de indução consiste basicamente da administração de antraciclina e citarabina, e outros fármacos podem ser utilizados como agentes hipometilantes, compostos que fazem parte de estudos clínicos e tratamento de suporte com medicamentos citostáticos orais, visando diminuir os eventos adversos causados pelo uso de quimioterápicos agressivos, porém observa-se que as taxas de sobrevida nos pacientes tratados com algum esquema quimioterapêutico são maiores que naqueles pacientes tratados apenas com tratamentos paliativos<sup>29,30</sup>.

As taxas de remissão apresentam um decréscimo com o aumento da idade do paciente e chega a atingir 90% em crianças, 70% em adultos jovens, 60% em adultos de meia idade, e 40% em pacientes mais velhos<sup>3</sup>. Quanto mais jovem o paciente com LMA, as taxas de sobrevida são maiores com melhor prognóstico. Em idosos com idade superior a 65 anos, a taxa de sobrevida relativa de cinco anos para esses pacientes é de 5,4%<sup>31</sup>. Diante do exposto, as novas opções terapêuticas capazes de mudar os desfechos clínicos das LMA são necessárias.

### **1.3. Aurora quinases**

O sucesso da mitose depende da integração do comportamento cromossômico e citoesquelético e para que esse processo ocorra de maneira funcionante, existem proteínas denominadas passageiros cromossomais que são responsáveis por monitorar a ligação dos cromossomos ao eixo e dessa maneira permitir que a próxima fase aconteça<sup>32</sup>.

A fase M do ciclo celular compreende a mitose que tem como objetivo a segregação das cromátides irmãs, cada célula irá receber um conjunto completo de cromossomos e outros componentes apropriados do citoplasma e organelas. A mitose pode ser dividida em cinco fases: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e

telófase. A segregação cromossômica depende da montagem correta do fuso mitótico. A citocinese ocorre no final da mitose promovendo clivagem celular formando duas células filhas a partir de uma célula parental e a sua regulação está estritamente ligada a progressão mitótica<sup>33</sup>.

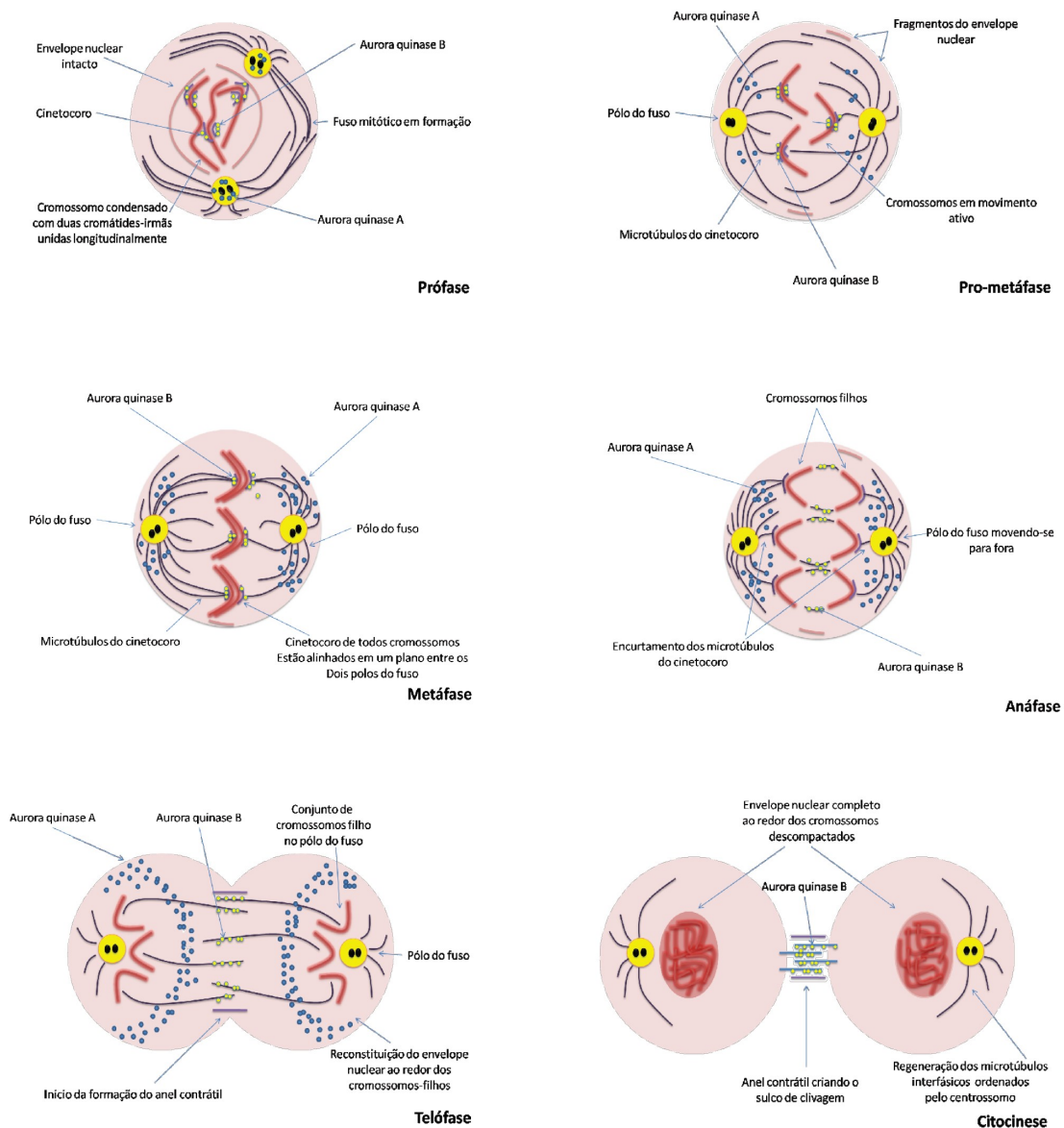
As proteínas denominadas como “passadores cromossomais” são responsáveis pela coordenação das funções citoesqueléticas e cromossomais durante a mitose. Essas proteínas estão associadas ao longo dos cromossomos durante a prófase e se concentram no centrômero interno durante a metáfase. Durante a transição para a anáfase, essas proteínas são transferidas para a região central do fuso mitótico e para o córtex celular, local onde o anel contrátil se formará<sup>32,34</sup>.

As proteínas aurora quinases (do inglês, *aurora kinases* [AURK]) estão envolvidas em vias de regulação de ponto de checagem das quais podemos citar formação do fuso, alinhamento dos cromossomos na metáfase e bi-orientação cromossomal, exibindo assim, a maioria das suas funções na regulação da mitose<sup>34,35,36</sup>.

As aurora quinases fazem parte da família serina/treonina quinases e são divididas em aurora quinase A (AURKA), B (AURKB) e C (AURKC), possuindo um comprimento de aminoácidos que varia de 309 a 403. Todas possuem um domínio N-terminal (39-129), um domínio de proteína quinase e um domínio C-terminal (15-20). AURKA e AURKB compartilham 71% de homologia no domínio catalítico C-terminal. A AURKA, AURKB e AURKC estão localizadas nos cromossomos: 20q13.2, 17p13.1 e 10q13, respectivamente<sup>37,38,39</sup>.

Um estudo realizado por Bischoff e colaboradores<sup>37</sup> através da utilização de imunofluorescência, mostrou que a AURKA encontra-se localizada no centrossomo, pólo do eixo, eixo de prófase para metáfase, mas predominante no eixo durante a telófase (Figura 3). A AURKA é altamente expressa na fase G<sub>2</sub>/M do ciclo celular, regula os processos de divisão mitótica celular em células normais<sup>40</sup>. Nos tecidos normais, a AURKA é expressa exclusivamente nos testículos, mas é possível visualizar a expressão em diversos tipos de câncer<sup>37,41</sup>. O aumento da expressão dessa proteína está relacionado com amplificação do centrossomo, aneuploidia e instabilidade cromossômica<sup>42,43</sup>.

**Figura 3. Localização das proteínas aurora quinases durante a mitose do ciclo celular.**



Durante a prófase, a proteína aurora quinase A (AURKA) se localiza no fuso mitótico junto aos centrosomos enquanto a proteína aurora quinase B (AURKB) se dispõe nos cinetócoros da prófase até a metáfase. Na pro-metáfase e metáfase, a AURKA tem um pico de expressão e está localizada nos pólos do fuso mitótico. No final da anáfase e durante toda a telófase, a AURKA se encontram junto ao fuso e sofrem um processo de regulação negativa enquanto a AURKB se encontram na zona intermediária do fuso e no corpo médio respectivamente e durante a citocinese se encontra também no corpo médio sem sofrer regulação negativa, diferente da AURKA. Fonte: autor.

A AURKB localiza-se nas regiões centroméricas dos cromossomos durante o início da mitose. No início da anáfase a AURKB sofre mudança na sua localização, sendo translocada dos centrômeros para os microtúbulos<sup>44</sup>. Após a segregação dos cromossomos, a célula entra em citocinese, e a AURKB acumula-se na zona intermediária do fuso e no córtex celular antes de se concentrar novamente no corpo

médio (Figura 3)<sup>45</sup>. A AURKB fosforila a histona H3 no sítio serina 10, sendo essa etapa fundamental para a condensação cromossomal, desta forma a p-histona H3<sup>S10</sup> é amplamente utilizado para avaliar a atividade de AURKB<sup>46</sup>.

A super expressão de AURKA e AURKB em ampla variedade de tipos de câncer têm sido reportada por diversos grupos de pesquisa independentes nos últimos anos<sup>37,42,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59</sup>, incluindo nas neoplasias hematológicas<sup>60,61,62,63</sup>. Esses achados têm chamado à atenção desta família de proteínas como potencial alvo para inibição farmacológica e terapia antineoplásica<sup>37,64,65</sup>.

De fato muitos inibidores de aurora quinases foram desenvolvidos, mas um deles com ação dupla sob AURKA e AURKB chamou a atenção do nosso grupo de pesquisa pelos resultados promissores em LMA<sup>66</sup>. A reversina (2-(4-morfolinoanilino)-6-ciclo-hexilaminopurina) foi originalmente identificada como um agente de desdiferenciação de mioblastos murinos em células progenitoras multipotentes<sup>67,68</sup>. Estudos recentes vêm mostrando que a reversina apresenta atividade antineoplásica em vários tipos de câncer<sup>69,70,71,72,73,74</sup>, incluindo neoplasias hematológicas<sup>66,75,76</sup>. A reversina é um análogo de ATP e tem sido relatado como um potente inibidor de multiquinase com seletividade para AURKA, AURKB, Monopolar spindle (Mps1) e c-Jun N-terminal kinase (JNK)<sup>74,77,78</sup>. Entre os eventos celulares desencadeados por esse composto, apoptose, catástrofe mitótica e autofagia foram descritas no câncer<sup>59,66</sup>.

#### 1.4. Stathmin 1

Stathmin 1 (STMN1) é uma proteína de 149 aminoácidos organizados em quatro domínios definidos por proteólise limitada que pertence a família Stathmin. Todos os membros dessa família possuem quatro sítios de fosforilação em serina (16, 25, 38 e 68) na região N-terminal e um domínio de ligação à tubulina (Entre os aminoácidos 42-126). Desses quatro sítios de fosforilação, apenas o resíduo 16 é conservado entre a família stathmin<sup>67,68</sup>.

A proteína STMN1 regula a dinâmica dos microtúbulos. O microtúbulo é uma estrutura polimérica composta por cadeias de heterodímeros  $\alpha/\beta$  tubulina e constitui a maior porção do citoesqueleto, sendo essencial para a estrutura e função celular.

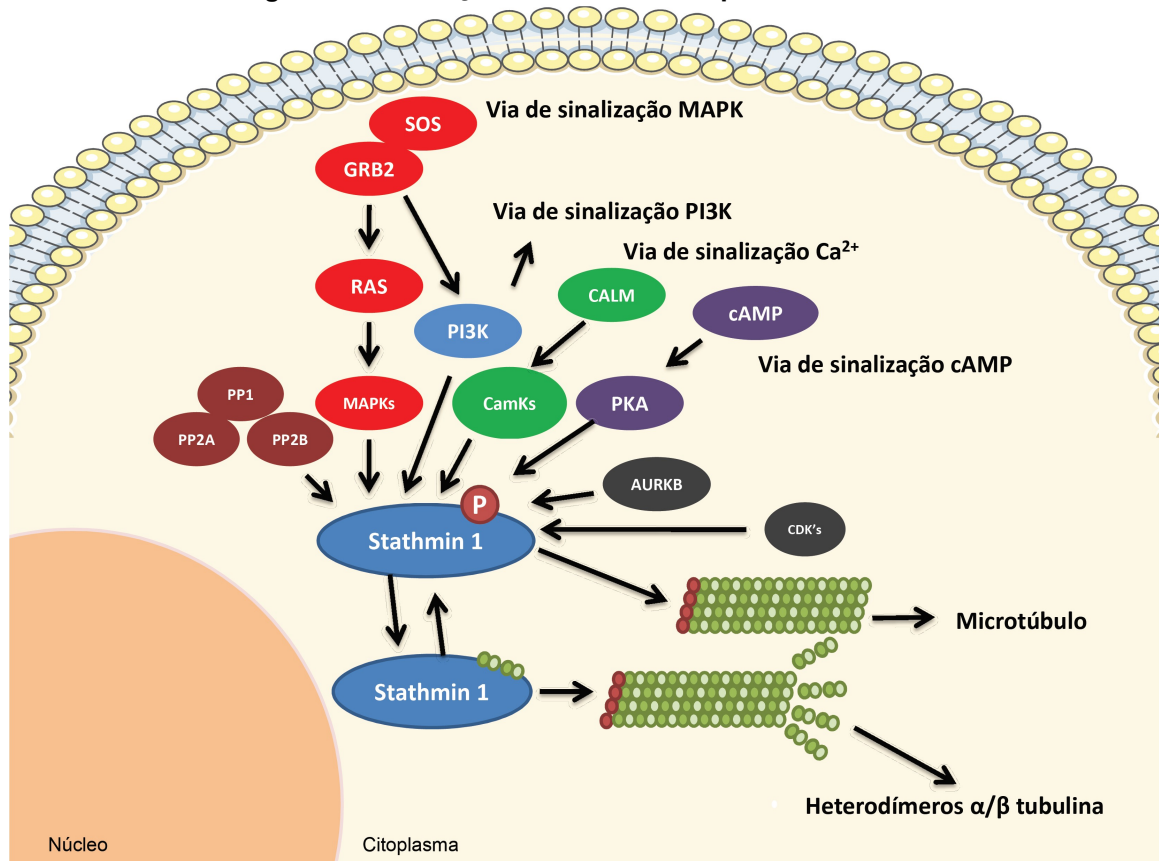
As funções celulares relacionado aos microtúbulos incluem transporte intracelular, mobilidade celular e polaridade<sup>79,80</sup>.

Os microtúbulos existem em um constante estado de polimerização e despolimerização que é referenciado como a dinâmica dos microtúbulos<sup>69,70</sup>. A proteína STMN1 atua sequestrando dímeros de  $\alpha/\beta$  tubulina reduzindo a polimerização dos microtúbulos ou estimulando os microtúbulos já formados a sofrerem catástrofe ao promover a sua desestabilidade<sup>81</sup>.

A fosforilação de STMN1 ocorre como resposta a vários sinais, incluindo aqueles envolvidos na proliferação, diferenciação celular e progressão do ciclo celular. A fosforilação pode ocorrer em quatro sítios de serina (16, 25, 38 e/ou 63) reduzindo a afinidade de STMN1 pelos heterodímeros de  $\alpha/\beta$  tubulina, o que representa um importante mecanismo de sua regulação<sup>82,83</sup>.

É claramente conhecido que a fosforilação de STMN1 é necessária para que as células entrem em mitose. Na transição da fase G<sub>2</sub>/M, a fosforilação de quatro resíduos de serina ocorre sequencialmente; serina 25 e serina 38 são as primeiras fosforiladas por quinases dependentes de ciclina (CDK) sendo a CDK1 e as serinas 16 e 63 são fosforiladas sequencialmente<sup>82</sup>. AURKB, proteína quinase A (PKA), serina treonina proteína quinase (PAK1) e a proteína quinase dependente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (CAMK) podem fosforilar STMN1 no sítio de serina 16 e/ou 63, resultando em uma potente inativação da capacidade de ligação à tubulina. Adicionalmente, STAT3 fosforilada pode se ligar e inibir STMN1, induzindo maior estabilidade dos microtúbulos. Além das funções de STMN1 na progressão do ciclo celular, esta proteína também está implicada na correta segregação dos cromossomos, clonogenicidade, motilidade celular e sobrevivência de células normais e cancerosas<sup>84,85</sup>. A representação esquemática da sinalização medida por STMN1 é ilustrada na [Figura 4](#).

**Figura 4. Sinalização celular mediada por Stathmin 1.**



A proteína stathmin 1 em sua forma ativa (não fosforilada) e sua forma inativa (fosforilada) é representada. A proteína stathmin 1 é responsável pela dinâmica dos microtúbulos e uma vez fosforilada por outras vias sinalizatórias (vias de sinalização mediados por MAPK, PI3K, CamKs, cAMP, aurora quinase B e ciclinas dependentes de quinases) se encontra na sua forma inativa, incapaz de promover a desestabilização dos microtúbulos já que não sequestra os dímeros de  $\alpha/\beta$  tubulina. Por outro lado, a ação de fosfatases ativam stathmin 1 gerando despolimerização e instabilidade dos microtúbulos. Fonte: autor.

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa evidenciaram que STMN1 é altamente expressa em neoplasias hematológicas, incluindo as LMA e LLA<sup>61,63</sup>. Além disso, a inibição genética de STMN1 através de shRNA resultou na redução da proliferação celular e clonogenicidade de linhagens celulares de LMA e LLA<sup>61,62</sup>.

A inibição farmacológica de STMN1 ainda é um desafio, sendo descrito na literatura apenas um potencial inibidor seletivo. O composto GDP366 (1-[4-(4-Aminoetieno[2,3-d]pirimidina-5-yl)fenil]-3-(3-metilfenil)uréia) foi descrito como um inibidor duplo para STMN1 e BIRC5 (survivina), ambos os alvos interessantes do ponto de vista de terapia antineoplásica<sup>86</sup>. Em células de câncer de cólon HCT116, GDP366 foi capaz de inibir a expressão gênica e protéica de STMN1 e BIRC5, reduzir a clonogenicidade, levar a uma parada do ciclo celular na fase G<sub>2</sub>/M e aneuploidia, e aumentar a senescência<sup>86</sup>.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Investigação dos efeitos celulares e moleculares da inibição farmacológica de proteínas envolvidas na regulação do citoesqueleto e progressão do ciclo celular, aurora quinases e STMN1, em modelos de leucemias agudas.

### **2.1. Objetivos específicos**

Utilizando a reversina para inibição farmacológica de AURKA e AURKB em modelo celulares de LLA:

- (i) Avaliar a viabilidade, apoptose, proliferação, clonogenicidade, progressão do ciclo celular e autofagia.
- (ii) Investigar as vias de sinalização celular envolvidas nas respostas celulares através de Western blot e PCR array.

Utilizando os compostos identificados por quimioinformática como potenciais inibidores de STMN1 em modelo celulares de LLA e LMA:

- (i) Avaliar a viabilidade, apoptose, proliferação, clonogenicidade e progressão do ciclo celular.
- (ii) Testar os efeitos dos compostos selecionados em relação à atividade e expressão de STMN1.
- (iii) Investigar as vias de sinalização celular envolvidas nas respostas celulares através de Western blot e PCR array.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Dados de expressão gênica de *AURKA*, *AURKB* e *STMN1*

Os dados de expressão de mRNA de *AURKA* (probe 208079\_s\_at) e *AURKB* (probe 209464\_at) de linfócitos normais (n=12), LLA-B (n=82), LLA-T (n=54) são derivados do portal de dados de acesso público *AmaZonia! database 2008* (<http://amazonia.transcriptome.eu>)<sup>87</sup>. Os dados da expressão de mRNA de *STMN1* (probe 200783 e 217714\_s\_at) de doadores saudáveis (linfócitos normais (n=12) e medula óssea normal (n=5), total n=17), LLA-B (n=82), LLA-T (n=54), LMA de risco favorável (n=120), LMA de risco intermediário (n=342) e LMA de risco adverso (n=66) são derivados do portal de dados de acesso público *AmaZonia! database 2008* (<http://amazonia.transcriptome.eu>)<sup>87</sup>. Os valores de expressão gênica foram obtidos a partir de experimentos de microarranjos de cDNA pelo sistema *Affymetrix HGU133 plus 2.0 arrays* e os dados foram cruzados usando números de identificação específicos de tumores.

#### 3.2. Definição dos compostos com potencial para inibição de *STMN1* e/ou instabilidade dos microtúbulos

A identificação de potenciais compostos capazes de inibir a atividade de *STMN1* foi realizada *in silico* por meio de ferramentas de quimioinformática aplicando o planejamento baseado na estrutura do ligante (LBVS), onde a estrutura química da molécula GDP366 foi utilizada para identificar substâncias com alto grau de similaridade estrutural e físico-química. O estudo foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Andrei Leitão do Grupo de Química Medicinal (Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo).

#### 3.3. Linhagens celulares

As células Daudi, Namalwa, MOLT4 e Jurkat foram obtidas da ATCC (Filadélfia, PA, EUA). As células Karpas 422 foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. Martin Dreyling (University Hospital Grosshadern/LMU, Munique, Alemanha). As células NB4 foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego (Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo). As células CEM e RS4;11 foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli (Universidade de



São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil). As linhagens celulares foram cultivadas em meio de cultura indicados pela American Type Culture Collection (ATCC) ou Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), suplementados com soro fetal bovino e penicilina/streptomicina. As células foram mantidas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. As células Jurkat, Namalwa, U937 e NB4 foram autenticadas pela análise de correspondência *Short Tandem Repeat* (STR) usando o sistema PowerPlex® 16 HS (Promega, Madison, WI, EUA) e o sistema ABI 3500 Sequence Detector System (Life Technologies, Foster City, CA, EUA) e estavam livres de micoplasma no momento do congelamento. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas por centrifugação em gradiente Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) de um doador saudável e o Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo aprovou este estudo (Parecer CEP: 845.854).

### 3.4. Inibidores farmacológicos

A reversina [2-(4-morfolinoanilino)-6-ciclo-hexilaminopurina] e o AD80 (1-[4-(4-amino-1-propan-2-ylpirazolo[3,4-d]pirimidina-3-yl)fenil]-3-[2-fluoro-5-(trifluorometil)fenil]ureia) foram obtidos da TargetMol (Target Molecule Corp., Boston, MA, EUA) e preparados como uma solução estoque 50 mM e 25 mM em dimetilsulfóxido (Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; DMSO), respectivamente. O GDP366 (1-[4-(4-aminothieno[2,3-d]pyrimidin-5-yl)phenyl]-3-(3-methylphenyl)urea), GW768505A (1-[4-[4-amino-6-(4-methoxyphenyl)furo[2,3-d]pyrimidin-5-yl]phenyl]-3-[2-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenyl]urea; hydrochloride) e GSK2606414 (1-[5-(4-amino-7-methylpyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)-2,3-dihydroindol-1-yl]-2-[3-(trifluoromethyl)phenyl]ethanone) foram obtidos da MCE (MedicalChemExpress, Monmouth Junction, NJ, EUA), AOBIOUS (AOBIOUS INC, Gloucester, MA, EUA) e ApexBio (ApexBio Technology, Houston, TX, EUA), respectivamente, e preparados como uma solução estoque 25 mM em DMSO.

### 3.5. Western blot

Para a extração de proteína total foi acrescentado ao precipitado celular tampão de extração de proteínas contendo 100 mM Tris (pH 7.6), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 35 mg/mL PMSF, 10 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 100 mM NaF, 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> e 4

mM EDTA. Após 30 minutos de incubação em gelo, essas foram centrifugadas para remoção dos restos celulares. As amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE em aparelho de eletroforese, seguida de eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com leite 5% e incubada com anticorpos primários específicos diluídos em tampão de bloqueio e posteriormente foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados à HRP (horseradish peroxidase). O sistema de revelação foi realizado de acordo com as instruções do SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate System (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA) e do equipamento G:BOX Chemi XX6 gel doc system (Syngene, Cambridge, UK). Os anticorpos (utilizados ou que serão utilizados) estão descritos na [Tabela 3](#).

**Tabela 3. Anticorpos primários utilizados para Western blot.**

Empresa	Alvo	Número catálogo
Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, EUA)	AURKA	sc-25425
	AURKB	sc-25426
	p-Histona H3 <sup>S10</sup>	sc-8656-R
	Stathmin 1 (OP18)	sc-55531
	p-Stathmin 1 <sup>S16</sup>	sc-12948-R
	α-tubulina	sc-5286
	PARP1	sc-56197
Cell Signaling Technology (Danvers, EUA)	γH2AX	#9718
	SQSTM1/p62	#88588
	LC3/II	#2775
	BCL2	#15071
	GAPDH	#2118
	p-S6RP <sup>S235/236</sup>	#4858
	S6RP	#2217
Survivina (BIRC5)	#2808	

### 3.6. Análise do perfil de expressão gênica por PCR array

O PCR array é um ferramenta exploratória que fornece informações pontuais e de fácil interpretação permitindo a investigação e análise da expressão de dezenas de genes de interesse ao mesmo tempo. Para os experimentos utilizando a reversina optamos por investigar a expressão de genes envolvidos no processo de autofagia. Em resumo, o RNA total de células Namalwa tratadas com veículo ou reversina (10 μM) por 24 horas foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific). O cDNA foi sintetizado a partir de 2 μg de RNA utilizando RT2 First Strand Kit (Qiagen Sciences Inc., Germantown, MD, USA). O PCR array foi realizado utilizando a plataforma Human Autophagy RT2 Profiler PCR Array (#PAHS-084ZA; Qiagen Sciences Inc.) de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de

mRNA foram normalizados pela células tratadas com veículo e genes que apresentaram um *fold change*  $\geq 2$  após o tratamento foram incluídos no heatmap usando um software visualizador de experimentos múltiplos (MeV) 4.9.0. A amplificação foi realizada utilizando o aparelho ABI 7500 Sequence Detector System (Thermo Fisher Scientific).

Para o estudo com os potenciais inibidores de STMN1, GDP366 e AD80, foi utilizado o PCR array Human Cytoskeleton Regulators (#PAHS-088A, Qiagen Sciences Inc) contendo 84 genes relacionados com regulação do citoesqueleto, incluindo genes que codificam proteínas que interagem com os microtúbulos, proteínas envolvidas na organização e biogênese dos microtúbulos, proteínas relacionadas com a polimerização e despolimerização dos microtúbulos, e proteínas que participam da organização do fuso mitótico. Em resumo, o RNA total de células Jurkat tratadas com veículo, AD80 (2  $\mu\text{M}$ ) ou GDP366 (10  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific) e o cDNA foi sintetizado utilizando RT2 First Strand Kit (Qiagen Sciences Inc). O PCR array foi realizado utilizando a plataforma Human Cytoskeleton Regulators kit (#PAHS-088ZC; Qiagen Sciences Inc.) de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de mRNA foram normalizados pela células tratadas com veículo e genes que apresentaram um *fold change*  $\geq 1.5$  após o tratamento com AD80 e/ou GDP366 foram incluídos no heatmap usando MeV 4.9.0. A amplificação foi realizada utilizando o aparelho QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific).

### 3.7. PCR quantitativo

As amostras de RNA total foram extraídas utilizando reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific), contendo 1  $\mu\text{g}$  de RNA e reversamente transcritas em cDNA com o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). A amplificação gênica em tempo real foi realizada no aparelho ABI 7500 Sequence Detector System (Thermo Fisher Scientific) utilizando o sistema TaqMan ou SyberGreen com iniciadores específicos (Tabela 4). A quantificação relativa das expressões de cada gene normalizado pelo gene de referência foi calculada utilizando-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}88}$ .

**Tabela 4. Sequência e concentração dos iniciadores utilizados no PCR quantitativo**

<b>Gene</b>	<b>Sequência/ Identificação Catálogo</b>	<b>Concentração</b>
<i>AURKA</i>	Hs00269212.m1	*
<i>AURKB</i>	Hs00177782.m1	*
<i>GAPDH</i>	4326317E-0411007	*
<i>18S rRNA</i>	4332641	*
<i>BCL2</i>	FW: ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA RV: ACAGTTCCACAAAGGCATCC	300 nM
<i>BAD</i>	FW: CACCAGCAGGAGCAGCCAAC RV: CGACTCCGGATCTCCACAGC	300 nM
<i>ULK1</i>	FW: CAGACAGCCTGATGTGCAGT RV: CAGGGTGGGGATGGAGAT	150 nM
<i>ATG10</i>	FW: TACGCAACAGGAACATCCA RV: AACAACTGGCCCTACAATGC	150 nM
<i>IRGM</i>	FW: GGA CTCTGGCAATGGGATGT RV: CCCTCATGTCCTGTGTTTCGA	300 nM
<i>MAP1L3B</i>	FW: AAGGCGCTTACAGCTCAATG RV: CTGGGAGGCATAGACCATGT	150 nM
<i>STMN1</i>	FW: AGCCCTCGGTCAAAGAATC RV: TCAAGACCTCAGCTTCATGGG	150 nM
<i>HPRT1</i>	FW: GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA RV: TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT	150 nM
<i>ACTB</i>	FW: AGGCCAACCGCGAGAAG RV: ACAGCCTGGATAGCAACGTACA	150 nM

\*Sondas obtidas da Thermo Fisher Scientific (EUA) e utilizadas de acordo com instruções do fabricante.

### 3.8. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de methylthiazoletetrazolium (MTT), de acordo com as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich). Em resumo,  $2 \times 10^4$  células por poço foram cultivadas em placa de 96 poços em meio de cultura com 10% de soro fetal bovino e na presença de concentrações crescentes de reversina (veículo [Ø]; 1; 2,5; 5; 10; 25 e 50  $\mu$ M), GDP366 e AD80 (veículo [Ø]; 0,0032; 0,016; 0,08, 0,4; 2; 10 e 50  $\mu$ M); após 24, 48 e/ou 72h de incubação, foram adicionados 10  $\mu$ L de solução contendo MTT a 5 mg/mL e incubados por 4 horas a 37°C. A reação foi interrompida usando 100  $\mu$ L de 0,1N HCl em isopropanol. A viabilidade celular foi mensurada na absorbância de 570 nm, utilizando um leitor automático de placa. Os experimentos foram realizados em cinco replicatas. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados para cada condição. Os valores foram calculados utilizando uma análise de regressão não linear no software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

### 3.9. Avaliação de proliferação por marcação com Ki-67

Células foram ressuspensas em etanol 70% e armazenadas à -20°C. A Marcação com anti-Ki-67 foi realizada de acordo com instruções do fabricante (Ki-67 FITC clone B56; BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) e a média de intensidade de fluorescência foi obtida usando um FACSCalibur. O IgG isotipo foi utilizado como controle negativo para cada condição. Dez mil eventos foram adquiridos para cada amostra.

### **3.10. Ensaio de clonogenicidade**

A formação de colônias foi realizada em meio semissólido de metilcelulose ( $0,5 \times 10^3$  células/mL; MethoCult 4230; StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canadá) na presença ou ausência de reversina, GDP366 e AD80. As colônias foram detectadas após 10 dias de cultura pela adição de 1 mg/mL de reagente MTT e as contagens realizadas com o auxílio do Image J quantification software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

### **3.11. Avaliação de apoptose**

Células controles ou tratadas com concentrações crescentes de reversina, GDP366 ou AD80 foram coletadas e ressuspensas em tampão de ligação contendo 1 µg/mL de 7AAD ou iodeto de propídio (PI) e 1 µg/mL de APC ou FITC anexina V (BD Bioscience). Após incubação ao abrigo de luz por 15 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram analisadas em um FACSCalibur (BD Bioscience). Dez mil eventos foram adquiridos para cada amostra.

### **3.12. Análises do ciclo celular**

Um total de  $6 \times 10^5$  células por poço foi semeado em placas de 6 poços na presença de reversina (veículo [Ø]; 1; 2,5; 5 e 10µM), GDP366 (veículo [Ø]; 2; 10 e 50 µM), AD80 (veículo [Ø]; 0,4; 2 e 10µM). As células foram fixadas em etanol 70%, por pelo menos 2 horas à 4°C antes das análises e incubadas com 20 µg/mL de iodeto de propídio (PI) contendo 10 µg/mL de RNase A por 30 minutos à temperatura ambiente. As análises da fluorescência celular foram realizadas com um FACSCalibur e as distribuições das fases do ciclo celular foi determinada pelo software FlowJo (Treestar, Inc., San Carlos, CA, EUA).

### 3.13. Análise por imunofluorescência

As células leucêmicas foram fixadas em lamínulas com poli-L-lisina (1 mg/mL), fixadas com 3,7% de formaldeído, permeabilizada com 0,5% Triton X-PBS e bloqueadas com 3% de albumina sérica bovina (BSA) PBS. Então, as células foram incubadas com conjugado anti- $\alpha$ -tubulina Alexa Fluor® 488 (1:100 em 3% BSA PBS, Thermo Fisher Scientific) por 12 horas seguido de lavagem com PBS. As imagens foram geradas usando o Confocal Zeiss LSM-780-NLO, e o tamanho das células foram medidas usando o software ZEN 3.0 blue edition (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

### 3.14. Ensaio cometa

O ensaio cometa alcalino foi realizado utilizando as células Jurkat e Namalwa. Um total de  $1.5 \times 10^5$  células foram tratadas com reversina 5  $\mu$ M ou veículo por 24 horas. O protocolo realizado foi de acordo com um estudo anterior<sup>89</sup>. Pelo menos cento e cinquenta cometas de dois experimentos independentes foram analisados utilizando o software LUCIA Comet Assay™ software (Laboratory Image, Prague, República Tcheca) e o dano em DNA foi definido utilizando o valor do momento de cauda (proporção de DNA cabeça/cauda)<sup>90</sup>. Os ensaios cometas foram realizados em colaboração com a Dra. Natália Cestari Moreno (Departamento de Microbiologia, ICB – USP).

### 3.15. Avaliação de autofagia por marcação com laranja de acridina

Para a determinação de organelas vesiculares ácidas,  $5 \times 10^5$  foram cultivadas na presença de reversina (veículo [Ø]; 1; 2,5; 5 e 10  $\mu$ M) por 24 horas. As células foram lavadas e incubadas com solução de laranja de acridina (0,1  $\mu$ g/mL; Sigma-Aldrich). As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur; BD Bioscience) após 30 minutos de incubação protegida da luz, seguindo as orientações de Thomé *et al.*, 2012<sup>91</sup>. Dez mil eventos foram adquiridos para cada amostra.

### 3.16. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., CA, EUA). O teste Kruskal-Wallis e pós-teste Dunn,

ANOVA e pós-teste de Bonferroni e teste  $t$  de Student para fatores mensuráveis foram utilizados conforme apropriado. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

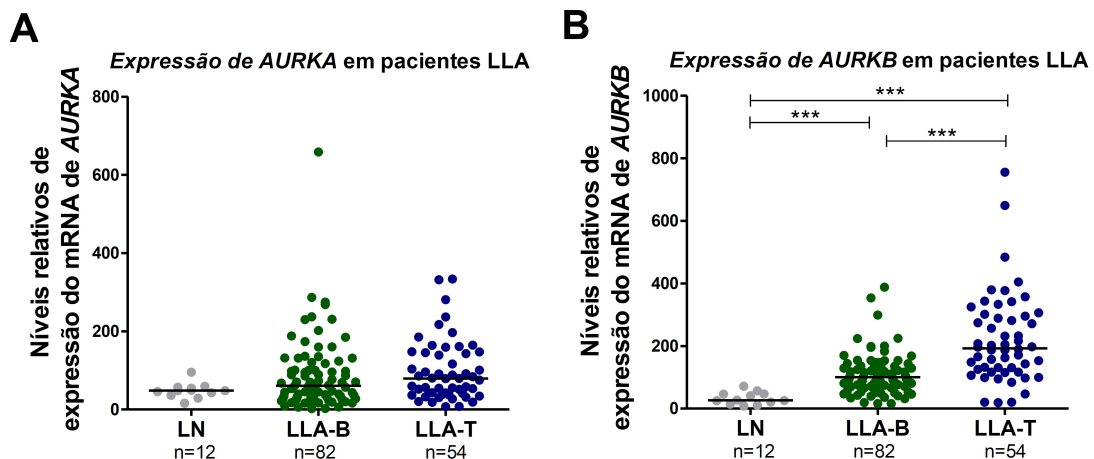
## 4.0. RESULTADOS

### 4.1. Investigação dos efeitos moleculares e celulares do tratamento com reversina em modelos de LLA.

#### 4.1.1. A expressão de *AURKB* é aumentada em amostras de pacientes com LLA

Utilizando dados de expressão gênica obtidos através da análise microarranjos de cDNA (<http://amazonia.transcriptome.eu>), a expressão de *AURKB* foi aumentada em amostras de pacientes com LLA-B e LLA-T quando comparada à amostras de linfócitos normais ( $p < 0.0001$ ), sendo maior nas amostras de LLA-T quando comparada as de LLA-B ( $p < 0.0001$ ). Os níveis de *AURKA* foram semelhantes entre os grupos estudados (Figura 5).

Figura 5. Os níveis de expressão gênica de *AURKB* são aumentados em amostras de pacientes com leucemia linfoblástica aguda (LLA).



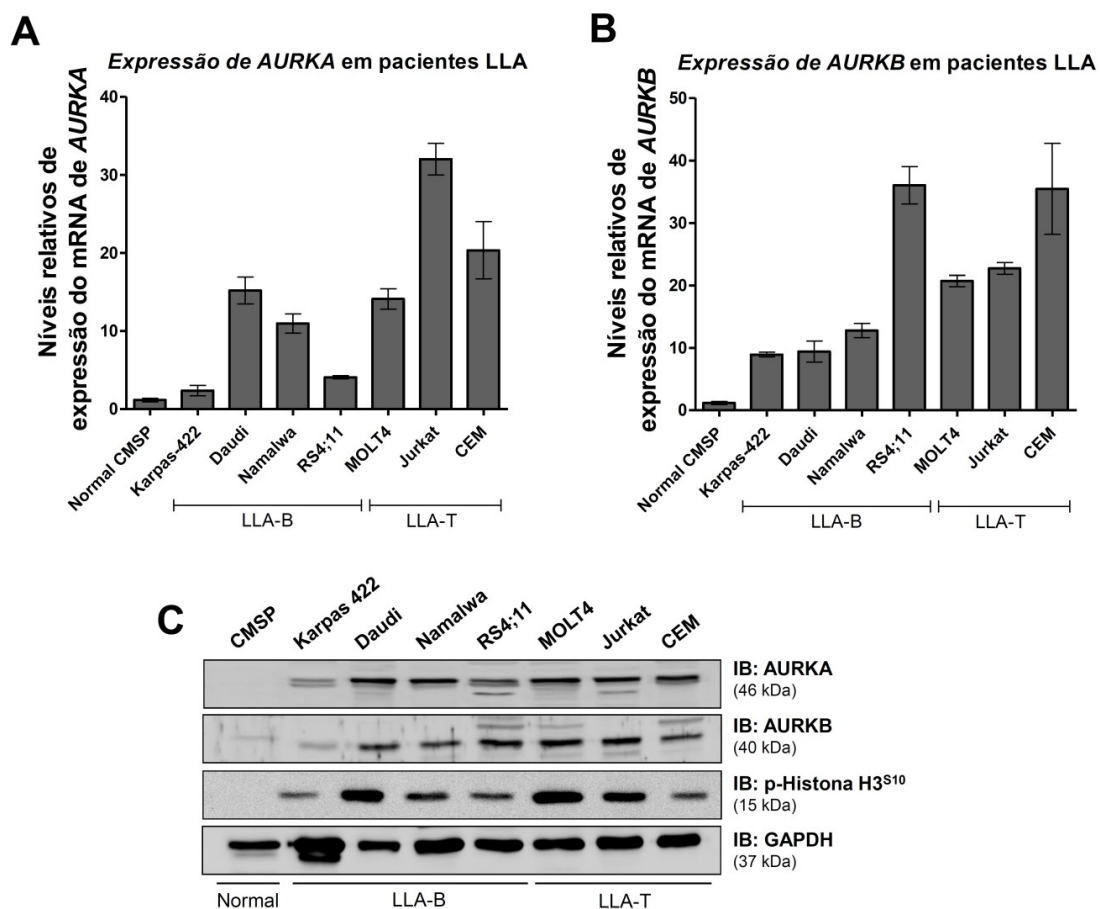
Níveis de RNAm de *AURKA* (A) (208079\_s\_at) e *AURKB* (209464\_at) (B) comparados entre leucócitos normais (LN), amostras de LLA-B e LLA-T. O eixo "Y" representa os dados de expressão gênica obtidos do banco de dados AmaZonia! 2008 (<http://amazonia.transcriptome.eu>) que foram gerados a partir de dados de microarranjos de cDNA *Affymetrix HGU133 plus 2.0 arrays*. Os conjuntos de dados foram cruzados usando números de identificação específicos de tumores. Os números de indivíduos para cada grupo são indicados. \*\*\* $p < 0,0001$ ; Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste Dunn.

#### 4.1.2. *AURKA* e *AURKB* são altamente expressas em modelos celulares de LLA



Utilizando um painel contendo linhagens celulares de LLA-B (Karpas 442, Daudi, Namalwa e RS4;11) e LLA-T (MOLT-4, Jurkat e CEM) foi observado um aumento da expressão gênica de *AURKA* e *AURKB* em relação aos leucócitos normais (CMSP) (Figura 6A-B). A análise por Western Blot corrobora esses achados e indicam aumento da atividade de *AURKB* como evidenciado pelo aumento da fosforilação da histona H3 (Figura 6C).

**Figura 6. *AURKA* e *AURKB* são altamente expressas em linhagens celulares de LLA-B e LLA-T.**

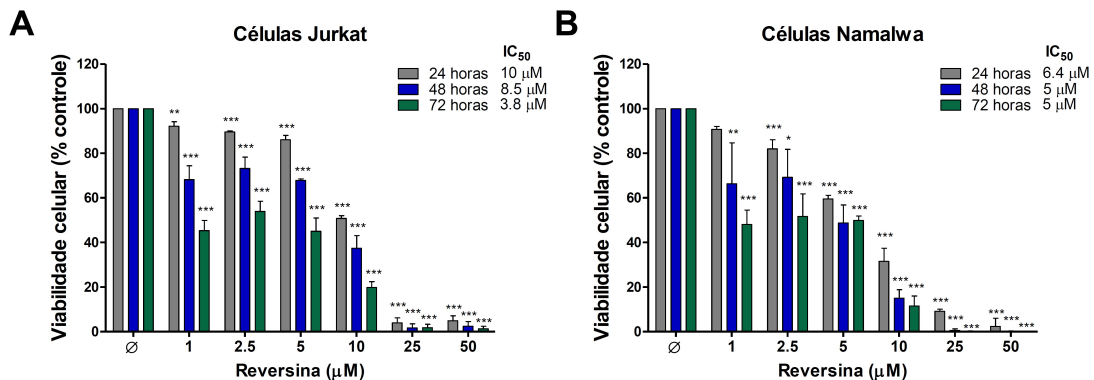


Os níveis de RNAm de *AURKA* (A) e *AURKB* (B) em célula mononuclear de sangue periférico normal (CMSP) e amostras de linhagens celulares leucêmicas de LLA-B (Karpas 442 (linfoma), Daudi, Namalwa e RS4;11) e LLA-T (MOLT-4, Jurkat e CEM) foram avaliadas por PCR quantitativo. O CMSP foi usado como amostra calibradora. *GAPDH* e *18S rRNA* foram usados como genes de referência. (C) Análise protéica realizada por *Western Blot* para as proteínas *AURKA*, *AURKB* e fosfo (p)-Histona H3<sup>S10</sup>, nos extratos celulares totais de CMSP e linhagens celulares de LLA-B e LLA-T como indicadas; as membranas foram condicionadas com o anticorpo para detecção de GAPDH. A revelação foi realizada pelo sistema SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate system e o equipamento G:BOX Chemi XX6 gel doc.

#### 4.1.3. O tratamento com reversina reduz viabilidade celular em células Jurkat e Namalwa

Tendo em vista o aumento expressão e atividade das aurora quinases em modelos de LLA, o efeito da reversina foi investigado. Em células Jurkat (LLA-T) e Namalwa (LLA-B) foi observada que o tratamento com reversina reduz a viabilidade celular de maneira concentração e tempo dependente ( $p < 0.05$ ) (Figura 7).

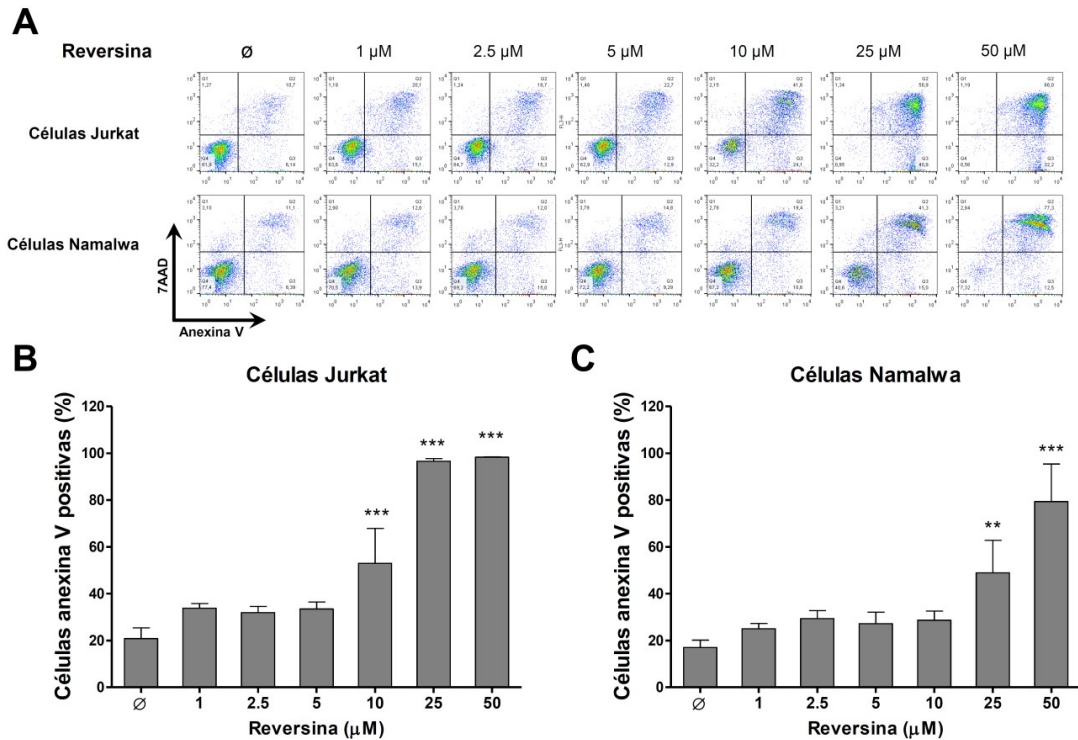
**Figura 7. Reversina induz a diminuição da viabilidade celular em linhagem Jurkat e Namalwa.**



A citotoxicidade da reversina foi avaliada nas células por meio do ensaio de MTT onde observa-se resposta concentração e tempo dependente. As linhagens Jurkat (**A**) e Namalwa (**B**) foram tratadas com veículo (∅) ou concentrações diferentes de reversina (1, 2.5, 5, 10, 25, e 50 µM) durante 24, 48 e 72 horas. Os valores expressos representam a porcentagem de células viáveis para cada condição relevante comparadas ao controle. Os resultados são mostrados como a média  $\pm$  DP de pelo menos quatro experimentos independentes. Os valores  $p$  e as linhagens são indicados nos gráficos; \*\*\* $p < 0.0001$ ; ANOVA e pós-teste de Bonferroni

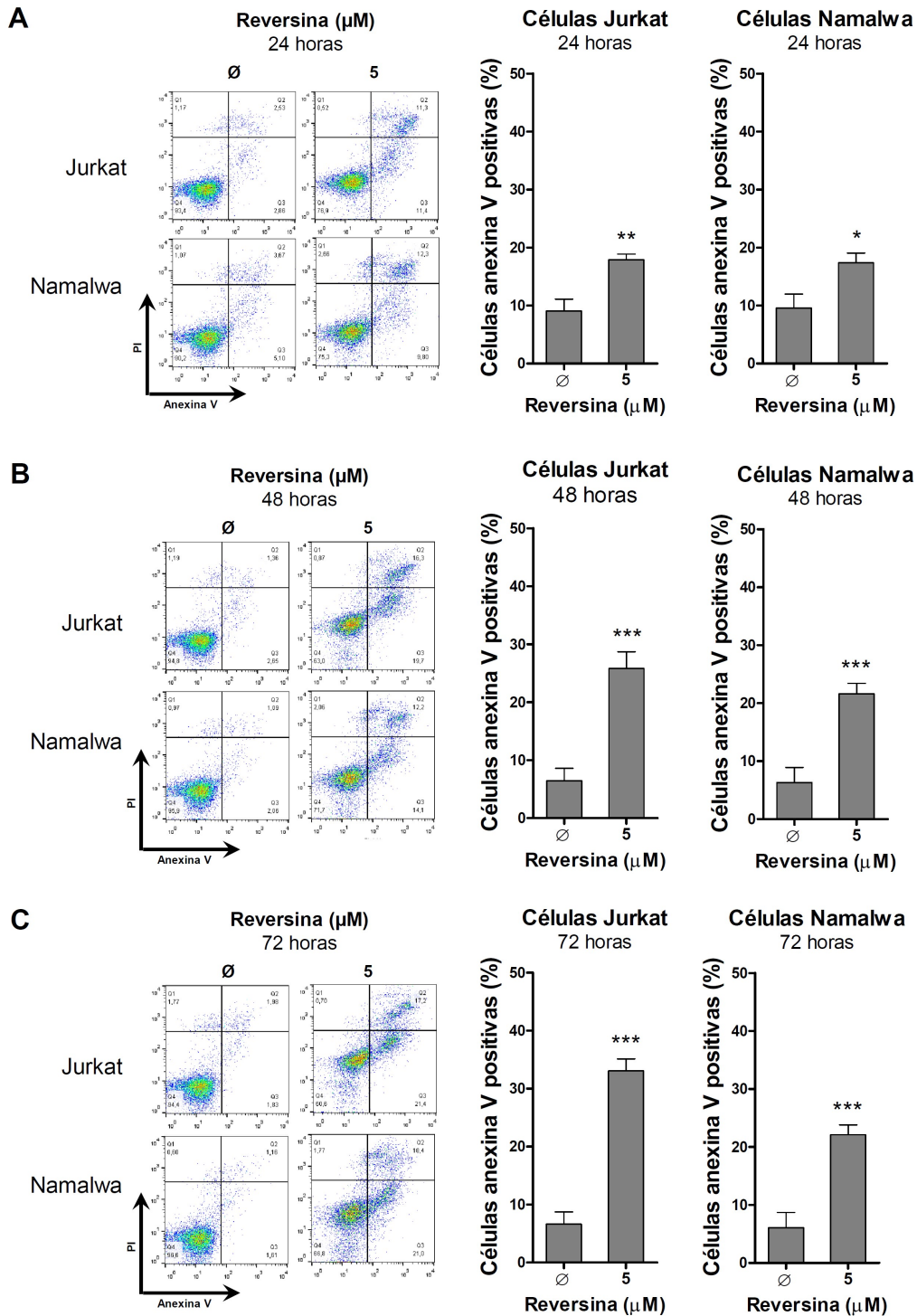
Para verificar se o tratamento era capaz de induzir apoptose nas linhagens de LLA, as células foram marcadas com anexina V e 7AAD. A reversina induziu apoptose de forma concentração dependente em ambas as linhagens celulares ( $p < 0.01$ ), sendo a Jurkat mais sensível (Figura 8). Quando as linhagens foram expostas ao tratamento em tempos diferentes (24, 48 e 72 horas), apenas na concentração de 5 µM, observou-se o aumento da população celular em apoptose com o aumento do tempo de exposição ao fármaco (Figura 9). Notavelmente, os efeitos apoptóticos foram menos extensos do que os esperados quando comparados aos resultados obtidos no ensaio MTT, sugerindo que outros mecanismos de morte celular podem estar envolvidos na redução a viabilidade celular.

Figura 8. O tratamento com reversina induz apoptose em linhagens celulares de LLA.



(A) As células apoptóticas foram identificadas pela marcação com anexina V e 7AAD, detectadas por citometria de fluxo após o tratamento com concentrações crescentes de reversina (1, 2.5, 5, 10, 25 e 50  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Gráficos de pontos representativos são mostrados para cada condição de tratamento; nos quadrantes superiores e inferiores direito (Q2+Q3) contém a população apoptótica (células marcadas com anexina V). (B) os gráficos em barra representam a média  $\pm$  DP da quantificação de células apoptóticas de mínimo quatro experimentos independentes. Os valores de  $p$  são indicados nos gráficos; \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ; ANOVA e pós teste Bonferroni.

Figura 9. O tratamento com reversina induz a apoptose de maneira tempo dependente.

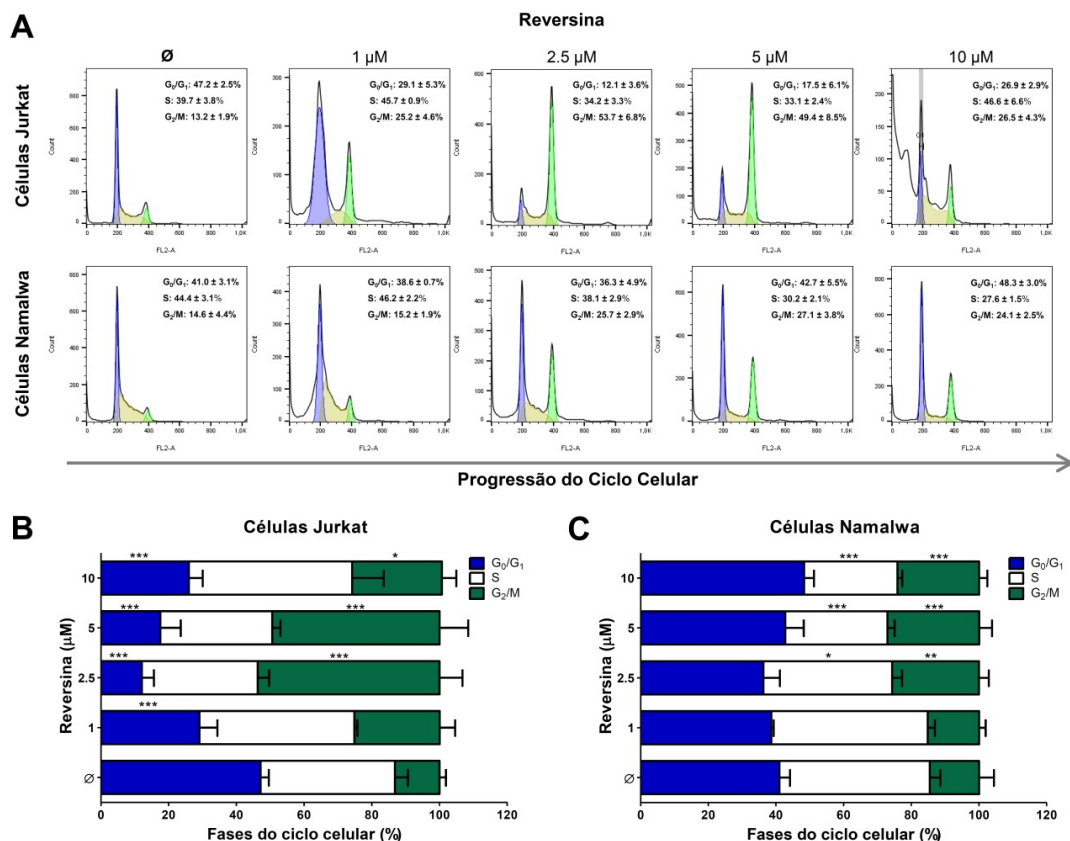


As células apoptóticas foram identificadas pela marcação com anexina V e iodeto de propídio (PI), detectadas por citometria de fluxo após o tratamento com reversina utilizando uma única concentração (5  $\mu\text{M}$ ) durante 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas. Gráficos de pontos representativos são mostrados para cada condição de tratamento; nos quadrantes superiores e inferiores direito (Q2+Q3) contém a população apoptótica (células marcadas com anexina V). Os gráficos em barra representam a média  $\pm$  DP da quantificação de células apoptóticas de pelo menos quatro experimentos independentes em cada tempo de tratamento. Os valores de  $p$  são indicados nos gráficos; \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ; ANOVA e pós teste Bonferroni.

#### 4.1.4. Parada do ciclo celular na fase G<sub>2</sub>/M é induzida pelo tratamento com reversina

Em baixas concentrações, o tratamento com reversina induz uma parada no ciclo celular na fase G<sub>2</sub>/M ( $p < 0,05$ ; Figura 10) sendo observado esse aumento mesmo após as células serem expostas por maior tempo ao tratamento (24, 48 e 72 horas) (Figura 11) e aumento do tamanho da célula ( $p < 0,05$ ; Figura 12) em ambas as linhagens celulares de LLA. Nas células Jurkat, foi possível observar aumento da população de células subG1 na reversina de 10  $\mu\text{M}$ , o que foi coerente com os dados de apoptose.

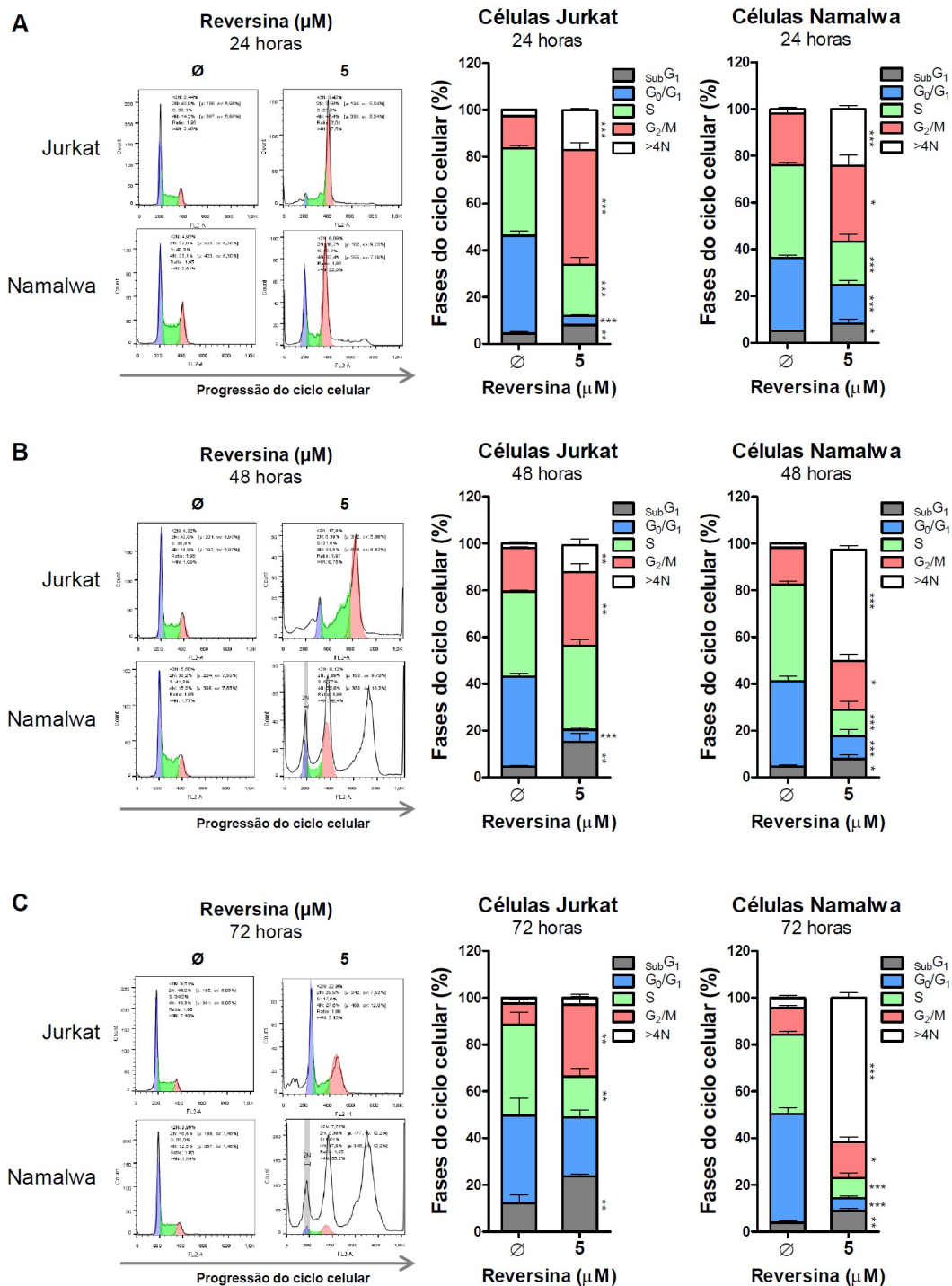
Figura 10. O tratamento com reversina induz parada na progressão do ciclo celular na fase G<sub>2</sub>/M.



(A) A progressão do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo e as células marcadas com iodeto de propídio (IP). As células foram tratadas com reversina em diferentes concentrações (1, 2.5, 5, 10  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas. Para cada linhagem (Jurkat e Namalwa) um histograma é apresentado, onde cada concentração utilizada representa uma condição. O gráfico em barras representa a média  $\pm$  DP da porcentagem de células nas fases do ciclo celular em G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>/M após o tratamento com reversina em pelo menos quatro experimentos diferentes. O valor  $p$  e as porcentagens são indicados nos gráficos; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; ANOVA e pós teste Bonferroni.

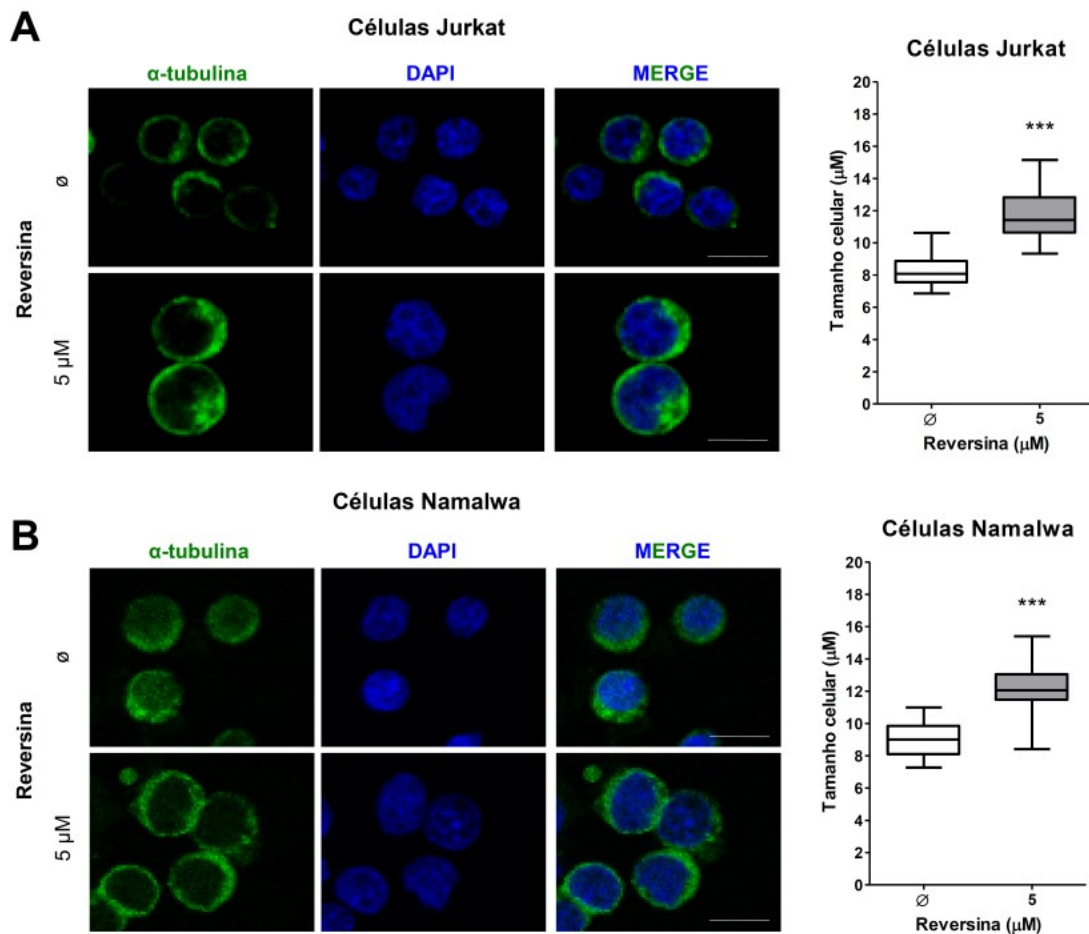


Figura 11. A exposição à reversina induz o aumento da população  $subG_1$  e poliplóide em células de LLA ao longo do tempo.



(A) A progressão do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo e as células marcadas com iodeto de propídio (PI). As células foram tratadas com reversina em uma única concentração (1, 2.5, 5, 10  $\mu M$ ) por 24, 48 e 72 horas. Para cada linhagem (Jurkat e Namalwa) um histograma é apresentado, onde cada concentração utilizada representa uma condição. O gráfico em barras representa a média  $\pm$  DP da porcentagem de células nas fases do ciclo celular em  $G_0/G_1$ , S e  $G_2/M$  após o tratamento com reversina em pelo menos quatro experimentos diferentes. O valor  $p$  e as porcentagens são indicados nos gráficos; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; ANOVA e pós teste Bonferroni.

**Figura 12. O tratamento com reversina promove aumento no tamanho das células Jurkat e Namalwa.**

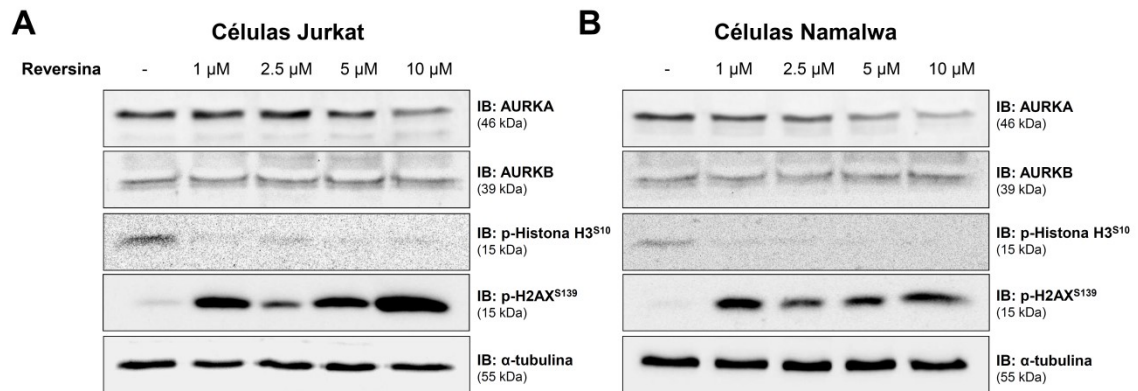


Imunofluorescência e quantificação do tamanho de células Jurkat (**A**) e Namalwa (**B**) após o tratamento com reversina a 5  $\mu\text{M}$ , mostrando a marcação por  $\alpha$ -tubulina (verde) e DAPI (azul). O MERGE representa a sobreposição das imagens. As escalas são mostradas nas figuras (50  $\mu\text{m}$ ). Os gráficos em barra representam os achados morfológicos de no mínimo 15 células para cada condição. \*\*\* $p < 0,001$ ; Teste  $t$  de Student.

#### 4.1.5. O tratamento com reversina reduz a atividade de AURKB e induz marcadores de dano no DNA

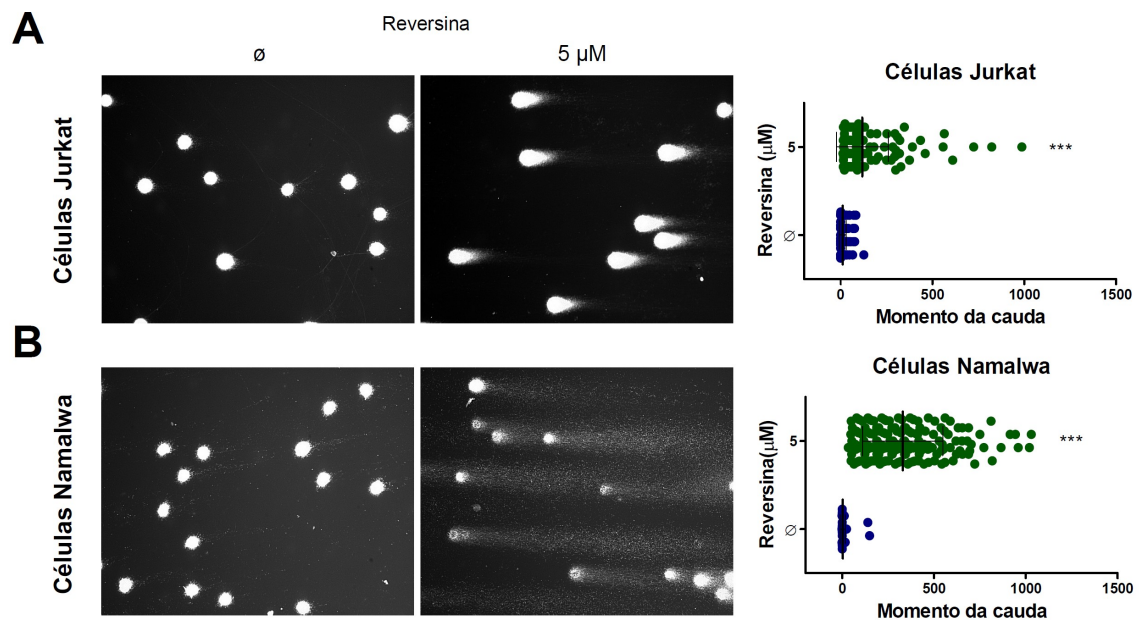
Uma redução da expressão protéica de AURKA e da atividade de AURKB, como evidenciada pela redução e fosforilação da histona H3, foi observada em células Jurkat e Namalwa após a exposição à reversina (Figura 13). Adicionalmente, marcadores de dano no DNA, incluindo a fosforilação da histona H2AX (Figura 13) e a presença de células “cometa” foram observados após o tratamento com reversina (Figura 14).

**Figura 13. O tratamento com reversina reduz a atividade de AURKB e promove dano em DNA.**



A análise protéica das proteínas AURKA, AURKB, p-histona H3<sup>S10</sup> e p-H2AX<sup>S139</sup> em extrato total de células Jurkat (**A**) e Namalwa (**B**) tratadas com concentrações crescentes de reversina (veículo, 1, 2.5, 5 ou 10 μM) por 24 horas; membranas foram incubadas com anticorpo para a detecção da respectiva proteína analisada ou α-tubulina. A revelação foi realizada pelo sistema SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate system e o equipamento G:BOX Chemi XX6 gel doc.

**Figura 14. O ensaio cometa evidencia dano no DNA causado por reversina em células Jurkat e Namalwa.**



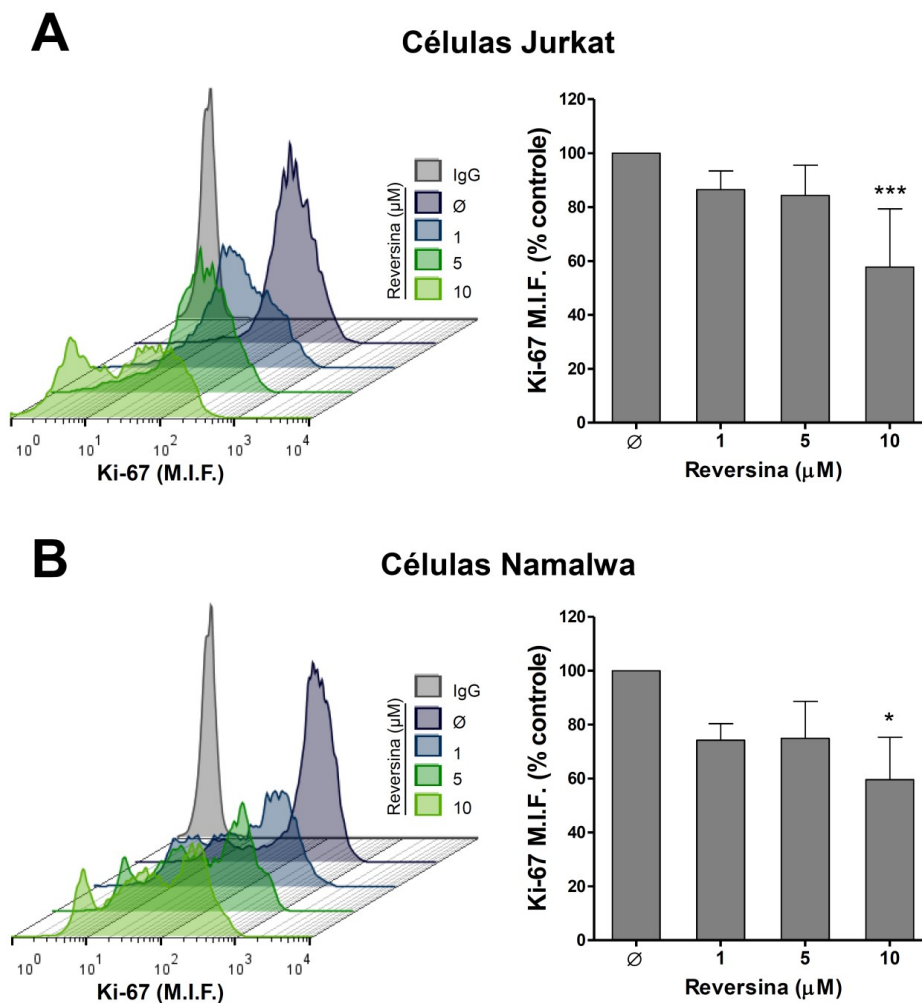
Ensaio de cometa para células Jurkat (**A**) e Namalwa (**B**) tratadas com reversina de 5 μM ou veículo por 24 horas de pelo menos 150 cometas de células para cada condição em dois experimentos independentes. Os gráficos de dispersão representam os valores do momento da cauda (razão DNA da cabeça/cauda) obtidos usando o software LUCIA Comet Assay™. \*\*\* $p < 0,001$ ; Teste t de Student.

#### 4.1.6. O tratamento com reversina reduz a proliferação celular e o crescimento clonal autônomo



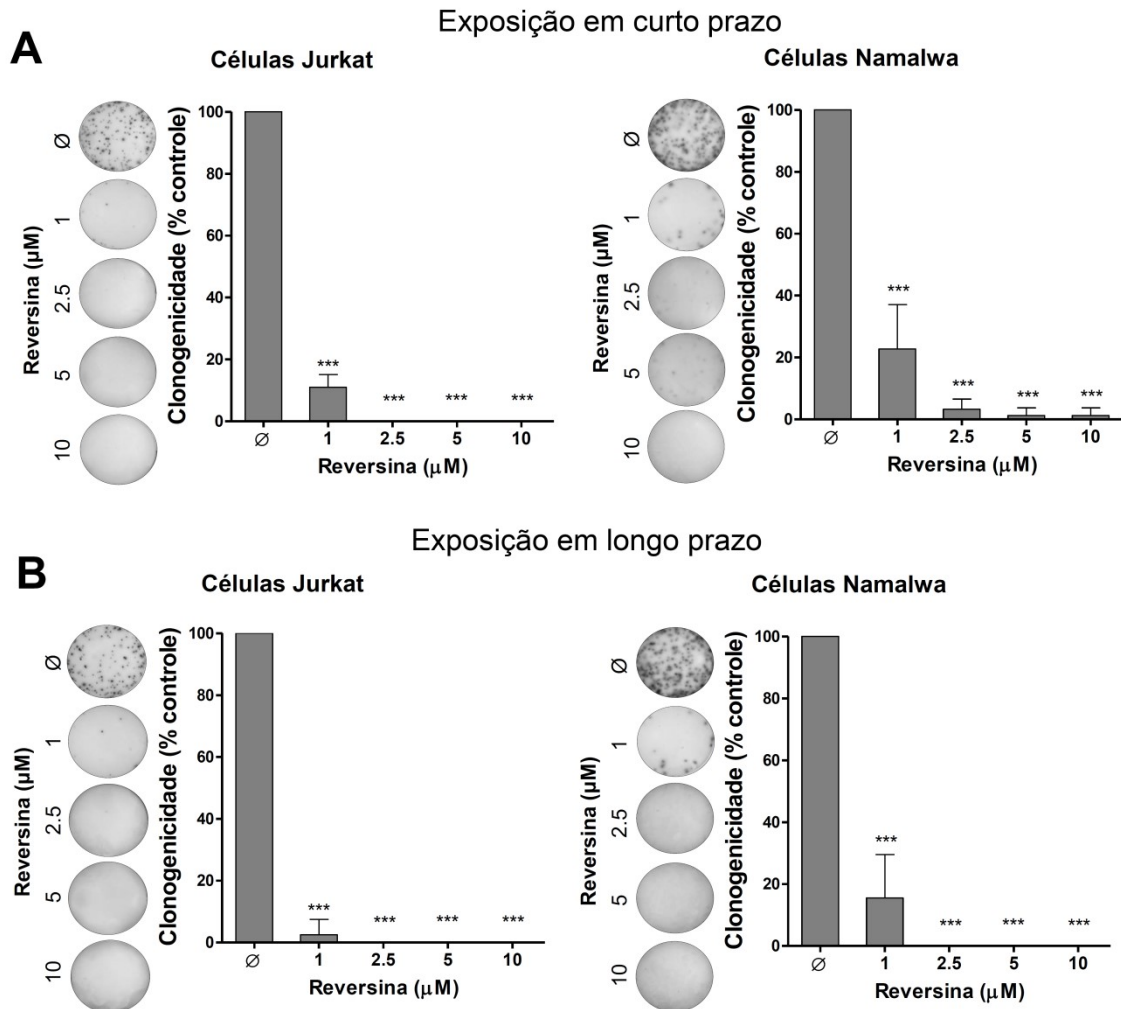
Em células Jurkat e Namalwa, a exposição em curto prazo à reversina reduziu significativamente a proliferação celular ( $p < 0,05$ ; Figura 15). A seguir, o crescimento clonal autônomo foi avaliado. Notavelmente, o tratamento com reversina em curto prazo (24 horas) e em longo prazo (10 dias) reduziu a clonogenicidade em ambas as linhagens celulares de LLA ( $p < 0,001$ ; Figura 16). Esses dados indicam que a exposição à reversina durante a primeira mitose leva a uma parada irreversível da proliferação celular.

**Figura 15. O tratamento com reversina reduz a capacidade proliferativa das células Jurkat e Namalwa.**



A intensidade média de fluorescência (M.I.F.) de Ki-67 foi determinada por citometria de fluxo em células Jurkat (**A**) ou Namalwa (**B**) tratadas com reversina (veículo [Ø], 1, 2,5, 5, 10  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas; Os histogramas para cada condição são ilustrados. Os gráficos de barras representam a M.I.F de Ki-67 normalizada para as respectivas células de controle e os resultados são mostrados como média  $\pm$  DP de pelo menos quatro experimentos independentes. Os valores de  $p$  e as linhagens celulares são indicados nos gráficos; \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Figura 16. O tratamento com reversina reduz o crescimento clonal autônomo de linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda.



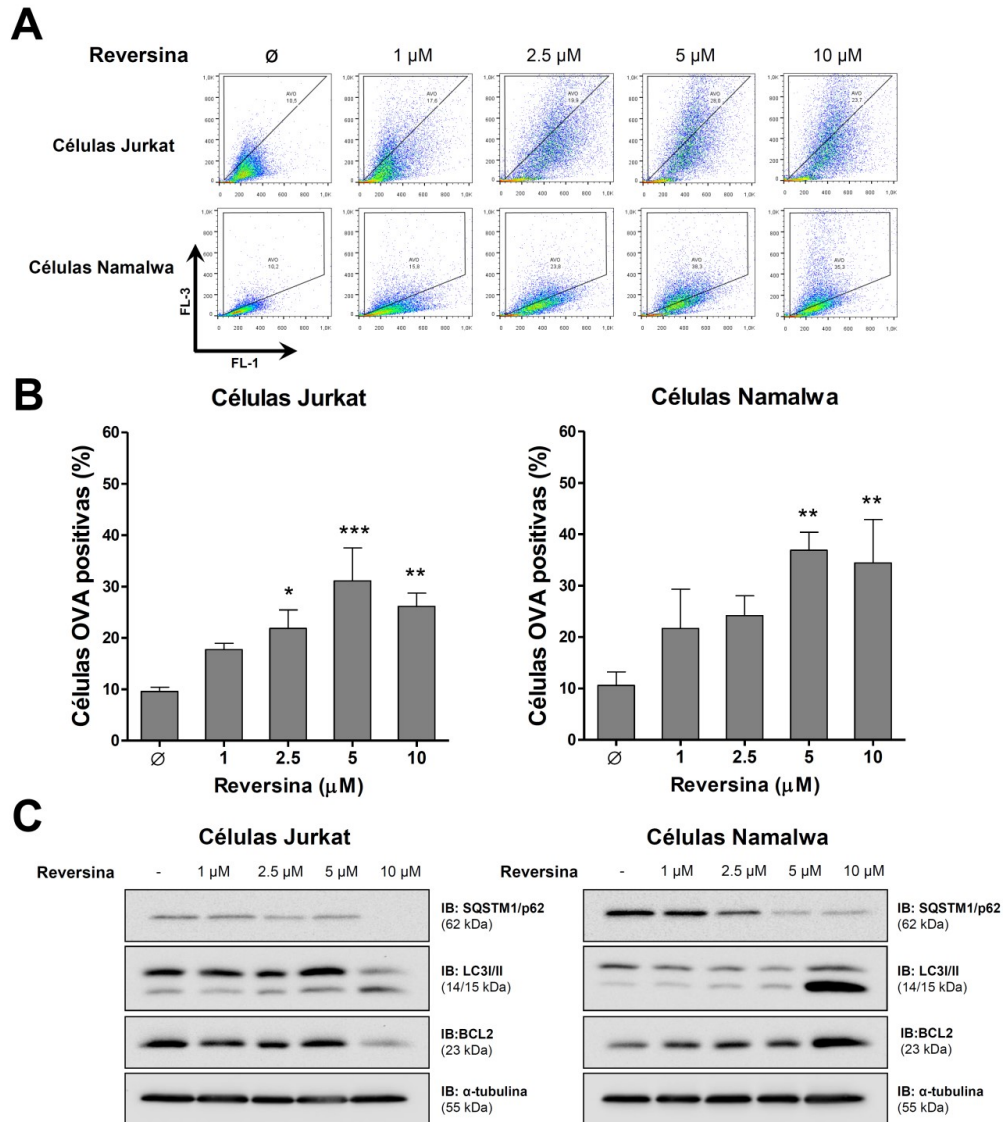
As colônias contendo células viáveis foram detectadas por MTT após 10 dias cultivo das células Jurkat e Namalwa tratadas com reversina (1, 2,5, 5, 10 μM) por 24 horas (exposição curta) **(A)** ou por 10 dias (exposição longa) **(B)**. As imagens das colônias ilustram um experimento e os gráficos de barras mostram a média ± DP de pelo menos quatro experimentos independentes. \*\*\* $p < 0,0001$ ; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

#### 4.1.7. O tratamento com reversina induz o fluxo autofágico em linhagens celulares de LLA

Estudos recentes têm sido relatados que o tratamento com reversina induz a autofagia em tumores sólidos<sup>69,71,72,73</sup>, mas os mecanismos moleculares envolvidos permanecem incertos. Em linhagens celulares de LLA, o tratamento com reversina induziu marcadores celulares e moleculares de autofagia, incluindo aumento de

organelas vesiculares ácidas ( $p < 0,05$ , Figura 17A-B) e expressão de LC3II, bem como consumo de SQSTM1/p62 (Figura 17C).

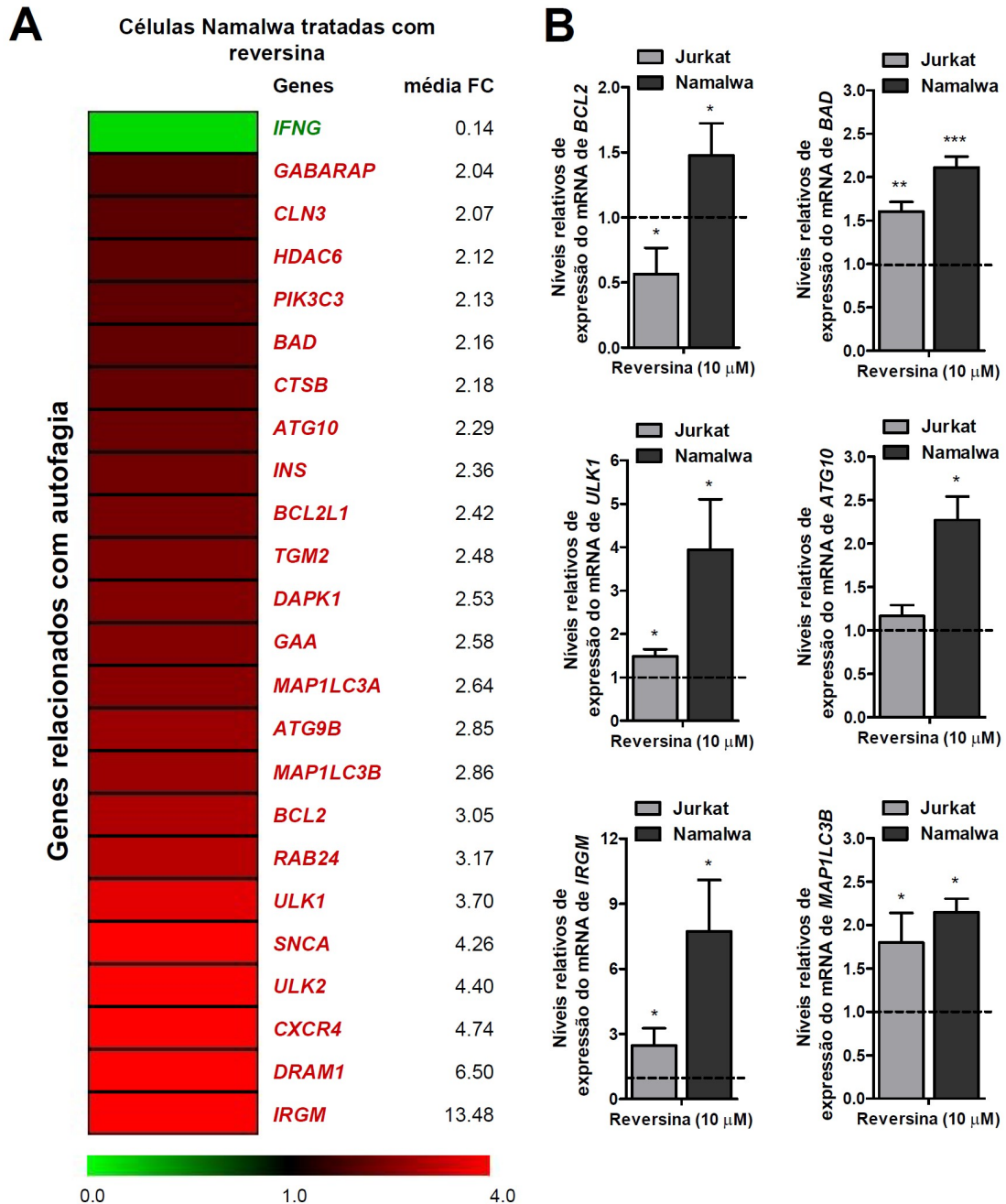
**Figura 17. O tratamento com reversina desencadeia a formação de autofagossomos em células de LLA.**



(A) As organelas vesiculares ácidas foram detectadas por meio de citometria de fluxo em células Jurkat e Namalwa tratadas com concentrações diferentes de reversina (veículo [Ø], 1, 2.5, 5, 10 µM) por 24 horas usando o método de marcação com laranja de acridina. Gráficos de pontos representativos são apresentados para cada condição; O quadrante “AVO” contém células positivas para o canal FL-3 que é caracterizado pelo aumento na formação de organelas vesiculares ácidas. (B) os gráficos em barras mostram a média  $\pm$  DP de no mínimo três experimentos diferentes. Os valores de  $p$  e as linhagens celulares são indicados nos gráficos; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ ; ANOVA e pós teste Bonferroni. (C) A análise das proteínas LC3BI/II, p62/SQSTM1, e BCL2 a partir de extrato total celular de células Jurkat e Namalwa tratadas com concentrações crescentes de reversina por 24 horas foram realizadas por Western blot; as membranas foram incubadas com anticorpo específico para a proteína desejada ou  $\alpha$ -tubulina como controle constitutivo; o desenvolvimento foi feito pelo sistema SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate usando o programa G:BOX Chemi X66.

Buscando entender os mecanismos moleculares envolvidos na autofagia induzida pelo tratamento com reversina, um *PCR array* contendo 84 genes relacionados com a regulação da autofagia foi realizado. Em células Namalwa, 25 dos 84 genes investigados foram modulados após o tratamento com reversina (Figura 18A). Baseado nos efeitos celulares observados após o tratamento com reversina, seis genes (*BCL2*, *BAD*, *ULK1*, *ATG10*, *IRGM* e *MAP1LC3B*) foram selecionado para validação em um maior número de experimentos em células Jurkat e Namalwa. A expressão de *BCL2* diminuiu nas células Jurkat e aumentou nas células Namalwa, o que corrobora nossos resultados de análise protéica por Western blot e dados dos ensaios de apoptose. Os níveis de mRNA de *BAD*, *ULK1*, *IRGM* e *MAP1LC3B* aumentaram em ambas linhagens após o tratamento com reversina ( $p < 0.05$ ). Em células Namalwa, mas não em células Jurkat, a expressão de *ATG10* aumentou após o tratamento com reversina ( $p < 0.05$ , Figura 18B).

Figura 18. O tratamento com reversina modula a expressão de genes relacionados à indução e sustentação do fluxo autofágico em células Jurkat e Namalwa.



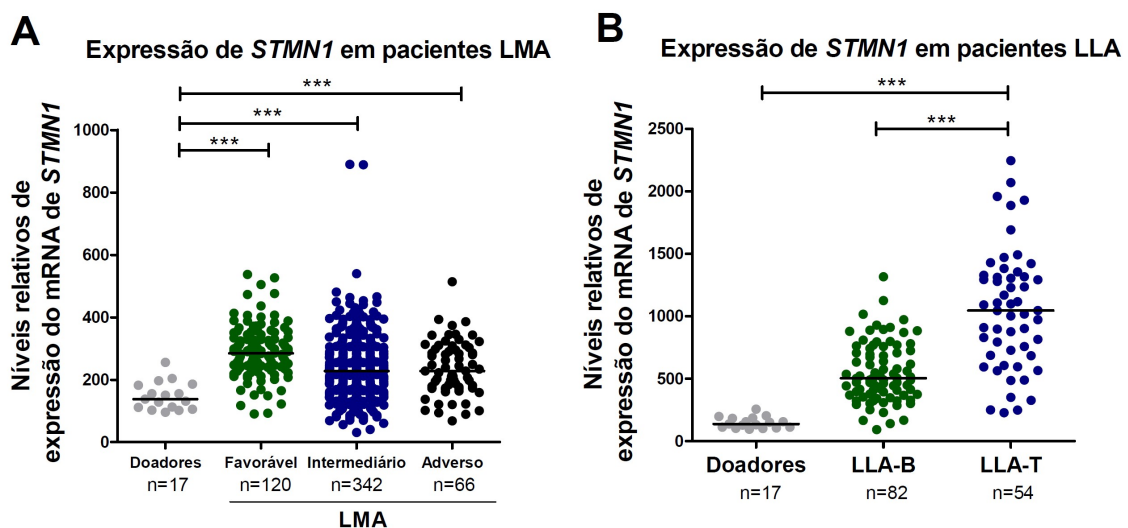
(A) Expressão de genes relacionados à autofagia demonstrando um *fold-change* (FC)  $\geq 2$  nas células Namalwa tratadas com reversina (10  $\mu\text{M}$ ) em comparação com células tratadas com DMSO que foram incluídas no *heatmap*. Dois experimentos diferentes para cada condição foram realizados para a análise; em verde observa-se os níveis de mRNA diminuídos e em vermelho os níveis de mRNA aumentados. (B) Expressão de mRNA de *BCL2*, *BAD*, *ULK1*, *ATG10*, *IRGM*, e *MAP1LC3B* em células Jurkat e Namalwa tratadas com reversina (10  $\mu\text{M}$ ; n=4). As amostras de células controle (tratadas com veículo) foram usadas como amostra calibradora e estão representadas pela linha tracejada. Os genes *HPRT1* e *ACTB* foram usados como genes de referência. Os valores de *p* e linhagens celulares estão indicados nos gráficos. \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001; Teste *t* student.

## 4.2. Identificação de potenciais inibidores de *STMN1* e a caracterização de seus efeitos celulares em modelos de LMA e LLA

### 4.2.1. A expressão de *STMN1* é aumentada em amostras de pacientes com LMA e LLA

Utilizando dados de expressão gênica obtidos através de análise de microarranjos de cDNA (<http://amazonia.transcriptome.eu>), a expressão de *STMN1* foi aumentada em amostras de pacientes portadores de LMA independente da estratificação de risco (favorável, intermediário e adverso) quando comparados com a expressão dessa em doadores normais. Em amostras de pacientes portadores de LLA-B e LLA-T, também observou o aumento da expressão de mRNA de *STMN1*, quando comparado com linfócitos normais  $p < 0.0001$  (Figura 19).

**Figura 19.** Os níveis de expressão gênica de *STMN1* são aumentados em amostras de pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) e leucemia linfoblástica aguda (LLA).



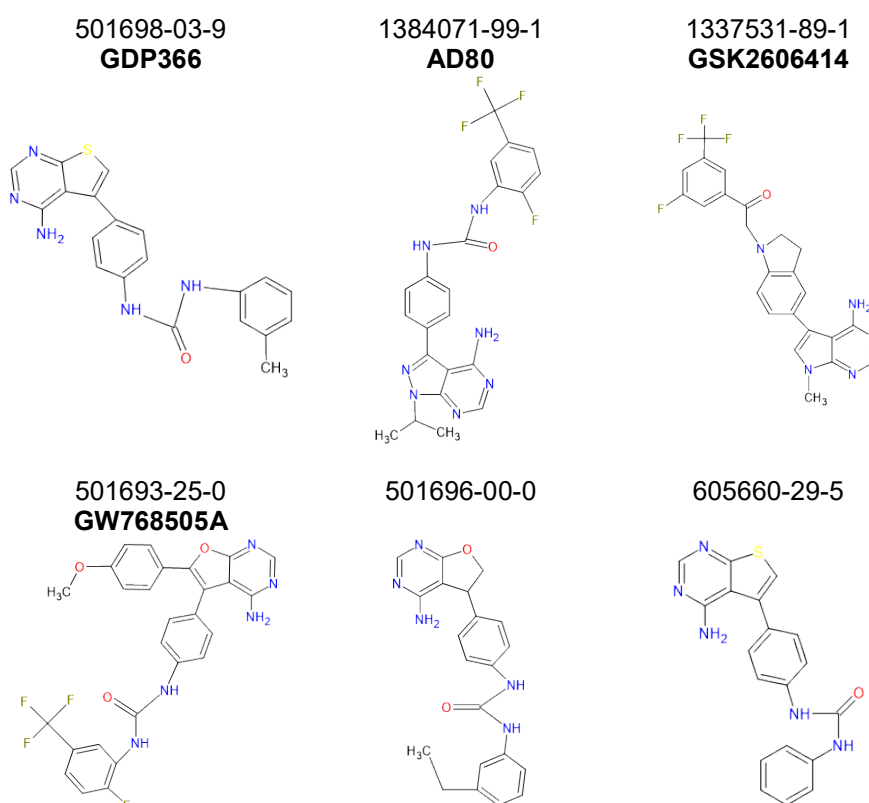
Níveis de RNAm de *STMN1* (A) (200783\_s\_at e 217714\_s\_at) em amostras de portadores de LMA separados pelo grau de risco (favorável, intermediário, adverso) comparado com doadores normais. (B) Níveis de RNAm de *STMN1* (200783\_s\_at e 217714\_s\_at) em amostras de portadores de LLA comparados entre leucócitos normais (LN), amostras de LLA-B e LLA-T. O eixo "Y" representa os dados de expressão gênica obtidos do banco de dados AmaZonia! 2008 (<http://amazonia.transcriptome.eu>) que foram gerados a partir de dados de microarranjos de cDNA *Affymetrix HGU133 plus 2.0 arrays*. Os conjuntos de dados foram cruzados usando números de identificação específicos de tumores. Os números de indivíduos para cada grupo são indicados. \*\*\* $p < 0,0001$ ; Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste Dunn.



#### 4.2.2. Análise por quimiinformática identificou análogos do composto GDP366

A análise através de quimiinformática considerando a estrutura química da molécula GDP366 (o único inibidor de STMN1 reportado até o momento<sup>86</sup>) como referência identificou cinco compostos com alto grau de similaridade estrutural (Figura 20). Os compostos 1337531-89-1 (GSK2606414), 501693-25-0 (GW768505A) e 1384071-99-1 (AD80) estavam disponíveis comercialmente e foram utilizados no presente estudo. Os demais compostos (501696-00-0 e 605660-29-5) foram descritos como tendo atividade inibitória para VEGF e não estavam disponíveis comercialmente na época da aquisição do material.

**Figura 20. Identificação de análogos de GDP366 por quimiinformática.**

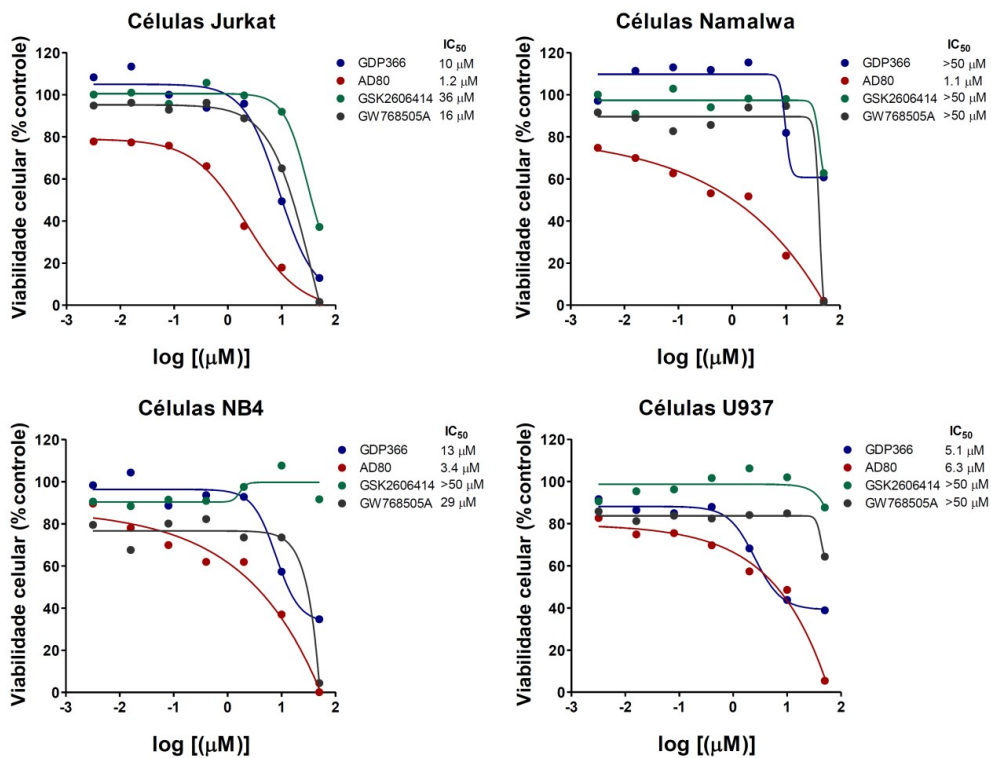


Análise por quimiinformática baseada na estrutura do GDP366 (único inibidor descrito para STMN1) identificou cinco compostos com alto grau de similaridade estrutural. A representação das estruturas químicas e códigos CAS da substância de referência (GDP366) e dos compostos identificados estão ilustrados.

#### 4.2.3. O tratamento com AD80 apresentou a maior potência e eficácia nos modelos celulares de LLA e LMA.

Os efeitos de GDP366 e de seus três análogos sob a viabilidade celular foram investigados em células Jurkat (LLA-T), Namalwa (LLA-B), NBA (LMA) e U937 (LMA). As células leucêmicas foram expostas a concentrações crescente dos inibidores por 72 horas. O composto AD80 apresentou o menor  $IC_{50}$  dentre os compostos testados (Figure 21). Devido a baixa potência dos compostos GSK2606414 e GW768505A, não foi possível determinar os valores de  $IC_{50}$  nas linhagens celulares Namalwa, NB4 e/ou U937. O compostos de referência, GDP366, apresentou  $IC_{50}$  de 10  $\mu M$  para células Jurkat, 13  $\mu M$  para células NB4, 5,1  $\mu M$  para as células U937. Não foi possível determinar o  $IC_{50}$  de GDP366 em células Namalwa (>50  $\mu M$ ). Desta forma, os estudos subsequentes foram realizados como composto de referência para GDP336 e o seu análogo mais promissor, AD80 (Figure 21).

**Figura 21. Efeitos do tratamento com GDP366 e seus análogos identificados por quimioinformática sob a viabilidade celular de linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia mieloide aguda (LMA).**

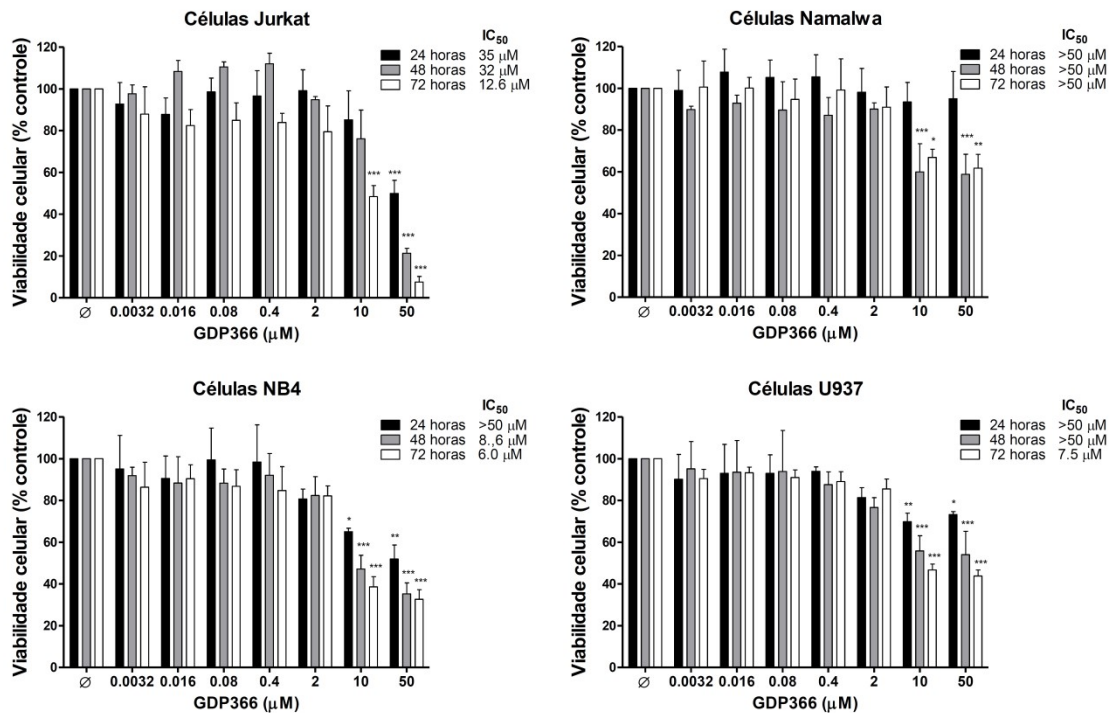


As células Jurkat (LLA-T), Namalwa (LLA-B), NB4 (LMA) e U937 (LMA) foram expostas ao tratamento com concentrações crescentes (0.0032, 0.016, 0.08, 0.4, 2, 10 e 50 $\mu M$ ) dos fármacos selecionados por 72 horas. Os valores de  $IC_{50}$  para cada composto estão descritos.



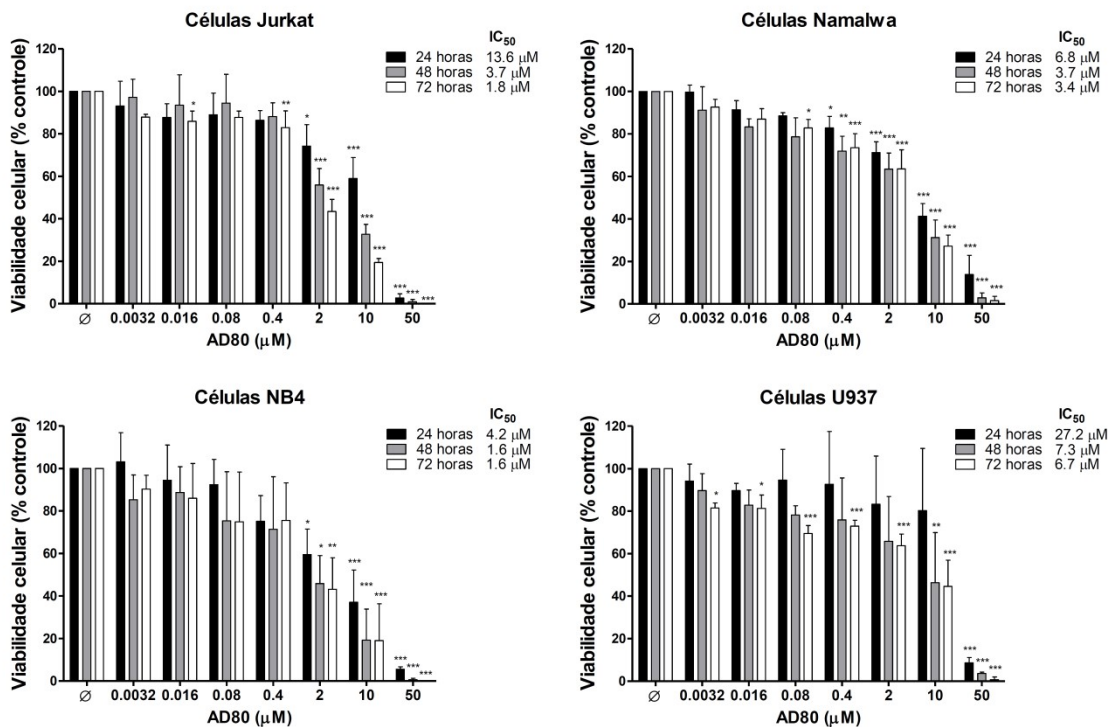
Em seguida, a determinação das curvas de concentração e tempo resposta para o GDP366 e AD80 foi realizada para as linhagens celulares de LLA e LMA. Ambos os compostos GDP366 (Figura 22) e AD80 (Figura 23) apresentaram efeitos concentração e tempo dependente.

**Figura 22. O tratamento com GDP366 reduz a viabilidade celular de forma concentração e tempo dependente em modelos celulares de leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia mielóide aguda (LMA).**



As células Jurkat (LLA-T), Namalwa (LLA-B), NB4 (LMA) e U937 (LMA) foram expostas ao tratamento com concentrações crescentes (0,0032; 0,016; 0,08; 0,4; 2; 10 e 50μM) dos fármacos selecionados por 24, 48 e 72 horas. Os valores expressos representam à porcentagem de células viáveis para cada condição comparadas ao controle (células tratadas com veículo [∅]). Os gráficos de barras representam à média ± DP de no mínimo quatro experimentos independentes. Os valores de *p* e as linhagens celulares são indicados nos gráficos; \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.0001; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

**Figura 23. O tratamento com AD80 reduz a viabilidade celular de forma concentração e tempo dependente em modelos celulares de leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia mielóide aguda (LMA).**

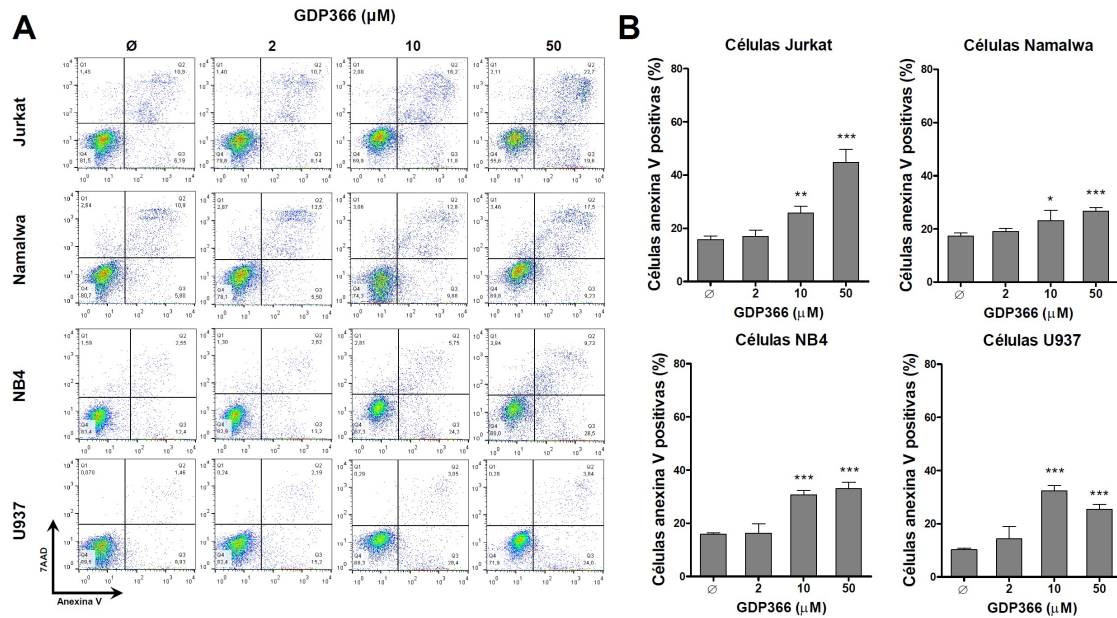


As células Jurkat (LLA-T), Namalwa (LLA-B), NB4 (LMA) e U937 (LMA) foram expostas ao tratamento com concentrações crescentes (0,0032; 0,016; 0,08; 0,4; 2; 10 e 50µM) dos fármacos selecionados por 24, 48 e 72 horas. Os valores expressos representam à porcentagem de células viáveis para cada condição comparadas ao controle (células tratadas com veículo [Ø]). Os gráficos de barras representam a média  $\pm$  DP de no mínimo quatro experimentos independentes. Os valores  $p$  e as linhagens celulares são indicados nos gráficos; \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.0001; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

#### 4.2.4. O tratamento com GDP366 e AD80 induz apoptose em linhagens celulares de LLA e LMA

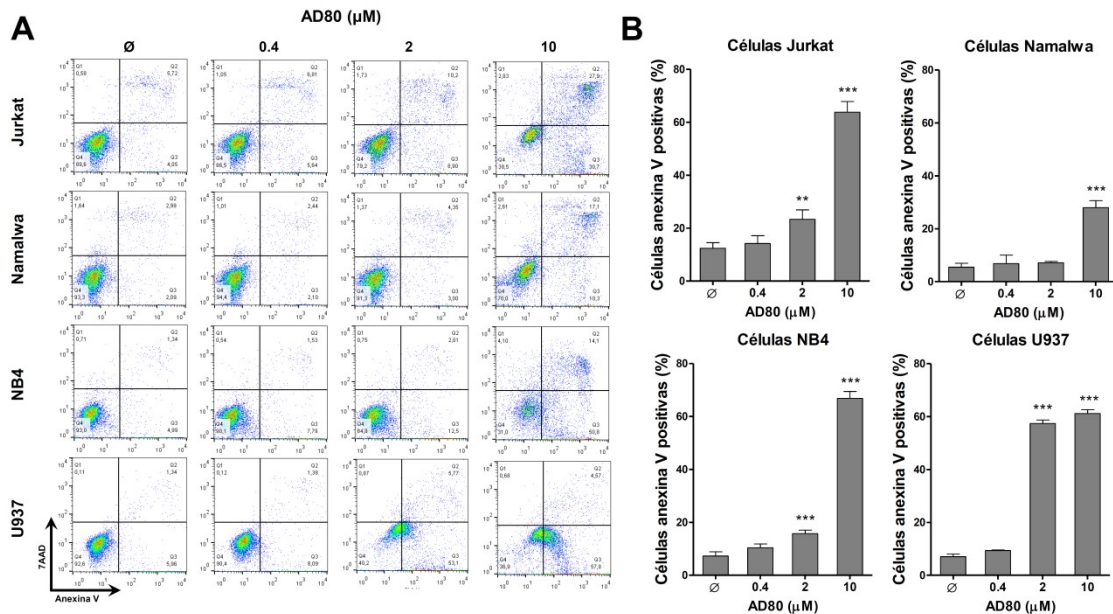
Utilizando a marcação com anexina V/7ADD e citometria de fluxo foram evidenciados que o tratamento com concentrações crescentes de GDP366 (Figura 24) e AD80 (Figura 25) induz apoptose de maneira concentração dependente em todas as linhagens leucêmicas testadas ( $p$ <0.05), sendo as células Namalwa menos sensível a apoptose induzida pelos fármacos.

**Figura 24. O tratamento com GDP366 induz apoptose em linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia mieloide aguda (LMA).**



**(A)** Gráficos de pontos representativos de células Jurkat (LLA-T), Namalwa (LLA-B), NB4 (LMA) e U937 (LMA) tratadas com concentrações crescentes de GDP366 ou veículo (Ø) por 24 horas. As células apoptóticas foram identificadas pela marcação com anexina V e 7AAD, detectadas por citometria de fluxo. Os quadrantes superiores e inferiores direito (Q2+Q3) contêm a população apoptótica (células marcadas com anexina V). **(B)** os gráficos em barra representam à média ± DP da quantificação de células apoptóticas de mínimo quatro experimentos independentes. Os valores de *p* são indicados nos gráficos; \**p*<0.05, \*\*\**p*<0.0001; ANOVA e pós teste Bonferroni.

**Figura 25. O tratamento com AD80 induz apoptose em linhagens celulares de leucemia infoblástica aguda (LLA) e leucemia mieloide aguda (LMA).**

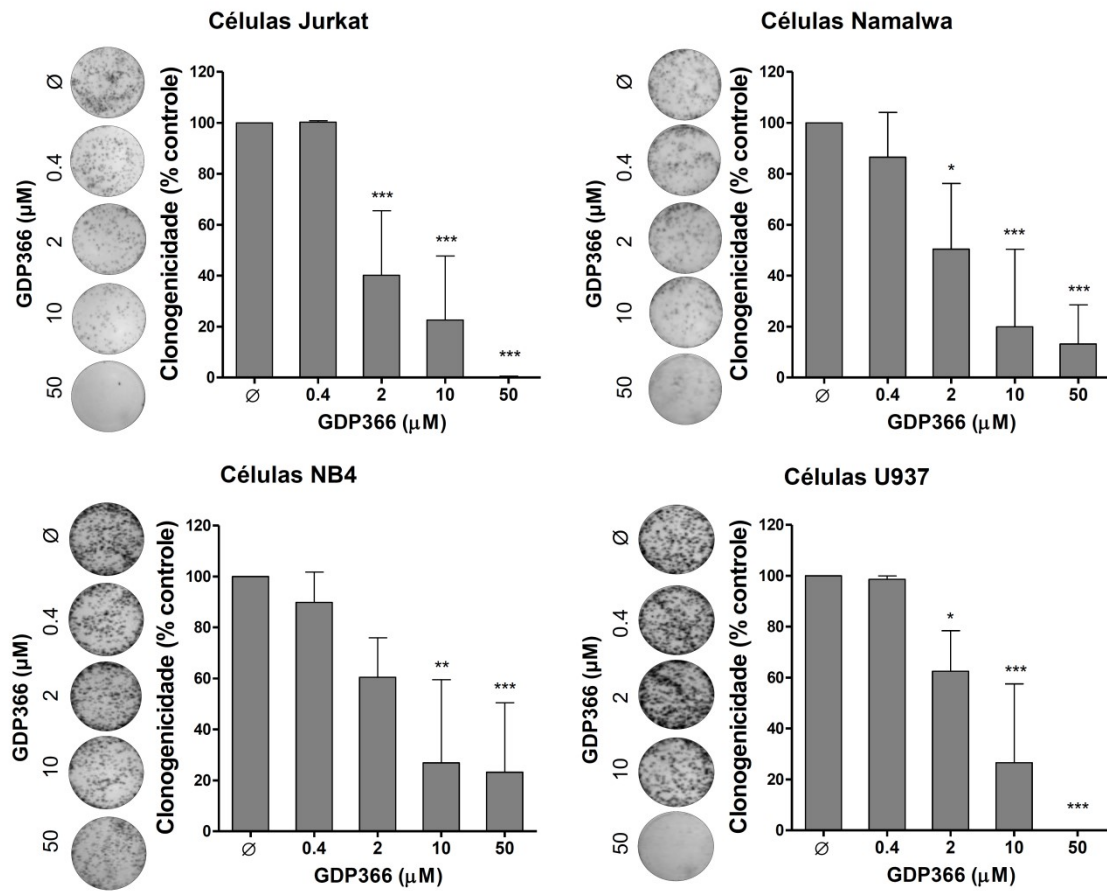


(A) Gráficos de pontos representativos de células Jurkat (LLA-T), Namalwa (LLA-B), NB4 (LMA) e U937 (LMA) tratadas com concentrações crescentes de AD80 ou veículo ( $\emptyset$ ) por 24 horas. As células apoptóticas foram identificadas pela marcação com anexina V e 7AAD, detectadas por citometria de fluxo. Os quadrantes superiores e inferiores direito (Q2+Q3) contêm a população apoptótica (células marcadas com anexina V). (B) Os gráficos em barra representam a média – DP da quantificação de células apoptóticas de mínimo quatro experimentos independentes. Os valores de  $p$  são indicados nos gráficos; \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ; ANOVA e pós teste Bonferroni.

#### 4.2.5. O tratamento com GDP366 e AD80 inibe o crescimento clonal autônomo de células de leucemias agudas

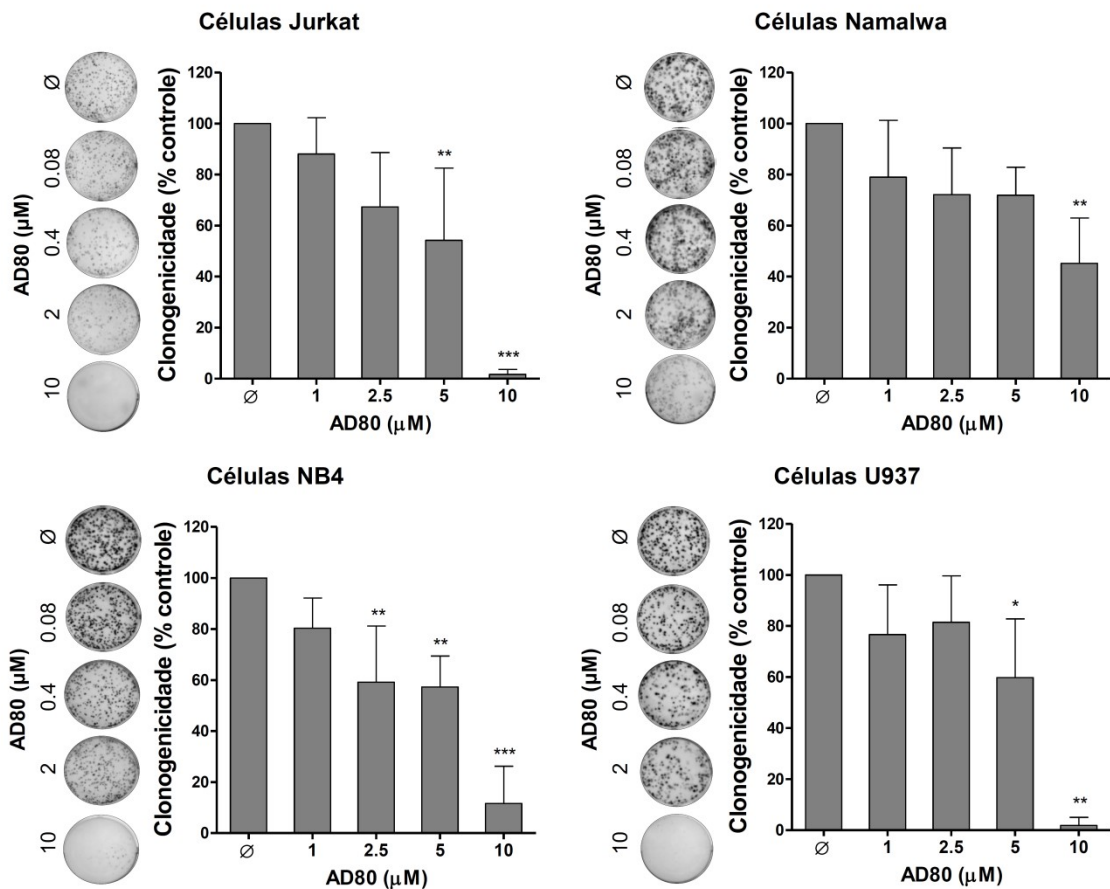
O tratamento com ambos os fármacos é capaz de reduzir a capacidade das células leucêmicas em formar colônia. Nas concentrações 10 e 50 µM, GDP366 apresentou uma redução  $\geq 20\%$  no número de colônias formadas ( $p < 0.05$ ), sendo as células NB4 mais sensíveis ao GDP366. Em células Jurkat e U937, na maior concentração utilizada (50 µM) reduziu drasticamente a clonogenicidade (Figura 26). De forma similar, o tratamento com AD80 inibiu a formação de colônias em todas as linhagens leucêmicas testadas ( $p < 0.05$ ), sendo as células Namalwa as mais resistentes (Figura 27).

**Figura 26. O tratamento com GDP366 reduz a clonogenicidade autônoma de linhagens celulares de leucemias agudas.**



As colônias contendo células viáveis foram detectadas por MTT após 10 dias de cultivo das células Jurkat (LLA-T), Namalwa (LLA-B), NB4 (LMA) e U937 (LMA) tratadas com GDP366 (veículo [∅]; 0,4; 2; 10 e 50 μM) por 10 dias. As imagens das colônias ilustram um experimento e os gráficos de barras mostram a média ± DP de pelo menos três experimentos independentes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ ; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

**Figura 27. O tratamento com AD80 reduz a clonogenicidade autônoma de linhagens celulares de leucemias agudas.**



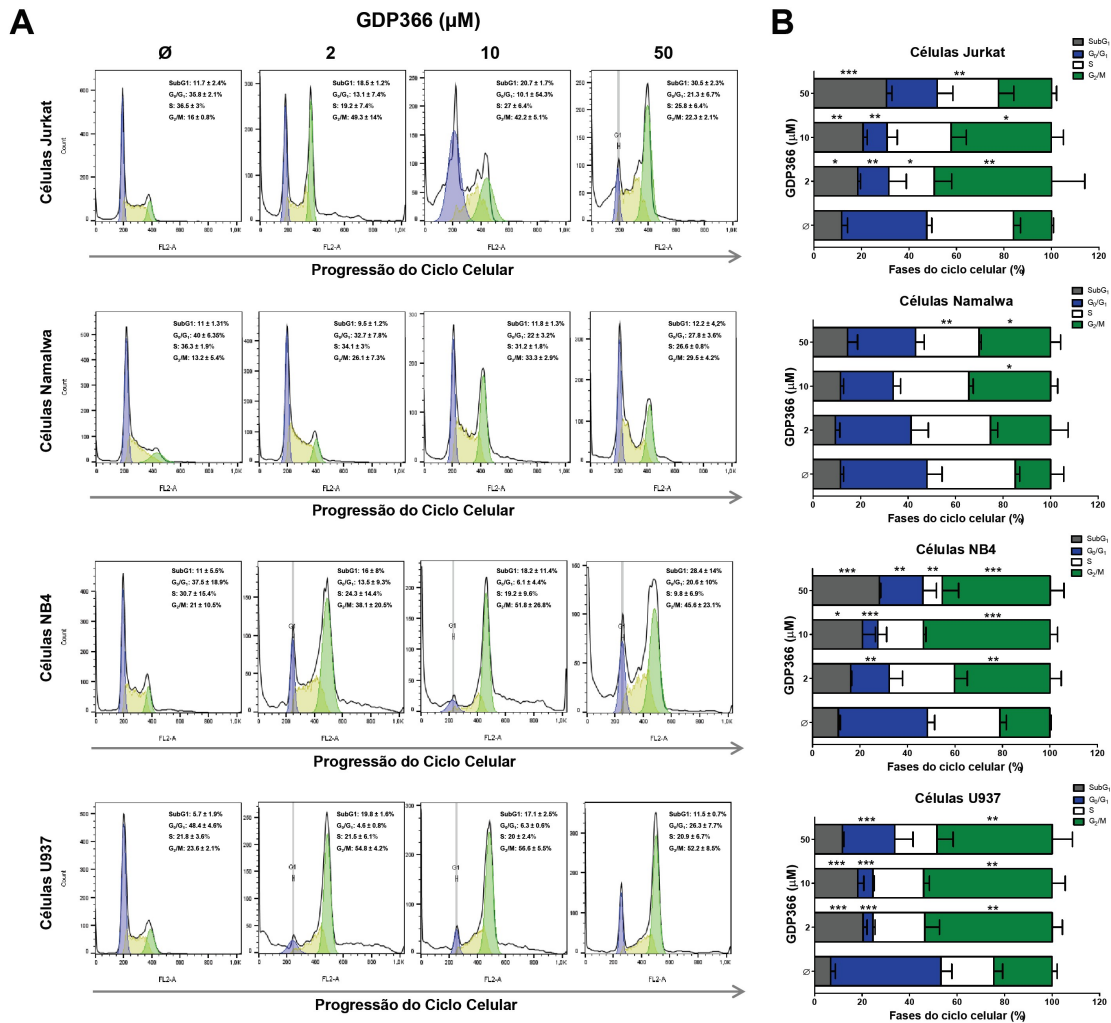
As colônias contendo células viáveis foram detectadas por MTT após 10 dias cultivo das células Jurkat (LLA-T), Namalwa (LLA-B), NB4 (LMA) e U937 (LMA) tratadas com AD80 (veículo [Ø], 0,08; 0,4, 2 e 10 µM) por 10 dias. As imagens das colônias ilustram um experimento e os gráficos de barras mostram a média ± DP de pelo menos três experimentos independentes. \*\*\* $p < 0,0001$ ; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

#### 4.2.6. O tratamento com GDP366 e AD80 induz a parada na fase G<sub>2</sub>/M do ciclo celular nas linhagens de leucemias agudas

O tratamento com baixas concentrações de GDP366 (Figura 28) e AD80 (Figura 29) induz acúmulo de células na fase G<sub>2</sub>/M do ciclo celular, enquanto as altas concentrações induzem o aumento de células na fase subG<sub>1</sub>, o que corrobora os dados obtidos em ensaios de apoptose. Em consonância com os resultados anteriores as células Namalwa foram as mais resistentes aos eventos desencadeados pelos fármacos no ciclo celular.

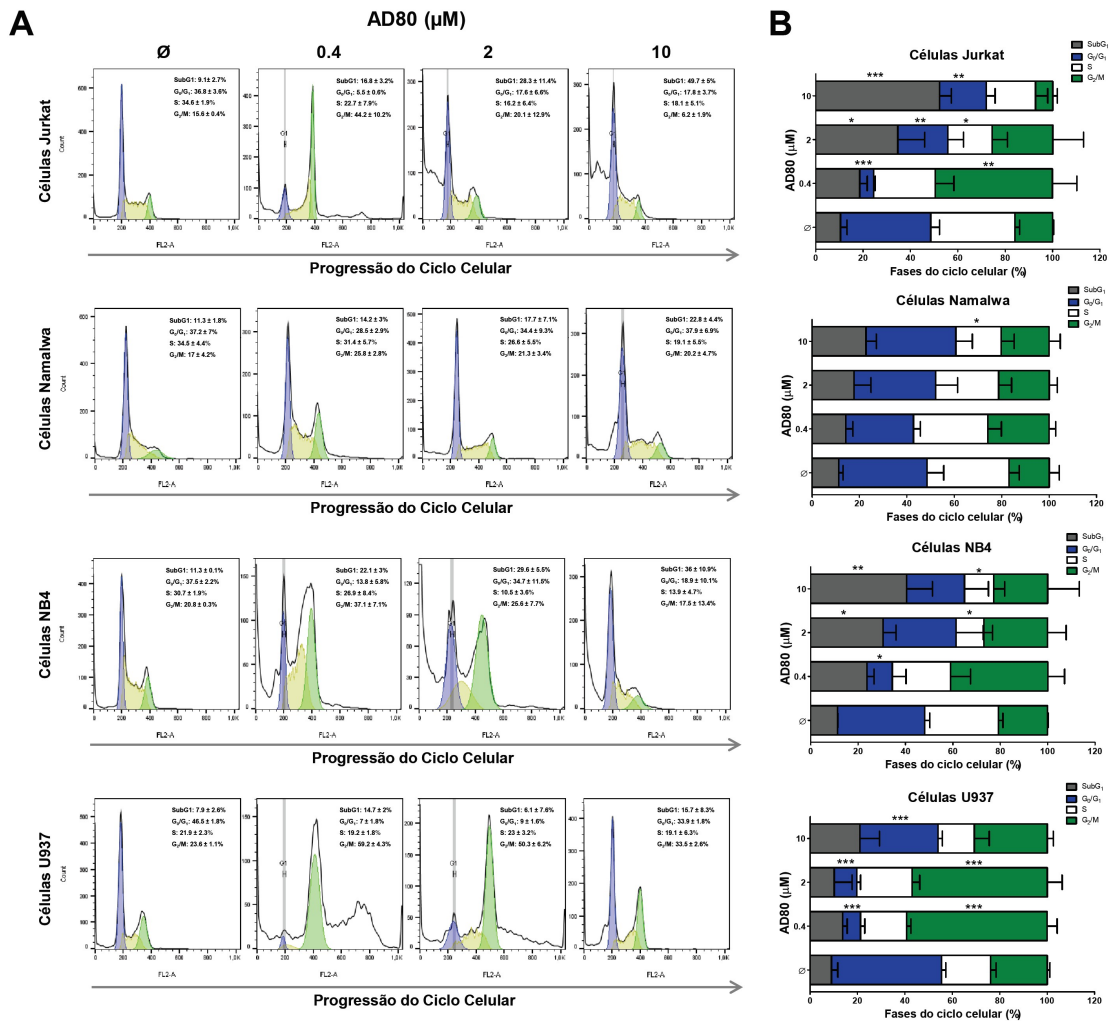


Figura 28. O tratamento com GDP366 altera a progressão do ciclo celular em modelos de leucemias agudas.



(A) A progressão do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo e as células marcadas com iodeto de propídio (PI). As células foram tratadas com GDP366 em diferentes concentrações (veículo [Ø]; 2; 10 e 50 $\mu\text{M}$ ) por 24 horas. Para cada linhagem um histograma representativo é ilustrado. (B) O gráfico em barras representa à média  $\pm$  DP da porcentagem de células nas fases do ciclo celular em SubG1, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>/M após o tratamento com GDP366 em no mínimo três experimentos independentes. Os valores *p* são indicados nos gráficos; \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001; ANOVA e pós teste Bonferroni.

**Figura 29. O tratamento com AD80 altera a progressão do ciclo celular em modelos de leucemias agudas.**



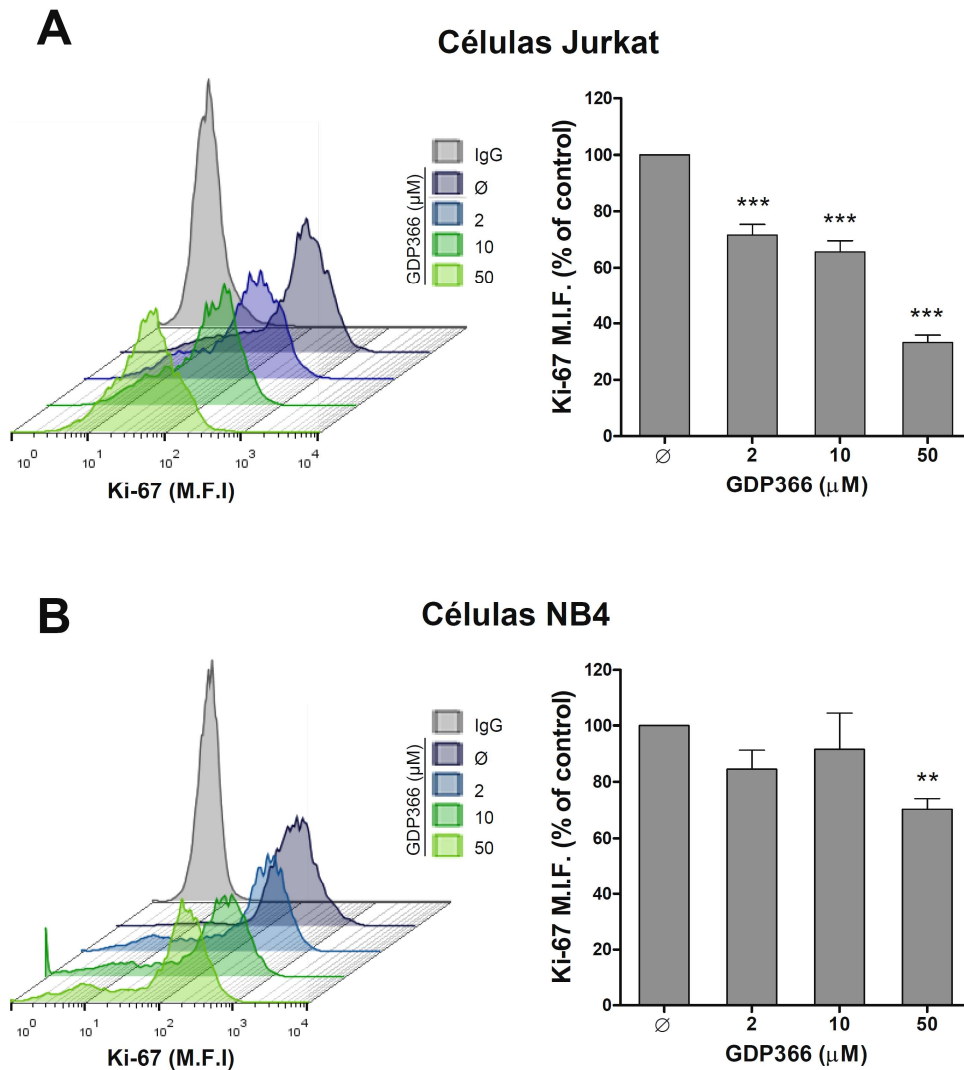
(A) A progressão do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo e as células marcadas com iodeto de propídio (PI). As células foram tratadas com AD80 em diferentes concentrações (veículo [0]; 0.4; 2 e 10 μM) por 24 horas. Para cada linhagem um histograma representativo é ilustrado. (B) O gráfico em barras representa à média ± DP da porcentagem de células nas fases do ciclo celular em SubG1, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>/M após o tratamento com AD80 em no mínimo três experimentos independentes. Os valores *p* são indicados nos gráficos; \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001; ANOVA e pós teste Bonferroni.

#### 4.2.7. O tratamento com GDP366 e AD80 reduz a proliferação celular em células Jurkat e NB4

Em células Jurkat e NB4, a exposição em curto prazo à GDP366 e AD80 reduziu a proliferação celular de forma concentração dependente (*p*<0,05; Figura 30 e 31). Corroborando dados anteriores, o AD80 apresentou maior potência na redução da proliferação celular.

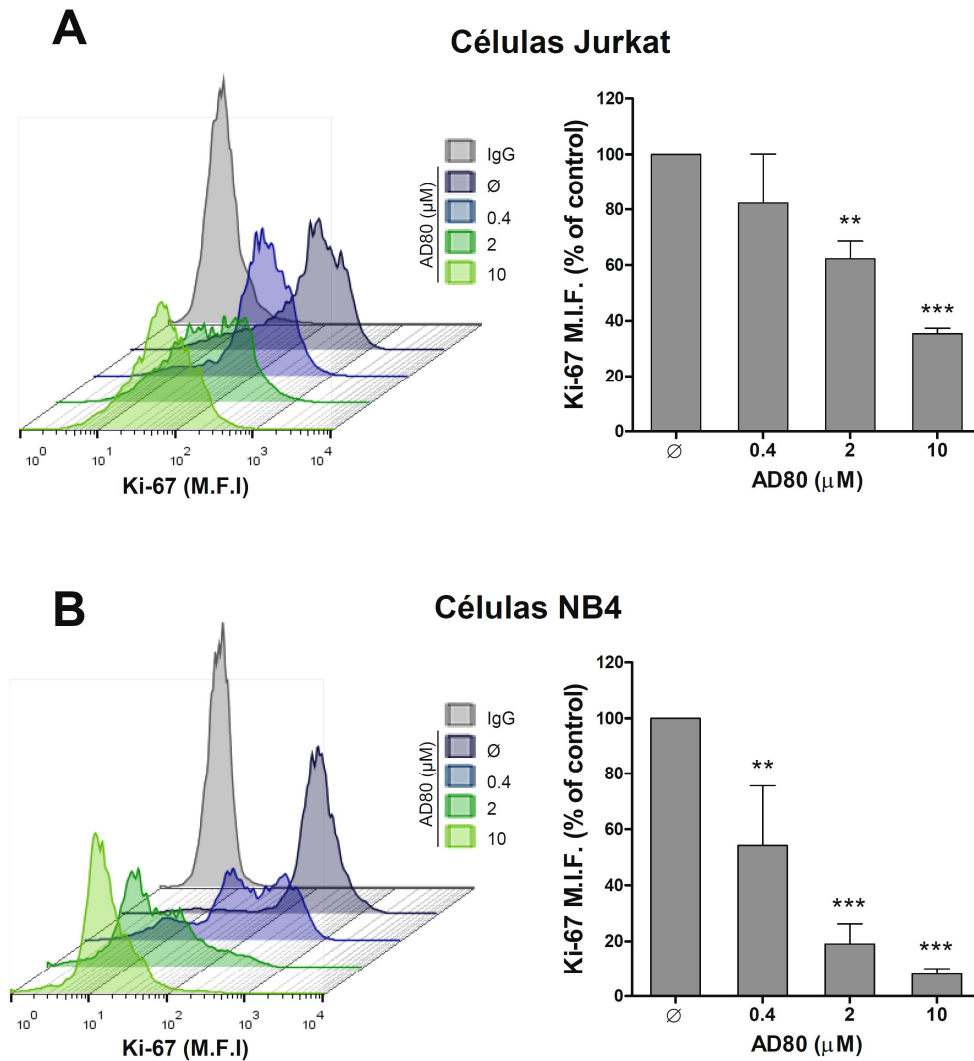


Figura 30. O tratamento com GDP36 reduz o potencial proliferativo em células Jurkat e NB4.



A intensidade média de fluorescência (M.I.F.) de Ki-67 foi determinada por citometria de fluxo em células Jurkat (**A**) ou NB4 (**B**) tratadas com GDP366 (veículo [Ø], 2, 10 e 50  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas; Os histogramas para cada condição são ilustrados. Os gráficos de barras representam a M.I.F de Ki-67 normalizada para as respectivas células de controle e os resultados são mostrados como média  $\pm$  DP de pelo menos quatro experimentos independentes. Os valores de  $p$  e as linhagens celulares são indicados nos gráficos; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Figura 31. O tratamento com AD80 reduz o potencial proliferativo em células Jurkat e NB4.

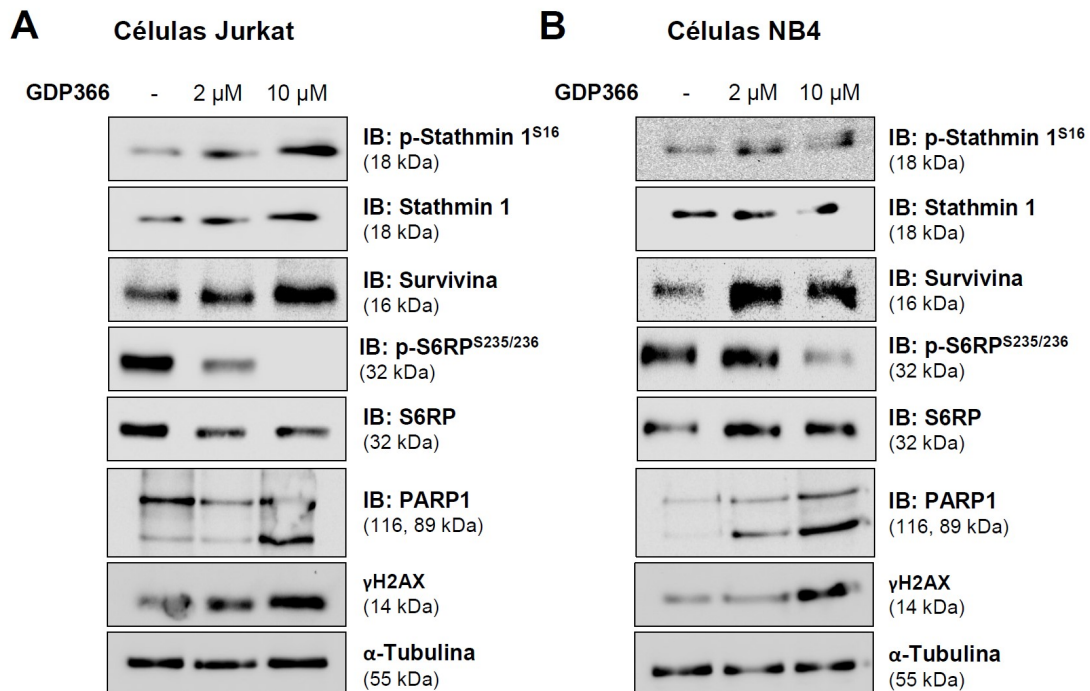


A intensidade média de fluorescência (M.I.F.) de Ki-67 foi determinada por citometria de fluxo em células Jurkat (**A**) ou NB4 (**B**) tratadas com AD80 (veículo [ $\emptyset$ ]; 0,4; 2 e 10  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas; Os histogramas para cada condição são ilustrados. Os gráficos de barras representam a M.I.F. de Ki-67 normalizada para as respectivas células de controle e os resultados são mostrados como média  $\pm$  DP de pelo menos quatro experimentos independentes. Os valores de  $p$  e as linhagens celulares são indicados nos gráficos; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

#### 4.2.8. O tratamento com GDP366 e AD80 inibiu a atividade/expressão STMN1 em células Jurkat e NB4

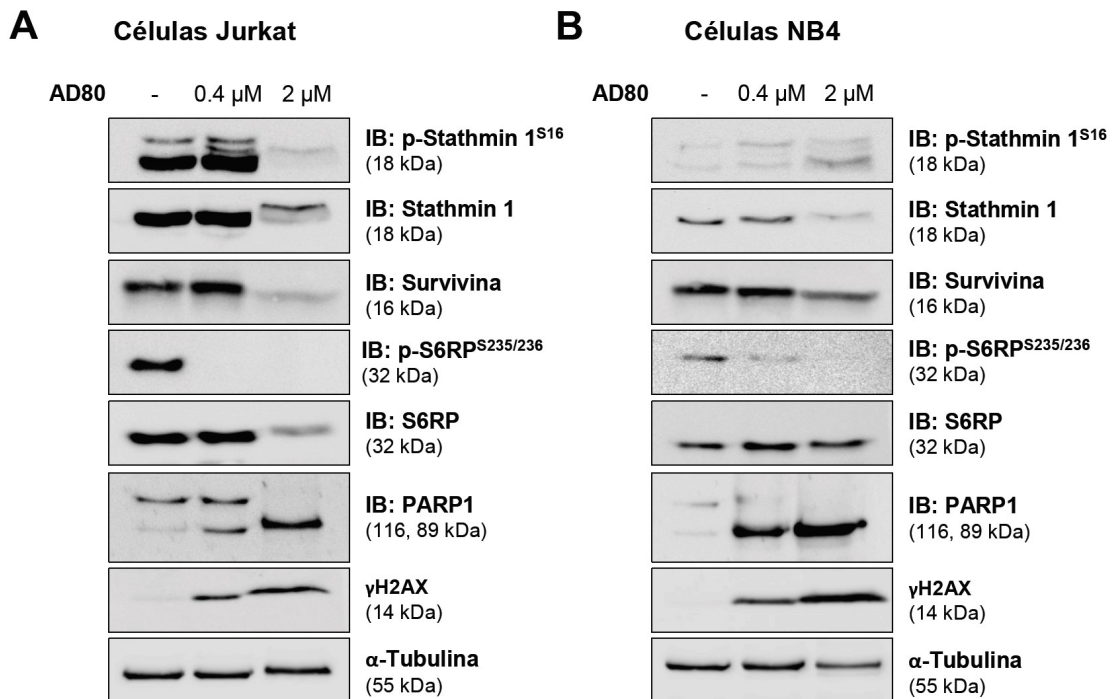
O GDP366 induz fosforilação de STMN1 (forma inativa) e apoptose (PARP1 clivada) e marcadores de danos ao DNA ( $\gamma$ H2AX) nas células Jurkat e NB4. O AD80 reduz fortemente a expressão de STMN1 e também induz a clivagem de PARP1 e a expressão de  $\gamma$ H2AX. Além disso, o AD80, mas não o GDP366, inibe efetivamente a expressão da survivina (BIRC5) nas duas linhagens celulares de leucemia testadas (Figura 30 e Figura 31).

Figura 32. O tratamento com GDP366 induz fosforilação de STMN1 e marcadores de morte celular.



A análise protéica das proteínas p-stathmin1<sup>S16</sup>, stathmin1, survivina, p-S6RP<sup>S235-236</sup>, S6RP, PARP1 e  $\gamma$ H2AX<sup>S139</sup> em extrato total de células Jurkat (A) e NB4 (B) tratadas com concentrações crescentes de GDP366 (veículo, 2 ou 10  $\mu$ M) por 24 horas; membranas foram incubadas com anticorpo para a detecção da respectiva proteína analisada ou  $\alpha$ -tubulina. A revelação foi realizada pelo sistema SuperSignal<sup>TM</sup> West Dura Extended Duration Substrate system e o equipamento G:BOX Chemi XX6 gel doc.

**Figura 33. O tratamento com AD80 reduz a expressão de STMN1 e induz marcadores de morte celular.**



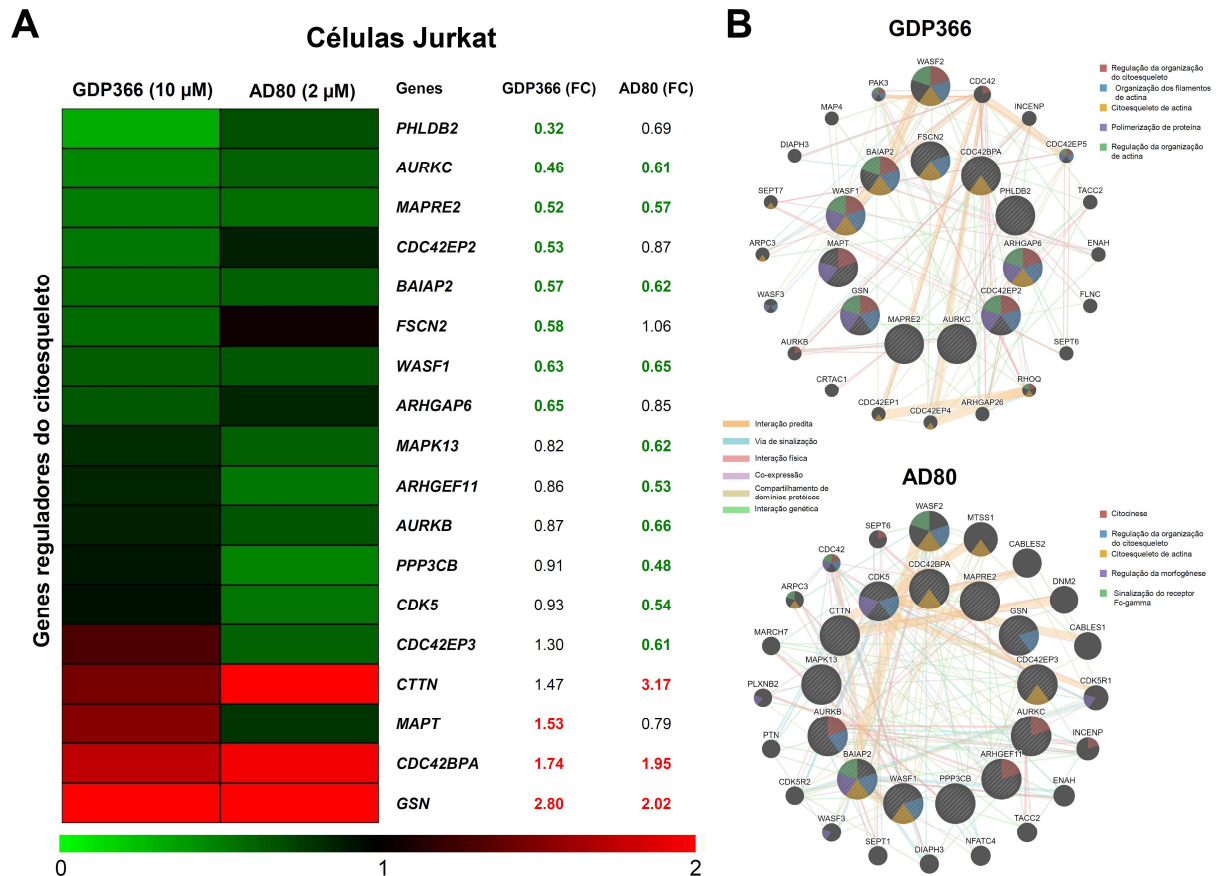
A análise protéica das proteínas p-stathmin1<sup>S16</sup>, stathmin1, survivina, p-S6RP<sup>S235-236</sup>, S6RP, PARP1 e  $\gamma$ H2AX<sup>S139</sup> em extrato total de células Jurkat (**A**) e NB4 (**B**) tratadas com concentrações crescentes de AD80 (veículo, 0,4 ou 2  $\mu$ M) por 24 horas; membranas foram incubadas com anticorpo para a detecção da respectiva proteína analisada ou  $\alpha$ -tubulina. A revelação foi realizada pelo sistema SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate system e o equipamento G:BOX Chemi XX6 gel doc.

#### 4.2.9. GDP366 e AD80 modulam genes relacionados com citoesqueleto em células Jurkat

Como estratégia exploratória dos potenciais efeitos de GDP366 e AD80 em processos relacionados ao citoesqueleto, uma análise de PCR array foi realizada. Um total de 18 dos 84 genes investigados foi modulado após tratamento, sendo 5 modulados pelo GDP366 (*PHLDB2*, *CDC42EP2*, *FSCN2*, *ARHGAP6* e *MAPT*), 7 modulados pelo AD80 (*MAPK13*, *ARHGEF11*, *AURKB*, *PPP3CB*, *CDK5*, *CDC42EP3* e *CTTN*) e 6 modulados por ambos os fármacos (*AURKC*, *MAPRE2*, *BAIAP2*, *WASF1*, *CDC42BPA* e *GSN*) (Figura 32A). Na análise utilizando a ferramenta GeneMANIA (<https://genemania.org/>) e os genes modulados em cada tratamento, destaca-se os processos relacionados com regulação e organização do citoesqueleto de actina para GDP366 e os processos relacionados com regulação

da citocinese, organização do citoesqueleto de actina e morfogênese para AD80 (Figura 32B).

Figura 34. Genes relacionados com citoesqueleto modulados por GDP366 e AD80 em células Jurkat



(A) Expressão de genes relacionados ao citoesqueleto demonstrando um *fold-change* (FC)  $\geq 1,5$  nas células Jurkat tratadas com GDP366 (10  $\mu$ M) ou AD80 (2  $\mu$ M) em comparação com células tratadas com DMSO que foram incluídas no *heatmap*. Dois experimentos diferentes para cada condição foram realizados para a análise; em verde observa-se os níveis de mRNA diminuídos e em vermelho os níveis de mRNA aumentados. (B) Análise de redes para genes modulados por GDP366 ou AD80 construída utilizando a base de dados GeneMANIA (<https://genemania.org/>). Os genes regulados para cima e para baixo no array PCR são ilustrados como círculos assurados e os genes interagindo incluídos pela modelagem do software são indicados por círculos sem assura. As principais interações entre os genes são indicadas por linhas coloridas e os cinco principais processos celulares são descritos na Figura.

## 5.0. DISCUSSÃO

Nesse estudo, um dos objetivos específicos foi investigar efeitos moleculares e celulares do tratamento com reversina em modelos de LLA, uma vez que os efeitos deste fármaco já foram previamente descritos em modelos de LMA<sup>66,76</sup>. Como já reportado por nosso grupo de pesquisa e outros autores anteriormente, esse fármaco induz apoptose e catástrofe mitótica em neoplasias mielóides, incluindo LMA<sup>66</sup>, leucemia mielóide crônica<sup>75</sup> e neoplasia mieloproliferativa positiva JAK2<sup>V617F</sup><sup>76</sup>. A reversina atua como um inibidor de múltiplas quinases<sup>66,74,92</sup>, incluindo as aurora quinases, uma família de proteínas altamente expressa e associadas com o desenvolvimento e progressão tumoral em diversos tipos de cânceres<sup>93</sup>. Em nosso trabalho, o aumento da expressão de AURKB observado nos pacientes com LLA corrobora estudos anteriores<sup>94</sup> e sugere que essa proteína pode ser um novo alvo interessante para o tratamento desse tipo de leucemia.

Cerca de 80% dos casos de LLA acometem crianças entre 2 a 5 anos de idade dos quais em torno de 90% obtém sucesso no tratamento. Em pacientes idosos, esses dados se mostram diferentes, onde observamos que apenas 30-40% alcançaram remissão da doença em longo prazo o que torna essencial a busca por novos agentes terapêuticos<sup>25</sup>.

Mediante essas informações da literatura e ao papel biológico atribuído as auroras quinases no fenótipo maligno têm sido crescentes o interesse no desenvolvimento de inibidores seletivos para essa família de proteínas<sup>95,96</sup>. Em um estudo realizado com alisertib, um fármaco inibidor seletivo para AURKA, a atividade citotóxica do fármaco foi observada para modelos celulares de LMA e LLA<sup>97</sup>. Harrington *et al.*, 2007<sup>98</sup>, utilizando o fármaco VX-680 (também conhecido por MK-0457) reportou a redução da viabilidade celular em células MOLT-4 e CCRF-CEM (ambas LLA-T). Em um estudo semelhante utilizando o fármaco AZD1152 (inibidor seletivo de AURKB) reportaram a redução na proliferação e parada do ciclo celular na fase G<sub>2</sub>/M em células leucêmicas PALL-2 (LLA BCR-ABL1<sup>+</sup>)<sup>99</sup>. Em linhagens leucêmicas expressando BCR-ABL1 e BCR-ABL<sup>T315I</sup>, o tratamento com VX-680 e PHA-739358 reduziu a viabilidade celular<sup>100,101</sup>. Em um estudo clínico com pacientes com LLA BCR-ABL1<sup>+</sup>, o tratamento com VX-680 apresentou resposta clínica favorável<sup>102</sup>.

Nossos dados mostram que o tratamento com reversina diminui a viabilidade celular em Jurkat e Namalwa sem forte indução de apoptose nessas linhagens o que difere de modelos de neoplasia mielóide previamente estudados<sup>75,76</sup>. Por outro lado, observamos aumento nos níveis de catástrofe mitótica em LLA, conforme evidenciados pela aneuploidia, dano em DNA e falha em proliferação após o tratamento com reversina, o que foi semelhante ao observado em neoplasias mielóides<sup>103</sup>. Em ensaios de formação de colônias, a exposição ao tratamento com reversina reduziu proliferação autônoma nas linhagens, característica essa associada à agressividade nas leucemias agudas<sup>104,105</sup>.

Resultados recentes obtidos em tumores sólidos mostram que o tratamento com reversina induz morte celular por autofagia, porém os mecanismos envolvidos permanecem desconhecidos<sup>69,71,72,73</sup>. Em nosso estudo, as concentrações foram capazes de promover diminuição de viabilidade celular e de não induzir a apoptose, levou à indução de autofagia em ambas as linhagens celulares. No cenário molecular, observamos o aumento da expressão gênica *ULK1*, *IRGM* e *MAP1LC3B* em Jurkat e Namalwa. O gene *ULK1* codifica uma proteína quinase serina-treonina específica que dá início a autofagia<sup>106,107</sup>, enquanto o gene *MAP1LC3B* codifica a proteína LC3B que atua na formação dos autofagossomos<sup>108</sup>. A proteína IRGM codificada pelo gene *IRGM* interage com ULK1 e Beclina 1 promovendo a formação do complexo de iniciação da autofagia<sup>109</sup>. IRGM tem sido apresentado como um potente indutor de autofagia em infecções por patógenos intracelulares<sup>110</sup>, mas sua função na autofagia de células cancerosas permanece pouco explorada. Wang *et al.*, 2017<sup>111</sup>, reportaram que IRGM participa em um processo de troca da morte celular por apoptose para a morte por autofagia em células de hepatocarcinoma. Desta forma, nossos achados propõem potenciais mecanismos envolvidos na autofagia em linhagens LLA promovidos pelo tratamento com reversina, indicando que essa atua iniciando e sustentando a autofagia.

Notavelmente, os níveis de *BCL2* foram reduzidos nas células Jurkat e aumentados nas células Namalwa após o tratamento com reversina, o que corrobora a maior sensibilidade a apoptose induzida pela reversina observada nas células Jurkat. Huang *et al.*<sup>77</sup> relataram que a reversina modula a relação BCL2/BAX para induzir apoptose em células de câncer de mama. Da mesma forma, nosso grupo de pesquisa relatou que a regulação negativa do BCL2 estava associada à

sensibilidade à reversina nos modelos celulares de neoplasias mieloproliferativas<sup>76</sup>. Esses dados corroboram os achados atuais de que os níveis de BCL2 em resposta à reversina podem prever resposta apoptótica.

Em resumo, a reversina reduz a viabilidade celular em modelos celulares de LLA desencadeando múltiplos mecanismos de morte celular: apoptose, catástrofe mitótica e autofagia. Nossos achados destacam a via das auroras quinases como uma oportunidade anticâncer para a ALL.

Outro objetivo específico deste estudo foi investigar potenciais inibidores farmacológicos para STMN1, uma oncoproteína relacionada ao fenótipo maligno de LLA e LMA<sup>112</sup>. Nesse sentido, uma análise por quimiinformática foi aplicada para identificar compostos com similaridade estrutural com o GDP366, único inibidor de STMN1 reportado até o momento<sup>86</sup>. O GDP366 foi descrito como capaz de reduzir os níveis gênicos de STMN1 e BIRC5 (survivina), sendo essa última parte de uma família de proteínas inibidoras de apoptose, ambos os genes alvos interessante do ponto de vista de terapia antineoplásica<sup>86</sup>. Em modelos de câncer de cólon, o tratamento com GDP366 foi capaz de induzir catástrofe mitótica e senescência, além de reduzir o crescimento tumoral *in vivo*<sup>86</sup>.

Cinco compostos com similaridades estruturais com GDP366 foram identificados, dos quais apenas três estavam disponíveis comercialmente no momento da aquisição dos materiais, sendo eles o AD80, GSK2606414 e GW768505A.

O fármaco AD80 tem sido reportado com um inibidor multiquinase seletivo para RET, RAF, SRC e S6K<sup>113</sup>. Em modelos de neoplasia endócrina, o tratamento com AD80 promoveu aumento de apoptose<sup>113</sup>. Em células CCRF-CEM (LLA-T) e MOLT3 (LMA), ambas deficientes para a proteína PTEN e com hiperativação de S6K1, o tratamento com AD80 reduziu a viabilidade. O tratamento com AD80 também foi capaz de reduzir a formação tumoral e aumentar a sobrevivência em animais com linfomas PTEN<sup>-/-</sup><sup>114</sup>. Recentemente, Yu et al., 2019<sup>115</sup> reportaram a diminuição na expressão de genes relacionados ao ciclo celular (G<sub>2</sub>/M) após o tratamento com AD80 em células HUH7. Esses achados corroboram os efeitos antineoplásicos observados em nossos modelos celulares de LLA e LMA, mas a relação com STMN1 e a dinâmica de microtúbulos ainda permanece como alvo de nossas pesquisas.



Em um painel de 294 quinases, o fármaco GSK2606414 foi identificado primeiramente como potente inibidor de KIT, PERK e recentemente estudos demonstram sua capacidade em inibir RIPK1, uma quinase envolvida na morte celular mediada por TNF- $\alpha$ <sup>116</sup>. KIT é um receptor de tirosina quinase tipo III expresso em diversos tipos celulares dos quais incluem células progenitoras hematopoéticas. Dentre suas funções, KIT inicia uma cadeia essencial para o crescimento e desenvolvimento, sobrevivência celular, metabolismo e diferenciação quando ligado a seu ligante: Fator de células tronco (FCT-SCF) ativando múltiplas vias de transdução de sinal que incluem RAS/ERK, PI3K/AKT, fosfolipase C, JAK/STAT e vias de quinase SRC<sup>117</sup>. Enquanto a contribuição de PERK tem sido demonstrada no início do câncer e auxílio à resistência aos quimioterápicos, se tornando então um alvo para o tratamento<sup>116,118</sup>. Apesar dos alvos relevantes descritos para o GSK2606414, seus efeitos sob a viabilidade celular em nossos modelos de LLA e LMA foram aquém do desejado para um fármaco antineoplásico. Já o composto GW768505A tem sido reportado como um potente inibidor da autofosforilação das quinases TRKA, TRKB e TRKC em células KM12<sup>119</sup>.

Através da análise de expressão protéica, observou-se a diminuição da expressão de S6RP fosforilada após tratamento com GDP366 e AD80, proteína essa fosforilada pela quinase S6 (S6K) e como resposta a esse processo, ocorre aumento da síntese protéica<sup>120</sup>. Em um ambiente normal, uma das atividades da proteína S6K consiste em fosforilar e inibir vias pró-apopóticas (BAD e GSK3), como consequência, observa-se o aumento da viabilidade celular<sup>121,122</sup>. Assim, a diminuição na fosforilação de S6RP pode levar a diminuição na síntese de proteínas, bloqueio da progressão do ciclo celular e indução de apoptose, conforme observado no tratamento com GDP366 e AD80.

A proteína S6RP é efetora da cascata de sinalização PI3K/AKT/mTOR. A relação entre a expressão de STMN1 e a ativação desta cascata de sinalização tem sido reportada: a inibição de PI3K com LY294002 ou a inibição de AKT com MK2206 reduz a expressão de STMN1<sup>123,124</sup>. De forma similar, o inibidor de PI3K, BKM120, induz a fosforilação de STMN1 em modelos de LLA<sup>125</sup>. Um mecanismo proposto é que a AKT poderia ativar o fator de transcrição FOXM1 que induziria diretamente a expressão do gene STMN1<sup>124</sup>. Nossos achados reforçam a relação entre PI3K/AKT/mTOR e STMN1 em modelos de leucemias agudas.

Observou-se ainda, o aumento na expressão de survivina, na expressão de PARP1 clivada e  $\gamma$ H2AX após tratamento com GDP366, enquanto que o tratamento com AD80 diminuiu a expressão de survivina e aumentou a expressão de PARP1 clivada e  $\gamma$ H2AX. A proteína survivina desempenha importante papel à sobrevivência celular ao inibir a apoptose, sendo observado seu aumento expressivo em diversos tipos de câncer, correlacionada com uma doença mais agressiva e baixa expectativa de melhora clínica, uma vez que em tecidos normais a sua presença é praticamente indetectável<sup>126,127</sup>. A diminuição na expressão proteica de survivina foi descrita em células HCT116 após o tratamento com GDP366<sup>86</sup>, fato que não foi observado nas linhagens celulares de LLA e LMA, o que corrobora a menor potência e eficácia do GDP366 nesses modelos.

A proteína STMN1 está diretamente relacionada com a desestabilização de microtúbulos sendo observado o aumento de sua expressão em diversos tipos de tumores sólidos e também em neoplasias hematológicas como reportado por nosso grupo de pesquisa<sup>128,129,130,131</sup> e validado em cortes de banco de dados públicos. Os tratamentos com GDP366 e AD80 parecem atuar de maneiras distintas sob STMN1: GDP366 aumenta os níveis de STMN1 em sua forma fosforilada (serina 16, um sítio inibitório), enquanto AD80 promove diminuição da expressão de STMN1. Do ponto de vista funcional ambos os fármacos potencialmente inibem as funções biológicas mediadas por STMN1.

A modulação de genes relacionados com regulação do citoesqueleto de actina, citocinese e morfogênese foi destaque após tratamento com GDP366 e AD80 na análise por *PCR array* e GeneMANIA, processos esses relacionados com o desenvolvimento e progressão do câncer<sup>132</sup>. O gene *CDK5* foi reduzido pelo AD80, e o gene *GSN* foi aumentado por ambos os fármacos em células Jurkat. O gene *CDK5* atua na progressão do ciclo celular e promove a proliferação<sup>133</sup>, enquanto os altos níveis do gene *GSN* têm sido associados com redução de proliferação, migração e invasão em tumores sólidos<sup>134,135</sup>. Entretanto a validação da modulação desses genes em um número maior de experimentos e nas demais linhagens leucêmicas ainda se faz necessária.

Em resumo, no presente estudo o valor terapêutico da inibição farmacológica de proteínas envolvidas na regulação do citoesqueleto e progressão do ciclo celular, aurora quinases e STMN1, foi investigado. Existe uma regulação cruzada entre esse

conjunto de proteínas, sendo que as auroras quinas fosforilam STMN1 para modular a dinâmica de microtúbulos<sup>136</sup>, assim é esperado semelhanças em muitas das características fenotípicas observadas entre os tratamentos com reversina, GDP366 e AD80. Outro ponto relevante é que AURKA, AURKB e STMN1 são altamente expressas e/ou ativadas em células leucêmicas quando comparadas às células normais, o que pode conferir seletividade aos fármacos aqui testados. Assim, o presente estudo pavimenta avenidas para converter provas-de-conceito baseado em estudos genéticos em compostos farmacológicos mais próximos da realidade clínica.

## CONCLUSÃO

Em modelos LLA:

- O tratamento com reversina inibe a atividade das auroras quinases e reduz a viabilidade celular através de múltiplos mecanismos de morte celular, incluindo apoptose, catástrofe mitótica e autofagia.

- A análise exploratória por PCR array sugere que o tratamento com reversina induz a expressão de genes que iniciam e sustentam o fluxo autofágico.

Em modelos LLA e LMA:

- A análise por quimioinformática identificou cinco compostos análogos ao GDP366, sendo três deles investigados em ensaios celulares.

- O tratamento com GDP366 e AD80 reduz a viabilidade celular, proliferação e clonogenicidade, induz a apoptose de forma concentração dependente e modula a progressão do ciclo celular.

- O GDP366 aumenta a expressão de p-STMN1, survivina, PARP1 clivado e  $\gamma$ H2AX e reduz o p-S6RP, enquanto que o AD80 reduz a expressão de STMN1, survivina, p-S6RP e induz a expressão de PARP1 clivado e  $\gamma$ H2AX.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med.* (2006) 354:2034-2045.
2. Mayani H, Flores-Figueroa E, Chavez-Gonzalez A. In vitro biology of human myeloid leukemia. *Leuk Res.* (2009) 33:624-637.
3. Rose-Inman H, Kuehl D. Acute leukemia. *Emerg Med Clin North Am.* (2014) 32:579-596.
4. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature.* (2014) 505:327-334.
5. Tasian SK, Bornhauser M, Rutella S. Targeting Leukemia Stem Cells in the Bone Marrow Niche. *Biomedicines.* (2018) 6.
6. Ho TC, LaMere M, Stevens BM, Ashton JM, Myers JR, O'Dwyer KM, et al. Evolution of acute myelogenous leukemia stem cell properties after treatment and progression. *Blood.* (2016) 128:1671-1678.
7. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia.* (1995) 9:1783-1786.
8. Ferrara F. Unanswered questions in acute myeloid leukaemia. *Lancet Oncol.* (2004) 5:443-450.
9. Hoffbrand VA, Fundamentos em hematologia, 6 ed. ed., Artmed, Porto Alegre, 2013.
10. Logan GE, Mor-Vaknin N, Braunschweig T, Jost E, Schmidt PV, Markovitz DM, et al. DEK oncogene expression during normal hematopoiesis and in Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood Cells Mol Dis.* (2015) 54:123-131.
11. Faraoni I, Compagnone M, Lavorghna S, Angelini DF, Cencioni MT, Piras E, et al. BRCA1, PARP1 and gammaH2AX in acute myeloid leukemia: Role as biomarkers of response to the PARP inhibitor olaparib. *Biochim Biophys Acta.* (2015) 1852:462-472.

12. Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect.* (2007) 115:138-145.
13. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* (1976) 33:451-458.
14. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* (2009) 114:937-951.
15. Arber DA. The 2016 WHO classification of acute myeloid leukemia: What the practicing clinician needs to know. *Semin Hematol.* (2019) 56:90-95.
16. Bennett JM. Changes in the Updated 2016: WHO Classification of the Myelodysplastic Syndromes and Related Myeloid Neoplasms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* (2016) 16:607-609.
17. Hasle H. Pattern of malignant disorders in individuals with Down's syndrome. *Lancet Oncol.* (2001) 2:429-436.
18. Whitlock JA. Down syndrome and acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* (2006) 135:595-602.
19. Shaw MP, Eden OB, Grace E, Ellis PM. Acute lymphoblastic leukemia and Klinefelter's syndrome. *Pediatr Hematol Oncol.* (1992) 9:81-85.
20. Mushtaq N, Wali R, Fadoo Z, Saleem AF. Acute lymphoblastic leukemia in a child with Fanconi's anaemia. *J Coll Physicians Surg Pak.* (2012) 22:458-460.
21. Sakajiri S, Mori K, Isobe Y, Kawamata N, Oshimi K. Epstein-Barr virus-associated T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* (2002) 117:127-129.
22. Bachanova V, Verneris MR, DeFor T, Brunstein CG, Weisdorf DJ. Prolonged survival in adults with acute lymphoblastic leukemia after reduced-intensity conditioning with cord blood or sibling donor transplantation. *Blood.* (2009) 113:2902-2905.

23. Thomas X, Boiron JM, Huguet F, Dombret H, Bradstock K, Vey N, et al. Outcome of treatment in adults with acute lymphoblastic leukemia: analysis of the LALA-94 trial. *J Clin Oncol.* (2004) 22:4075-4086.
24. Paul S, Kantarjian H, Jabbour EJ. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clin Proc.* (2016) 91:1645-1666.
25. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* (2017) 7:e577.
26. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer J.* (2016) 6:e441.
27. Sill H, Olipitz W, Zebisch A, Schulz E, Wolfler A. Therapy-related myeloid neoplasms: pathobiology and clinical characteristics. *Br J Pharmacol.* (2011) 162:792-805.
28. Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* (2012) 366:1079-1089.
29. Lowenberg B, Zittoun R, Kerkhofs H, Jehn U, Abels J, Debusscher L, et al. On the value of intensive remission-induction chemotherapy in elderly patients of 65+ years with acute myeloid leukemia: a randomized phase III study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group. *J Clin Oncol.* (1989) 7:1268-1274.
30. Ossenkoppele G, Lowenberg B. How I treat the older patient with acute myeloid leukemia. *Blood.* (2015) 125:767-774.
31. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* (2014) 64:252-271.
32. Adams RR, Carmena M, Earnshaw WC. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol.* (2001) 11:49-54.
33. Nigg EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2001) 2:21-32.

34. Carmena M, Ruchaud S, Earnshaw WC. Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins. *Curr Opin Cell Biol.* (2009) 21:796-805.
35. Kollareddy M, Dzubak P, Zheleva D, Hajduch M. Aurora kinases: structure, functions and their association with cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* (2008) 152:27-33.
36. Bolanos-Garcia VM. Aurora kinases. *Int J Biochem Cell Biol.* (2005) 37:1572-1577.
37. Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, et al. A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J.* (1998) 17:3052-3065.
38. Kimura M, Matsuda Y, Yoshioka T, Sumi N, Okano Y. Identification and characterization of STK12/Aik2: a human gene related to aurora of *Drosophila* and yeast IPL1. *Cytogenet Cell Genet.* (1998) 82:147-152.
39. Bernard M, Sanseau P, Henry C, Couturier A, Prigent C. Cloning of STK13, a third human protein kinase related to *Drosophila* aurora and budding yeast Ipl1 that maps on chromosome 19q13.3-ter. *Genomics.* (1998) 53:406-409.
40. Giet R, Petretti C, Prigent C. Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? *Trends Cell Biol.* (2005) 15:241-250.
41. Guan Z, Wang XR, Zhu XF, Huang XF, Xu J, Wang LH, et al. Aurora-A, a negative prognostic marker, increases migration and decreases radiosensitivity in cancer cells. *Cancer Res.* (2007) 67:10436-10444.
42. Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, et al. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet.* (1998) 20:189-193.
43. Meraldi P, Honda R, Nigg EA. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53<sup>-/-</sup> cells. *EMBO J.* (2002) 21:483-492.
44. Carmena M, Earnshaw WC. The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2003) 4:842-854.



45. Gassmann R, Carvalho A, Henzing AJ, Ruchaud S, Hudson DF, Honda R, et al. Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J Cell Biol.* (2004) 166:179-191.
46. Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia BA, Shabanowitz J, et al. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature.* (2005) 438:1116-1122.
47. Sen S, Zhou H, White RA. A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene.* (1997) 14:2195-2200.
48. Li X, Sakashita G, Matsuzaki H, Sugimoto K, Kimura K, Hanaoka F, et al. Direct association with inner centromere protein (INCENP) activates the novel chromosomal passenger protein, Aurora-C. *J Biol Chem.* (2004) 279:47201-47211.
49. Gritsko TM, Coppola D, Paciga JE, Yang L, Sun M, Shelley SA, et al. Activation and overexpression of centrosome kinase BTAK/Aurora-A in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* (2003) 9:1420-1426.
50. Katayama H, Ota T, Jisaki F, Ueda Y, Tanaka T, Odashima S, et al. Mitotic kinase expression and colorectal cancer progression. *J Natl Cancer Inst.* (1999) 91:1160-1162.
51. Li D, Zhu J, Firozi PF, Abbruzzese JL, Evans DB, Cleary K, et al. Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/Aurora A kinase in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* (2003) 9:991-997.
52. Kimura M, Matsuda Y, Yoshioka T, Okano Y. Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/lpl1-related protein kinase, AIK3. *J Biol Chem.* (1999) 274:7334-7340.
53. Tchatchou S, Wirtenberger M, Hemminki K, Sutter C, Meindl A, Wappenschmidt B, et al. Aurora kinases A and B and familial breast cancer risk. *Cancer Lett.* (2007) 247:266-272.
54. Gu J, Gong Y, Huang M, Lu C, Spitz MR, Wu X. Polymorphisms of STK15 (Aurora-A) gene and lung cancer risk in Caucasians. *Carcinogenesis.* (2007) 28:350-355.

55. Sorrentino R, Libertini S, Pallante PL, Troncone G, Palombini L, Bavetsias V, et al. Aurora B overexpression associates with the thyroid carcinoma undifferentiated phenotype and is required for thyroid carcinoma cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab.* (2005) 90:928-935.
56. Qi G, Ogawa I, Kudo Y, Miyauchi M, Siriwardena BS, Shimamoto F, et al. Aurora-B expression and its correlation with cell proliferation and metastasis in oral cancer. *Virchows Arch.* (2007) 450:297-302.
57. Smith SL, Bowers NL, Betticher DC, Gautschi O, Ratschiller D, Hoban PR, et al. Overexpression of aurora B kinase (AURKB) in primary non-small cell lung carcinoma is frequent, generally driven from one allele, and correlates with the level of genetic instability. *Br J Cancer.* (2005) 93:719-729.
58. Reichardt W, Jung V, Brunner C, Klein A, Wemmert S, Romeike BF, et al. The putative serine/threonine kinase gene STK15 on chromosome 20q13.2 is amplified in human gliomas. *Oncol Rep.* (2003) 10:1275-1279.
59. Buschhorn HM, Klein RR, Chambers SM, Hardy MC, Green S, Bearss D, et al. Aurora-A over-expression in high-grade PIN lesions and prostate cancer. *Prostate.* (2005) 64:341-346.
60. Hanash SM, Strahler JR, Kuick R, Chu EH, Nichols D. Identification of a polypeptide associated with the malignant phenotype in acute leukemia. *J Biol Chem.* (1988) 263:12813-12815.
61. Machado-Neto JA, de Melo Campos P, Favaro P, Lazarini M, Lorand-Metze I, Costa FF, et al. Stathmin 1 is involved in the highly proliferative phenotype of high-risk myelodysplastic syndromes and acute leukemia cells. *Leuk Res.* (2014) 38:251-257.
62. Machado-Neto JA, de Melo Campos P, Favaro P, Lazarini M, da Silva Santos Duarte A, Lorand-Metze I, et al. Stathmin 1 inhibition amplifies ruxolitinib-induced apoptosis in JAK2V617F cells. *Oncotarget.* (2015) 6:29573-29584.
63. Machado-Neto JA, Rodrigues Alves APN, Fernandes JC, Coelho-Silva JL, Scopim-Ribeiro R, Fenerich BA, et al. Paclitaxel induces Stathmin 1 phosphorylation, microtubule stability and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *Heliyon.* (2017) 3:e00405.

64. Anand S, Penrhyn-Lowe S, Venkitaraman AR. AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell*. (2003) 3:51-62.
65. Sen S, Zhou H, Zhang RD, Yoon DS, Vakar-Lopez F, Ito S, et al. Amplification/overexpression of a mitotic kinase gene in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*. (2002) 94:1320-1329.
66. D'Alise AM, Amabile G, Iovino M, Di Giorgio FP, Bartiromo M, Sessa F, et al. Reversine, a novel Aurora kinases inhibitor, inhibits colony formation of human acute myeloid leukemia cells. *Mol Cancer Ther*. (2008) 7:1140-1149.
67. Kim YK, Choi HY, Kim NH, Lee W, Seo DW, Kang DW, et al. Reversine stimulates adipocyte differentiation and downregulates Akt and p70(s6k) signaling pathways in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. (2007) 358:553-558.
68. Amabile G, D'Alise AM, Iovino M, Jones P, Santaguida S, Musacchio A, et al. The Aurora B kinase activity is required for the maintenance of the differentiated state of murine myoblasts. *Cell Death Differ*. (2009) 16:321-330.
69. Lee YR, Wu WC, Ji WT, Chen JY, Cheng YP, Chiang MK, et al. Reversine suppresses oral squamous cell carcinoma via cell cycle arrest and concomitantly apoptosis and autophagy. *J Biomed Sci*. (2012) 19:9.
70. Piccoli M, Palazzolo G, Conforti E, Lamorte G, Papini N, Creo P, et al. The synthetic purine reversine selectively induces cell death of cancer cells. *J Cell Biochem*. (2012) 113:3207-3217.
71. Lu CH, Liu YW, Hua SC, Yu HI, Chang YP, Lee YR. Autophagy induction of reversine on human follicular thyroid cancer cells. *Biomed Pharmacother*. (2012) 66:642-647.
72. Lu YC, Lee YR, Liao JD, Lin CY, Chen YY, Chen PT, et al. Reversine Induced Multinucleated Cells, Cell Apoptosis and Autophagy in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *PLoS One*. (2016) 11:e0158587.
73. Fang CY, Chen JS, Chang SK, Shen CH. Reversine induces autophagic cell death through the AMP-activated protein kinase pathway in urothelial carcinoma cells. *Anticancer Drugs*. (2018) 29:29-39.

74. Jemaa M, Abassi Y, Kifagi C, Fezai M, Daams R, Lang F, et al. Reversine inhibits Colon Carcinoma Cell Migration by Targeting JNK1. *Sci Rep.* (2018) 8:11821.
75. Rodrigues Alves AP, Machado-Neto JA, Scheucher PS, Paiva HH, Simoes BP, Rego EM, et al. Reversine triggers mitotic catastrophe and apoptosis in K562 cells. *Leuk Res.* (2016) 48:26-31.
76. Lima K, Carlos J, Alves-Paiva RM, Vicari HP, Souza Santos FP, Hamerschlak N, et al. Reversine exhibits antineoplastic activity in JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms. *Sci Rep.* (2019) 9:9895.
77. Huang D, Huang Y, Huang Z, Weng J, Zhang S, Gu W. Relation of AURKB over-expression to low survival rate in BCRA and reversine-modulated aurora B kinase in breast cancer cell lines. *Cancer Cell Int.* (2019) 19:166.
78. Song HK, Noh EM, Kim JM, You YO, Kwon KB, Lee YR. Reversine inhibits MMP-3, IL-6 and IL-8 expression through suppression of ROS and JNK/AP-1 activation in interleukin-1beta-stimulated human gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol.* (2019) 108:104530.
79. Karst AM, Levanon K, Duraisamy S, Liu JF, Hirsch MS, Hecht JL, et al. Stathmin 1, a marker of PI3K pathway activation and regulator of microtubule dynamics, is expressed in early pelvic serous carcinomas. *Gynecol Oncol.* (2011) 123:5-12.
80. Marklund U, Larsson N, Gradin HM, Brattsand G, Gullberg M. Oncoprotein 18 is a phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics. *EMBO J.* (1996) 15:5290-5298.
81. Holmfeldt P, Larsson N, Segerman B, Howell B, Morabito J, Cassimeris L, et al. The catastrophe-promoting activity of ectopic Op18/stathmin is required for disruption of mitotic spindles but not interphase microtubules. *Mol Biol Cell.* (2001) 12:73-83.
82. Larsson N, Marklund U, Gradin HM, Brattsand G, Gullberg M. Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis. *Mol Cell Biol.* (1997) 17:5530-5539.
83. Gradin HM, Larsson N, Marklund U, Gullberg M. Regulation of microtubule dynamics by extracellular signals: cAMP-dependent protein kinase switches off the activity of oncoprotein 18 in intact cells. *J Cell Biol.* (1998) 140:131-141.

84. Nemunaitis J. Stathmin 1: a protein with many tasks. New biomarker and potential target in cancer. *Expert Opin Ther Targets*. (2012) 16:631-634.
85. Ng DC, Lin BH, Lim CP, Huang G, Zhang T, Poli V, et al. Stat3 regulates microtubules by antagonizing the depolymerization activity of stathmin. *J Cell Biol*. (2006) 172:245-257.
86. Shi X, Wang D, Ding K, Lu Z, Jin Y, Zhang J, et al. GDP366, a novel small molecule dual inhibitor of survivin and Op18, induces cell growth inhibition, cellular senescence and mitotic catastrophe in human cancer cells. *Cancer Biol Ther*. (2010) 9:640-650.
87. Carrouer TL, Assou S, Tondeur S, Lhermitte L, Lamb N, Reme T, et al. Amazonia!: An Online Resource to Google and Visualize Public Human whole Genome Expression Data. *The Open Bioinformatics Journal*. (2010) 4:5-10.
88. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods*. (2001) 25:402-408.
89. Cortat B, Garcia CC, Quinet A, Schuch AP, de Lima-Bessa KM, Menck CF. The relative roles of DNA damage induced by UVA irradiation in human cells. *Photochem Photobiol Sci*. (2013) 12:1483-1495.
90. Moreno NC, Garcia CCM, Munford V, Rocha CRR, Pelegrini AL, Corradi C, et al. The key role of UVA-light induced oxidative stress in human Xeroderma Pigmentosum Variant cells. *Free Radic Biol Med*. (2019) 131:432-442.
91. Thome MP, Filippi-Chiela EC, Villodre ES, Migliavaca CB, Onzi GR, Felipe KB, et al. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. *J Cell Sci*. (2016) 129:4622-4632.
92. Santaguida S, Tighe A, D'Alise AM, Taylor SS, Musacchio A. Dissecting the role of MPS1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibitor reversine. *J Cell Biol*. (2010) 190:73-87.
93. Willems E, Dedobbeleer M, Digregorio M, Lombard A, Lumapat PN, Rogister B. The functional diversity of Aurora kinases: a comprehensive review. *Cell Div*. (2018) 13:7.

94. Hartsink-Segers SA, Zwaan CM, Exalto C, Luijendijk MW, Calvert VS, Petricoin EF, et al. Aurora kinases in childhood acute leukemia: the promise of aurora B as therapeutic target. *Leukemia*. (2013) 27:560-568.
95. Cicenias J. The Aurora kinase inhibitors in cancer research and therapy. *J Cancer Res Clin Oncol*. (2016) 142:1995-2012.
96. Goldenson B, Crispino JD. The aurora kinases in cell cycle and leukemia. *Oncogene*. (2015) 34:537-545.
97. Maris JM, Morton CL, Gorlick R, Kolb EA, Lock R, Carol H, et al. Initial testing of the aurora kinase A inhibitor MLN8237 by the Pediatric Preclinical Testing Program (PPTP). *Pediatr Blood Cancer*. (2010) 55:26-34.
98. Harrington EA, Bebbington D, Moore J, Rasmussen RK, Ajose-Adeogun AO, Nakayama T, et al. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nat Med*. (2004) 10:262-267.
99. Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, Tasaka T, Taniguchi A, Kuwayama Y, et al. AZD1152, a novel and selective aurora B kinase inhibitor, induces growth arrest, apoptosis, and sensitization for tubulin depolymerizing agent or topoisomerase II inhibitor in human acute leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood*. (2007) 110:2034-2040.
100. Carter TA, Wodicka LM, Shah NP, Velasco AM, Fabian MA, Treiber DK, et al. Inhibition of drug-resistant mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2005) 102:11011-11016.
101. Fei F, Lim M, Schmidhuber S, Moll J, Groffen J, Heisterkamp N. Treatment of human pre-B acute lymphoblastic leukemia with the Aurora kinase inhibitor PHA-739358 (Danusertib). *Mol Cancer*. (2012) 11:42.
102. Giles FJ, Cortes J, Jones D, Bergstrom D, Kantarjian H, Freedman SJ. MK-0457, a novel kinase inhibitor, is active in patients with chronic myeloid leukemia or acute lymphocytic leukemia with the T315I BCR-ABL mutation. *Blood*. (2007) 109:500-502.
103. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*. (2004) 23:2825-2837.

104. Lowenberg B, van Putten WL, Touw IP, Delwel R, Santini V. Autonomous proliferation of leukemic cells in vitro as a determinant of prognosis in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* (1993) 328:614-619.
105. Kukita T, Arima N, Matsushita K, Arimura K, Ohtsubo H, Sakaki Y, et al. Autocrine and/or paracrine growth of adult T-cell leukaemia tumour cells by interleukin 15. *Br J Haematol.* (2002) 119:467-474.
106. Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol.* (2010) 22:132-139.
107. Chan EY, Kir S, Tooze SA. siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem.* (2007) 282:25464-25474.
108. Ge L, Wilz L, Schekman R. Biogenesis of autophagosomal precursors for LC3 lipidation from the ER-Golgi intermediate compartment. *Autophagy.* (2015) 11:2372-2374.
109. Chauhan S, Mandell MA, Deretic V. IRGM governs the core autophagy machinery to conduct antimicrobial defense. *Mol Cell.* (2015) 58:507-521.
110. Singh SB, Davis AS, Taylor GA, Deretic V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science.* (2006) 313:1438-1441.
111. Wang LL, Jin XH, Cai MY, Li HG, Chen JW, Wang FW, et al. AGL2 promotes cancer cell growth through IRGM-regulated autophagy and enhanced Aurora A activity in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* (2018) 414:71-80.
112. Machado-Neto JA, Saad ST, Traina F. Stathmin 1 in normal and malignant hematopoiesis. *BMB Rep.* (2014) 47:660-665.
113. Dar AC, Das TK, Shokat KM, Cagan RL. Chemical genetic discovery of targets and anti-targets for cancer polypharmacology. *Nature.* (2012) 486:80-84.
114. Liu H, Feng X, Ennis KN, Behrmann CA, Sarma P, Jiang TT, et al. Pharmacologic Targeting of S6K1 in PTEN-Deficient Neoplasia. *Cell Rep.* (2017) 18:2088-2095.
115. Yu JX, Craig AJ, Duffy ME, Villacorta-Martin C, Miguela V, Ruiz de Galarreta M, et al. Phenotype-Based Screens with Conformation-Specific Inhibitors Reveal p38

Gamma and Delta as Targets for HCC Polypharmacology. *Mol Cancer Ther.* (2019) 18:1506-1519.

116. Axten JM, Medina JR, Feng Y, Shu A, Romeril SP, Grant SW, et al. Discovery of 7-methyl-5-(1-([3-(trifluoromethyl)phenyl]acetyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (GSK2606414), a potent and selective first-in-class inhibitor of protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). *J Med Chem.* (2012) 55:7193-7207.

117. Stankov K, Popovic S, Mikov M. C-KIT signaling in cancer treatment. *Curr Pharm Des.* (2014) 20:2849-2880.

118. Mahameed M, Wilhelm T, Darawshi O, Obiedat A, Tommy WS, Chintha C, et al. The unfolded protein response modulators GSK2606414 and KIRA6 are potent KIT inhibitors. *Cell Death Dis.* (2019) 10:300.

119. Elkins JM, Fedele V, Szklarz M, Abdul Azeez KR, Salah E, Mikolajczyk J, et al. Comprehensive characterization of the Published Kinase Inhibitor Set. *Nat Biotechnol.* (2016) 34:95-103.

120. Iwenofu OH, Lackman RD, Staddon AP, Goodwin DG, Haupt HM, Brooks JS. Phospho-S6 ribosomal protein: a potential new predictive sarcoma marker for targeted mTOR therapy. *Mod Pathol.* (2008) 21:231-237.

121. Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J.* (2012) 441:1-21.

122. Zhang HH, Lipovsky AI, Dibble CC, Sahin M, Manning BD. S6K1 regulates GSK3 under conditions of mTOR-dependent feedback inhibition of Akt. *Mol Cell.* (2006) 24:185-197.

123. Jiang W, Huang S, Song L, Wang Z. STMN1, a prognostic predictor of esophageal squamous cell carcinoma, is a marker of the activation of the PI3K pathway. *Oncol Rep.* (2018) 39:834-842.

124. Li M, Yang J, Zhou W, Ren Y, Wang X, Chen H, et al. Activation of an AKT/FOXM1/STMN1 pathway drives resistance to tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. *Br J Cancer.* (2017) 117:974-983.



125. Pereira JK, Machado-Neto JA, Lopes MR, Morini BC, Traina F, Costa FF, et al. Molecular effects of the phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor NVP-BKM120 on T and B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer*. (2015) 51:2076-2085.
126. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*. (1997) 3:917-921.
127. Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene*. (2003) 22:8581-8589.
128. Niethammer P, Bastiaens P, Karsenti E. Stathmin-tubulin interaction gradients in motile and mitotic cells. *Science*. (2004) 303:1862-1866.
129. Baquero MT, Hanna JA, Neumeister V, Cheng H, Molinaro AM, Harris LN, et al. Stathmin expression and its relationship to microtubule-associated protein tau and outcome in breast cancer. *Cancer*. (2012) 118:4660-4669.
130. Nie W, Xu MD, Gan L, Huang H, Xiu Q, Li B. Overexpression of stathmin 1 is a poor prognostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Lab Invest*. (2015) 95:56-64.
131. Biaoxue R, Xiguang C, Hua L, Shuanying Y. Stathmin-dependent molecular targeting therapy for malignant tumor: the latest 5 years' discoveries and developments. *J Transl Med*. (2016) 14:279.
132. Ong MS, Deng S, Halim CE, Cai W, Tan TZ, Huang RY, et al. Cytoskeletal Proteins in Cancer and Intracellular Stress: A Therapeutic Perspective. *Cancers (Basel)*. (2020) 12.
133. Pozo K, Bibb JA. The Emerging Role of Cdk5 in Cancer. *Trends Cancer*. (2016) 2:606-618.
134. Li WX, Yang MX, Hong XQ, Dong TG, Yi T, Lin SL, et al. Overexpression of gelsolin reduces the proliferation and invasion of colon carcinoma cells. *Mol Med Rep*. (2016) 14:3059-3065.
135. Chen Z, Li K, Yin X, Li H, Li Y, Zhang Q, et al. Lower Expression of Gelsolin in Colon Cancer and Its Diagnostic Value in Colon Cancer Patients. *J Cancer*. (2019) 10:1288-1296.
136. Belletti B, Baldassarre G. Stathmin: a protein with many tasks. New biomarker and potential target in cancer. *Expert Opin Ther Targets*. (2011) 15:1249-1266.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A

#### Concentração inibitória de reversina em leucócitos normais e em linhagens celular de leucemia linfoblástica aguda.

<b>Células</b>	<b>CI<sub>50</sub><sup>1</sup></b>	<b>95% CI</b>
CMSP normal <sup>2</sup>	>50 µM	n.d.
Karpas 422	5.1 µM	4.5 – 5.7 µM
Daudi	11 µM	9.3 – 12.8 µM
Namalwa	5.0 µM	3.9 – 7.8 µM
RS4; 11	4.7 µM	4.1 – 5.3 µM
MOLT4	2.3 µM	1.5 – 3.2 µM
Jurkat	3.8 µM	2.8 – 4.9 µM
CEM	12.6 µM	10.2 – 15.1 µM

<sup>1</sup>Tratamento com reversina por 72 horas (1 a 50 µM).

<sup>2</sup>Média de três experimentos com doadores saudáveis (1 mulher e 2 homens, idade: 30-35 anos).

Abreviações: CI, concentração inibitória; 95% CI, 95% intervalo de confiança; CMSP, células mononuclear do sangue periférico; n.d., não determinado.

## APÊNDICE B

**Genes relacionados à autofagia investigados por PCR array.**

<b>Genes</b>	<b>Fold-change<sup>1</sup></b>
AKT1	1.38
AMBRA1	1.95
APP	1.58
ATG10	<b>2.29</b>
ATG12	1.57
ATG16L1	1.60
ATG16L2	1.53
ATG3	0.98
ATG4A	1.11
ATG4B	1.39
ATG4C	1.06
ATG4D	1.76
ATG5	1.09
ATG7	1.71
ATG9A	1.49
ATG9B	<b>2.85</b>
BAD	<b>2.16</b>
BAK1	1.51
BAX	1.68
BCL2	<b>3.05</b>
BCL2L1	<b>2.42</b>
BECN1	1.91
BID	1.04
BNIP3	1.49
CASP3	1.81
CASP8	1.85
CDKN1B	1.93
CDKN2A	1.11
CLN3	<b>2.07</b>
CTSB	<b>2.18</b>
CTSD	1.68
CTSS	1.67
CXCR4	<b>4.74</b>
DAPK1	<b>2.53</b>
DRAM1	<b>6.50</b>
DRAM2	1.57
EIF2AK3	1.75
EIF4G1	1.29
ESR1	1.50
FADD	1.15
FAS	1.66
GAA	<b>2.58</b>
GABARAP	<b>2.04</b>
GABARAPL1	1.45
GABARAPL2	1.74

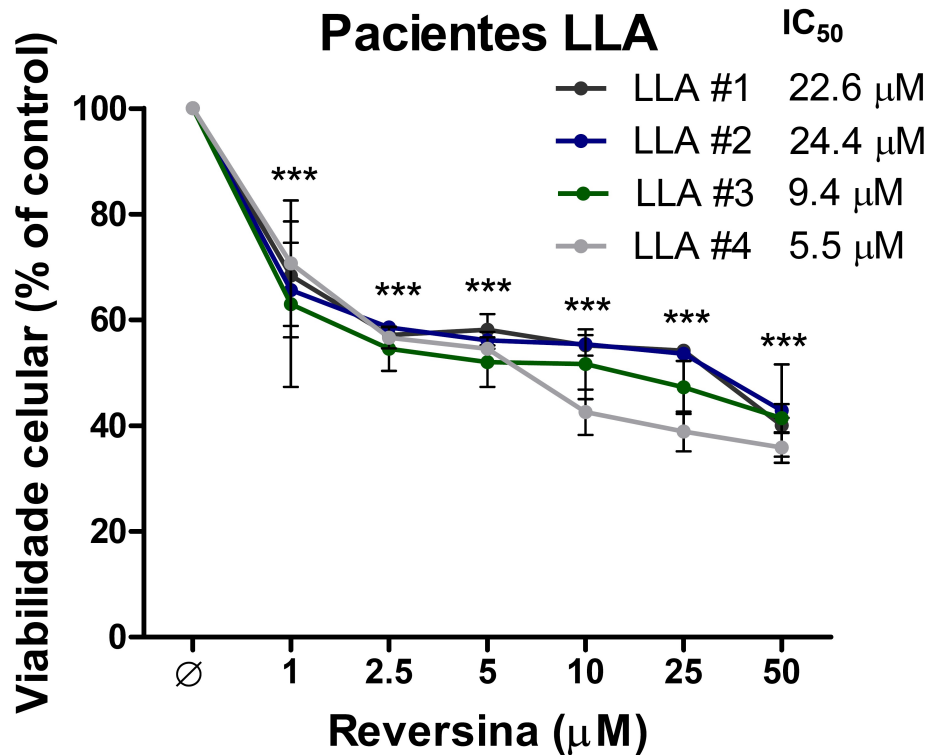
<i>HDAC1</i>	1.06
<i>HDAC6</i>	<b>2.12</b>
<i>HGS</i>	1.79
<i>HSP90AA1</i>	0.82
<i>HSPA8</i>	0.83
<i>HTT</i>	1.29
<i>IFNG</i>	<b>0.14</b>
<i>IGF1</i>	0.94
<i>INS</i>	<b>2.36</b>
<i>IRGM</i>	<b>13.48</b>
<i>LAMP1</i>	1.40
<i>MAP1LC3A</i>	<b>2.64</b>
<i>MAP1LC3B</i>	<b>2.86</b>
<i>MAPK14</i>	1.48
<i>MAPK8</i>	1.68
<i>MTOR</i>	1.39
<i>NFKB1</i>	1.27
<i>NPC1</i>	1.96
<i>PIK3C3</i>	<b>2.13</b>
<i>PIK3CG</i>	0.85
<i>PIK3R4</i>	1.36
<i>PRKAA1</i>	1.76
<i>PTEN</i>	1.56
<i>RAB24</i>	<b>3.17</b>
<i>RB1</i>	1.33
<i>RGS19</i>	1.44
<i>RPS6KB1</i>	1.35
<i>SNCA</i>	<b>4.26</b>
<i>SQSTM1</i>	1.64
<i>TGFB1</i>	1.08
<i>TGM2</i>	<b>2.48</b>
<i>TMEM74</i>	1.33
<i>TNF</i>	0.92
<i>TNFSF10</i>	1.54
<i>TP53</i>	1.50
<i>ULK1</i>	<b>3.70</b>
<i>ULK2</i>	<b>4.40</b>
<i>UVRAG</i>	0.94
<i>WIP1</i>	1.70

<sup>1</sup>As células Namalwa foram tratadas com reversina (10 $\mu$ M) e o *fold-change* em relação ao tratamento com veiculo é apresentado. Os dados representam a média de dois experimentos independentes para cada condição.

A expressão relativa dos genes que apresentou alteração duas vezes a mais que o controle está destacado em negrito.

## APÊNDICE C

A reversina reduz a viabilidade celular em células de leucemia linfoblástica aguda primária.



A citotoxicidade dose-resposta foi analisada pelo ensaio de metiltiazoletetrazólio (MTT) para células primária de leucemia linfoblástica aguda tratadas com reversina (1, 2,5, 5, 10, 25 e 50  $\mu$ M) por 72 horas. Os valores são expressos como a porcentagem de células viáveis para cada paciente em relação às células tratadas com veiculo. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  DP de dois experimentos independentes. Os valores de  $p$  e pacientes são indicados nos gráficos; \*\*\*  $p < 0,0001$ ; ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

## APÊNDICE D

Características clínicas e laboratoriais das amostras de pacientes leucêmicos.

<b>Parâmetros</b>	<b>Números</b>
Pacientes com LLA	4
no diagnóstico	3
na recaída	1
Blastos na amostra (%) [media (alcance)]	89 (52-98)
Gênero	
Masculino	3
Feminino	1
Idade (anos), media (alcance)	32 (19-61)
Imunofenótipo	
LLA-B	4

Abreviações: LLA, leucemia linfoblástica aguda; LLA-B, leucemia linfoblástica aguda B.

## APÊNDICE E

**Genes reguladores de citoesqueleto investigados por PCR array.**

<b>Genes</b>	<b>GDP366 (<i>fold-change</i>)<sup>1</sup></b>	<b>AD80 (<i>fold-change</i>)<sup>1</sup></b>
<i>ACTR2</i>	0.95	0.80
<i>ACTR3</i>	1.21	0.87
<i>ARAP1</i>	1.18	1.18
<i>ARFIP2</i>	0.88	1.24
<i>ARHGAP6</i>	0.85	<b>0.65</b>
<i>ARHGDIB</i>	0.99	0.88
<i>ARHGEF11</i>	<b>0.53</b>	0.86
<i>ARPC1B</i>	0.80	1.01
<i>ARPC2</i>	1.18	1.02
<i>ARPC3</i>	0.81	0.94
<i>ARPC4</i>	0.96	0.93
<i>ARPC5</i>	0.93	0.99
<i>AURKA</i>	1.20	0.72
<i>AURKB</i>	<b>0.66</b>	0.87
<i>AURKC</i>	<b>0.61</b>	<b>0.46</b>
<i>BAIAP2</i>	<b>0.62</b>	<b>0.57</b>
<i>CALD1</i>	1.13	1.29
<i>CALM1</i>	0.85	0.78
<i>CASK</i>	1.10	1.27
<i>CCNA1</i>	<b>N.E.</b>	<b>N.E.</b>
<i>CCNB2</i>	0.87	0.86
<i>CDC42</i>	1.02	0.76
<i>CDC42BPA</i>	<b>1.95</b>	<b>1.74</b>
<i>CDC42EP2</i>	0.87	<b>0.53</b>
<i>CDC42EP3</i>	<b>0.61</b>	1.30
<i>CDK5</i>	<b>0.54</b>	0.93
<i>CDK5R1</i>	1.43	1.15
<i>CFL1</i>	0.96	0.88
<i>CIT</i>	0.77	1.01
<i>CLASP1</i>	1.08	0.98
<i>CLASP2</i>	0.84	0.87
<i>CLIP1</i>	1.14	0.96
<i>CLIP2</i>	0.83	1.28
<i>CRK</i>	0.81	0.80
<i>CTTN</i>	<b>3.17</b>	1.47
<i>CYFIP1</i>	1.21	1.47
<i>CYFIP2</i>	0.82	1.29
<i>DIAPH1</i>	0.82	0.87
<i>DSTN</i>	1.45	1.25
<i>EZR</i>	1.15	1.18
<i>FNBP1L</i>	1.28	1.22

<i>FSCN2</i>	1.06	<b>0.58</b>
<i>GSN</i>	<b>2.02</b>	<b>2.80</b>
<i>IQGAP1</i>	0.91	0.79
<i>IQGAP2</i>	0.82	1.11
<i>LIMK1</i>	0.89	1.16
<i>LIMK2</i>	0.97	0.69
<i>LLGL1</i>	1.27	1.29
<i>MACF1</i>	1.10	1.03
<i>MAP3K11</i>	1.09	0.91
<i>MAP4</i>	1.37	0.98
<i>MAPK13</i>	<b>0.62</b>	0.82
<i>MAPRE1</i>	1.01	0.81
<i>MAPRE2</i>	<b>0.57</b>	<b>0.52</b>
<i>MAPT</i>	0.79	<b>1.53</b>
<i>MARK2</i>	1.10	0.86
<i>MID1</i>	0.94	1.15
<i>MSN</i>	1.01	0.97
<i>MYLK</i>	0.87	1.28
<i>MYLK2</i>	0.76	1.11
<i>NCK1</i>	0.95	1.00
<i>NCK2</i>	1.12	1.18
<i>PAK1</i>	1.30	1.07
<i>PAK4</i>	0.96	0.84
<i>PFN2</i>	1.31	1.06
<i>PHLDB2</i>	0.69	<b>0.32</b>
<i>PIKFYVE</i>	1.05	0.90
<i>PPP1R12A</i>	0.98	0.84
<i>PPP1R12B</i>	1.45	1.01
<i>PPP3CA</i>	0.67	0.87
<i>PPP3CB</i>	<b>0.48</b>	0.91
<i>RAC1</i>	0.95	0.75
<i>RACGAP1</i>	0.78	0.76
<i>RDX</i>	1.03	0.76
<i>RHOA</i>	1.27	0.92
<i>ROCK1</i>	1.02	0.85
<i>SSH1</i>	1.05	1.10
<i>SSH2</i>	0.67	0.73
<i>STMN1</i>	0.73	0.96
<i>TIAM1</i>	1.16	1.00
<i>VASP</i>	1.34	1.18
<i>WAS</i>	0.92	0.99
<i>WASF1</i>	<b>0.65</b>	<b>0.63</b>
<i>WASL</i>	0.74	0.95

<sup>1</sup>As células Jurkat foram tratadas com GDP366 (10 $\mu$ M) ou AD80 (2 $\mu$ M) e o *fold-change* em relação ao tratamento com veiculo é apresentado. Os dados representam a média de dois experimentos independentes para cada condição.



A expressão relativa dos genes que apresentou alteração duas vezes a mais que o controle está destacado em negrito.

N.E.: Não apresentou níveis detectáveis de expressão.

## ANEXOS

## ANEXO A

## Reversine exerts cytotoxic effects through multiple cell death mechanisms in acute lymphoblastic leukemia. Carlos, J.A.E.G. *et al.*, Cellular Oncology, 2020.

Cellular Oncology  
<https://doi.org/10.1007/s13402-020-00551-3>

ORIGINAL PAPER



### Reversine exerts cytotoxic effects through multiple cell death mechanisms in acute lymphoblastic leukemia

Jorge Antonio Elias Godoy Carlos<sup>1</sup> · Keli Lima<sup>1</sup> · Juan Luiz Coelho-Silva<sup>2</sup> · Raquel de Melo Alves-Paiva<sup>3</sup> · Natália Cestari Moreno<sup>4</sup> · Hugo Passos Vicari<sup>1</sup> · Fábio Pires de Souza Santos<sup>3</sup> · Nelson Hamerschlak<sup>3</sup> · Leticia Veras Costa-Lotuf<sup>1</sup> · Fabiola Traina<sup>2</sup> · João Agostinho Machado-Neto<sup>1</sup>

Accepted: 22 July 2020  
 © International Society for Cellular Oncology 2020

#### Abstract

**Purpose** Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is an aggressive hematological cancer with limited therapeutic options for adult patients. Aurora kinases have drawn attention as potential targets in hematological neoplasms due to their high expression and biological functions. Aurora kinase A (AURKA) and AURKB are essential for a successful mitosis, acting in spindle mitotic organization and cytokinesis. Reversine is a synthetic purine analog that acts as a multi-kinase inhibitor with anti-neoplastic activity by targeting AURKA and AURKB.

**Methods** ALL patient gene expression data were retrieved from the Amazonia! database. For functional assays, Jurkat (T-ALL) and Namalwa (B-ALL) cells were exposed to increasing concentrations of reversine and submitted to various cellular and molecular assays.

**Results** We found that AURKB expression was higher in ALL patient samples compared to normal lymphocytes ( $p < 0.0001$ ). The ALL cell lines tested displayed aberrant AURKA and AURKB expression. In Jurkat and Namalwa cells, reversine reduced cell viability in a dose- and time-dependent manner ( $p < 0.05$ ). Reversine also significantly reduced the viability of primary ALL cells. Reversine induced apoptosis and autophagy, and reduced cell proliferation in both cell lines ( $p < 0.05$ ). Mitotic catastrophe markers, including cell cycle arrest at G<sub>2</sub>/M, increased cell size and DNA damage, were observed upon reversine exposure. Short- and long-term treatment with reversine inhibited autonomous clonogenicity ( $p < 0.05$ ). At the molecular level, reversine reduced AURKB activity, induced SQSTM1/p62 consumption, and increased LC3BII and  $\gamma$ -H2AX levels. In Namalwa cells, reversine modulated 25 out of 84 autophagy-related genes, including *BCL2*, *BAD*, *ULK1*, *ATG10*, *IRGM* and *MAP1LC3B*, which indicates that reversine acts by initiating and sustaining autophagy signals in ALL cells.

**Conclusions** From our data we conclude that reversine reduces the viability of ALL cells by triggering multiple cell death mechanisms, including apoptosis, mitotic catastrophe, and autophagy. Our findings highlight reversine as a potential anticancer agent for ALL.

**Keywords** Acute lymphoblastic leukemia · Cell death · Aurora kinases · Reversine

Jorge Antonio Elias Godoy Carlos and Keli Lima contributed equally to this work.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s13402-020-00551-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ João Agostinho Machado-Neto  
 jamachadoneto@usp.br

<sup>1</sup> Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, São Paulo, SP CEP 05508-900, Brazil

<sup>2</sup> Department of Medical Images, Hematology and Clinical Oncology, University of São Paulo at Ribeirão Preto Medical School, Ribeirão Preto, São Paulo, SP, Brazil

<sup>3</sup> Einstein's Teaching and Research Institute, Albert Einstein Hospital, São Paulo, SP, Brazil

<sup>4</sup> Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

## ANEXO B

**BUB3 (BUB3 mitotic checkpoint protein). Carlos, J.A.E.G. & Machado-Neto, J.A., Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, 2020.**

Atlas of Genetics and Cytogenetics  
in Oncology and Haematology



OPEN ACCESS JOURNAL

INIST-CNRS

## Gene Section

Review

### BUB3 (BUB3 mitotic checkpoint protein)

Jorge Antonio Elias Godoy Carlos, João Agostinho Machado-Neto

Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo, São Paulo, Brazil; jorgegdy@icloud.com; jamachadoneto@usp.br

Published in Atlas Database: March 2019

Online updated version : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/BUB3ID855ch10q26.html>

Printable original version : <http://documents.irevues.inist.fr/bitstream/handle/2042/70647/03-2019-BUB3ID855ch10q26.pdf>

DOI: 10.4267/2042/70647

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial-No Derivative Works 2.0 France Licence.  
© 2020 Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology

#### Abstract

BUB3 is a WD40 protein that belongs to spindle mitotic checkpoint complex, which monitors the chromosome attachment to mitotic (or meiotic) fuse and prevents premature chromosome segregation. Alterations in BUB3 have been associated with chromosomal instability and aneuploidy, but their contribution for cancer development and progression are poorly understood, and appear to differ depending on the type of cancer.

The present review contains data on BUB3 DNA, RNA, protein encoded and function.

#### Keywords

BUB3; Mitotic checkpoint protein BUB3; WD40 protein; Spindle checkpoint; Cell cycle; Anaphase-promoting complex.

#### Identity

**Other names:** BUB3L, hBUB3

**HGNC (Hugo):** BUB3

**Location:** 10q26.13

#### DNA/RNA

##### Description

The entire BUB3 gene is approximately 16.2 Kb (start: 123154277 and end: 123170467 bp; orientation: Forward strand).

##### Transcription

The BUB3 gene encodes for 4 transcript variants: there are two transcript variants deposited in the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) and two additional transcript variants reported in Ensembl (<http://www.ensembl.org/>).

The transcript variant 1 is the longest transcript variant (exons: 8, coding exons: 7, transcript length: 7828 bp) and encodes the isoform a (328 amino acids [aa]). The transcript variant 2 present an alternative splice site in 3' coding region (exons: 8, coding exons: 7, transcript length: 1361 bp), which leads to a frameshift and a shorter and distinct C-terminus compared to isoform a (isoform b, 326 aa)..

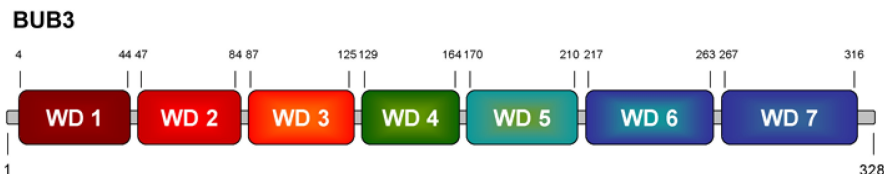


Figure 1. BUB3 protein structure. BUB3 protein presents seven WD40 repeat domain, a nearly 40 amino acids (aa) motif rich in tryptophan-aspartic acids (W-D). The position of aa are indicated.