

**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

## 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.

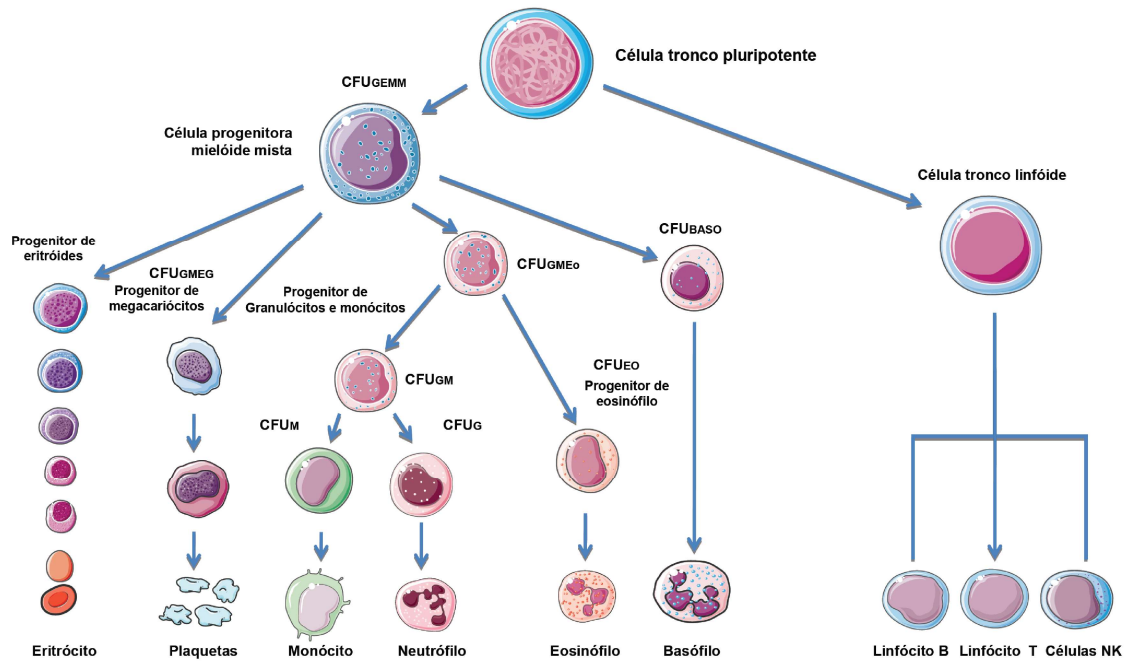
## INTRODUÇÃO

### 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.**

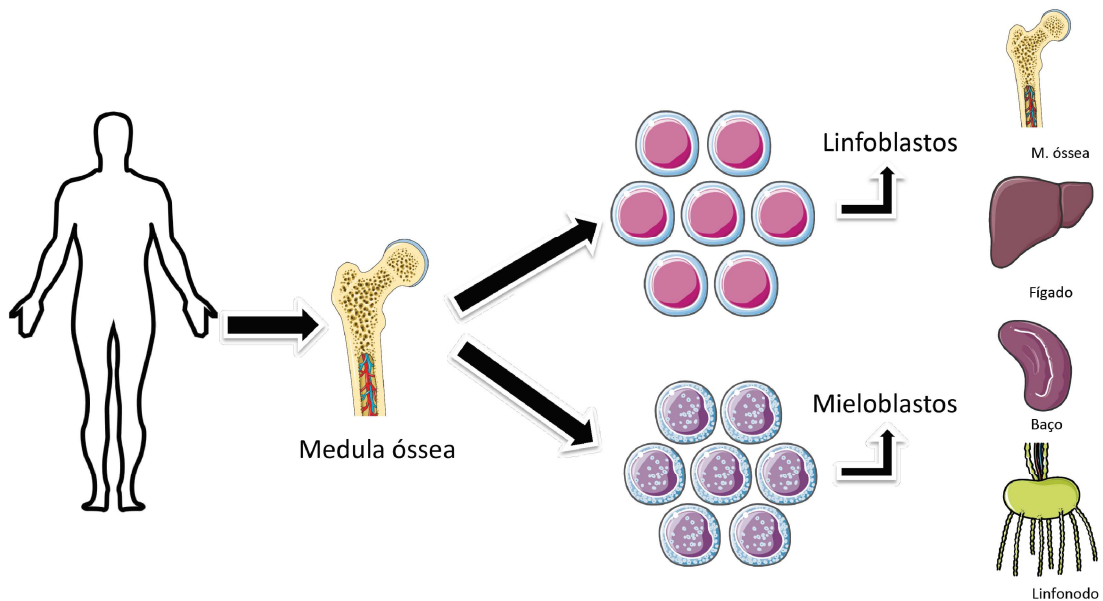


A hematopoese inicia-se a partir de uma célula tronco pluripotente que pode dar origem às distintas linhagens celulares ou autorenovar-se. A diferenciação celular a partir dessa célula tronco pode acontecer por alocação aleatória ou por sinais externos recebidos dando origem às unidades formadoras de 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.

## 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>

**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.

### **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.

## **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>.

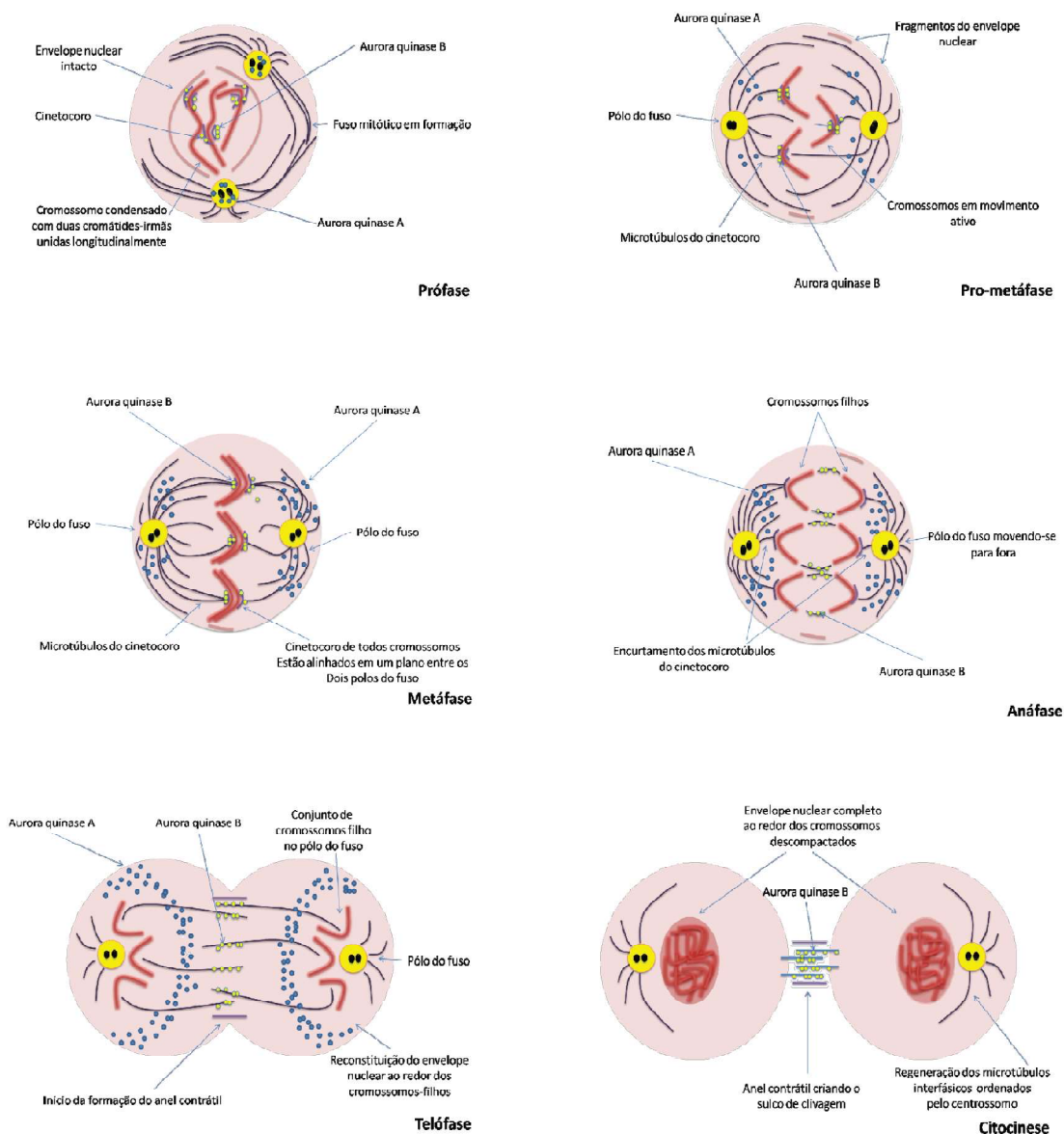
As proteínas denominadas como “passadores cromossomais” são responsáveis pela coordenação das funções citoesqueléticas e cromossomais durante a mitose. Essas proteínas estão associadas ao longo dos cromossomos durante a prófase e se concentram no centrômero interno durante a metáfase. Durante a transição 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 centróssomos 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>.

## **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>.

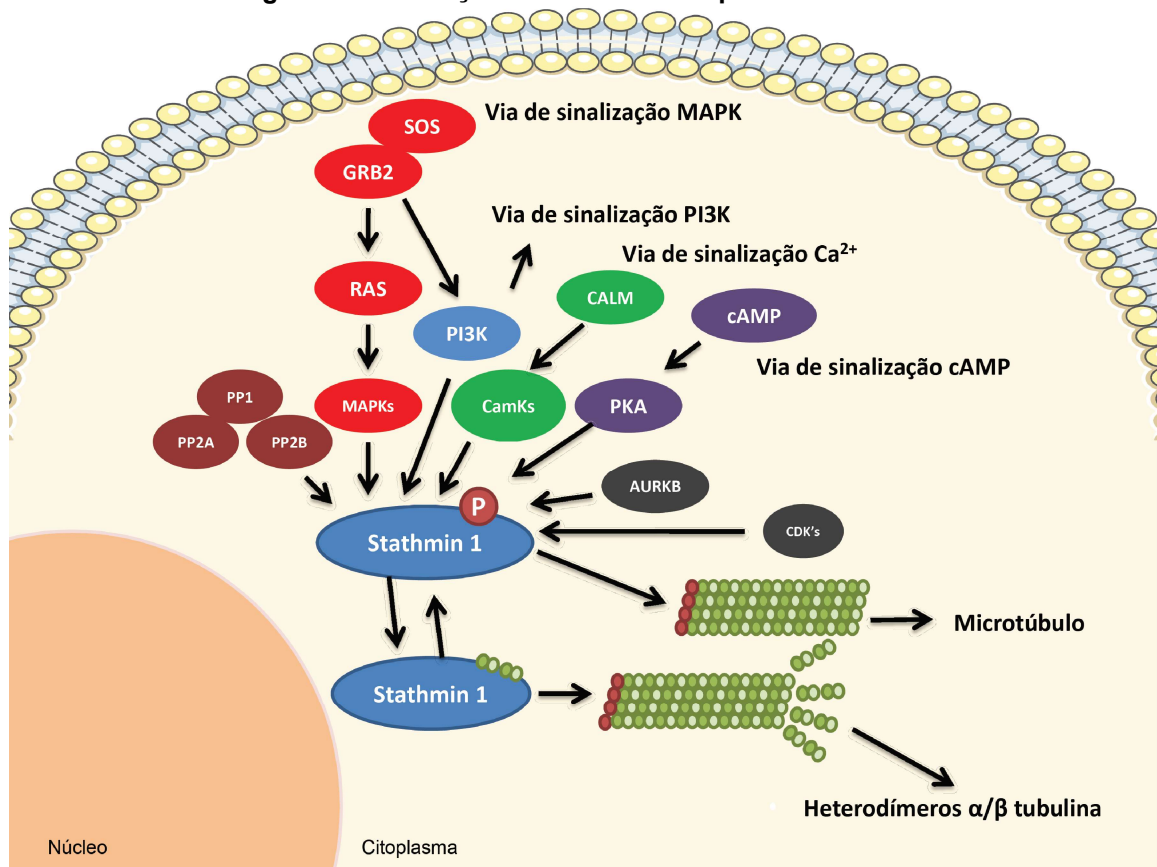
Os microtúbulos existem em um constante estado de polimerização e despolimerização que é referenciado como a dinâmica dos microtúbulos<sup>69,70</sup>. A proteína STMN1 atua sequestrando dímeros de  $\alpha/\beta$  tubulina reduzindo a polimerização dos microtúbulos ou estimulando os microtúbulos já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

## 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. Biauxue 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.