

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LEILANE SALES DE OLIVEIRA

**EFEITO CITOTÓXICO DO COMPOSTO YM-155 EM LINHAGENS DERIVADAS
DE LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA DE CÉLULAS T**

Alfenas/MG

2016

LEILANE SALES DE OLIVEIRA

**EFEITO CITOTÓXICO DO COMPOSTO YM-155 EM LINHAGENS DERIVADAS
DE LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA DE CÉLULAS T**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas-MG como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde. Área de concentração: Fisiopatologia
Orientadora: Profa. Dra. Jaqueline Carvalho de Oliveira
Co-orientadora: Profa. Dra. Marisa Ionta

Alfenas/MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Oliveira, Leilane Sales de.

Efeito citotóxico do composto YM-155 em linhagens derivadas de leucemia linfóide aguda de células T / Leilane Sales de Oliveira. -- 2016.

95 f. : il.

Orientadora: Jaqueline Carvalho de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Leucemia de Células T. 2. Inibidores químicos. 3. Apoptose. I. Oliveira, Jaqueline Carvalho de. II. Título.

CDD 616.99419

LEILANE SALES DE OLIVEIRA

**EFEITO CITOTÓXICO DO COMPOSTO YM-155 EM LINHAGENS
DERIVADAS DE LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA DE CÉLULAS T**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas-MG. Área de concentração: Fisiopatologia.

Aprovada em: 18/07/2016

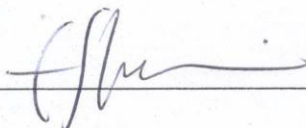
Profa. Dra. Jaqueline Carvalho de Oliveira
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Maria Sol Brassesco Annichini
Instituição: Universidade de São Paulo
USP

Assinatura: 

Prof. Dr. Felipe Fornias Sperandio
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Dedico este trabalho a Minha Família.
Em especial aos Meus Pais e ao Meu Irmão,
minha lição mais profunda de ética, dignidade e amor.
Obrigada por sempre acreditarem em mim e naquilo que faço,
pelo incentivo e por todos os ensinamentos de vida.
Espero que esta etapa, que agora termino,
possa de alguma forma retribuir todo o carinho, apoio
e dedicação que, constantemente, me oferecem.

AGRADECIMENTOS

Por mais difícil que seja transformar sentimentos em palavras, não poderia deixar de registrar o quanto serei eternamente grata a vocês pelo estímulo intelectual e emocional imprescindíveis no sucesso deste trabalho.

A **Deus**, por me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos e colocar neles pessoas tão especiais, força para não desistir e proteção para me amparar em todos os momentos.

Em especial, sou inteiramente grata à Profa. Dra. **Jaqueline Carvalho de Oliveira** pela orientação e suporte sempre, onde estimulou minha curiosidade e a vontade de querer fazer melhor, o que, sem dúvida, elevou meus conhecimentos científicos. Reconheço não só a confiança depositada, desde o início, mas também o sentido de responsabilidade que me inculuiu em todas as fases do Projeto. Agradeço também pela dedicação incansável ao nosso trabalho e pelas palavras de incentivo, me fazendo acreditar que tudo daria certo. E deu! Você é uma inspiração pessoal e profissional.

À Profa. Dra. **Marisa Ionta**, minha sincera admiração e agradecimento pela co-orientação neste Projeto. Muito obrigada por me acolher em seu laboratório de portas abertas, pela disponibilidade e pelo profissionalismo associado à amizade. Seu apoio constante e sugestões foram determinantes na elaboração desta Dissertação.

Ao Prof. Dr. **Angel Maurício Castro Gamero**, pelos conselhos e ensinamentos. Por estar à disposição, respondendo minhas dúvidas, incentivando e contribuindo para o enriquecimento da minha formação científica. Você é parte deste trabalho.

À Profa. Dra. **Ester Siqueira Caixeta**, por todo carinho e amizade, bem como por suas contribuições na etapa da qualificação e, interesse, apoio e preocupação nos momentos de aflição.

Ao Prof. Dr. **Luiz Gonzaga Tone** por nos ceder as linhagens celulares com as quais realizamos o Projeto, e me receber em seu laboratório, dando o suporte necessário durante a realização do mesmo.

À Dra. **Rosane de Paula Queiroz** pelo apoio e carinho com que me recebeu na Universidade de São Paulo (USP) – Ribeirão Preto.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e paciência em analisar este trabalho, discussões e sugestões que servirão para meu crescimento, aprendizado e incentivo à pesquisa.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde** agradeço a oportunidade e o privilégio que tive em frequentar este Mestrado que muito contribuiu para minha formação.

À secretária do Programa **Maria Antonieta Alvarenga** por sua simpatia e atenção na administração dos nossos compromissos, sendo uma profissional extremamente competente e dedicada.

Ao amigo **Rodrigo**, com quem dividi as tensões de todos os prazos desde a prova do Mestrado. Obrigada por ser essa pessoa incrível, disposto a me ajudar em todos os momentos e ter sempre as respostas mais brilhantes para meus questionamentos.

Ao amigo **Guilherme**, pelo carinho e extremo cuidado no apoio a meus experimentos, mas principalmente por todas as suas horas no fluxo que compartilhou comigo de “espontânea” vontade.

À amiga **Simone**, além da ajuda constante, meu agradecimento pela amizade, ombro e pelas melhores palavras nas horas mais difíceis.

Ao **Pablo**, quem sempre esteve ao meu lado se tornando um grande amigo, pela colaboração, parceria e por alegrar meus dias com sua energia contagiante.

Ao amigo **Rafa**, pelo suporte e transmissão de confiança em todos os momentos. Sua amizade e companheirismo diários são bençãos em minha vida.

Aos amigos, **Glícia, Joseana, Délcio, Évila e Renato** pelo carinho, amizade e por tornarem meus dias muito mais leves e prazerosos.

À **Grazi, Jão, Edu e Rodolfo** pela parceria no nosso “time”, disponibilidade e apoio no cuidado com nossas células.

À **Neusa e Isabel**, por cuidarem do nosso local de trabalho e darem a ele um ambiente muito familiar.

Às grandes amigas **Ana e Hellen**, com quem divido não só o apartamento, mas as diversas emoções envolvidas com esse momento. Em especial, à Ana pelos anos de amizade e por sempre cuidar e se preocupar comigo.

Em especial, às grandes amigas **Pamela, Flavinha e Andréia**, por viverem comigo minhas melhores lembranças, aliviando as tensões dessa fase, e me dando todo o suporte emocional que só se pode esperar de pessoas tão únicas e amadas.

À **FAPEMIG** agradeço pelo incentivo, suporte financeiro e por acreditar no potencial deste estudo.

Ao **CNPq** e **Capex**, pelo apoio financeiro concedido.

À **Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG**, agradeço a disponibilidade de instalações físicas e recursos que foram de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho. E minha gratidão se dá de forma especial por ser a instituição onde me graduei e, atualmente, exerço minhas atribuições de Farmacêutica.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

(HOLMES, 1858)

RESUMO

A leucemia linfóide aguda de células T (LLA-T) é um tipo agressivo de câncer hematológico que surge a partir da transformação maligna de progenitores de células T. Apesar do progresso significativo no tratamento atual, os desafios concentram-se na morbidade após os regimes de quimioterapia convencionais e na sobrevivência pós-recaída. Além disso, os pacientes com LLA-T apresentam pior prognóstico quando comparados àqueles com precursores de células B, conseqüentemente, novas abordagens terapêuticas ainda se fazem necessárias para aprimorar os resultados naquele subtipo. YM-155 é um derivado imidazólico originalmente classificado como supressor transcricional de survivina e tem demonstrado potente efeito antiproliferativo sobre uma grande variedade de tumores humanos, porém a atividade desse composto ainda é pouco explorada em linhagens de células T. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de YM-155 no crescimento e morte celular em linhagens de LLA-T infantil. O presente estudo demonstrou que YM-155 exibiu atividade antiproliferativa e potente efeito indutor de apoptose nessas células, na qual a linhagem JURKAT mostrou ser mais sensível ao tratamento em relação a CCRF-CEM, apresentando o valor de CI_{50} , respectivamente, $73,11 \pm 7,65$ nM e $2,17 \pm 0,08$ μ M. Além disso, YM-155 diminuiu significativamente a capacidade de formação de colônias e induziu o bloqueio do ciclo celular da CCRF-CEM na fase S e, na linhagem JURKAT, diminuiu substancialmente a população em G2/M e aumentou a fração Sub-G1. No entanto, em ambas, não foi observada a inibição da expressão de survivina após tratamento com YM-155, assim como a inibição da expressão dos genes *VEGF* e *Bcl-xL*, o que sugere que esse composto, em linhagens LLA-T mutadas para TP53, esteja atuando de forma independente da inibição de survivina e do fator de transcrição SP-1. Conclui-se que YM-155 é eficaz na redução do crescimento e aumento de morte celular, portanto representa um agente antitumoral promissor em linhagens de leucemia linfóide aguda de células T.

Palavras-chave: Leucemia linfóide aguda de células T. Survivina. YM -155.

Atividade antiproliferativa. Apoptose

ABSTRACT

T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is an aggressive hematological cancer that arises from the malignant transformation of T-cell progenitors. Despite the significant progress in current treatment, challenges remain the lifelong morbidity after present chemotherapy regimens and post-relapse survival. Additionally, patients with T-ALL have poor prognosis compared to those with B-cell precursor, consequently, novel therapeutic approaches are still needed to improve the outcome in this cohort. YM-155 is an imidazolium derivative originally discovered as suppressant of survivin transcription and has potent antiproliferative effects on a variety of human cancer, but, YM-155 effect in T-ALL cell line is underexplored. Based on this information, the present study aimed to evaluate YM-155 effect on cell lines derived from pediatric T-ALL. The drug exhibited antiproliferative activity and induced apoptosis. JURKAT cells (IC_{50} value: was 73.11 ± 7.65 nM) was more sensitive to treatment than CCRF-CEM (IC_{50} value: 2.17 ± 0.08 μ M). Moreover, YM-155 decreased clonogenic capacity and affected cell cycle dynamic. In CCRF-CEM, the treatment induced S phase arrest and, in JURKAT cells, decreased G2/M population and increased sub-G1 fraction. However, in both cell line, inhibition of survivin expression was not observed after treatment with YM-155, as well as the inhibition of *VEGF* and *Bcl-xL* genes expression, suggesting that this compound, in p53-deficient T-ALL cell line, is acting independently of survivin and SP-1 transcription factor inhibition. This results reinforcing the likelihood of using YM-155 as a therapeutic approach to combat leukemia and increase knowledge about mechanisms in vitro.

Keywords: T-cell acute lymphoblastic leukemia. Survivin. YM-155. Antiproliferative activity. Apoptosis

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - População heterogênea de blasto..... | 24 |
| Figura 2 - Estrutura química do composto YM-155 | 30 |
| Figura 3 - Funções da survivina que contribuem para o desenvolvimento de tumores e metástase..... | 34 |
| Figura 4 - Ensaio de viabilidade da linhagem JURKAT determinada com o corante resazurina..... | 42 |
| Figura 5 - Viabilidade celular da linhagem CCRF-CEM determinada pelo ensaio com resazurina | 50 |
| Figura 6 - Viabilidade celular da linhagem JURKAT determinada pelo ensaio com resazurina | 51 |
| Figura 7 - Imagens obtidas por microscopia em contraste de fase da linhagem CCRF-CEM... .. | 52 |
| Figura 8 - Imagens obtidas por microscopia em contraste de fase da linhagem JURKAT | 53 |
| Figura 9 - Gráfico das células viáveis da linhagem CCRF-CEM | 55 |
| Figura 10 - Gráfico das células viáveis da linhagem JURKAT | 56 |
| Figura 11 - Frequência (%) de células da linhagem CCRF-CEM marcadas por Anexina V e/ou 7-AAD | 58 |
| Figura 12 - Frequência (%) de células da linhagem JURKAT marcadas por Anexina V e/ou 7-AAD | 59 |
| Figura 13 - Frequência (%) de células CCRF-CEM com fragmentação de DNA | 60 |
| Figura 14 - Frequência (%) de células JURKAT com fragmentação de DNA | 60 |
| Figura 15 - Taxa (%) de formação de colônias da linhagem CCRF-CEM..... | 61 |
| Figura 16 - Taxa (%) de formação de colônias da linhagem JURKAT | 62 |
| Figura 17 - Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene <i>survivina</i> na CCRF-CEM..... | 63 |
| Figura 18 - Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene <i>survivina</i> na JURKAT | 63 |
| Figura 19 - Gráfico da quantificação relativa da expressão dos genes <i>VEGF</i> e <i>Bcl- xL</i> na CCRF-CEM | 64 |

| | |
|---|----|
| Figura 20 - Gráfico da quantificação relativa da expressão dos genes <i>VEGF</i> e <i>Bcl- xL</i> na JURKAT | 64 |
| Figura 21 - Expressão de survivina nas linhagens CCRF-CEM e JURKAT por <i>western blotting</i> | 65 |
| Figura 22 - Expressão de survivina nas linhagens CCRF-CEM e JURKAT por <i>western blotting</i> | 65 |
| Figura 23 - Gráfico da distribuição da população de células CCRF-CEM nas diferentes fases do ciclo celular | 66 |
| Figura 24 - Gráfico da distribuição da população de células JURKAT nas diferentes fases do ciclo celular | 67 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Subclassificação de LLA-T de acordo com estágios de diferenciação... | 25 |
| Tabela 2 - Sequência dos primers utilizados na análise da expressão gênica em nível de RNAm | 47 |
| Tabela 3 - Número de células da linhagem CCRF-CEM, pelo ensaio de exclusão por azul de tripano, após tratamento com YM-155 por 24 h | 54 |
| Tabela 4 - Número de células da linhagem CCRF-CEM, pelo ensaio de exclusão por azul de tripano, após tratamento com YM-155 por 48 h | 54 |
| Tabela 5 - Número de células da linhagem JURKAT, pelo ensaio de exclusão por azul de tripano, após tratamento com YM-155 por 24 h..... | 55 |
| Tabela 6 - Número de células da linhagem JURKAT, pelo ensaio de exclusão por azul de tripano, após tratamento com YM-155 por 48 h..... | 55 |
| Tabela 7 - Frequência (%) de células da linhagem CCRF-CEM marcadas por Anexina V e/ou 7-AAD | 57 |
| Tabela 8 - Frequência (%) de células da linhagem JURKAT marcadas por Anexina V e/ou 7-AAD | 58 |
| Tabela 9 - Frequência (%) de células da linhagem CCRF-CEM nas diferentes fases do ciclo celular | 66 |
| Tabela 10 - Frequência (%) de células da linhagem CCRF-CEM nas diferentes fases do ciclo celular | 67 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|--|
| $\Delta\Delta CT$ | - <i>Delta delta cycle threshold method</i> |
| $\gamma H2AX$ | - <i>Phosphorylated histone H2AX</i> |
| 7-AAD | - 7-aminoactinomycin D |
| A-549 | - Linhagem de câncer de pulmão |
| ABL1 | - <i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i> |
| AGS | - Linhagem de tumor de estômago |
| Akt | - Proteína quinase Serina/Treonina específica |
| Ang1 | - Angiopietina-1 |
| ANOVA | - Análise de Variância |
| ART | - <i>ADP-ribosylation factor</i> |
| ATCC | - <i>American Type Culture Collection</i> |
| BCA | - <i>Bicinchoninic Acid</i> |
| Bcl-2 | - <i>B- cell lymphoma 2</i> |
| Bcl-Xl | - <i>B-cell lymphoma-extra large</i> |
| BCR | - <i>Breakpoint cluster region protein</i> |
| BrdU | - <i>5-bromo-2'-deoxyuridine</i> |
| CAD | - carbamílfosfato sintetase/ aspartato carbamíltransferase/ dihidrorotase |
| Calu-6 | - Linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão |
| CCND1 | - Gene de ciclina D1 |
| CDKN1A | - <i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A</i> |
| CDKN2A | - <i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A</i> |

| | |
|------------------|---|
| CHO | - Ovário de hamster chinês |
| cDNA | - DNA complementar |
| <i>c-fos</i> | - Fator de transcrição da família <i>Fos</i> |
| Chk2 | - <i>Checkpoint kinase 2</i> |
| CI ₅₀ | - Concentração inibitória média |
| CPC | - <i>Complexo passageiro cromossômico</i> |
| CREB | - <i>cAMP response element-binding protein</i> |
| DEPC | - Di-etil pirocarbonato |
| DMSO | - Dimetilsulfóxido |
| E2F1 | - Fator de transcrição 1 da família E2F |
| EDTA | - <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> |
| EGFR | - <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> |
| FITC | - Isotiocianato de fluoresceína |
| HBXIP | - Proteína de interação com a proteína X do vírus da hepatite B |
| HeLa | - Linhagem de carcinoma cervical |
| HepG2 | - Linhagem de carcinoma hepatocelular humano |
| HLA-DR | - <i>Human Leukocyte Antigen - antigen D Related</i> |
| IGFR | - <i>Insulin-like Growth Factor</i> |
| Ig | - Imunoglobulina |
| IGROV-1 | - Linhagem de carcinoma de ovário humano |
| ILF3 | - Interleucina 3 |
| INK4A | - Família de inibidores de CdKs |
| INSEN | - Proteínas do interior do centrômero |
| JURKAT | - Linhagem celular derivada de Leucemia Linfóide Aguda de |

| | |
|--------------------|--|
| | células T |
| K562 | - Linhagem celular derivada de Leucemia Linfóide Aguda de células B |
| KIP | - Família de inibidores de CdKs |
| LLA | - <i>Leucemia Linfóide Aguda</i> |
| LLA-T | - Leucemia Linfóide Aguda de células T |
| LLA-B | - Leucemia Linfóide Aguda de células B |
| LMA | - Leucemia mielóide aguda |
| LMO1 | - <i>LIM domain only 1 (rhombotin-like 1)</i> |
| LMO2 | - <i>LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)</i> |
| LYL1 | - <i>Lymphoblastic Leukemia Associated Hematopoiesis Regulator 1</i> |
| Mcl-1 | - <i>Myeloid Cell Leukemia 1</i> |
| MDA-MB-468 | - Linhagem celular de tumor de mama |
| MLL | - <i>Mixed lineage leukemia</i> |
| mTOR | - <i>Mammalian target of rapamycin</i> |
| MTX | - Metotrexato |
| NADPH | - <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> |
| NF- κ B | - <i>Nuclear Factor Kappa B</i> |
| p54 ^{nrb} | - <i>paraspeckle regulatory 54-kDa nuclear RNA-binding protein</i> |
| PARP | - <i>Polimerases Poli-ADP-ribose</i> |
| PAX-5 | - <i>Paired Box 5</i> |
| PBSA | - <i>Phosphate Buffer Saline</i> |
| PBX1 | - <i>Pre-B-Cell Leukemia Homeobox 1</i> |

| | |
|---------|---|
| PC-3 | - Linhagem celular de cancro de próstata |
| PCR | - <i>Polimerase Chain Reaction</i> |
| PI3K | - <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i> |
| PKB | - <i>Protein kinase B</i> |
| PPC-1 | - Linhagem celular de cancro de próstata |
| PVDF | - <i>Polyvinylidene fluoride</i> |
| qRT-PCR | - <i>Quantitative R</i> |
| RCT | - <i>Receptor de célula T</i> |
| REH | - Linhagem celular derivada de Leucemia Linfóide Aguda de células B |
| RIPA | - <i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i> |
| RL | - Linhagem celular de linfoma |
| ROS | - <i>Reactive Oxygen Species</i> |
| rTNF | - Receptore de fator de necrose tumoral |
| RT-PCR | - <i>Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction</i> |
| SDS | - Dodecil sulfato de sódio |
| SFB | - Soro Fetal Bovino |
| siRNA | - <i>small interfering RNA</i> |
| SLC35F2 | - <i>Solute carrier family 35 member F2</i> |
| STAT | - <i>Signal Transducer and Activator of Transcription protein</i> |
| SUPB15 | - Linhagem celular derivada de Leucemia Linfóide Aguda de células B |
| TAL1 | - <i>T-Cell Acute Lymphocytic Leukemia 1</i> |
| TAL2 | - <i>T-Cell Acute Lymphocytic Leukemia 1</i> - <i>Tris-buffer saline</i> |

| | |
|--------|--|
| TBS | |
| TCF3 | - Transcription Factor 3 |
| TDT | - desoxinucleotidiltransferase terminal |
| Tie2 | - <i>Tirosina quinase 2</i> |
| TLX1 | - <i>T-Cell Leukemia Homeobox 1</i> |
| TLX3 | - <i>T-Cell Leukemia Homeobox 3</i> |
| TNF-R1 | - <i>Tumor Necrosis Factor Receptor 1</i> |
| TP53 | - Proteína de 53 KDa |
| TRITC | - Isotiocianato de tetrametil rodamina |
| TTBS | - <i>Tris-buffer saline and tween 20</i> |
| TUNEL | - <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i> |
| U138MG | - Linhagem de glioblastoma |
| U251MG | - Linhagem de glioblastoma |
| VEGF | - <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> |
| VEGFR | - <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i> |
| XIAP | - <i>Proteína inibidora de apoptose ligada ao X</i> |
| YM-155 | - <i>4,9-dihydro-1-(2-methoxyethyl)2-methyl-4,9-dioxo-3-(2-pyrazinylmethyl)-1H-naphth[2,3-d]imidazolium, bromide</i> |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 21 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 23 |
| 2.1 | LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA | 23 |
| 2.1.1 | Subtipos da LLA infantil | 24 |
| 2.1.1.1 | Imunofenótipo..... | 25 |
| 2.1.1.2 | Alterações genéticas..... | 26 |
| 2.1.2 | Tratamento da LLA | 28 |
| 2.2 | YM-155 | 30 |
| 2.2.1 | Vias Moleculares de YM-155 | 32 |
| 2.2.1.1 | Survivina e sua relação com o câncer | 32 |
| 2.2.1.2 | Fator de transcrição SP1 | 35 |
| 2.2.1.3 | Complexo ILF3/p54 ^{nrb} | 37 |
| 2.2.2 | YM-155 e sua relação com TP53 | 37 |
| 3 | OBJETIVO | 39 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL | 39 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 39 |
| 4 | METODOLOGIA | 40 |
| 4.1 | LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTURA | 40 |
| 4.2 | PREPARAÇÃO DO COMPOSTO YM-155..... | 40 |
| 4.3 | ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR..... | 41 |
| 4.4 | ENSAIO DE CRESCIMENTO CELULAR | 42 |
| 4.5 | ENSAIO DE MORTE CELULAR | 43 |
| 4.5.1 | Ensaio de Anexina V | 43 |
| 4.5.2 | Ensaio de TUNEL | 44 |
| 4.7 | ENSAIO DE CAPACIDADE CLONOGÊNICA | 45 |
| 4.8 | ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM NÍVEL DE RNAm..... | 45 |
| 4.9 | <i>WESTERN BLOTTING</i> (IMMUNOBLLOT)..... | 47 |
| 4.10 | ENSAIO DE CICLO CELULAR | 48 |
| 4.11 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 49 |
| 5 | RESULTADOS | 50 |
| 5.1 | ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR | 50 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 5.2 | ANÁLISE DE CRESCIMENTO CELULAR..... | 54 |
| 5.3 | ANÁLISE DE MORTE CELULAR..... | 56 |
| 5.3.1 | Análise de Anexina V | 56 |
| 5.3.2 | Análise de TUNEL | 59 |
| 5.4 | ANÁLISE DE CAPACIDADE CLONOGÊNICA..... | 61 |
| 5.5 | ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM NÍVEL DE RNA | 62 |
| 5.6 | ANÁLISE DE <i>WESTERN BLOTTING</i> | 65 |
| 5.7 | ANÁLISE DA DINÂMICA DO CICLO CELULAR | 66 |
| 6 | DISCUSSÃO | 68 |
| 7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 77 |
| | REFERÊNCIAS..... | 78 |

1 INTRODUÇÃO

A leucemia linfóide aguda (LLA) se refere a um subtipo de neoplasia de células hematopoiéticas caracterizado pela rápida proliferação clonal e acúmulo de precursores linfóides na medula óssea, provocando alteração da hematopoiese normal. A LLA representa o câncer mais comum da infância, correspondendo a aproximadamente um quarto de todos os casos de câncer e 80% das leucemias da infância (PUI, 2010; LE JEUNE; THOMAS, 2016). Embora possa ocorrer em qualquer idade, tem incidência maior em crianças com idade entre 2 e 5 anos (BELMONTE et al., 2016).

As características biológicas da LLA, assim como seu prognóstico apresentam grande heterogeneidade em decorrência do subtipo considerado (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015; KEBRIAIEI; LARSON, 2003). Com relação ao imunofenótipo da LLA, as duas classes principais encontradas são de precursores B (LLA-B) e T (LLA-T), sendo a LLA-T associada a maior resistência à terapia na fase inicial de tratamento (indução) e recaídas extramedulares, e apesar dos avanços no tratamento esse subtipo ainda possui pior prognóstico quando comparado a LLA infantil de células B (LLA-B) (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015)

A poliquimioterapia representa o tratamento de escolha para a LLA e emprega fármacos com diferentes mecanismos de ação; e em alguns casos, o transplante de medula óssea é também indicado. As propostas terapêuticas para LLA infantil têm contribuído significativamente para a cura dos pacientes, pois cerca de 80% a 90% deles apresentam remissão total da doença (LE JEUNE; THOMAS, 2016). Contudo, um percentual de 15 a 20% dos pacientes sofrem recaída da doença, sendo que as chances de uma segunda remissão caem para 50 a 70%, e nesses pacientes em recaída apenas 20 a 30% são curados (HUNGER; MULLIGHAN, 2015).

Portanto, com o objetivo de se alcançar a remissão completa dos pacientes com LLA infantil, melhorar as respostas clínicas e a prevenção de recaídas, pesquisas têm buscado identificar novos compostos que sejam mais efetivos e apresentem maior seletividade às células tumorais, aspecto relevante para amenizar os efeitos indesejados da quimioterapia.

Nos últimos anos, a atividade antitumoral do composto YM-155 (*4,9-dihydro-1-(2-methoxyethyl)-2-methyl-4,9-dioxo-3-(2-pyrazinylmethyl)-1H-naphth[2,3-d]*

imidazolium, bromide) (Astellas Pharma Inc) tem sido investigada e alguns estudos mostram que o referido composto tem promissora atividade antitumoral devido a sua capacidade de inibir a atividade do promotor do gene que codifica a survivina (CHENG et al., 2012; NAKAHARA et al., 2007; TAO et al., 2012; ZHANG et al., 2016).

Survivina é membro da família de proteínas inibidoras de apoptose que tem papel fundamental na regulação da divisão celular e inibição da apoptose via bloqueio da ativação de caspases (CHEN et al., 2016). Essa proteína é considerada um marcador tumoral, uma vez que, seus níveis de expressão são altos em diversos tipos de tumor. Além disso, a expressão de survivina está correlacionada à resistência terapêutica e pior prognóstico (CHEN et al., 2016; PARK et al., 2011).

Estudos mostram que o composto YM-155 tem atividade antiproliferativa e pró-apoptótica sobre diferentes linhagens tumorais, as quais incluem tumores derivados de mama, pulmão, fígado, rim, melanoma, glioblastoma, nervos periféricos e leucemia mielóide aguda (DAÍ et al., 2012; GUO H. et al., 2015; GUO K. et al., 2015; GHADIMI et al., 2012; PAVLIDOU, KROUPIS; DIMAS, 2014; SMITH et al., 2015; YAMANAKA et al., 2011).

O efeito citotóxico de YM-155 sobre células de LLA tem sido evidenciado, porém, a maior parte dos estudos investigam a atividade do referido composto em linhagens do subtipo B (CHANG et al., 2015; TYNER et al., 2012). Assim sendo, é relevante estudar o potencial do composto YM-155 em células de LLA-T, uma vez que esse tipo de leucemia apresenta um pior prognóstico em relação a LLA-B.

Com isso, o presente trabalho pretende contribuir para o melhor entendimento da ação de YM-155 em células derivadas de LLA-T, com o objetivo de explorar novas abordagens terapêuticas para o tratamento de leucemias infantis do subtipo T.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Serão apresentadas as características mais comuns observadas nas leucemias, principalmente no tipo leucemia linfóide aguda do subtipo T no qual o presente trabalho concentrou-se. Assim como, a identificação do composto YM-155 e de suas principais vias moleculares.

2.1 LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA

As leucemias são neoplasias de células hematopoiéticas que se originam de células transformadas na medula óssea. Esse tipo de câncer é caracterizado por sua heterogeneidade fenotípica e genética, além da etiologia indefinida, uma vez que, está relacionado à interação de fatores genéticos, imunológicos, epigenéticos e ambientais (HERNÁNDEZ; MENÉNDEZ, 2016; IRONS; STILMANN, 1996).

As células transformadas, em geral, compartilham algumas características, as quais incluem: autossuficiência em sinais proliferativos, insensibilidade aos sinais anti-proliferativos, evasão à apoptose, potencial replicativo ilimitado, capacidade de induzir a formação de vasos sanguíneos (angiogênese), invasão tecidual e disseminação sistêmica (metástase) (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

A leucemia linfóide aguda (LLA) é caracterizada pela rápida proliferação clonal e acúmulo de precursores linfóides, bloqueados no estágio inicial de diferenciação, na medula óssea provocando alteração da hematopoiese normal. Essas células podem ainda adquirir a capacidade de se infiltrarem em órgãos como baço, fígado, gânglios linfáticos e órgãos do sistema nervoso central (FIGURA 1) (LE JEUNE; THOMAS, 2016; PUI; JEHA, 2007).

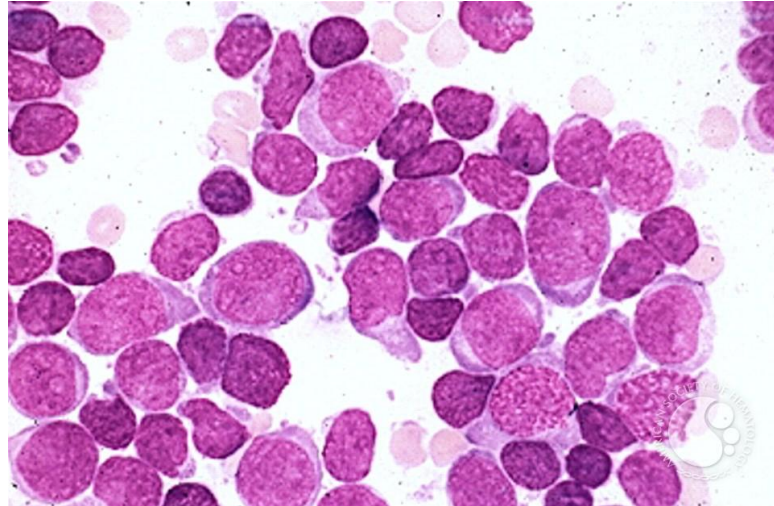


Figura 1 – População heterogênea de blastos em aspirado de medula óssea de paciente com LLA.

Fonte: Disponível em <<http://imagebank.hematology.org>>

A LLA representa o câncer mais comum da infância, correspondendo a aproximadamente um quarto de todos os casos de câncer e 80% das leucemias da infância (PUI, 2010; LE JEUNE; THOMAS, 2016). Embora possa ocorrer em qualquer idade, tem incidência maior em crianças com idade entre 2 e 5 anos (PUI; EVANS, 2006; BELMONTE et al., 2016). Além disso, as características biológicas da LLA, assim como seu prognóstico apresentam grande heterogeneidade em decorrência do subtipo considerado (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015; KEBRIAIEI; LARSON, 2003).

2.1.1 Subtipos da LLA

A LLA pode ser classificada em diferentes subtipos, principalmente, de acordo com o imunofenótipo e as alterações genéticas apresentadas pelas células.

2.1.1.1 Imunofenótipo

Com relação ao imunofenótipo da LLA, as duas classes principais encontradas são precursores B (LLA-B) e T (LLA-T). A LLA-B é caracterizada pela expressão de uma variedade de antígenos de célula B específicos que geralmente incluem PAX-5, CD19, CD20, CD22, CD24 e CD79a (ONCIU, 2009).

Dependendo do padrão de expressão de imunoglobulinas (Ig), a LLA-B pode ser classificada em pró-B (ausência de expressão Ig), pré-B comum (expressão citoplasmática de cadeias M com expressão ausente ou restrita da cadeia leve de Ig) e pré-B transicional (com expressão citoplasmática e na superfície de cadeia M, porém expressão ausente ou restrita da cadeia leve de Ig). Alguns casos raros podem apresentar expressão IgM completa na superfície, associado com outras características de células B maduras, como ausência CD34 e TDT (ONCIU, 2009). Nos casos B, Pró-B representa 5%, 75% correspondem ao subtipo comum e 15% de pré-B transicional, apenas 2-5% são do tipo maduro (FARIAS; CASTRO, 2004; MULLIGHAN, 2012).

A LLA-T é caracterizada pela expressão de antígenos associados à linhagem T (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8) assim como CD1a, CD10, CD34, CD99, HLA-DR e TDT (ONCIU, 2009). A LLA-T também pode ser subclassificada de acordo com os estágios de desenvolvimento do timócito normal, como mostrado na tabela seguinte (TABELA 1) (ONCIU, 2009).

Tabela 1 – Subclassificação de LLA-T de acordo com estágios de diferenciação.

| Subtipo | CD1a | CD2 | cCD3 | sCD3 | CD4 | CD5 | CD7 | CD8 | CD34 |
|-------------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| Pró-T | - | - | + | - | - | - | + | - | + |
| Pré-T | - | + | + | - | - | ± | - | - | ± |
| T cortical | + | + | + | - | + | ± | + | + | - |
| T medular | - | + | + | + | ± | ± | + | ± | - |

Fonte: Modificado de Onciu, 2009. (±), pode ou não estar presente.

A LLA-T representa 15% dos casos de LLA infantil e está associado com comportamento biológico e características clínicas específicas, exibindo mais resistência à terapia na primeira fase de tratamento, recaídas extramedulares e, apesar dos avanços no tratamento, ainda possui um pior prognóstico quando comparado a LLA-B infantil. Portanto a LLA-T necessita de terapia intensificada em relação aos outros subtipos (ARICÒ et al., 2002; BHOJWANI; YANG; PUI, 2015; GOLDBERG et al., 2003).

2.1.1.2 Alterações genéticas

Aproximadamente 75% das crianças com LLA apresentam anormalidades cromossômicas, sendo que alterações numéricas são as mais frequentes (HUNGER; MULLIGHAN, 2015).

A hiperdiploidia, caracterizada pela presença de 51-65 cromossomos, está presente em 20-30% dos casos de LLA infantil, sendo associada a prognósticos favoráveis (MULLIGHAN, 2012; SUTCLIFFE et al., 2005). A hipodiploidia (44–45 cromossomos) é observada em 6% dos casos, cujos pacientes apresentam respostas inferiores aos regimes adaptados de quimioterapia e estão associadas ao prognóstico desfavorável (MULLIGHAN; 2015; VROOMAN; SILVERMAN, 2009).

Eventos de translocação cromossômica também são comuns e resultam na expressão de proteínas quiméricas, as quais estão envolvidas com o desenvolvimento das LLAs, inclusive, podendo ser os primeiros eventos na leucemogênese, ocorrendo ainda durante o desenvolvimento fetal (GREAVES, 2003; MOORMAN, 2016). A translocação $t(12;21)(p13;q22)$, denominada TEL/AML1 ou ETV6/RUNX1, é a mais comum da LLA-B sendo observada em 15-25% dos casos e está relacionada a pacientes de 1 a 10 anos e a um bom prognóstico (FORESTIER et al., 2007; MOORMAN, 2016; MULLIGHAN, 2012).

A presença do cromossomo Filadélfia (BCR/ABL1), resultado da translocação $t(9;22)(q34;q11)$, é reconhecido como um marcador de pior prognóstico (ARICO et al., 2000; MOORMAN, 2016), gerando uma proteína quimérica com atividade tirosina quinase elevada. BCR/ABL1 ativa vias sinalizadoras que aumentam a

proliferação e alteram o processo de diferenciação celular. Essa translocação está presente em cerca de 3-5% dos casos de LLA infantil (MULLIGHAN, 2012).

O gene *MLL* (*mixed lineage leukemia*), mapeado em 11q23, tem papel fundamental na renovação hematopoiética de células-tronco e na leucemogênese (KRIVTSOV; AMRSTRONG, 2007). Rearranjos nesse são identificados em 5% dos casos de LLA-B infantil, chegando a 10% na LLA-T, e correspondem a aproximadamente 80% dos casos que são diagnósticos antes do primeiro ano de vida (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015). Por sua vez, a translocação t(1;19)(q23;p13) ocorre em 6% dos pacientes e envolve a fusão *TCF3-PBX1*, o qual se liga a proteína HOX, interferindo na diferenciação hematopoiética (MULLIGHAN, 2012).

A LLA-T apresenta alterações genéticas diversas e complexas, sendo que múltiplas alterações contribuem na patogênese dos subtipos da doença. As translocações cromossômicas estão presentes em cerca de 50% dos casos de LLA-T. Muitas translocações resultam na aproximação de oncogenes a promotores e acentuadores de genes do receptor de célula T (TCR) (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015; WENG et al., 2004), levando a hiperexpressão desses oncogenes em progenitores de células T, como *TLX1-TCR δ* , enquanto outras resultam na fusão de dois oncogenes que codificam fatores de transcrição como, por exemplo, *SIL-TAL1*. Estudos recentes do perfil de expressão gênica identificaram quatro subtipos principais de LLA-T, baseados na ativação de vias oncogênicas, sendo elas as que envolvem os genes *TLX1*, *LYL1*, *TAL/LMO2* e *TLX3* (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015).

Sinalização NOTCH1 é uma das principais vias envolvidas na proliferação e sobrevivência das células T de leucemia. Mutações no gene NOTCH1 têm sido encontradas em mais de 50% dos casos de LLA-T. Desregulação na sinalização de NOTCH1 pode induzir a expressão de diversos oncogenes e inibir vários supressores tumorais, fatores envolvidos na transformação maligna de precursores imaturos de células T e manutenção da leucemia já estabelecida. Dentre os alvos de NOTCH1 estão pré-TCRa, CD28, Deltex-1, hey1, hes1 e c-Myc, moléculas relacionadas à ativação de diferentes vias, as quais incluem a via PI3K–Akt/pkb dependente de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (BELMONTE et al., 2016; WENG et al., 2004).

Mutações envolvendo o braço curto do cromossomo 9 têm sido descritas com alta frequência em LLA-T. Cerca de 80% dos casos de LLA-T e 20% de LLA pré-B

apresentam perda dos genes supressores *p16/INK4A* e *p14/ARF* como resultado de deleções no locus *CDKN2A* (banda cromossômica 9p21). Além disso, estão aumentados os fatores transcricionais oncogênicos *c-Myc*, *nkx2-1*, *nkx2-2* e os genes *LMO1* e *LMO2*; *HOXA*; *TAL1* e *TAL2*. Alterações na expressão desses genes regulatórios podem levar ao bloqueio do processo de diferenciação celular bem como induzir aumento na taxa de proliferação em LLA-T (BELMONTE et al., 2016; HARRISON; FORONI, 2002).

2.1.2 Tratamento da LLA

Embora muito já tenha sido alcançado com os tratamentos da LLA infantil, onde em alguns centros as taxas de cura atingem 80% a 90% dos pacientes, esse tumor é o mais frequente da infância e a LLA permanece uma das principais causas de morte por câncer pediátrico (LE JEUNE; THOMAS, 2016). Entre os pacientes que atingem a remissão clínica, após a fase inicial do tratamento, 15 a 20% ainda sofrem recaída da doença, sendo que as chances de se chegar a uma segunda remissão são de 50 a 70%, e desses pacientes apenas 20 a 30% são curados (HUNGER; MULLIGHAN, 2015).

As abordagens terapêuticas mais recentes têm buscado não só a cura como a melhoria da qualidade de vida das crianças, diminuindo sequelas e a morbidade (PUI; ROBINSON, 2008). O tratamento da LLA se dá através de quimioterapia e, em alguns casos, o transplante de medula óssea é indicado (MEHTA et al., 2014). A poliquimioterapia é extremamente importante na eficácia do tratamento, uma vez que envolve fármacos com diferentes mecanismos de ação. Dentre eles estão os agentes alquilantes, antimetabólitos, antracíclicos e epipodofilotóxicos. A terapia pode ser adaptada ao risco de recaída dos pacientes, que é avaliado no momento do diagnóstico e nas primeiras semanas do tratamento (PUI et al., 2008; PUI; ROBINSON; LOOK, 2008).

De acordo com o protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil (GBTLI-99), os critérios básicos para estratificação de grupo de risco dos pacientes são idade, contagem leucocitária ao diagnóstico e resposta inicial ao tratamento. Respostas variáveis ao tratamento podem ser observadas, até entre os

casos do mesmo subtipo genético e, provavelmente estão relacionadas ao fato de que diferentes mutações podem ocorrer ao longo do processo de transformação maligna. Outros fatores prognósticos como índice de DNA da célula leucêmica, anormalidades citogenéticas e imunofenótipo também têm sido utilizados na estratificação dos pacientes nos grupos de risco (PUI; EVANS, 2013).

Os protocolos de poliquimioterapia podem ser adaptados às seguintes fases: indução, consolidação da remissão, intensificação, consolidação tardia e manutenção. Na indução são geralmente utilizados os medicamentos: dexametasona, vincristina, asparaginase e daunorrubicina. Intensificação: metotrexato, 6-mercaptopurina, doxorubicina, ciclofosfamida e asparaginase. Consolidação tardia: dexametasona, vincristina, doxorubicina, ciclofosfamida, asparaginase e 6-tioguanina. Manutenção: vincristina, metotrexato, 6-mercaptopurina e dexametasona. A duração do tratamento varia de acordo com o grupo de risco do paciente, sendo cerca de 2 a 3 anos (GBTLI, 2000).

A terapia abrange ainda a administração da quimioterapia intratecal. A radiação de crânio, largamente utilizada como medida de profilaxia para o sistema nervoso central tem sido suprida pela quimioterapia sistêmica e intratecal, a fim de minimizar possíveis complicações neurológicas e o surgimento de novas neoplasias (PUI et al., 2008; PUI; ROBISON; LOOK, 2008).

Os resultados obtidos com o uso intensivo e combinado de diferentes quimioterápicos tem sido satisfatórios, mas a toxicidade do tratamento ainda é um fator preocupante em pacientes com câncer. A terapia pode também produzir respostas adversas, com sérias complicações agudas, que se manifestam meses ou anos depois de finalizado o tratamento (PDQ[®], 2016).

Visto as alternativas agressivas de tratamento disponíveis e a importância de se identificar alternativas aos pacientes com recaídas, principalmente em pacientes com LLA-T, se faz necessário a busca por novos alvos terapêuticos.

2.2 YM-155

O composto Y-M155 (*4,9-dihydro-1-(2-methoxyethyl)-2-methyl-4,9-dioxo-3-(2-pyrazinylmethyl)-1H-naphth[2,3-d]imidazolium, bromide*) (Astellas Pharma Inc) (FIGURA 2) foi originalmente identificado como inibidor da atividade do promotor do gene da survivina, o qual codifica uma proteína envolvida com a inibição de apoptose. Essa atividade foi demonstrada por análise utilizando-se o ensaio de luciferase, onde o composto atuou especificamente em uma região de 269pb no centro da região promotora do gene da survivina (CHENG et al., 2012; NAKAHARA et al., 2007; TAO et al., 2012; YAMANAKA et al., 2008).

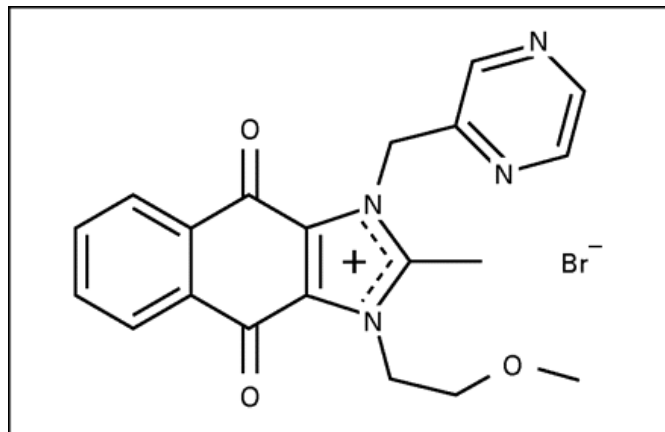


Figura 2 – Estrutura química do composto YM-155.
Fonte: Modificado de Tolcher et al., 2008.

Nakahara et al. (2007) demonstraram, pela primeira vez, que o composto YM-155 tem efeito antiproliferativo e inibe de forma específica a expressão de survivina em diferentes linhagens derivadas de tumores (HeLa, carcinoma cervical; CHO, carcinoma de ovário; A549, carcinoma de pulmão e linhagens de câncer de próstata hormônio refratário). Foi demonstrado ainda, em linhagens NSCLC (*non small cell lung cancer*, tumor de pulmão), que a inibição de survivina pelo composto era dependente da concentração e do tempo de tratamento (YAMANAKA et al., 2008).

As terapias antitumorais são limitadas, muitas vezes, por falhas nos mecanismos que induzem apoptose, fazendo com que as células permaneçam se multiplicando de maneira desordenada e a doença progrida (HANAHAN;

WEINBERG, 2000). Uma vez que, a apoptose é a forma mais bem caracterizada de morte celular programada, desempenhando papel vital no desenvolvimento e preservação da homeostasia (EROGLU; DERRY, 2016).

Após os trabalhos precursores, outros corroboraram os resultados inicialmente obtidos evidenciando a eficiência de YM-155 em diminuir o crescimento tumoral devido a sua potente atividade antiproliferativa e pro-apoptótica sobre diferentes linhagens tumorais, incluindo tumor de mama, pulmão, fígado, rim, melanoma, glioblastoma, tumor de nervos periféricos, hepatocarcinoma e leucemia mielóide aguda (LMA) (CHENG et al., 2012; DAÍ et al., 2012; GHADIMI et al., 2012; GUO H. et al., 2015; GUO K. et al., 2015; PAVLIDOU et al., 2014; SMITH et al., 2015; SASAKI et al., 2015; YAMANAKA et al., 2011; ZHANG et al., 2015)

O YM-155 é capaz de induzir a apoptose pela ativação de suas vias intrínsecas e extrínsecas, culminando na ativação de caspase-3 e clivagem de polimerases Poli-ADP-ribose (PARP), família de proteínas envolvidas em vários processos celulares, principalmente, reparo de DNA e morte celular programada. Foi relatada ainda, em células de câncer de mama, a ação dessa molécula na regressão tumoral, com insignificante toxicidade sistêmica, e redução do índice de metástase *in vivo* (PAVLIDOU; KROUPIS; DIMAS, 2014).

Embora YM-155 tenha sido caracterizado, originalmente, como inibidor da região promotora da survivina, estudos recentes indicam que esse composto pode induzir danos ao DNA e morte por uma via molecular alternativa à descrita inicialmente (SMITH et al., 2015). A sensibilidade ao composto mostrou também estar relacionada a diferenças marcantes na expressão de fatores anti-apoptóticos (XIAP, Bcl-2, Mcl-1), além de genes reguladores do ciclo celular (*CDKN1A*) e pró-apoptóticos (caspase-9 e DIABLO), bem como a supressão do sinal desencadeado pela ativação do EGFR (DE NECOCHEA-CAMPION, 2015; RAUCH et al., 2014).

Na LLA, YM-155 foi testado em linhagens do subtipo B onde se verificou sua potente atividade pró-apoptótica e antiproliferativa do mesmo (CHANG et al., 2015; TYNER et al., 2012). Em células T, seu efeito foi investigado na leucemia de células T do adulto, relacionado à infecção pelo vírus HTLV-1 e com uma biologia distinta à LLA-T (SASAKI et al., 2015). Dessa forma, o YM-155 representa um promissor agente para o tratamento de leucemias, entretanto, o seu potencial sobre a LLA-T foi pouco explorado.

2.2.1 Vias Moleculares de YM-155

O efeito antitumoral de YM-155 foi originalmente atribuído à sua ação inibitória da atividade do promotor do gene da survivina, por meio de sua ligação ao fator de transcrição SP1 e ao fator de ligação interleucina 3 (ILF3) do complexo ILF3/p54^{nrb}.

2.2.1.1 Survivina e sua relação com o câncer

Como já descrito previamente, o trabalho precursor de Nakahara et al. (2007), propôs inicialmente o composto YM-155 como inibidor seletivo da atividade do promotor do gene da survivina.

Essa atividade foi demonstrada por análises utilizando-se o ensaio de luciferase. Nesse verificou-se que o vetor contendo uma região central de 269pb do promotor do gene da survivina foi inibido pelo tratamento com YM-155 de forma tão efetiva quanto vetores contendo regiões maiores do promotor do gene, ou seja, determinando-se exatamente a região na qual YM-155 atua na inibição transcricional da expressão da survivina (CHENG et al., 2012; NAKAHARA et al., 2007).

Posteriormente, muitos outros trabalhos também encontraram redução da expressão da proteína survivina após tratamento com YM-155, incluindo diversos modelos tumorais, por exemplo, câncer de cólon, próstata, pulmão, endometrial, gástrico, renal e carcinoma hepatocelular (CHENG et al., 2012; CHUWA et al., 2016; NAKAHARA et al., 2011; TAO et al., 2012; ZHANG et al., 2015; 2016).

A proteína survivina é uma pequena proteína de 16 kD membro da família das PIAs (Proteínas Inibidoras de Apoptose). Diversos estudos têm indicado a relação da hiperexpressão de genes das PIAs em células cancerosas e em amostras de biópsia de tumor primário (CHEN et al., 2016).

Mais especificamente, a survivina tem demonstrado expressão aumentada em vários tipos tumorais como esofágico (80%), pancreático (76,9%), coloretal (63,7%), oral (72%), gástrico (35%), endometrial (87,5%) e câncer de bexiga (57.8%) (CHUWA et al., 2016; JAISWAL; GOEL; MITTAL, 2015). Adicionalmente, esse

aumento já foi relacionado com pior prognóstico, menores taxas de sobrevida, aumento de recaídas (MOORE et al., 2014; SONG et al., 2013; YAHYA et al., 2012), disseminação metastática, invasividade tumoral e quimioresistência (ALTIERI, 2013; CHURCH; TALBOT, 2012; PARK et al., 2011). Na LLA infantil, a survivina também tem sido encontrada com expressão aumentada (ESH et al., 2011; MORRISON et al., 2012).

A regulação da expressão e função dessa proteína é complexa e pode ocorrer em vários níveis, incluindo transcrição, *splincings* alternativos, sequestro intracelular através de diferentes ligantes (KELLY et al., 2011), além das modificações pós-traducionais, como fosforilação (FORTUGNO et al., 2008; GHOSH et al., 2003; O'CONNOR et al., 2000) e a acetilação que favorece a degradação da survivina pela maquinaria proteossômica dependente de ubiquitinação (RAUCH et al., 2014).

As principais funções da survivina estão relacionadas à regulação da divisão celular e à inibição da apoptose mas, além do seu papel direto na carcinogênese, essa também pode atuar na angiogênese tumoral, momento em que ela é fortemente expressa nas células endoteliais (FIGURA 3) (BLANC-BRUDE et al., 2003; HARFOUCHE et al., 2001; MESRI et al., 2002).

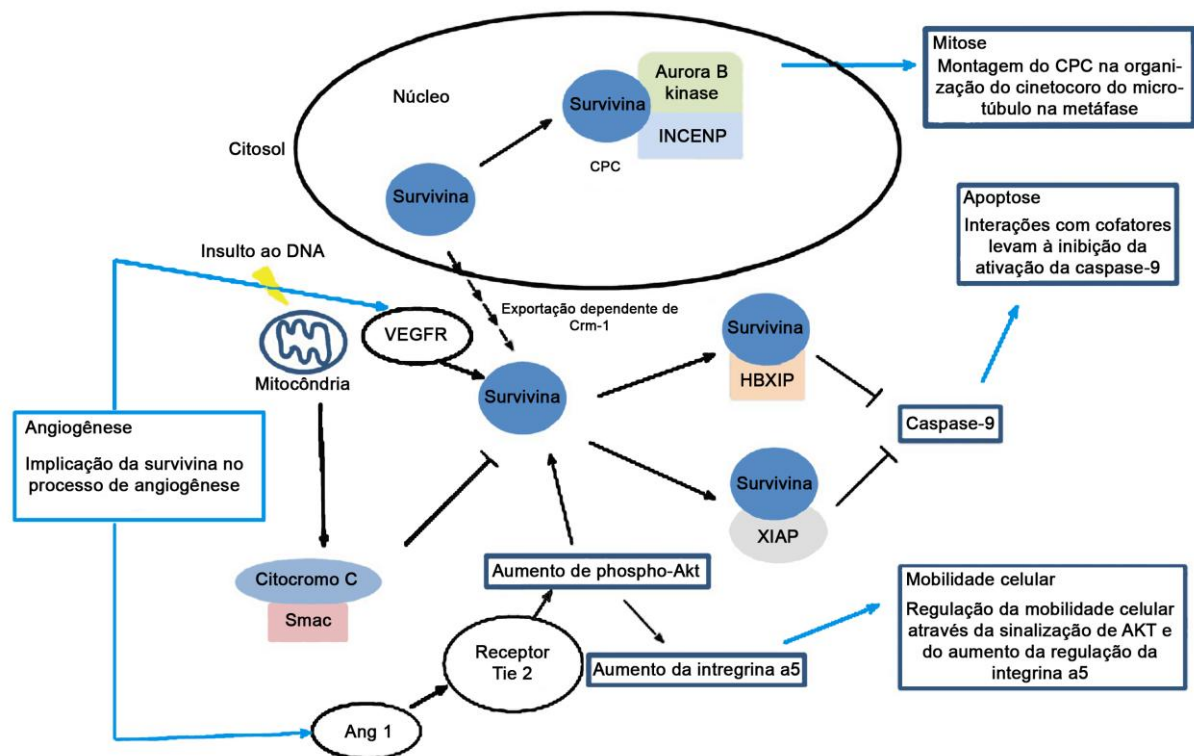


Figura 3 – Funções da survivina que contribuem para o desenvolvimento de tumores e metástase. CPC: Complexo passageiro cromossômico; INCENP: Proteínas do interior do centrômero; HBXIP: Proteína de interação com a proteína X do vírus da hepatite B; XIAP: Proteína inibidora de apoptose ligada ao X; Ang1: Angiopoietina-1; VEGFR: Receptor do fator de crescimento endotelial vascular; Tie2: Tirosina quinase 2.

Fonte: Modificado de McKenzie; Grossman (2012).

A survivina está dinamicamente localizada em diferentes regiões dos cromossomos ao longo do ciclo celular, sendo que seu pico de expressão se dá na fase G2/M e rapidamente declina na fase G1. Essa proteína se acumula no interior dos centrômeros na fase G2, onde se torna abundante durante a mitose (CHEN et al., 2016).

Na mitose, a survivina pode estar associada ao centrossomo e microtúbulos do fuso mitótico, onde interage diretamente com a tubulina polimerizada, o que sugere a regulação dos mesmos e conseqüentemente dessa fase do ciclo celular (DOHI et al., 2006; GROSSMAN et al., 2001; SHIN et al., 2001; WHEATLEY et al., 2001). Essa proteína pode ainda se concentrar nos cinetócoros dos cromossomos metafásicos, associada aos reguladores de citocinese, tais como Aurora cinase B, INCENP e Borealina/Dasara, que constituem uma subunidade do complexo passageiro cromossômico, essencial na segregação adequada dos cromossomos e citocinese (BOLTON et al., 2002; GASSMANN et al., 2004).

Foi proposto também um modelo onde a survivina medeia a orientação adequada de proteínas passageiras cromossômicas para os cinetócoros, além de estabilizar os microtúbulos, contribuindo para a formação do fuso bipolar (ALTIERI et al., 2006; LI et al., 1998; ROSA et al., 2006). Portanto, caso essa proteína seja removida, a divisão celular é interrompida ou indevidamente concluída, levando à morte celular (KELLY et al., 2011).

A hiperexpressão de survivina está associada também à inibição da morte celular pelas vias apoptóticas. Apesar de alguns estudos sugerirem que a survivina inibe a ativação das caspases 3, 7 e 9, outros falharam em demonstrar seu efeito direto sobre essas proteases (CHEN et al., 2016), sendo esse efeito citoprotetor atribuído principalmente ao bloqueio da via mitocondrial mediada pela caspase 9 (CHANDELE et al., 2004; MARUSAWA et al., 2003). A survivina ainda se associa à proteína inibidora de apoptose ligada ao X (XIAP), levando à inibição sinérgica da ativação de caspase-9 (DOHI et al., 2006; MOBAHAT; NARENDRAN; RIABOWOL, 2014). Na via intrínseca, sua atuação se dá por meio da inibição do potencial de clivagem do Citocromo C e do DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) induzido pela caspase 8.

A baixa expressão de survivina em tecidos normais (KHAN et al., 2015) bem como seu envolvimento na regulação da apoptose, progressão mitótica e sua íntima associação aos pontos de checagem do ciclo celular mostram que essa proteína é crítica para os estudos de marcadores tumorais, identificação de novos alvos-terapêuticos e no entendimento da biologia tumoral (MONZÓ et al., 1999; CHEN et al., 2016).

2.2.1.2 Fator de transcrição SP1

Observou-se que YM-155 promove o rompimento da ligação entre o fator de transcrição SP1 e o centro da região promotora do gene da survivina, o que é considerado um fator crítico no mecanismo de inibição da atividade da região promotora desse gene, e responsável pela ação antiproliferativa do composto em diversas células tumorais, como de câncer de pulmão, cólon e próstata (CHENG et al., 2012).

SP1 é um importante fator de transcrição capaz de reconhecer e se ligar especificamente a diversas sequências da região promotora ricas em GC/GT e subsequentemente interagir com componentes da maquinaria transcricional basal, ativando a expressão de um amplo espectro de genes, envolvidos em múltiplas funções, tanto em tecidos saudáveis quanto cancerosos (BLACK; BLACK ; AZIZKHAN-CLIFFORD, 2001).

Genes envolvidos no desenvolvimento e progressão do ciclo celular, frequentemente, possuem unidades GC repetitivas em suas sequências promotoras proximais e a interação dessas sequências à proteína SP1 é essencial para a expressão dos mesmos (SHI et al., 2001). Grinstein et al. (2002) constataram que o bloqueio de SP1 induz à interrupção do ciclo celular devido à inibição da ciclina D1 e indução na expressão de p27, um membro da família KIP que inibe complexos CDK-ciclina.

SP1 também atua na regulação de vários outros genes associados à tumorigênese, tais como E2F1, *c-fos*, fator de crescimento transformador α , fatores anti-apoptóticos da família bcl-2, Bcl-xL, assim como na síntese e metabolismo de purina/pirimidina (timidilato sintetase, adenosina desaminase, DNA polimerase α , carbamoilfosfato sintetase/ aspartato carbamoiltransferase/ diidroorotase (CAD) e na angiogênese (VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*) (CASTRO-RIVERA; SAMUDIO; SAFE, 2001; CHEN et al., 2000; DONG, 1999; DUAN; DUAN; SAFE, 1999; KHAN et al., 2003; NGWENYA; SAFE, 2003; SAMUDIO; VYHLIDAL; WANG et al., 2001; STONER; PORTER; SAFE, 1998; XIE et al., 2000; WANG et al., 1999; WORMKE; SAVILLE et al., 2004).

Como a desregulação dos fatores de transcrição da família SP contribuem para um fenótipo tumorigênico proliferativo e metastático, a hiperexpressão dessas proteínas em muitos cânceres humanos é considerada um fator de pior prognóstico para sobrevivência do paciente. Diante do exposto, a inibição das vias dependentes de SP representa uma estratégia importante em muitos tratamentos antitumorais (ARINZE; KAWAI, 2003; ZHU; LENZI; SCHWARTZ, 2002).

2.2.1.3 Complexo ILF3/p54^{nrb}

O complexo ILF3/p54^{nrb} associado à região promotora do gene da survivina também está envolvido com sua expressão. Outro mecanismo de ação do YM-155 inclui sua ligação à porção C terminal do fator de ligação interleucina 3 (ILF3), provocando sua dissociação da proteína p54^{nrb} (*paraspeckle regulatory 54-kDa nuclear RNA-binding protein*), assim alterando a localização subcelular de ambos. Esse desmembramento, portanto, resulta na inibição transcricional do gene da survivina (NAKAMURA et al., 2012; YAMAUCHI et al., 2012).

Membros da família de proteínas ILF3 podem regular a expressão de genes através de diversos mecanismos relacionados com o aumento da estabilidade do mRNA e processamento de pri-miRNA, por exemplo (KUWANO et al., 2008; PEI et al., 2008; SAKAMOTO et al., 2009; SHI et al., 2007). A hiperexpressão de ILF3 já foi relatada em carcinoma nasofaríngeo, de pulmão e de ovário (FUNG et al., 2000; GUO et al., 2008; 2012). Vumbaca et al. (2008) destacam o papel de ILF3 na progressão de neoplasias, visto que esse promove angiogênese tumoral por meio da estabilização do RNAm do VEGF. Esse estudo demonstrou ainda que o silenciamento de ILF3 induziu significativa redução da proliferação, migração e invasividade celular. Outro trabalho relatou que a perda de ILF3 diminuiu consideravelmente o desenvolvimento do tumor de mama e a metástase de pulmão em modelo animal (QINGWEI et al., 2013).

2.2.2 YM-155 e sua relação com TP53

A proteína supressora de tumor p53 faz parte de vias moleculares importantes no controle da progressão do ciclo celular, modulando o crescimento e proliferação celular em resposta a agentes que danificam o DNA ou a estímulos nocivos (NAHTA et al., 2015; VOGELSTEIN; LANE; LEVINE, 2000). Além disso, p53 é um fator de transcrição relacionado à regulação de muitos genes envolvidos em diversas funções celulares como reparo de DNA, apoptose, senescência e diferenciação celular (CHIPUK et al., 1997; CHRISTMANN; KAINA, 2013; HERMEKING et al.,

2000; MIYASHITA et al., 1995; ODA et al., 2000; REINHARDT; SCHUMACHER, 2012).

Células cancerosas possuem a habilidade de escapar da via inibitória de crescimento, levando a falhas na ativação da via intrínseca de apoptose. Por exemplo, p53 tem ação oposta ao efeito oncogênico do fator de transcrição SP1 na região promotora do gene da survivina. E é sugerido ainda que a perda da função da survivina medeia, parcialmente, a via apoptótica dependente de p53 (CHEN et al., 2016; RAUCH et al., 2014).

Mutações de *TP53* desempenham papel fundamental no desenvolvimento do câncer, sendo encontrada em quase 50% de todos os tipos tumorais (NAHTA et al., 2015). Em 81% dos casos das leucemias linfóides observa-se perda da função de p53, decorrente de mutações ou deleções, indicando que alterações desse gene seja um evento significativo na patogênese da doença (PETIT JEAN et al., 2007).

3 OBJETIVO

Seguem, detalhados abaixo, o objetivo geral e específicos do presente trabalho.

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do composto YM-155 em linhagens leucêmicas derivadas de pacientes com LLA-T.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em linhagens JURKAT e CCRF-CEM, avaliar o efeito do composto YM-155 sobre:

- a) A viabilidade e crescimento celular;
- b) A taxa de apoptose;
- c) A capacidade clonogênica;
- d) A expressão dos genes survivina, *BCI-xL* e *VEGF*;
- e) A dinâmica do ciclo celular.

4 METODOLOGIA

Os delineamentos experimentais utilizados no presente estudo foram explicitados abaixo.

4.1 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTURA

Foram utilizadas duas linhagens leucêmicas, JURKAT e CCRF-CEM, derivadas de pacientes com LLA-T, gentilmente cedidas pelo Prof^o Dr. Luiz Gonzaga Tone (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP), provenientes do banco de células internacional ATCC.

A linhagem JURKAT foi estabelecida a partir do sangue periférico de paciente, do sexo masculino, de 14 anos diagnosticado com LLA-T. Apresenta expressão de interleucina-2 e CD3 e deleção nos genes: *IFNA*, *P15INK4B*, *P16INK4A* e mutação *TP53*.

A linhagem CCRF-CEM, foi isolada a partir de sangue periférico de paciente, do sexo feminino, de 4 anos diagnosticado com LLA-T. Apresenta expressão de CD3, CD4, CD5 e CD7, deleção nos genes: *IFNA*, *IFNB*, *P16INK4A* e mutação *TP53*.

As células foram mantidas em meio RPMI suplementado com 1% de estreptomicina (100 mg/mL) associado à penicilina (60 mg/mL) e 10% de soro fetal bovino (pH 7,2–7,4), em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C.

4.2 PREPARAÇÃO DO COMPOSTO YM-155

O composto YM-155, Cayman Chemical Company (Ref.11490), importado pela INTERPRISE INSTRUMENTOS ANALÍTICOS LTDA, Paulínea-SP, foi mantido em solução estoque a 20 mM e soluções de uso a 2 mM e 100 µM em DMSO, armazenadas a -20°C.

Na realização dos tratamentos da linhagem JURKAT e CCRF-CEM, o composto foi adicionado ao meio de cultura imediatamente antes do uso, sendo diluído até as concentrações padronizadas para cada linhagem, com base em trabalhos anteriores (FENG; YOSHIDA; UEDA, 2013; LIANG et al., 2013) e testes realizados previamente.

4.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de viabilidade utilizando resazurina é um método de determinação colorimétrica do número de células metabolicamente ativas, *in vitro*. O corante resazurina tem sido amplamente utilizado como indicador de capacidade celular em vários tipos de ensaios, uma vez que enzimas mitocondriais com atividade diaforase são, provavelmente, responsáveis pela transferência de elétrons do NADPH + H⁺ para esse corante, reduzindo-o a resorufina. O nível de redução que é diretamente correlacionado com a quantidade de resorufina produzido pode ser quantificada espectrofotometricamente, sendo que a resazurina exibe um pico de absorção no comprimento de onda 590 nm e a resorufina 570 nm. Células não viáveis perdem rapidamente a capacidade metabólica e não reduzem o corante indicador, essas diferenças de absorbância na solução de células indicam a viabilidade celular (RISS et al., 2004)

Para o ensaio de viabilidade, as células de ambas as linhagens foram semeadas em triplicatas com densidades iniciais de $1,5 \times 10^4$ células viáveis/ 100 μ L de RPMI, em placa de 96 poços. As células foram tratadas com as concentrações de YM-155 1,0 μ M; 1,5 μ M; 2,0 μ M; 3,0 μ M e 4,0 μ M para a CCRF-CEM e 31,25 nM; 62,5 nM; 125 nM; 250 nM e 500 nM para a JURKAT, por 48 h. Além do controle negativo, sem tratamento, onde as células foram expostas apenas ao veículo do composto (DMSO) em porcentagem proporcional ao encontrado nas células tratadas (0,1% para CCRF-CEM e 0,075% para JURKAT).

Decorrido o tempo de tratamento, foi adicionado a cada poço 10 μ L de resazurina (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) preparado conforme recomendações do fabricante. As placas foram incubadas por 6 h em atmosfera úmida contendo 5% CO₂, a 37°C. O aspecto morfológico das culturas, visto por microscopia de contraste

de fase, foi registrado em fotomicrografias antes do processamento das amostras para o teste de viabilidade.

Foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm com onda de referência de 590 nm utilizando-se o espectrofotômetro de microplaca (FIGURA 4).

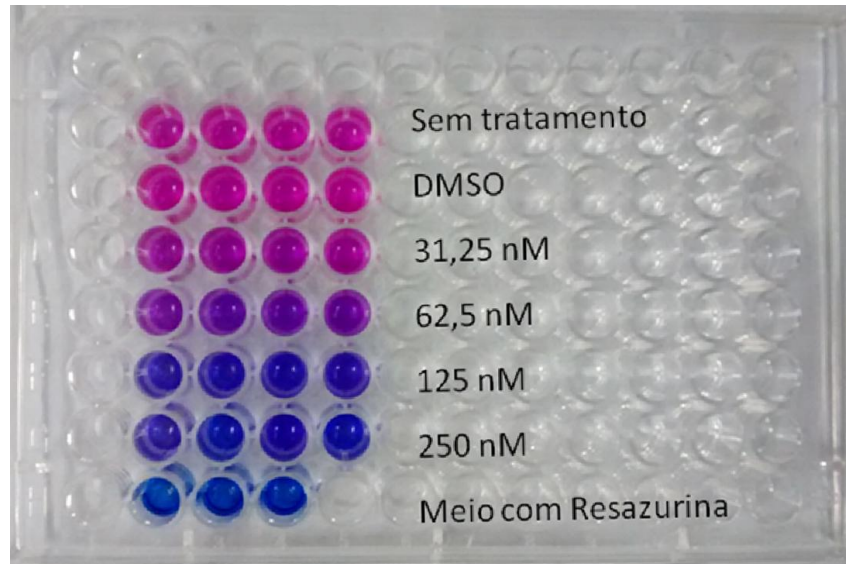


Figura 4 – Ensaio de viabilidade da linhagem JURKAT determinada com o corante resazurina tratada com diferentes concentrações de YM-155 por 48 h. Placa de 96 poços mostrando a variação de cor proporcional à taxa de redução do corante resazurina.

Fonte: Do autor.

4.4 ENSAIO DE CRESCIMENTO CELULAR

As células das linhagens CCRF-CEM e JURKAT foram semeadas com densidades iniciais de 4×10^5 células viáveis/ 100 μ L de RPMI, em placas de 35 mm de diâmetro. As concentrações utilizadas no tratamento com YM-155 foram 1,0 μ M e 2,0 μ M para a CCRF-CEM e 31,25 nM e 62,5 nM para a JURKAT. Como controle negativo cada linhagem foi cultivada com DMSO, em porcentagem proporcional ao encontrado nas células tratadas. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas e os períodos de tratamento estabelecidos foram 24 e 48 h.

Decorrido o tempo de tratamento, foi adicionado azul de tripano 0,4% (Sigma Aldrich, Califórnia, Estados Unidos) a uma alíquota da suspensão celular, na proporção de 1:1. Células viáveis (não coradas com o azul de tripano) e inviáveis

(coradas) foram contadas em câmara de Neubauer espelhada (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemanha) em microscópio invertido de contraste de fase. A partir dos valores obtidos para concentração de células nos diferentes períodos de tratamento, foi obtida a curva de crescimento das células para os grupos tratados e controle.

4.5 ENSAIO DE MORTE CELULAR

Neste trabalho foram analisados parâmetros distintos para avaliação de morte celular.

4.5.1 Ensaio de Anexina V

O ensaio para detecção de morte celular foi realizado utilizando-se a marcação de células apoptóticas com Anexina V - Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (*Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit* - Millipore Corporation, Hayward, CA) e células necróticas com 7-AAD. Anexina V é uma molécula que apresenta alta afinidade pela fosfatidilserina, se ligando a esta especificamente. A fosfatidilserina é um fosfolípido presente na face interna da membrana das células, sua externalização ocorre durante o processo de apoptose e serve como um sinal para que as células sejam removidas. A marcação positiva com 7-AAD indica que as células perderam a integridade da membrana.

Foram semeadas 6×10^4 células viáveis de cada linhagem/100 μ L de RPMI, em triplicatas. As mesmas foram tratadas com concentrações de YM-155 baseadas nos CI_{50} estabelecidos no ensaio de viabilidade com resazurina, sendo 1,0 μ M e 2,0 μ M para a CCRF-CEM e 37,5 nM e 75 nM para a JURKAT. Como controle negativo cada linhagem foi cultivada com DMSO, em porcentagem proporcional ao encontrado nas células tratadas. Decorrido o tempo de tratamento previamente padronizado para cada célula, 48 h para a CCRF e 24 h para a JURKAT, as células foram então centrifugadas a 80 g, por 5 minutos, a 4°C, o precipitado foi lavado com PBSA gelado e homogeneizado em 100 μ L do *Guava Nexin Reagent* (Millipore

Corporation, Hayward, CA), as células foram incubadas por 20 min protegidas da luz, em temperatura ambiente. Essas foram analisadas por citometria de fluxo, utilizando o Guava EasyCyte 8HT.

4.5.2 Ensaio de TUNEL

O método fundamenta-se na incorporação de resíduos de BrdU às terminações 3'-hidroxil expostas com a fragmentação do DNA. As células com fragmentação de DNA (positivas) são então marcadas pelo corante fluorescente TRICT conjugado a anticorpos anti-BrdU que se ligam às porções da molécula de DNA identificando o dano e podendo ser diferenciadas das viáveis (negativas) por meio da emissão de fluorescência (STURM et al., 2006), quantificada por citometria de fluxo.

Nesse ensaio 3×10^5 células viáveis/1 mL de RPMI foram semeadas em triplicatas. O tratamento procedeu-se com 1,0 μM e 2,0 μM para a CCRF-CEM e 37,5 nM e 75,0 nM de YM-155 para a JURKAT. Como controle negativo cada linhagem foi cultivada com DMSO, em porcentagem proporcional ao encontrado nas células tratadas. Após 48 h, o meio de cultura contendo as células em suspensão foi centrifugado a 80 g, por 5 min, o precipitado foi lavado em PBSA e as células fixadas com paraformaldeído 4% por 30 min. Após centrifugação, o precipitado foi homogeneizado em etanol 70% gelado e armazenado a -20°C , por no mínimo 2 h. As amostras foram lavadas com *Washing Buffer* (Guava[®] *Tunel Kit* - Millipore Corporation, Hayward, CA); centrifugadas e o precipitado homogeneizado em *DNA Labeling Mix* (Guava[®] *Tunel Kit* - Millipore Corporation, Hayward, CA). As células foram incubadas a 37°C por 1 h, ao abrigo da luz. Após a incubação foi adicionado *Rising Buffer* (Guava[®] *Tunel Kit* - Millipore Corporation, Hayward, CA), a solução foi centrifugada e o precipitado homogeneizado em *Anti-BrdU Staining Mix* (Guava[®] *Tunel Kit* - Millipore Corporation, Hayward, CA), as células foram incubadas por mais 30 min, em temperatura ambiente, protegido da luz. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (Guava Mini EasyCyte, 8HT) utilizando-se o software GuavaSoft 2.7.

4.7 ENSAIO DE CAPACIDADE CLONOGÊNICA

Para este ensaio foi utilizado o método de cultura em meio semi-sólido com metilcelulose. Dessa forma, 5×10^3 células viáveis/100 μL de RPMI foram semeadas e tratadas com as concentrações 0,5 μM ; 1,0 μM e 2,0 μM para a CCRF-CEM e 18,75 nM; 37,5 nM e 75,0 nM de YM-155 para a JURKAT. Como controle negativo cada linhagem foi cultivada com DMSO. Decorrido o tempo de tratamento de 24 h, as células foram lavadas duas vezes com PBSA, centrifugadas a 80 g por 5 min, homogeneizadas em 150 μL de meio RPMI e transferidas para 1,5 mL de meio de metilcelulose Methocult (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC). Após agitação em vórtex, foram adicionados 0,3 mL do meio com células, em triplicata, em uma placa de 24 poços. As células foram incubadas por 12 dias em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 , a 37°C.

As colônias foram representadas por aglomerados celulares com mais de 50 células, e foram contadas no microscópio invertido.

4.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM NÍVEL DE RNAm

A fim de investigar a influência de YM-155 na modulação da expressão gênica de *survivina* e potenciais vias celulares moduladas, como *VEGF* e *Bcl-xL*, foi analisado o perfil de expressão em nível de RNAm pela técnica de PCR em tempo-real quantitativo.

Foram semeadas para essa análise 2×10^6 células viáveis/ 2 mL em RPMI, em seguida foram tratadas com as concentrações de YM-155 baseadas nos CI_{50} estabelecidos para cada célula, sendo 2,0 μM para a CCRF-CEM e 75,0 nM para a JURKAT. Especificamente para a análise da *survivina*, também foram analisadas as concentrações de 1,0 μM e 37,5 nM para CCRF-CEM e JURKAT, respectivamente. Como controle negativo cada linhagem foi cultivada com DMSO, em porcentagem proporcional ao encontrado nas células tratadas. Decorrido o tempo de tratamento de 24 h, as soluções de células foram centrifugadas a 80 g por 5 min, o precipitado

lavado com PBSA e homogeneizado em 500 µL de TRIzol LS (Applied Biosystems, Foster City, CA).

As células foram incubadas por 24 h, a -20°C, transferidas para o banho de gelo e ao descongelarem foram acrescentados 200 µL de clorofórmio. A preparação foi centrifugada a 15000 g por 20 min, a fase aquosa (superior) contendo o RNA foi transferida para novos tubos. O RNA foi precipitado com 500 µL de álcool isopropílico gelado e armazenado por 24 h, a -80°C. Centrifugou-se a solução e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% em água DEPC. Após nova centrifugação e retirada do etanol, o RNA foi homogeneizado em água DEPC, que previne a ação de RNAses. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop.

O cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA utilizando-se o *Kit Superscript III*[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA) em meio contendo primers aleatórios, segundo recomendação do fabricante, no termociclador Applied Biosystems[®] Veriti[®] Thermal Cycler.

A expressão gênica em nível de RNAm foi quantificada através da técnica de PCR em tempo real por monitoração contínua de fluorescência utilizando-se o corante sybr green[®] durante a amplificação das sequências alvo específicas. Todas as reações foram realizadas no aparelho ABI PRISMTM 7500[®] (Applied Biosystems[®], Foster City, CA). Não foi necessário tratamento prévio das amostras de RNA com DNase, uma vez que os primers utilizados na PCR foram desenhados para amplificar especificamente RNAm maduro.

A amplificação ocorreu em meio contendo 4,5 µL de cDNA diluído 20 vezes, 5 µL de *master mix* (Sybr Green, tampão, dNTPs, Amplitaq Gold, MgCl₂ e ROX como referência passiva - Applied Biosystems, Foster City, CA) e 0,5 µL de primers (10 µM). Cada amostra foi amplificada em triplicata, sendo consideradas para análise as amostras cujo desvio não excedeu meio ciclo ($d < 0,5$).

Foi utilizado o método de quantificação relativa, o qual sinaliza a mudança de expressão do gene-alvo em relação a uma amostra de calibrador, que nesse caso as linhagens foram tratadas apenas com o solvente DMSO. Como controle endógeno (genes normalizadores) foi utilizada a expressão do gene GUS e a quantificação relativa foi obtida pela fórmula: $2^{-\Delta\Delta C_t}$, sendo C_t o ciclo em que o nível de fluorescência alcançou o limiar pré-estabelecido (*threshold*). A tabela 2 descreve os *primers* utilizados para essa análise.

Tabela 2 – Sequência dos *primers* utilizados na análise da expressão gênica em nível de RNAm, das linhagens CCRF-CEM e JURKAT após tratamento com YM-155, por 24 h.

| Gene | Sequência | Tamanho do fragmento | Referência |
|------------------|---|----------------------|--------------------------|
| GUS | 5' GAAAATATGT GGTTGGAGAGCTCATT/ CCGAGTGAAGATCCCCTTTTA 3' | 101bp | Mata et al., 2006 |
| SURVIVINA | 5' AGCCAGATGACGACCCATA/ CAAGGGTTAATTCTTCAAAGTCTT 3' | 93 bp | Graaf et al., 2005 |
| BCLXL | 5' TGCATTGTTCCCATAGAGTTCCA/ CCTGAATGACCACCTAGAGCCTT 3' | 79 bp | Liu et al., 2006 |
| VEGF | 5' AAGGAGGAGGGCAGAATCAT/ ATCTGCATGGTGATGTTGGA 3' | 226 bp | Blasberg et al., 2010 |

Fonte: Do autor

4.9 WESTERN BLOTTING (IMMUNOBLOT)

O inóculo de 1×10^7 células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² e tratadas, por 48 h, com as concentrações 2,0 µM para a CCRF-CEM e 75,0 nM de YM-155 para a JURKAT. Como controle negativo cada linhagem foi cultivada com DMSO, em porcentagem proporcional ao encontrado nas células tratadas. Em seguida, foram lavadas com PBSA gelado e homogeneizadas em tampão RIPA (NaCl 150mM, NP-40 1,0 %, ácido deoxicolato de sódio 1% em Tris-HCL 50 mM, pH= 7,5) contendo inibidores de proteases (Sigma Aldrich, Califórnia, Estados Unidos) e fosfatases (Ortovanadato de sódio 1mM). Após centrifugação a 12000 g por 10 minutos o sobrenadante foi coletado e alíquotas foram armazenadas a -80° C. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de BCA (*Bicinchoninic Acid*) com o kit Thermo Scientific™ Pierce™ (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

As amostras foram diluídas em tampão de amostra 4x (Tris 0,5 M – pH=6,8, glicerol, SDS 10%, bromofenol blue 1% e betamercaptoetanol 1% em água MiliQ) e desnaturadas por 5 minutos (100°C). O fracionamento das proteínas (30 µg) foi realizado em minigel de poliacrilamida 12% (2,5 horas a 100V).

As proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (Amersham, GE HealthCare, Buckinghamshire, Estados Unidos) por 2 h a 200 mA em tampão (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e metanol a 20% em água destilada). As membranas foram coradas em solução de Ponceau 0,5% por 3 min para verificar a eficiência do processo de transferência. Em seguida, foram lavadas 3 vezes em TBS (*Tris-buffered saline*) a 0,02 M (10 min cada lavagem). O bloqueio foi realizado com TBS a 0,02 M contendo leite desnatado em pó Molico® (Nestlé, São Paulo, Brasil) a 5% e tween 20 (Sigma Aldrich, Califórnia, Estados Unidos) a 0,05% por 1 h à temperatura ambiente sob agitação.

Os anticorpos primários anti-Survivina EPR2675 (1:1000 Abcam technology, Estados Unidos) e anti- α -Tubulina (1:1000 Sigma Aldrich LTDA, Brasil) foram diluídos em solução de bloqueio e as membranas foram incubadas com os anticorpos, durante a noite, a 4°C sob agitação. Após sucessivas lavagens com TBS e T-TBS (Tween20-TBS), as membranas foram incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo (para a anti- α -Tubulina) e coelho (para a anti-Survivina) (1:1000, Amersham, GE HealthCare, Buckinghamshire, Estados Unidos) conjugados a peroxidase e bandas imunorreativas foram detectadas por quimioluminescência (ECL®, Amersham, GE HealthCare, Buckinghamshire, Estados Unidos) conforme especificações do fabricante. Os resultados foram registrados em filmes radiográficos (*Hyperfilm Amersham*, GE HealthCare, Buckinghamshire, Estados Unidos). A quantificação das bandas foi realizada usando o programa de domínio público (ImageJ, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Estados Unidos).

4.10 ENSAIO DE CICLO CELULAR

Foram semeadas para esse ensaio 3×10^5 células viáveis/1 ml de RPMI em triplicatas e tratadas com as concentrações 0,5 μ M; 1,0 μ M e 2,0 μ M para a CCRF-CEM e 18,75 nM; 37,5 nM e 75,0 nM de YM-155 para a JURKAT. Como controle negativo cada linhagem foi cultivada com DMSO, em porcentagem proporcional ao encontrado nas células tratadas. Após 24 h do tratamento, as células foram lavadas com PBSA e fixadas em etanol 70%. Após duas novas lavagens com PBSA, foram

acrescentados 200 µl da solução PI (Iodeto de propídeo 1 mg/mL, RNase 50 µg/mL, N onidet P-40 0,2% - *Guava*[®] *Cell Cycle Reagent*, Millipore Corporation, Hayward, CA), após 30 min de incubação foram analisados 5000 eventos no citômetro de fluxo (Guava Mini EasyCyte, 8HT) utilizando-se o software GuavaSoft 2.7.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística, os dados dos experimentos celulares foram comparados pelo teste One-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni utilizando-se o *GraphPad Prism*[®] 5 software.

5 RESULTADOS

Seguem, discriminados abaixo, os resultados obtidos nos experimentos celulares.

5.1 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

Os ensaios preliminares de viabilidade celular permitiram a padronização da faixa de concentração do composto YM-155 capaz de inibir a viabilidade celular das linhagens CCRF-CEM e JURKAT. Assim sendo, curvas dose-respostas foram realizadas para a determinação do CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento) das linhagens estudadas.

Os valores de CI_{50} encontrados para a CCRF-CEM e JUKART foram, respectivamente $2,17 \pm 0,08 \mu\text{M}$ e $73,11 \pm 7,65 \text{ nM}$, após 48 h de tratamento (FIGURAS 5 e 6).

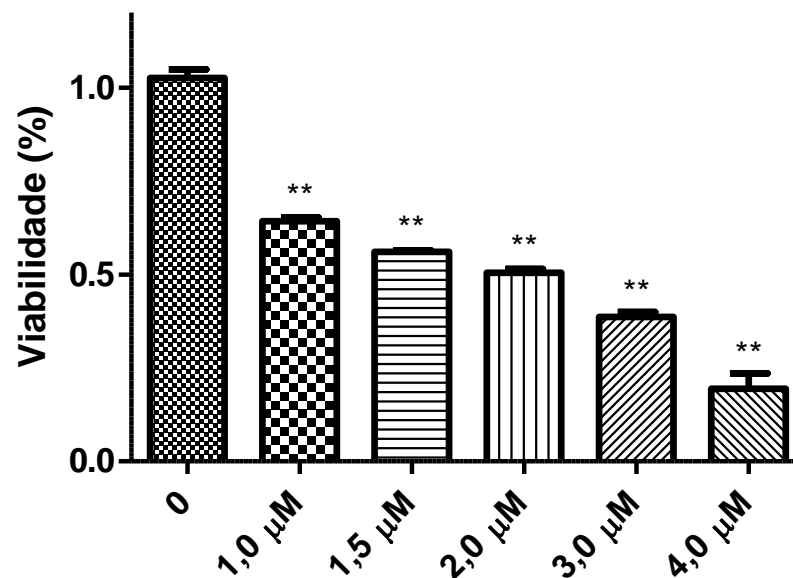


Figura 5 – Viabilidade celular da linhagem CCRF-CEM determinada pelo ensaio com resazurina. As células foram tratadas com diferentes concentrações de YM-155, por 48 h. ** $P < 0,01$, comparado com o tratamento controle (DMSO).

Fonte: Do autor.

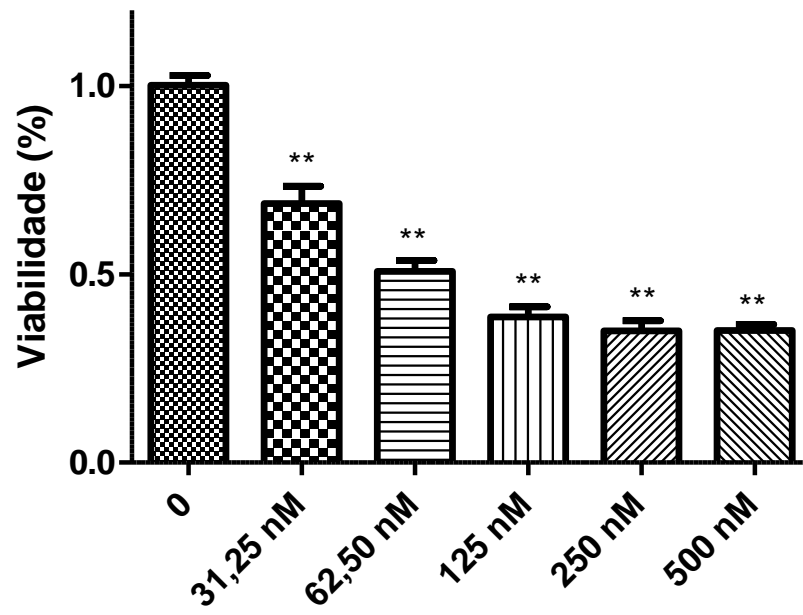


Figura 6 – Viabilidade celular da linhagem JURKAT determinada pelo ensaio com resazurina. As células foram tratadas com diferentes concentrações de YM-155, por 48 h. **P<0,01, comparado com o tratamento controle (DMSO).

Fonte: Do autor.

As figuras 7 e 8 mostram o aspecto morfológico das linhagens CCRF-CEM e JURKAT, após 48 h de tratamento com YM-155 em diferentes concentrações.

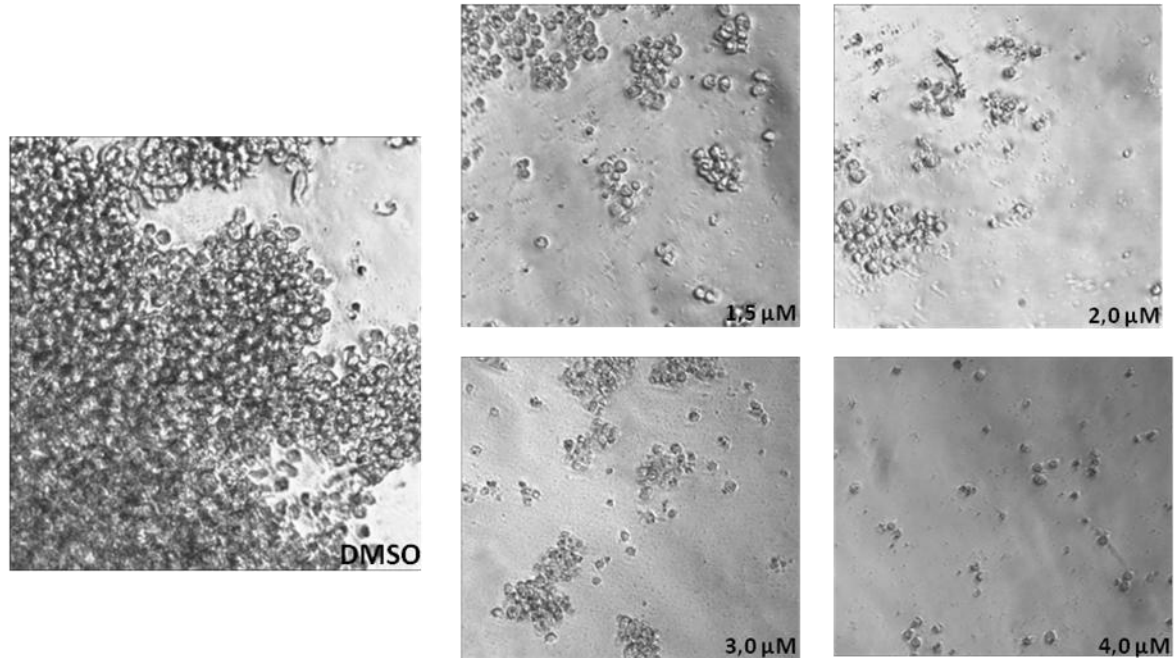


Figura 7 – Imagens obtidas por microscopia em contraste de fase da linhagem CCRF-CEM, após tratamento com diferentes concentrações de YM-155, por 48 h, em comparação com essas células tratadas apenas com DMSO.

Fonte: Do autor.

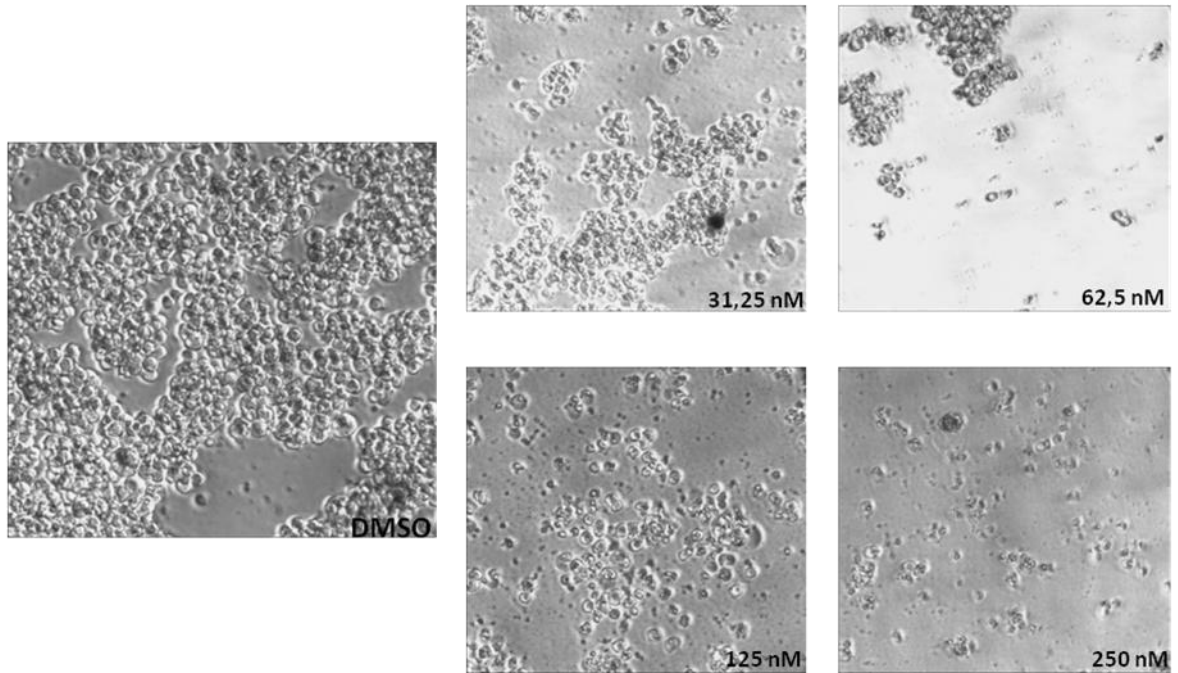


Figura 8 – Imagens obtidas por microscopia em contraste de fase da linhagem JURKAT, após tratamento com diferentes concentrações de YM-155, por 48 h, em comparação com essas células tratadas apenas com DMSO.

Fonte: Do autor.

5.2 ANÁLISE DE CRESCIMENTO CELULAR

Através da contagem direta de células viáveis e não viáveis por microscopia em contraste de fase na presença de azul de tripano, foi possível quantificar a população de células após 24 h e 48 h de tratamento com YM-155. O composto diminuiu significativamente o número de células vivas nas culturas tratadas em relação às controle, sendo que a redução de células viáveis foi maior nas culturas tratadas por 48 h em relação às tratadas por 24 h, indicando que o tratamento com YM-155 inibe o crescimento das linhagens CCRF-CEM (TABELA 3 e 4; FIGURA 9) e JURKAT (TABELA 5 e 6; FIGURA 10).

Tabela 3 – Número de células da linhagem CCRF-CEM, determinado pelo ensaio de exclusão por azul de tripano, após tratamento com diferentes concentrações de YM-155 por 24 h. *P<0,05; **P<0,01, comparado com o tratamento controle (DMSO).

| Amostra (x10³) | Viáveis | Mortas | Total |
|----------------------------------|----------------|---------------|--------------|
| DMSO | 1723±222 | 176±20 | 1899±211 |
| 1,0 µM | 390±85** | 350±78* | 740±111** |
| 2,0 µM | 321±111** | 386±68* | 707±179** |

Fonte: Do autor.

Tabela 4 – Número de células da linhagem CCRF-CEM, determinado pelo ensaio de exclusão por azul de tripano, após tratamento com diferentes concentrações de YM-155 por 48 h. *P<0,05; **P<0,01, comparado com o tratamento controle (DMSO).

| Amostra (10³) | Viáveis | Mortas | Total |
|---------------------------------|----------------|---------------|--------------|
| DMSO | 2477±39 | 440±99 | 2917±60 |
| 1,0 µM | 33±19** | 785±205* | 818±360** |
| 2,0 µM | 23±11** | 803±102* | 826±102** |

Fonte: Do autor.

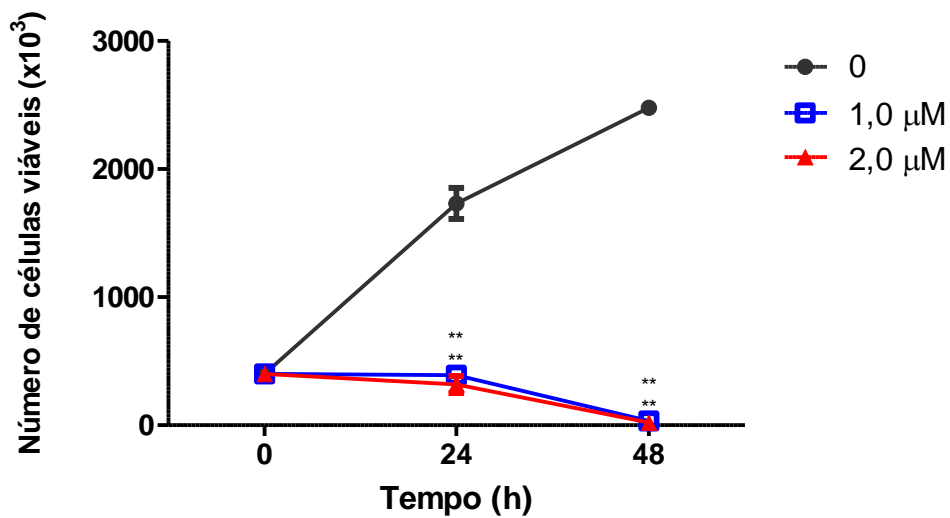


Figura 9 – Gráfico das células viáveis da linhagem CCRF-CEM, determinada pelo ensaio de exclusão por azul de tripano. As células foram tratadas com diferentes concentrações de YM-155, por 24 h e 48 h. **P<0,01, comparado com o tratamento controle (DMSO).

Fonte: Do autor.

Tabela 5 – Número de células da linhagem JURKAT, determinado pelo ensaio de exclusão por azul de tripano, após tratamento com diferentes concentrações de YM-155 por 24 h. *P<0,05, comparado com o tratamento controle (DMSO).

| Amostra (10 ³) | Viáveis | Mortas | Total |
|----------------------------|---------|---------|---------|
| DMSO | 773±127 | 218±28 | 991±153 |
| 37,5 nM | 470±74* | 220±113 | 690±187 |
| 75,0 nM | 461±15* | 293±50 | 754±50 |

Fonte: Do autor.

Tabela 6 – Número de células da linhagem JURKAT, determinado pelo ensaio de exclusão por azul de tripano, após tratamento com diferentes concentrações de YM-155 por 48 h. **P<0,01, comparado com o tratamento controle (DMSO).

| Amostra (10 ³) | Viáveis | Mortas | Total |
|----------------------------|----------|-----------|----------|
| DMSO | 947±45 | 355±21 | 1302±67 |
| 37,5 nM | 327±38** | 440±84 | 767±123 |
| 75,0 nM | 232±31** | 812±116** | 1045±148 |

Fonte: Do autor.

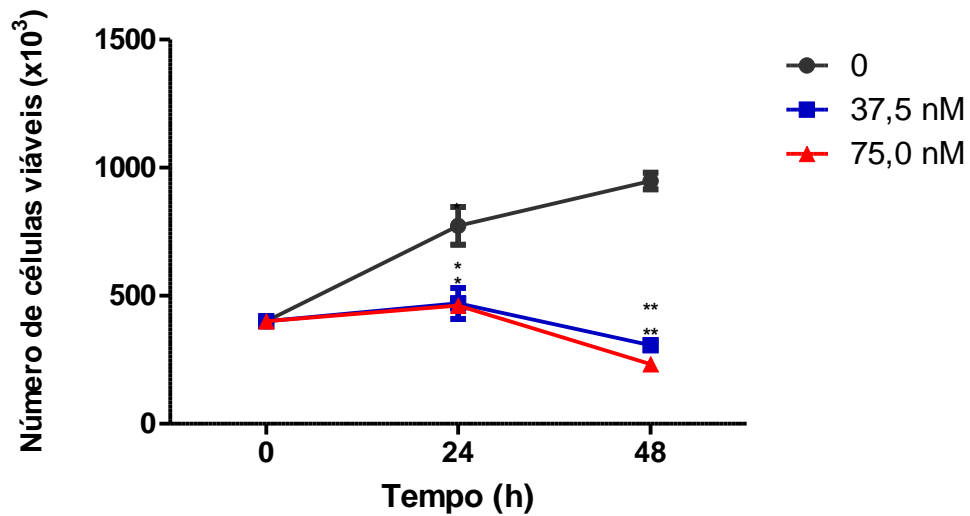


Figura 10 – Gráfico das células viáveis da linhagem JURKAT, determinada pelo ensaio de exclusão por azul de tripano. As células foram tratadas com diferentes concentrações de YM-155, por 24 h e 48 h. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, comparado com o tratamento controle (DMSO).

Fonte: Do autor.

5.3 ANÁLISE DE MORTE CELULAR

Neste trabalho foram analisados parâmetros distintos para avaliação de morte celular.

5.3.1 Análise de Anexina V

Inicialmente as células de LLA foram tratadas por 24 h com concentrações de YM-155 em torno do valor de CI_{50} correspondente a cada linhagem, obtido no estudo de viabilidade celular. As concentrações utilizadas foram 1,0 e 2,0 μM para a CCRF-CEM e 37,5 e 75 nM para a JURKAT. Porém com 24 h de tratamento, não foi observada alteração significativa na taxa de apoptose da linhagem CCRF-CEM, portanto, verificou-se esse fenômeno após 48 h de tratamento. Já para a linhagem JURKAT, o tratamento com 48 h apresentou elevada frequência de morte celular.

Dessa forma, as células JURKAT foram tratadas apenas por 24 h para a análise de apoptose usando o ensaio de Anexina V.

Em ambas as linhagens estudadas, após tratamento com YM155, houve aumento de células positivas para Anexina V (FIGURAS 11 e 12). Vale ressaltar a baixa frequência de células positivas para Anexina e 7-AAD, assim como positivas apenas para 7-AAD, indicando baixa frequência de possíveis eventos necróticos, o que demonstra a atividade pro-apoptótica de YM-155 sobre as linhagens estudadas (TABELAS 7 e 8).

Tabela 7 – Frequência (%) de células da linhagem CCRF-CEM marcadas por Anexina V e/ou 7-AAD, determinada por citometria de fluxo, após 48h de tratamento com YM-155 em diferentes concentrações. *P<0,05; **P<0,01, comparado com o tratamento controle (DMSO).

| Amostra | Anexina(-) 7-AAD(+) Necrose | Anexina(+) 7-AAD(+) Apop. Tardia | Anexina(-) 7-AAD(-) Viáveis | Anexina(+) 7-AAD(-) Apop. Inicial | Apoptose Total |
|----------------|--|---|--|--|---------------------------|
| DMSO | 0,40±0,28 | 0,25±00,70 | 85,30±3,11 | 14,10±03,54 | 14,35±3,46 |
| 1,0 µM | 0,35±0,07 | 4,00±0,42** | 63,50±0,85** | 32,20±1,41** | 36,15±0,90** |
| 2,0 µM | 0,50±0,28 | 11,15±0,07** | 44,75±2,76** | 43,60±2,55** | 54,75±2,47** |

Fonte: Do autor.

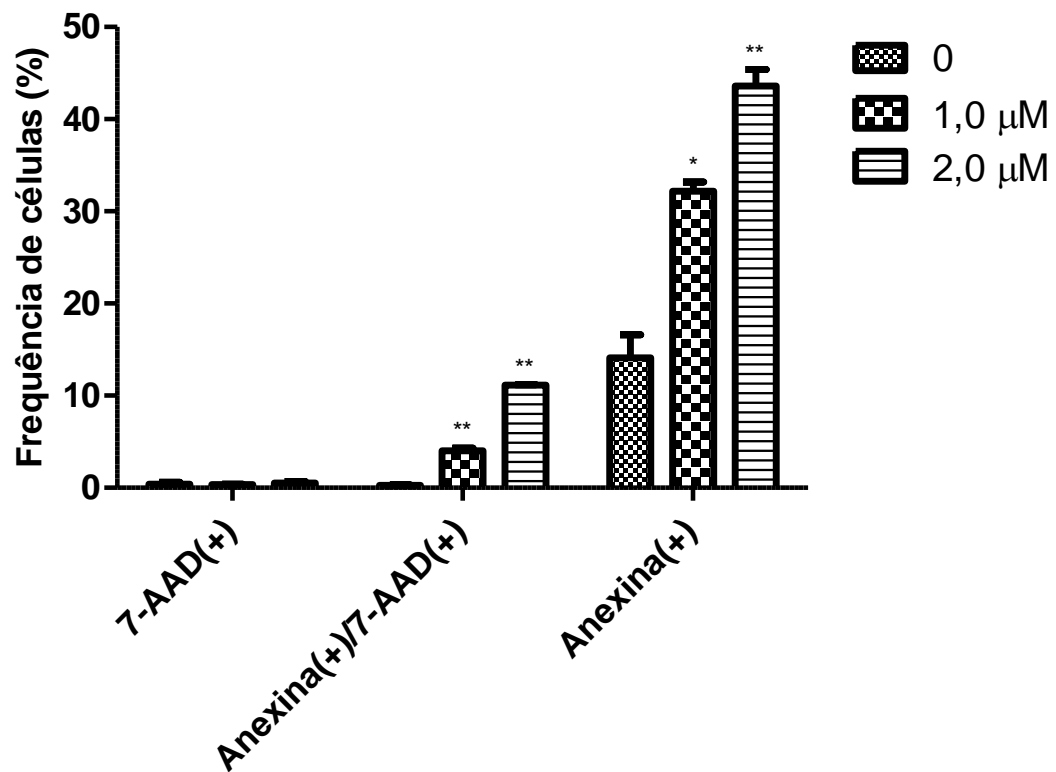


Figura 11 – Frequência (%) de células da linhagem CCRF-CEM marcadas por Anexina V e/ou 7-AAD, determinada por citometria de fluxo, após 48h de tratamento com YM-155 em diferentes concentrações. *P<0,05; **P<0,01, comparado com o tratamento controle (DMSO).

Fonte: Do autor.

Tabela 8 – Frequência (%) de células da linhagem JURKAT marcadas por Anexina V e/ou 7-AAD, determinada por citometria de fluxo, após 24h de tratamento com YM-155 em diferentes concentrações. **P<0,01, comparado com o tratamento controle (DMSO).

| Amostra | Anexina(-) | Anexina(+) | Anexina(-) | Anexina(+) | Apoptose Total |
|---------|---------------------|--------------------------|---------------------|---------------------------|----------------|
| | 7-AAD(+) Necrose | 7-AAD(+) Apop. Tardia | 7-AAD(-) Viáveis | 7-AAD(-) Apop. Inicial | |
| DMSO | 01,00 | 01,43±0,20 | 89,90±0,97 | 07,67±0,80 | 09,10±1,00 |
| 37,5 nM | 1,40±0,17 | 06,70±0,62** | 76,23±0,21** | 15,67±0,96** | 22,37±1,58** |
| 75,0 nM | 2,40±0,30** | 11,03±0,93** | 71,57±1,46** | 15,03±0,74** | 26,06±1,67** |

Fonte: Do autor.

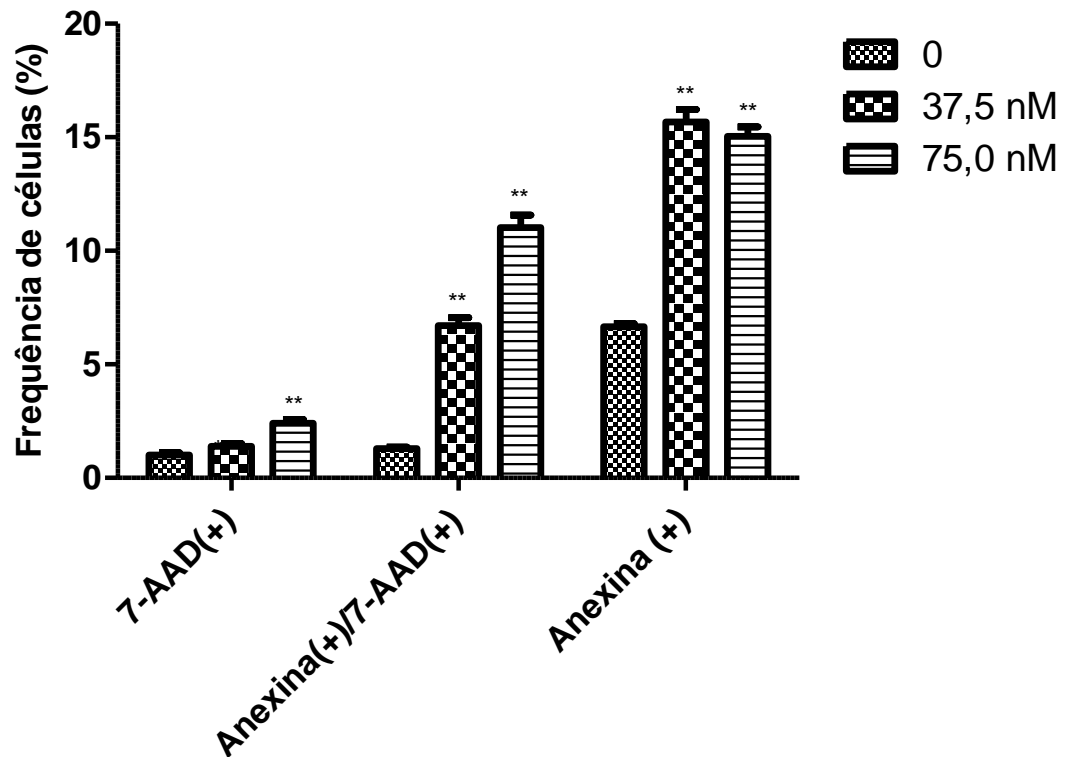


Figura 12 – Frequência (%) de células da linhagem JURKAT marcadas por Anexina V e/ou 7-AAD, determinada por citometria de fluxo, após 24h de tratamento com YM-155 em diferentes concentrações. **P<0,01, comparado com o tratamento controle (DMSO).

Fonte: Do autor.

5.3.2 Análise de TUNEL

O ensaio de fragmentação do DNA, utilizando-se o ensaio TUNEL, demonstrou uma elevação significativa da frequência de células CCRF-CEM e JURKAT positivas para reação de TUNEL, após 48 h de tratamento com YM-155. Os resultados indicam, portanto, que o composto induz fragmentação de DNA, um parâmetro indicativo de apoptose, corroborando os resultados obtidos no ensaio de Anexina V, em ambas as linhagens (FIGURA 13 e 14).

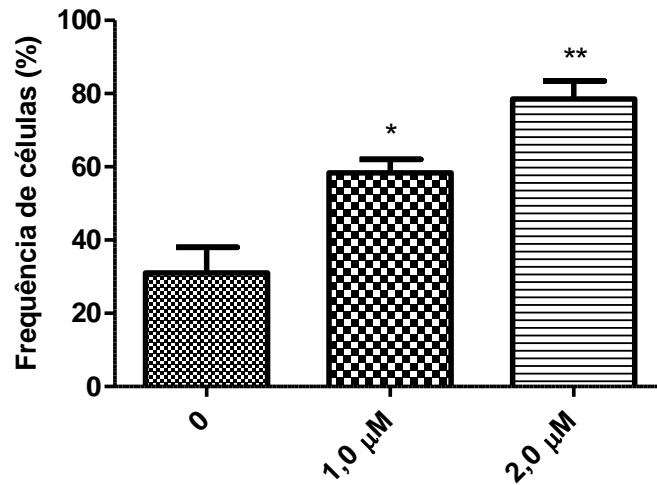


Figura 13 – Frequência (%) de células CCRF-CEM com fragmentação de DNA (positivas), determinadas por citometria de fluxo, no ensaio de TUNEL após tratamento com diferentes concentrações de YM-155, por 48 h. *P<0,05; **P<0,01 comparado com o tratamento controle (DMSO).

Fonte: Do autor.

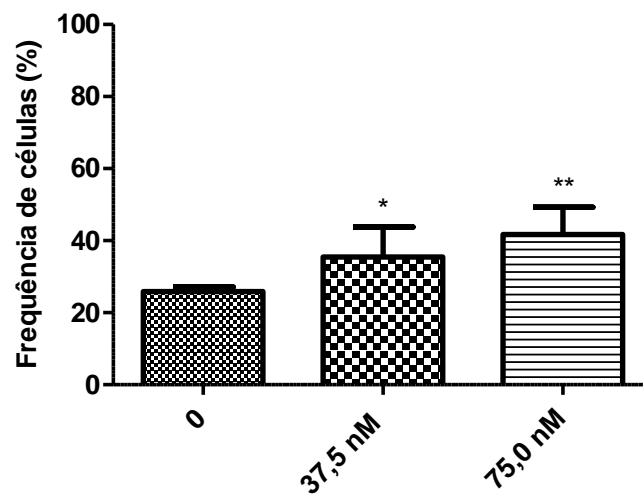


Figura 14 – Frequência (%) de células JURKAT com fragmentação de DNA (positivas), determinadas por citometria de fluxo, no ensaio de TUNEL após tratamento com diferentes concentrações de YM-155, por 48 h. *P<0,05; **P<0,01 comparado com o tratamento controle (DMSO).

Fonte: Do autor.

5.4 ANÁLISE DE CAPACIDADE CLONOGÊNICA

Através do ensaio de capacidade clonogênica, foi determinado que YM-155 diminuiu significativamente a capacidade de formação de colônias das linhagens CCRF-CEM (FIGURA 15) e JURKAT (FIGURA 16), após tratamento em diferentes concentrações do composto.

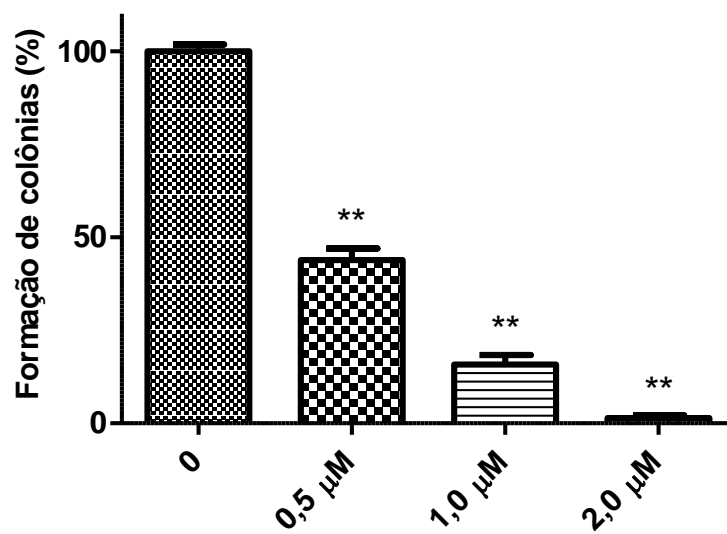


Figura 15 – Taxa (%) de formação de colônias da linhagem CCRF-CEM, determinado pelo ensaio de capacidade clonogênica, após tratamento com diferentes concentrações de YM-155, por 24 h e incubação por 12 dias em meio semi-sólido. **P<0,01, comparado com o tratamento controle (DMSO).

Fonte: Do autor.

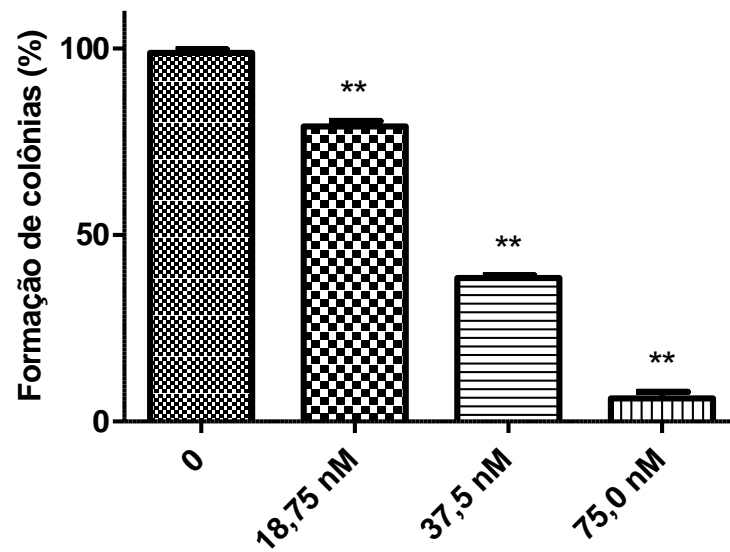


Figura 16 – Taxa (%) de formação de colônias da linhagem JURKAT, determinada pelo ensaio de capacidade clonogênica, após tratamento com diferentes concentrações de YM-155, por 24 h e incubação por 12 dias em meio semi-sólido. **P<0,01, comparado com o tratamento controle (DMSO).

Fonte: Do autor.

5.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM NÍVEL DE RNAm

Frente ao tratamento com YM-155 baseado nas concentrações de CI_{50} de cada célula, por 24 h, foi observado que a linhagem CCRF-CEM não apresentou diferença significativa na expressão do gene *survivina* (FIGURA 17). A linhagem JURKAT por sua vez, exibiu aumento na expressão de *survivina* com a administração da concentração de 75,0 nM composto de interesse (FIGURA 18).

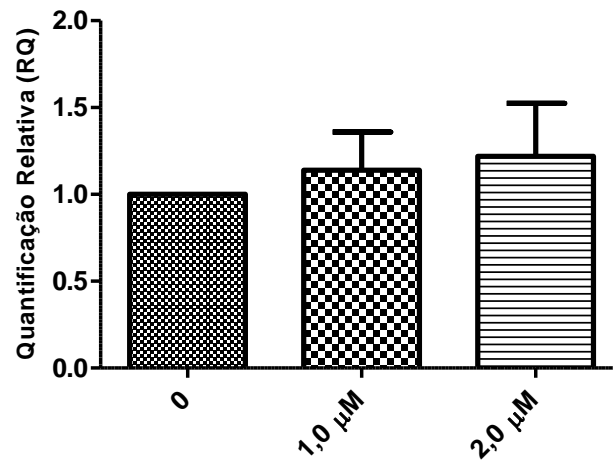


Figura 17 – Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene *survivina* na CCRF-CEM, em nível de RNAm, determinada por *real-time* PCR, após 24 h de tratamento com YM-155.

Fonte: Do autor.

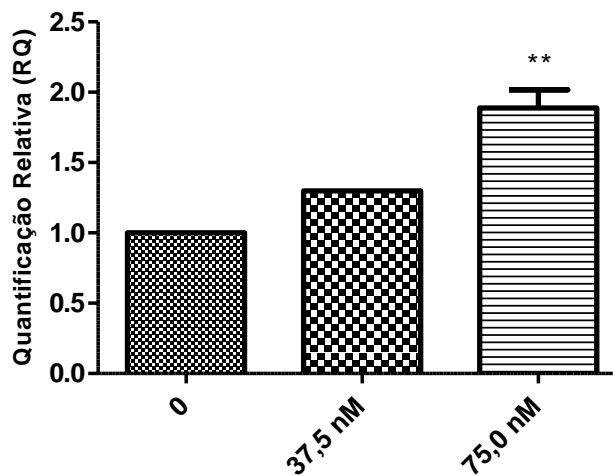


Figura 18 – Gráfico da quantificação relativa da expressão do gene *survivina* na JURKAT, em nível de RNAm, determinada por *real-time* PCR, após 24 h de tratamento com YM-155. **P<0,01, comparado com o tratamento controle (DMSO).

Fonte: Do autor.

Além disso, foi analisado o efeito do composto YM-155 na expressão dos genes *VEGF* e *Bcl-xL*, genes também regulados pelo fator de transcrição SP-1. Os resultados demonstraram que não houve variação da expressão de ambos os genes tanto na linhagem CCRF-CEM (FIGURA 19) quanto na JURKAT (FIGURA 20), após tratamento com o composto por 24 h.

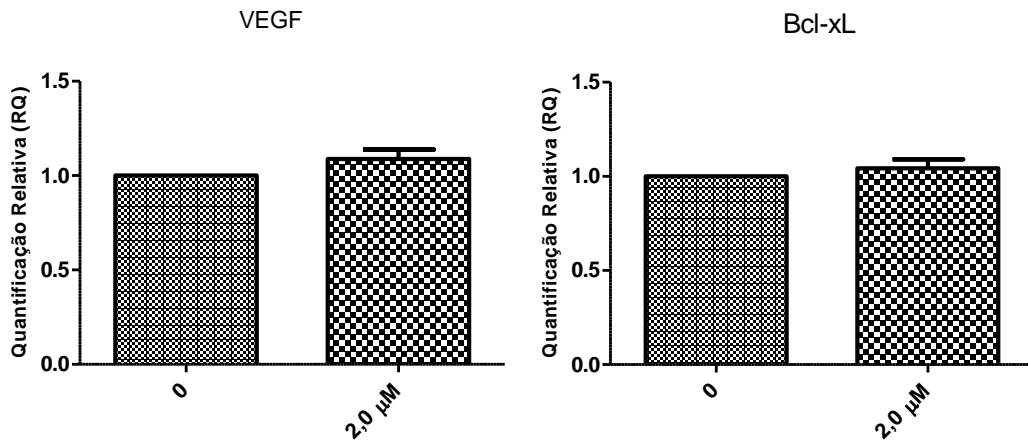


Figura 19 – Gráfico da quantificação relativa da expressão dos genes *VEGF* e *Bcl-xL* na CCRF-CEM, em nível de RNAm, determinada por *real-time* PCR, após 24 h de tratamento com YM-155.

Fonte: Do autor.

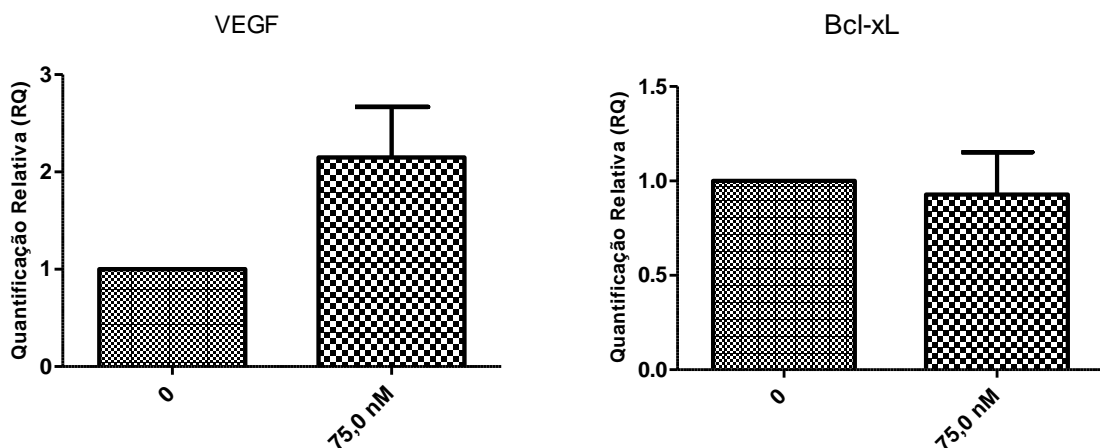


Figura 20 – Gráfico da quantificação relativa da expressão dos genes *VEGF* e *Bcl-xL* na JURKAT, em nível de RNAm, determinada por *real-time* PCR, após 24 h de tratamento com YM-155.

Fonte: Do autor.

5.6 ANÁLISE DE WESTERN BLOTTING

Novamente foi analisada a modulação da expressão da proteína survivina nas linhagens CCRF-CEM e JURKAT após tratamento com YM-155, 48 h, por *western blotting*. Nesse ensaio, assim como na análise da expressão gênica em nível de RNAm, não foi verificado o efeito do composto na diminuição do nível de expressão dessa proteína nas células estudadas (FIGURAS 21 e 22).

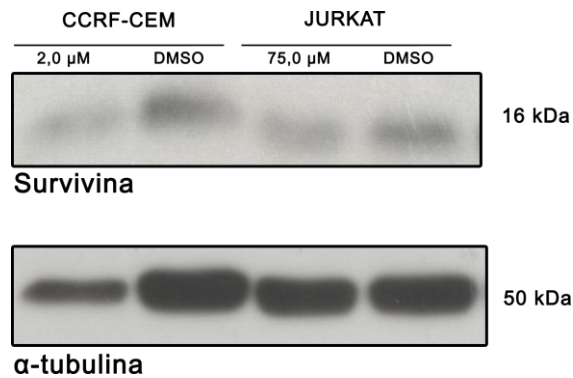


Figura 21 – Expressão de survivina nas linhagens CCRF-CEM e JURKAT por *western blotting*, após tratamento com YM-155 por 48 h. A expressão de α -tubulina foi usada como controle.

Fonte: Do autor.

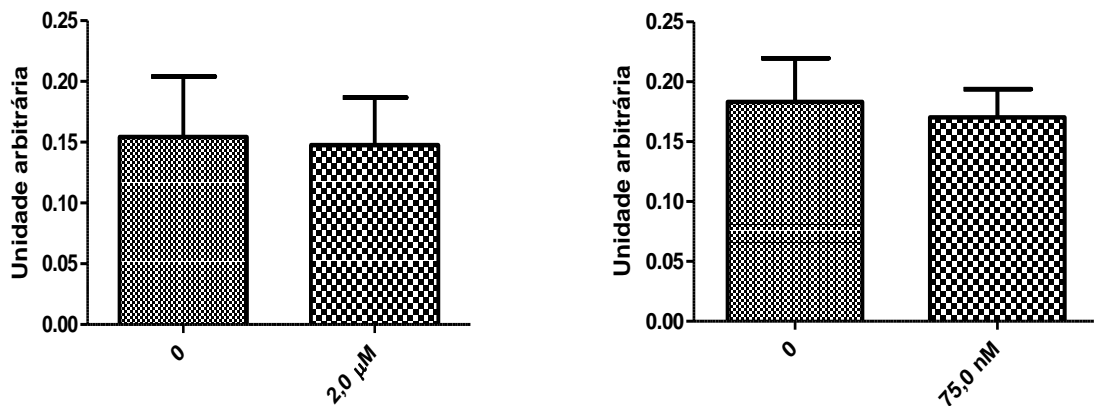


Figura 22 – Expressão de survivina nas linhagens CCRF-CEM e JURKAT por *western blotting*, após tratamento com YM-155 por 48 h. A expressão de α -tubulina foi usada como controle.

Fonte: Do autor.

5.7 ANÁLISE DA DINÂMICA DO CICLO CELULAR

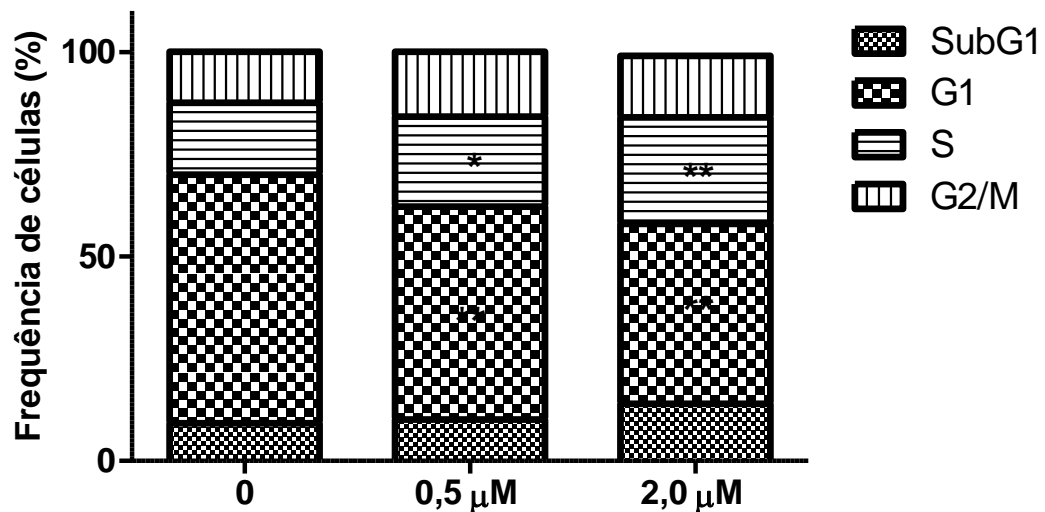
Na análise da dinâmica de progressão do ciclo celular da linhagem CCRF-CEM tratada com YM-155, por 24 h, observou-se aumento significativo da população na fase S e diminuição da proporção de células da fase G1, em ambas as concentrações testadas (TABELA 9; FIGURA 23).

Tabela 9 – Frequência (%) de células da linhagem CCRF-CEM nas diferentes fases do ciclo celular, determinada por citometria de fluxo, após 24 h de tratamento com YM-155.

*P<0,05; **P<0,01, comparado com o tratamento controle (DMSO).

| Amostra | Sub G1 | G1 | S | G2/M |
|---------|-----------|-------------|-------------|-----------|
| DMSO | 09,2±1,80 | 60,8±2,00 | 17,6±0,40 | 12,5±0,80 |
| 0,5 µM | 10,1±2,00 | 52,1±0,50** | 22,0±1,10* | 15,9±0,90 |
| 2,0 µM | 14,0±1,90 | 44,2±1,50** | 26,2±1,70** | 15,6±1,80 |

Fonte: Do autor



Fonte: Do autor.

A análise do ciclo celular da linhagem JURKAT tratada com YM-155, por 24 h, mostrou um perfil diferente daquele observado na CCRF-CEM. Houve aumento significativo da fração Sub-G1 e redução da população de células na fase G2/M do ciclo celular para ambas as concentrações testadas (TABELA 10, FIGURA 24).

Tabela 10 – Frequência (%) de células da linhagem JURKAT nas diferentes fases do ciclo celular, determinada por citometria de fluxo, após 24 h de tratamento com YM-155.

*P<0,05; **P<0,001, comparado com o tratamento controle (DMSO).

| Amostra | Sub G1 | G1 | S | G2/M |
|----------|--------------|------------|------------|--------------|
| DMSO | 09,49±3,35 | 55,55±1,61 | 13,30±4,27 | 21,68±0,38 |
| 18,75 nM | 15,20±3,36* | 56,08±3,58 | 13,23±5,56 | 15,46±1,47* |
| 75,00 nM | 21,37±1,05** | 50,50±3,52 | 13,66±5,35 | 14,53±2,82** |

Fonte: Do autor.

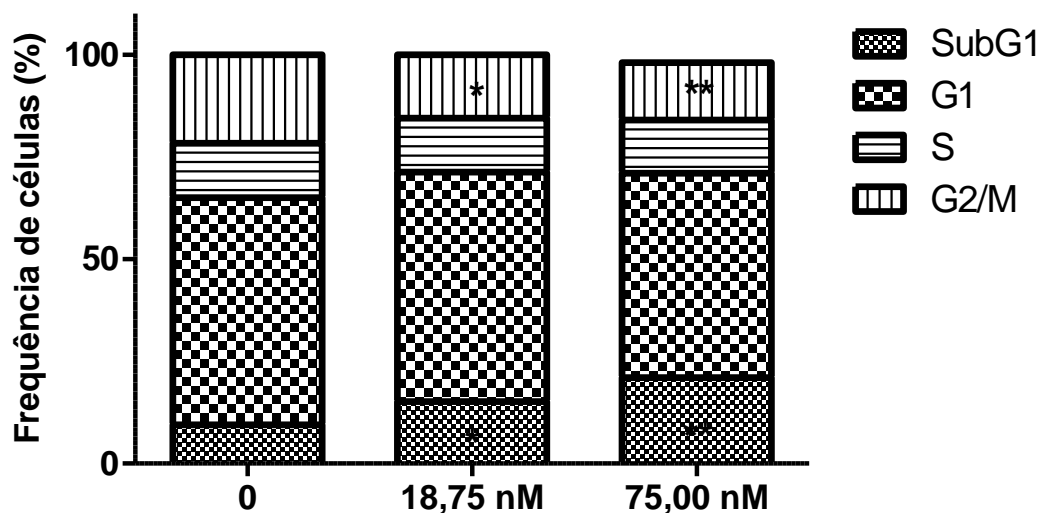


Figura 24 – Gráfico da distribuição da população de células JURKAT nas diferentes fases do ciclo celular, após tratamento com YM-155 por 24 h. *P<0,05; **P<0,001, comparado com o tratamento controle (DMSO).

Fonte: Do autor.

6 DISCUSSÃO

A LLA representa o tipo mais comum de neoplasia na infância e apesar do sucesso no tratamento, atualmente 15-20% dos pacientes ainda possuem recidiva, e esse panorama é agravado em alguns subtipos, por exemplo, na LLA de células T que representa cerca de 15% do pacientes com LLA e tem um prognóstico conhecidamente pior em relação a outros subtipos (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015; HUNGER; MULLIGHAN, 2015; LE JEUNE; THOMAS, 2016)

O composto YM-155 tem sido testado para o tratamento de muitos tipos de câncer por se tratar originalmente de uma pequena molécula supressora da expressão de survivina e indutora de apoptose, revelando potente atividade antiproliferativa para diversas linhagens celulares tumorais (FENG; YOSHIDA; UEDA, 2013; NAKAHARA et al., 2007; 2011; YAMANAKA et al., 2011; YOUNG-SOON et al., 2012). O presente trabalho visou avaliar o efeito do composto YM-155 em linhagens leucêmicas infantis do subtipo T e constatou diminuição da viabilidade e inibição da proliferação celular nas duas linhagens testadas, JURKAT e CCRF-CEM.

O efeito antiproliferativo de YM-155 já havia sido evidenciado por Nakahara et al. (2007) em linhagens de carcinoma cervical, tumor de ovário de hamster chinês, câncer de pulmão e de próstata hormônio refratário. Adicionalmente, Nakahara et al. (2011) fizeram um estudo mais amplo com diversas linhagens tumorais humanas tratadas com YM-155, entre as quais pode-se observar grande diferença de sensibilidade ao composto. Em meio às linhagens mais sensíveis estão a MDA-MB-468 (câncer de mama), RL (linfoma) e AGS (estômago) e dentre as mais resistentes encontram-se a A549/R, MCF-7/AD e IGROV-1/CDD, as quais são derivadas de pulmão, mama e ovário, respectivamente (NAKAHARA et al., 2007; 2011).

O trabalho de Nakahara foi o único trabalho encontrado que inclui uma análise, mesmo que superficial, da viabilidade de linhagens LLA-T após exposição ao YM-155. As linhagens CCRF-CEM e JURKAT também foram avaliadas por Nakahara et al. (2011) e, de maneira semelhante a nossas observações, se identificou grande discrepância de sensibilidade entre as duas populações celulares, sendo a CCRF-CEM a linhagem de maior resistência.

Estudos prévios demonstraram que o YM-155 é incorporado às células tumorais de maneira dependente de proteínas da família de carreadores de solutos, como SLC35F2, e seu nível de incorporação intracelular varia bastante entre as linhagens celulares. Dessa forma, o nível de expressão desses carreadores desempenha papel importante na distribuição do composto nos tecidos tumorais e representa um dos mecanismos moleculares relacionados à quimioresistência das células (MINEMATSU et al., 2009; 2010).

Posteriormente aos trabalhos precursores de Nakahara, o efeito antiproliferativo do composto YM-155 tem sido amplamente demonstrado em diversos tipos tumorais como no câncer de mama, pulmão, fígado, rim, melanoma, glioma, tumor de nervos periféricos, leucemia mielóide aguda (LMA) (DAÍ et al., 2012; GHADIMI et al., 2012; GUO H. et al., 2015; GUO K. et al., 2015; PAVLIDOU et al., 2014; SMITH et al., 2015; YAMANAKA et al., 2011) e inclusive na LLA de células B (CHANG et al., 2015; TYNER et al., 2012).

Adicionalmente à diminuição da viabilidade celular, é importante que um composto com potencial efeito antitumoral apresente outras características como induzir morte celular. A apoptose é a forma mais bem caracterizada de morte celular programada, sendo fundamental não apenas no desenvolvimento, mas também na diferenciação, imunidade, resposta ao estresse, estabilidade genômica e homeostasia tecidual de organismos unicelulares e multicelulares. Em geral, alterações no processo de apoptose podem levar ao desenvolvimento de anormalidades, doenças degenerativas, autoimunidade, suscetibilidade a infecções e ao câncer (EROGLU; DERRY, 2016).

Portanto, a evasão à apoptose além de ser uma característica marcante em células de câncer ainda é crítica na resistência às terapias antitumorais e, por isso, genes envolvidos com o processo de apoptose tornaram-se importantes alvos das terapias antineoplásicas.

No presente trabalho verificou-se aumento significativo de células CCRF-CEM e JURKAT capazes de externalizar a fosfatidilserina, um dos parâmetros frequentemente utilizados para análise de apoptose, após o tratamento com YM-155. Como também foi encontrada pouca marcação de células com o corante 7-AAD, o que sugere pouco evento necrótico. A morte celular por meio de necrose não é interessante, uma vez que, envolve a liberação de conteúdo celular que pode degenerar tecidos sadios. Além disso, a eliminação desse material necrótico e os

mecanismos de reparo tecidual estão associados a processos inflamatórios que trazem agravos ao organismo (BRASILEIRO, 2013). Portanto, os resultados indicam a atividade pró-apoptótica do composto sobre ambas as linhagens estudadas, fortalecendo a proposta do potencial uso de YM-155 como agente antineoplásico.

Estudo realizado por De Necochea-Campion et al. (2015) demonstrou que YM-155 foi capaz de induzir a apoptose pela ativação das vias intrínseca e extrínseca, culminando na ativação de caspase-3 e clivagem de polimerases Poli-ADP-ribose (PARP), família de proteínas envolvidas em vários processos celulares, principalmente, reparo de DNA e morte celular programada.

O efeito desse composto na indução de apoptose é evidenciado em células derivadas de vários tipos de tumor (CHENG et al., 2012; NAKAHARA et al., 2011; SASAKI et al., 2015; ZHANG et al., 2015) porém, não havia sido avaliado previamente em linhagens de LLA-T infantil. Feng, Yoshida, Ueda (2013), em acordo com os resultados obtidos no presente estudo, observaram a potente atividade citotóxica de YM-155 em células humanas de leucemia mielóide por meio da indução de apoptose, determinada pelo aumento de células positivas para Anexina V. E de maneira semelhante, trabalhos mais recentes realizados com linhagens de câncer de ovário, carcinoma endometrial e LMA concluíram que após exposição ao YM-155 houve aumento da porcentagem de células apoptóticas, detectado pelo aumento na frequência de células positivas para Anexina V (CHUWA et al., 2016; MIR et al., 2014; SMITH et al., 2015).

A degradação da cromatina é um processo de extrema importância decorrente da cascata apoptótica e, diferente de outros tipos de morte celular, acredita-se que a fragmentação internucleossomal que ocorre durante a apoptose gera fragmentos de tamanhos específicos. A fragmentação expõe terminações 3'-hidroxil, as quais podem ser detectadas pelo ensaio de TUNEL (DARZYNKIEWICZ; GALKOWSK; ZHAO, 2008). No presente estudo, o ensaio de TUNEL foi utilizado com o objetivo de avaliar o potencial do YM-155 em induzir danos ao DNA, sendo observado que as células tratadas apresentam maior frequência de células com DNA danificado. Em conjunto, os resultados obtidos pelo ensaio de Anexina V e TUNEL sugerem que, de fato, o tratamento com essa molécula induz apoptose nas linhagens CCRF-CEM e JURKAT.

Apesar da metodologia de TUNEL ser amplamente utilizada como indicativo de apoptose em linhagens tumorais (GU et al., 2016; HU et al., 2016), existem

relatos de que esse ensaio não seja capaz de discriminar entre processos de necrose ou autofagia (Kraupp et al., 1995). Adicionalmente, danos ao DNA causados por espécies reativas de oxigênio (ERO) também podem ser detectados por TUNEL (MA et al., 2016).

Frequentemente, tratamentos antineoplásicos são prejudicados pelas propriedades de formação de um novo tumor, inerentes de algumas células. Como a habilidade das células tumorais de formarem colônias é requisito essencial no processo de metástase, essa capacidade após o tratamento é um aspecto importante a ser considerado em potenciais compostos terapêuticos. Visto isso, com o ensaio de capacidade clonogênica constatou-se que o tratamento com YM-155 foi responsável por reduzir significativamente a capacidade das linhagens CCRF-CEM e JURKAT de formarem colônias, demonstrando efeitos a longo prazo do composto, mesmo após sua remoção do meio.

Corroborando resultados encontrados no presente trabalho, Cheng et al. (2016) evidenciaram o efeito de YM-155 na inibição da formação de colônias em células tumorais gástricas. Além disso, constataram que o composto também atua em colônias recém-formadas, restringindo sua expansão. Outro trabalho confirmou a atividade de YM-155 na redução da capacidade de linhagens de osteosarcoma de formarem colônias, e verificou ainda que quando em associação à doxorrubicina, quimioterápico largamente utilizado no tratamento desse tipo de câncer, o composto foi capaz de reverter a resistência dessas células ao medicamento (ZHANG et al., 2015).

Desde a primeira caracterização do composto YM-155, vários estudos apontam sua atividade antineoplásica baseada em sua capacidade de inibir especificamente a expressão de survivina (CHENG et al., 2012; CHUWA et al., 2016; NAKAHARA et al., 2007; 2011; TAO et al., 2012; ZHANG et al., 2016). Neste enfoque, o presente trabalho avaliou a expressão do RNAm da proteína survivina, a fim de confirmar esse mecanismo molecular nas linhagens celulares estudadas. Porém, na linhagem CCRF-CEM não foi observada alteração significativa da expressão de survivina após o tratamento com YM-155, enquanto a JURKAT apresentou aumento na expressão dessa proteína.

A fim de confirmar esse resultado, foi analisada também a expressão de survivina em nível proteico, por *Western Blotting*. Diferente de outros trabalhos que utilizaram essa metodologia (FALKENHORST et al., 2016; SASAKI et al., 2015), os

dados obtidos neste ratificaram que o composto não promoveu diminuição da expressão da proteína em linhagens de LLA-T estudadas.

Embora YM-155 regule negativamente a survivina em vários tipos de câncer, dados recentes apontam seu efeito citotóxico, independentemente dessa inibição, sugerindo que o composto pode inibir crescimento e induzir apoptose por outros mecanismos que sejam independentes da inibição da survivina (CHANG et al., 2015; DE NECOCHEA-CAMPION, 2015; SMITH et al., 2015).

Há descrições indicando que o YM-155 influencia vários fatores celulares bem como vias de sinalização. Além da repressão transcricional da survivina, o composto induz a expressão de genes reguladores negativos do ciclo celular (CDKN1A) e de genes pró-apoptóticos (caspase-9 e DIABLO); a supressão da ativação de EGFR e a inibição da expressão de oncogenes (Mcl-1 e securina) também foram observados em consequência ao tratamento com YM-155 (RAUCH et al., 2014).

Mesmo evidenciando diferentes mecanismos de ação de YM-155 sobre células tumorais, os estudos anteriores também encontraram inibição transcricional de *survivina*, diferentemente dos resultados aqui apresentados, no qual a expressão dessa proteína não foi atenuada após tratamento com YM-155. Chang et al. (2015) demonstram, após tratamento com YM-155, a diminuição da expressão de survivina em linhagens celulares de LLA-B, REH e SUPB15, selvagens para *TP53*, mas a alteração dessa expressão não foi identificada nas células K562, derivada de leucemia mielóide crônica e com mutação em *TP53*, apesar de K562 ter demonstrado elevada sensibilidade ao composto.

As linhagens LLA-T estudadas no presente trabalho, CCRF-CEM e JURKAT, também são deficientes de *TP53* e, igualmente não foi verificada inibição da expressão de survivina após exposição a YM-155 em nenhuma das linhagens. Porém, Nakahara et al. (2007; 2011) já haviam descrito que esse composto inibe o crescimento de células tumorais humanas independentemente do perfil de *TP53*. E evidenciaram o efeito de YM-155 na diminuição da expressão de survivina em linhagens celulares mutadas para *TP53*, como na Calu-6 (adenocarcinoma de pulmão), PC-3 e PPC-1 (câncer da próstata).

Contudo, nas linhagens K562, REH e SUPB15, independentemente da expressão da survivina, houve aumento da regulação de genes envolvidos na resposta a danos ao DNA, sugerindo que YM-155 possa induzir danos diretos ao

DNA (CHANG et al., 2015). Iwasa et al. (2008) concordam com esses resultados, pois relataram que o composto sensibilizou células de carcinoma de pulmão (NSCLC) à radiação, sendo seu efeito provavelmente atribuído à inibição do reparo de DNA e indução de apoptose.

Considerando que o composto YM-155 é uma quinona poliaromática pertencente a um grupo funcionalmente diversificado de agentes antineoplásicos, como antraciclinas, daunorubicina, doxorubicina, mitomicina C e mitoxantronas, que são principalmente agentes intercalantes de DNA, é de se esperar que o composto tenha efeito de dano ao DNA (GLAROS et al., 2012). Adicionalmente, Winter et al. (2014) reforça que YM-155 possui características de um autêntico intercalante de DNA, gerando danos a essa molécula na fração de células tratadas. Nesse estudo, foi observado aumento quebras de cadeias duplas e inibição da replicação do DNA (WINTER et al., 2014).

Em ambas as linhagens estudadas aqui, YM-155 apresentou efeito citotóxico independente da expressão da survivina e, a partir dos nossos resultados no ensaio de TUNEL e do aumento em sub-G1 na análise de ciclo celular, é possível que em linhagens de LLA-T com mutação de *TP53* esse composto também cause danos ao DNA, porém, não podemos afirmar que essa fragmentação seja independente do processo de apoptose evidenciado. Além do aumento em sub-G1, no presente trabalho verificamos que YM-155 afeta a dinâmica do ciclo celular. Esse dado também apoia a ação do composto por uma via independente de survivina.

A redução ou perda da survivina em células de mamíferos está associada a vários defeitos na divisão celular, os quais incluem amplificação centrossômica, montagem anormal do fuso mitótico, deslocamento de quinases mitóticas e falhas de *checkpoints* mitóticos (GIODINI et al., 2002; LENS et al., 2003; LI et al., 1999; WHEATLEY et al., 2001). Visto que a expressão da survivina é mínima durante o ciclo celular até a fase G₂/M, onde atinge seu ápice de expressão, a inibição dessa proteína induziria o bloqueio do ciclo em G₂/M (CHEN et al., 2016; DE JONG et al., 2016; GHADIMI et al., 2012). Efeito esse comprovado pelo *knock-down* específico da survivina, pelo uso de siRNAs (GHADIMI et al., 2012; KAPPLER et al., 2004; NING et al., 2004)

Porém, nenhuma das linhagens analisadas no presente trabalho apresentou esse bloqueio, sendo verificada na CCRF-CEM redução de células em G1 e parada

do ciclo na fase S. Na JURKAT, verificamos aumento da porção sub-G1 e diminuição de células na fase G2/M após tratamento com YM-155.

Chang et al. (2015), mesmo estudando células LLA-B com TP53 selvagem, identificaram bloqueio do ciclo na fase S, resultado de danos diretos de YM-155 ao DNA durante sua replicação. O que, por sua vez, provoca aumento da fosforilação de TP53, Chk2 e γ H2AX, levando à morte celular por apoptose. Os resultados obtidos com a análise do ciclo celular da linhagem CCRF-CEM vão de encontro com Chang et al. (2015). Além do dano ao DNA, o bloqueio em S pode ocorrer devido a vários fatores como defeitos na formação de cromatina e deficiências no *check-point* (NELSON et al., 2002; YE et al., 2003).

Na JURKAT, a redução de células em G2/M e aumento em sub-G1, foi semelhantemente descrito por Tao et al. (2012), Smith et al. (2015) e Chuwa et al. (2016) nos quais, após tratamento com YM-155, foi evidenciado aumento da população em sub-G1 na análise do ciclo celular de linhagens tumorais de rim humano, leucemia mielóide aguda e câncer endometrial. Tao et al. (2012) também identificaram diminuição da população em G2/M.

As diferenças nos perfis de progressão do ciclo celular apresentado pelas linhagens CCRF-CEM e JURKAT, tratadas com o composto, podem ser resultado de suas diversidades genéticas. Apesar de gerarem respostas distintas, em ambas as linhagens pode-se observar aumento dos índices apoptóticos. Ou seja, as vias genéticas influenciadas pelo composto YM1-55 podem ser variáveis, inclusive em linhagens do mesmo subtipo tumoral.

Os mecanismos exatos de ação do composto YM-155 ainda são desconhecidos. Por exemplo, na regulação da proteína survivina esse composto foi descrito com efeito pré-transcricional, se ligando a fatores de transcrição, como SP1 e ILF3/p54, fundamentais na regulação da apoptose e progressão do ciclo celular, e os dissociando da região promotora desse gene (CHENG et al., 2012; YAMAUCHI et al., 2012). Porém ainda não está bem estabelecida a atuação do YM-155 em outros genes regulados pelos mesmos fatores de transcrição, por exemplo, SP1 (RAUCH et al., 2014).

O fator de transcrição SP1 exerce um impacto geral sobre a dinâmica do ciclo celular, seu bloqueio leva à parada do ciclo devido à inibição de ciclina D1 e indução de p27 (KIP1) (GRINSTEIN et al., 2002). Porém como ambos atuam na regulação da transição G1/S, os resultados de ciclo celular obtidos no presente estudo não se

relacionam a esse possível mecanismo de ação de YM-155. Adicionalmente, SP1 atua na regulação de vários outros genes associados à tumorigênese como E2F1, *c-fos*, fator de crescimento transformador α , fatores anti-apoptóticos da família *bcl-2*, *Bcl-xL*, assim como na síntese e metabolismo de purina/pirimidina (timidilato sintase, adenosina deaminase, DNA polimerase α , carbamilfosfato sintetase/ aspartato carbamiltransferase/ dihidroorotase (CAD) e na angiogênese, VEGF (CASTRO-RIVERA; SAMUDIO; SAFE, 2001; CHEN et al., 2000; DUAN; PORTER; SAFE, 1998; DONG, 1999; DUAN; SAFE, 1999; KHAN; ABDELRAHIM; SAMUDIO, 2003; NGWENYA; SAFE, 2003; SAMUDIO et al., 2001; SAVILLE et al., 2004; STONER et al., 2004; WANG et al., 1999; XIE et al., 2000).

Hipotetizando que seria importante considerar efeitos antiproliferativos mais amplos com a inibição do SP1 em demais regiões promotoras após tratamento com YM-155 (RAUCH et al., 2014), além da modulação da expressão de survivina foi avaliada a expressão dos genes *VEGF* e *Bcl-xL* após tratamento com o composto. No entanto, nossos resultados demonstraram que não houve inibição da expressão de ambos os genes nas linhagens estudadas. Portanto, esses dados sugerem que YM-155 em linhagens LLA-T deficientes de TP53, esteja atuando não só de forma independente de survivina, mas por mecanismos outros que não a inibição do fator de transcrição SP-1.

Independente da via molecular que a YM-155 esteja interferindo nas linhagens LLA-T, os resultados aqui apresentados sugerem que esse composto é efetivo na diminuição do crescimento e aumento da morte celular, podendo ser uma molécula promissora no tratamento dos pacientes, principalmente daqueles com maior sensibilidade ao composto.

Na fase de ensaios clínicos, geralmente o tratamento com YM-155 tem sido bem tolerado e respostas clínicas são observadas numa variedade de tipos tumorais (LEWIS et al., 2011; RAUCH et al., 2014).

Os resultados dos testes de fase I mostraram que o tratamento com essa molécula em pacientes com tumores sólidos refratários de câncer de pulmão, esôfago, coloretal e timo são promissores, visto a grande segurança no uso em pacientes, a concentração atingida no plasma e sua eficiente atividade antitumoral (SATO et al., 2009). Tolcher et al. (2008) evidenciaram que o tratamento com YM-155 foi bem tolerado em câncer de próstata hormônio refratário e NHL (Linfoma Non-Hodgkin), sendo a toxicidade considerada baixa e controlável, representada por

estomatites reversíveis e transitórias, artralgias, náuseas e febre, e o efeito adverso mais grave relacionado à droga foi o desenvolvimento de neutropenia (grau 4) em alguns pacientes.

Em outro estudo envolvendo indivíduos com câncer de próstata hormônio refratário, pulmão (NSCLC) e melanoma tratados com YM-155 intravenoso, oito pacientes apresentaram efeitos adversos cardíacos e renais, sugerindo que a função renal deve ser monitorada a fim de prevenir o acúmulo excessivo do composto, mas no geral, a administração na maioria dos pacientes foi bem tolerada (RAUCH et al., 2014).

Também já foram realizados ensaios de fase II, em pacientes com melanoma, e esses estudos também indicaram a segurança do tratamento com o composto agindo de forma isolada, apesar de ter sido apontada falha renal aguda reversível em um dos pacientes (LEWIS et al., 2011). Porém, esse efeito adverso não foi observado em um estudo mais recente onde os eventos decorrentes da terapia com YM-155 foram considerados controláveis com suporte individual e puderam ser solucionados, atingindo os valores de base, por meio da suspensão ou redução da dose do composto (KUDCHADKAR et al., 2015).

Portanto a eficácia clínica de YM-155 é suportada pelas respostas estáveis antitumorais alcançadas com seu tratamento nos estudos de fase I e II, e com base nesses resultados, o composto mostra-se uma estratégia promissora no tratamento das mais diversas neoplasias. Nakahara et al. (2007) consideram que uma vantagem importante de YM-155 em relação às outras moléculas antitumorais é o fato daquele apresentar aumento da eficácia associada à baixa toxicidade, em esquemas contínuos de administração. Nesse estudo foram encontradas concentrações menores da droga distribuída no plasma do que no tumor, refletindo menor exposição dos tecidos normais aos efeitos de YM-155.

Embora o mecanismo exato do tratamento em linhagens LLA-T precise ser melhor investigado, é sugerido que YM-155 possa ser um candidato no tratamento de LLA-T infantil, principalmente em pacientes com alta sensibilidade ao composto.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados aqui apresentados, conclui-se que:

- a) YM-155 diminui a viabilidade e o crescimento de linhagens derivadas de pacientes com leucemia linfóide aguda de células T (LLA-T), com a linhagem JURKAT mais sensível à YM-155 em relação à CCRF-CEM;
- b) YM-155 é um potente indutor de morte celular por apoptose em linhagens LLA-T;
- c) YM-155 inibe significativamente a capacidade de formação de colônias em linhagens de LLA-T;
- d) YM-155 não diminui a expressão gênica de *survivina*, *Bcl-xL* e *VEGF* em linhagens de LLA-T;
- e) A atividade antiproliferativa de YM-155 sobre a linhagem CCRF-CEM se dá através do bloqueio do ciclo celular na fase S;
- f) YM-155 interferiu na progressão normal do ciclo celular da JURKAT, diminuindo consideravelmente sua população em G2/M e aumentando a fração Sub-G1.

Portanto, concluímos que o composto YM-155 representa um promissor agente antitumoral sobre as linhagens de leucemia linfóide aguda de células T com mutação do gene *TP53*.

REFERÊNCIAS

ALTIERI, D. Validating survivin as a cancer therapeutic target. **Nature Reviews Cancer**, Worcester, v. 3, n. 1, p. 46-54, Jan, 2003.

ALTIERI, D. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. **Current opinion in cell biology**, Worcester, v. 18, n. 6, p. 609-615, Dec, 2006.

ALTIERI, D. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. **Nature Reviews Cancer**, Philadelphia, v. 8, n. 1, p. 61-70, Jan, 2008.

ALTIERI, D. Targeting survivin in cancer. **Cancer letters**, Philadelphia, v. 332, n. 2, p. 225-228, May, 2013.

AMMANAMANCHI, S. et al. Induction of transforming growth factor- β receptor type II expression in estrogen receptor-positive breast cancer cells through SP1 activation by 5-aza-2'-deoxycytidine. **Journal of Biological Chemistry**, Toledo, v. 273, n. 26, p. 16527-16534, Jun, 1998.

AOYAMA, Y. et al. Population pharmacokinetic modeling of sepantronium bromide (YM155), a small molecule survivin suppressant, in patients with non-small cell lung cancer, hormone refractory prostate cancer, or unresectable stage III or IV melanoma. **Investigational new drugs**, v. 31, n. 2, p. 443-451, Apr, 2013.

ARICÒ, M. et al. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. **New England Journal of Medicine**, Pavia, v. 342, n. 14, p. 998-1006, Apr, 2000.

ARICÒ, M. et al. Improved outcome in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia defined by prednisone-poor response treated with double Berlin-Frankfurt-Muenster protocol II. **Blood**, Pavia, v. 100, n. 2, p. 420-426, Mar, 2002

ARINZE, I.; KAWAI, Y. Sp family of transcription factors is involved in valproic acid-induced expression of Gai2. **Journal of Biological Chemistry**, Nashville, v. 278, n. 20, p. 17785-17791, May, 2003.

BELMONTE, M. et al. Targeting leukemia stem cells: which pathways drive self-renewal activity in T-cell acute lymphoblastic leukemia? **Current Oncology**, Vancouver, v. 23, n. 1, p. 34, Feb, 2016

BELSON, M.; KINGSLEY, B.; HOLMES, A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. **Environmental health perspectives**, Atlanta, p. 138-145, Jan, 2007.

BHOJWANI, D.; YANG, J.; PUI, C. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric clinics of North America**, Memphis, v. 62, n. 1, p. 47-60, Feb, 2015.

BLACK, A.; BLACK, J.; AZIZKHAN-CLIFFORD, J. Sp1 and krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. **Journal of cellular physiology**, Buffalo, v. 188, n. 2, p. 143-160, Jun, 2001.

BLANC-BRUDE, O. et al. Therapeutic Targeting of the Survivin Pathway in Cancer Initiation of Mitochondrial Apoptosis and Suppression of Tumor-associated Angiogenesis. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 7, p. 2683-2692, Jul, 2003.

BLASBERG, J. et al. Lung cancer osteopontin isoforms exhibit angiogenic functional heterogeneity. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**, New York, v. 139, n. 6, p. 1587-1593, Jun, 2010.

BOLTON, M. et al. Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. **Molecular biology of the cell**, Charlottesville, v. 13, n. 9, p. 3064-3077, Sep, 2002.

BOZOK, C. et al. Capsaicin induced apoptosis and gene expression dysregulation of human acute lymphoblastic leukemia CCRF-CEM cells. **Journal of BU ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology**, Izmir, v. 19, n. 1, p. 183-190, Jan-Mar, 2013.

BRASILEIRO, G. **Patologia Geral - Bogliolo**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Ago, 2013.

CARROLL, W.; RAETZ, E. Clinical and laboratory biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. **The Journal of pediatrics**, v. 160, n. 1, p. 10-18, Jan, 2012.

CASTRO-RIVERA, E.; SAMUDIO, I.; SAFE, S. Estrogen regulation of cyclin D1 gene expression in ZR-75 breast cancer cells involves multiple enhancer elements. **Journal of Biological Chemistry**, College Station, v. 276, n. 33, p. 30853-30861, Aug, 2001.

CHANDELE, A. et al. Upregulation of survivin in G2/M cells and inhibition of caspase 9 activity enhances resistance in staurosporine-induced apoptosis. **Neoplasia**, Ganeshkhind, v. 6, n. 1, p. 29-40, Jan-Feb, 2004.

CHANG, B. et al. YM155 potently kills acute lymphoblastic leukemia cells through activation of the DNA damage pathway. **Journal of hematology & oncology**, v. 8, n. 1, p. 39, Apr, 2015.

CHEN, X. et al. Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. **Journal of Cancer**, Aurora, v. 7, n. 3, p. 314-323, Jan, 2016.

CHENG, Q. et al. Suppression of survivin promoter activity by YM155 involves disruption of Sp1-DNA interaction in the survivin core promoter. **International journal of biochemistry and molecular biology**, Buffalo, v. 3, n. 2, p. 179, May, 2012.

CHENG, X. et al. Survivin inhibitor YM155 suppresses gastric cancer xenograft growth in mice without affecting normal tissues. **Oncotarget**, Shanghai, Feb, 2016.

CHENG, S. et al. YM155 down-regulates survivin and XIAP, modulates autophagy and induces autophagy-dependent DNA damage in breast cancer cells. **British journal of pharmacology**, Tainan, v. 172, n. 1, p. 214-234, Jan, 2015.

CHESON, B. et al. A phase II study of the survivin suppressant YM155 in patients with refractory diffuse large B-cell lymphoma. **Cancer**, v. 118, n. 12, p. 3128-3134, Oct, 2012.

CHIPUK, J. et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. **Science**, San Diego, v. 303, n. 5660, p. 1010-1014, Feb, 2004.

CHIPUK, J.; GREEN, D. PUMA cooperates with direct activator proteins to promote mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. **Cell Cycle**, Memphis, v. 8, n. 17, p. 2692-2696, Sep, 2009.

CHRISTMANN, M.; KAINA, B. Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. **Nucleic acids research**, Mainz, v. 41, n. 18, p. 8403-8420, Oct, 2013.

CHURCH, D.; TALBOT, D. Survivin in solid tumors: rationale for development of inhibitors. **Current oncology reports**, Headington, v. 14, n. 2, p. 120-128, Apr, 2012.

CHUWA, A. et al. Significance of survivin as a prognostic factor and a therapeutic target in endometrial cancer. **Gynecologic Oncology**, Hongo Bunkyo, Jun, 2016.

CRYNS, V.; YUAN, J. Proteases to die for. **Genes & Development**, Illinois, v. 12, n. 11, p. 1551-1570, 1998.

DARZYNKIEWICZ, Z.; GALKOWSKI, D.; ZHAO, H. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. **Methods**, Valhalla, v. 44, n. 3, p. 250-254, Mar, 2008.

DE JONG, Y. et al. Targeting survivin as a potential new treatment for chondrosarcoma of bone. **Oncogenesis**, Leiden, v. 5, n. 5, p. e222, May, 2016.

DE NECOCHEA-CAMPION, R. et al. AML sensitivity to YM155 is modulated through AKT and Mcl-1. **Cancer letters**, Loma Linda, v. 366, n. 1, p. 44-51, Sep, 2015.

DOHI, T. et al. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, San Diego, v. 279, n. 33, p. 34087-34090, Aug, 2004.

DOHI, T. et al. Inhibition of apoptosis by survivin improves transplantation of pancreatic islets for treatment of diabetes in mice. **EMBO reports**, Worcester, v. 7, n. 4, p. 438-443, Apr, 2006.

DONG, L. et al. Mechanisms of transcriptional activation of bcl-2 gene expression by 17 β -estradiol in breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, College Station, v. 274, n. 45, p. 32099-32107, Nov, 1999.

DUAN, R.; PORTER, W.; SAFE, S. Estrogen-Induced c-fos Protooncogene Expression in MCF-7 Human Breast Cancer Cells: Role of Estrogen Receptor Sp1

Complex Formation 1. **Endocrinology**, College Station, v. 139, n. 4, p. 1981-1990, Apr, 1998.

EROGLU, M.; DERRY, W. B. Your neighbours matter—non-autonomous control of apoptosis in development and disease. **Cell Death & Differentiation**, Jul, 2016.

ESH, A. et al. Prognostic significance of survivin in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 27, n. 1, p. 18-25, Mar, 2011.

FARIAS, M.; DE CASTRO, S. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. 2004. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Mariela_Farias/publication/26392137_Diagnostico_laboratorial_das_leucemias_linfides_agudas/links/00b4953c3cbcfe2ace000000.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2015

FENG, W.; YOSHIDA, A.; UEDA, T. YM155 induces caspase-8 dependent apoptosis through downregulation of survivin and Mcl-1 in human leukemia cells. **Biochemical and biophysical research communications**, Eiheiji-Chou, v. 435, n. 1, p. 52-57, May, 2013.

FORESTIER, E. et al. Cytogenetic patterns in ETV6/RUNX1-positive pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: A Nordic series of 245 cases and review of the literature. **Genes, Chromosomes and Cancer**, Umeå, v. 46, n. 5, p. 440-450, Feb, 2007.

FORTUGNO, P. et al. Regulation of survivin function by Hsp90. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Worcester, v. 100, n. 24, p. 13791-13796, Nov, 2003.

FUNG, L. et al. Differential gene expression in nasopharyngeal carcinoma cells. **Life sciences**, Hong Kong, v. 67, n. 8, p. 923-936, Jul, 2000.

GASSMANN, R. et al. Borealin a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. **The Journal of cell biology**, Edinburgh, v. 166, n. 2, p. 179-191, Jul, 2004.

GHADIMI, M. et al. Survivin is a viable target for the treatment of malignant peripheral nerve sheath tumors. **Clinical Cancer Research**, Houston, v. 18, n. 9, p. 2545-2557, May, 2012.

GHOSH, J. et al. Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, Worcester, v. 283, n. 8, p. 5188-5194, Feb, 2008.

GLAROS, T. et al. The “survivin suppressants” NSC 80467 and YM155 induce a DNA damage response. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, Frederick, v. 70, n. 1, p. 207-212, Jul, 2012.

GRAAF, A. et al. Expression of C-IAP1, C-IAP2 and SURVIVIN discriminates different types of lymphoid malignancies. **British journal of haematology**, Venlo, v. 130, n. 6, p. 852-859, Aug, 2005.

GOLDBERG, J. et al. Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana-Farber Cancer Institute acute lymphoblastic leukemia consortium experience. **Journal of Clinical Oncology**, Boston, v. 21, n. 19, p. 3616-3622, Oct, 2003.

GRAAF, A. et al. Expression of C-IAP1, C-IAP2 and SURVIVIN discriminates different types of lymphoid malignancies. **British journal of haematology**, v. 130, n. 6, p. 852-859, Sep, 2005.

GREAVES, M. Pre-natal origins of childhood leukemia. **Reviews in clinical and experimental hematology**, London, v. 7, n. 3, p. 233-245, Sep, 2003.

GRINSTEIN, E. et al. Sp1 as G1 cell cycle phase specific transcription factor in epithelial cells. **Oncogene**, Dusseldorf, v. 21, n. 10, p. 1485-1492, Feb, 2002.

GROSSMAN, D. et al. Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 108, n. 7, p. 991, Oct, 2001.

Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil. GBTLI/99 – protocolo de tratamento da leucemia linfóide aguda em crianças. Campinas: [s.n]; 2000. 188p.

GU, H. et al. Oral Resveratrol Prevents Osteoarthritis Progression in C57BL/6J Mice Fed a High-Fat Diet. **Nutrients**, Shenyang, v. 8, n. 4, p. 233, Apr, 2016.

GUO, H. et al. Silencing of survivin using YM155 inhibits invasion and suppresses proliferation in glioma cells. **Cell biochemistry and biophysics**, Jinan, v. 71, n. 2, p. 587-593, Mar, 2015.

GUO, K. et al. A combination of YM-155, a small molecule survivin inhibitor, and IL-2 potently suppresses renal cell carcinoma in murine model. **Oncotarget**, Guangzhou, v. 5, Aug, 2015.

GUO, N. et al. Confirmation of gene expression–based prediction of survival in non–small cell lung cancer. **Clinical Cancer Research**, Morgantown, v. 14, n. 24, p. 8213-8220, Dec, 2008.

GUO, Y. et al. Correlations among ERCC1, XPB, UBE2I, EGF, TAL2 and ILF3 revealed by gene signatures of histological subtypes of patients with epithelial ovarian cancer. **Oncology reports**, Morgantown, v. 27, n. 1, p. 286-292, Jan, 2012.

HAN, B. et al. A set of miRNAs that involve in the pathways of drug resistance and leukemic stem-cell differentiation is associated with the risk of relapse and glucocorticoid response in childhood ALL. **Human molecular genetics**, Guangzhou, v. 20, n. 24, p. 4903-4915, Dec, 2011.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. The hallmarks of cancer. **Cell**, San Francisco, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan, 2000.

HARFOUCHE, R. et al. Mechanisms which mediate the antiapoptotic effects of angiopoietin-1 on endothelial cells. **Microvascular research**, Montreal, v. 64, n. 1, p. 135-147, Jul, 2002.

HERMEKING, H. et al. 14-3-3σIs a p53-Regulated Inhibitor of G2/M Progression. **Molecular cell**, Baltimore, v. 1, n. 1, p. 3-11, Dec, 1997.

HERNÁNDEZ, A.; MENÉNDEZ, P. Linking Pesticide Exposure with Pediatric Leukemia: Potential Underlying Mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, Granada, v. 17, n. 4, p. 461, Mar, 2016.

HU, Q. et al. Interleukin enhancer-binding factor 3 promotes breast tumor progression by regulating sustained urokinase-type plasminogen activator expression. **Oncogene**, Augusta, v. 32, n. 34, p. 3933-3943, Aug, 2013.

HU, Z. et al. Enhancement of anti-tumor effects of 5-fluorouracil on hepatocellular carcinoma by low-intensity ultrasound. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 1, p. 1, Apr, 2016.

HUNGER, S. et al. Improving outcomes for high-risk ALL: Translating new discoveries into clinical care. **Pediatric blood & cancer**, Aurora, v. 56, n. 6, p. 984-993, Jun, 2011.

HUNGER, S.; MULLIGHAN, Charles G. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 16, p. 1541-1552, Oct, 2015.

IRONS, R.; STILLMAN, W. Impact of benzene metabolites on differentiation of bone marrow progenitor cells. **Environmental health perspectives**, Denver, v. 104, n. Suppl 6, p. 1247, Dec, 1996.

IWASA, T. et al. Marked anti-tumour activity of the combination of YM155, a novel survivin suppressant, and platinum-based drugs. **British journal of cancer**, Osaka-Sayama, v. 103, n. 1, p. 36-42, Jun, 2010.

IWASA, T. et al. Radiosensitizing effect of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in non-small cell lung cancer cell lines. **Clinical Cancer Research**, Osaka-Sayama, v. 14, n. 20, p. 6496-6504, Oct, 2008.

JAISWAL, P.; GOEL, A.; MITTAL, R. Survivin: A molecular biomarker in cancer. **The Indian journal of medical research**, Lucknow, v. 141, n. 4, p. 389, Apr, 2015.

JENNINGS, R. et al. Regulation of the human transforming growth factor beta type II receptor gene promoter by novel Sp1 sites. **Oncogene**, Tampa, v. 20, n. 47, p. 6899-6909, Oct, 2001.

JI, C. et al. Multiple and essential Sp1 binding sites in the promoter for transforming growth factor- β type I receptor. **Journal of Biological Chemistry**, New Haven, v. 272, n. 34, p. 21260-21267, Aug, 1997.

KEBRIAEI, P.; LARSON, R. Progress and challenges in the therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. **Current opinion in hematology**, v. 10, n. 4, p. 284-289, Jul, 2003.

KELLY, R. et al. Impacting tumor cell-fate by targeting the inhibitor of apoptosis protein survivin. **Mol Cancer**, v. 10, n. 35, p. 10.1186, Apr, 2011.

KERR, J.; WYLLIE, A.; CURRIE, A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British journal of cancer**, v. 26, n. 4, p. 239, Aug, 1972.

KHAN, S. et al. Estrogen receptor/Sp1 complexes are required for induction of cad gene expression by 17 β -estradiol in breast cancer cells. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 2325-2335, Jun, 2003.

KHAN, S. et al. Localization and upregulation of survivin in cancer health disparities: a clinical perspective. **Biologics: targets & therapy**, Loma Linda, v. 9, p. 57, Jul, 2015.

KO, L.; PRIVES, C. p53: puzzle and paradigm. **Genes & development**, v. 10, n. 9, p. 1054-1072, May, 1996.

KUDCHADKAR, R. et al. A phase 2, multicenter, open-label study of sepantronium bromide (YM155) plus docetaxel in patients with stage III (unresectable) or stage IV melanoma. **Cancer medicine**, Atlanta, v. 4, n. 5, p. 643-650, May, 2015.

KUWANO, Y. et al. MKP-1 mRNA stabilization and translational control by RNA-binding proteins HuR and NF90. **Molecular and cellular biology**, Baltimore, v. 28, n. 14, p. 4562-4575, Jul, 2008.

LAI, P. C. et al. Novel survivin inhibitor YM155 elicits cytotoxicity in glioblastoma cell lines with normal or deficiency DNA-dependent protein kinase activity. **Pediatrics & Neonatology**, v. 53, n. 3, p. 199-204, Jun, 2012.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Childhood Cancers. Late Effects of Treatment for Childhood Cancer (PDQ®). Disponível em: <<http://www.cancer.gov/types/childhood-cancers/late-effects-pdq>>. Acesso em: March 31, 2016.

LE JEUNE, C.; THOMAS, X. Potential for bispecific T-cell engagers: role of blinatumomab in acute lymphoblastic leukemia. **Drug design, development and therapy**, v. 10, p. 757, Feb, 2016.

LEU, J. et al. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak–Mcl1 complex. **Nature cell biology**, Philadelphia, v. 6, n. 5, p. 443-450, May, 2004.

LEWIS, K. et al. A multi-center phase II evaluation of the small molecule survivin suppressor YM155 in patients with unresectable stage III or IV melanoma. **Investigational new drugs**, v. 29, n. 1, p. 161-166, Feb, 2011.

LI, F.; ALTIERI, D. Transcriptional analysis of human survivin gene expression. **Biochem. J**, London, v. 344, p. 305-311, Dec, 1999.

LI, F. et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. **Nature**, New Haven, v. 396, n. 6711, p. 580-584, Dec, 1998.

LI, F.; FRAUMENI JR, J. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? **Ann Intern Med.**, v. 71, n. 4, p. 747-752, Oct, 1969.

LI, Q. et al. Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of schisandrin B against human glioma cells. **Cancer cell international**, Wenzhou, v. 15, n. 1, p. 12, Feb, 2015.

LIANG, H. et al. Silencing of survivin using YM155 induces apoptosis and chemosensitization in neuroblastomas cells. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, Jinan, v. 17, n. 21, p. 2909-2915, Nov, 2013.

LIU, G. et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. **Molecular cancer**, Los Angeles, v. 5, n. 1, p. 1, Dec, 2006.

LIU, Y. et al. The role of Sp1 in the differential expression of transforming growth factor- β receptor type II in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. **Journal of Biological Chemistry**, Toledo, v. 275, n. 16, p. 12231-12236, Apr, 2000.

MA, G. et al. Cucurbitacin E induces caspase-dependent apoptosis and protective autophagy mediated by ROS in lung cancer cells. **Chemico-Biological Interactions**, Macao, Jun, 2016.

MARUSAWA, H. et al. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. **The EMBO journal**, La Jolla, v. 22, n. 11, p. 2729-2740, Jun, 2003.

MASLAK, P.; MCKENZIE, S. Precursor B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *America Society of Hematology*. Disponível em <<http://imagebank.hematology.org>>. Acesso em: 05 Jun 2016.

MATA, J. F. et al. Cytosine arabinoside-metabolizing enzyme genes are underexpressed in children with MLL gene-rearranged acute lymphoblastic leukemia. **Brazilian journal of medical and biological research**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 11, p. 1417-1423, Nov, 2006.

MCKENZIE, J.; GROSSMAN, D. Role of the apoptotic and mitotic regulator survivin in melanoma. **Anticancer research**, Salt Lake City, v. 32, n. 2, p. 397-404, Feb, 2012.

MESRI, M. et al. Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by survivin targeting. **The American journal of pathology**, New Haven, v. 158, n. 5, p. 1757-1765, May, 2001.

MIHARA, M. et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. **Molecular cell**, Stony Brook, v. 11, n. 3, p. 577-590, Mar, 2003.

MINEMATSU, T. et al. Carrier-mediated uptake of 1-(2-methoxyethyl)-2-methyl-4, 9-dioxo-3-(pyrazin-2-ylmethyl)-4, 9-dihydro-1H-naphtho [2, 3-d] imidazolium bromide (YM155 monobromide), a novel small-molecule survivin suppressant, into human solid tumor and lymphoma cells. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n. 3, p. 619-628, 2009.

MINEMATSU, T. et al. Characterization of human organic cation transporter 1 (OCT1/SLC22A1)-and OCT2 (SLC22A2)-mediated transport of 1-(2-methoxyethyl)-2-methyl-4, 9-dioxo-3-(pyrazin-2-ylmethyl)-4, 9-dihydro-1H-naphtho [2, 3-d] imidazolium bromide (YM155 monobromide), a novel small molecule survivin suppressant. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 38, n. 1, p. 1-4, 2010.

MIR, R. et al. YM155 sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin inducing apoptosis and tumor regression. **Gynecologic oncology**, IDIBELL, v. 132, n. 1, p. 211-220, Jan, 2014.

MITA, A. et al. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. **Clinical Cancer Research**, San Antonio, v. 14, n. 16, p. 5000-5005, Aug, 2008.

MOBAHAT, M.; NARENDRAN, A.; RIABOWOL, K. Survivin as a preferential target for cancer therapy. **International journal of molecular sciences**, Calgary, v. 15, n. 2, p. 2494-2516, Feb, 2014.

MOLL, U. et al. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. **Current opinion in cell biology**, New York, v. 17, n. 6, p. 631-636, Dec, 2005.

MONZÓ, M. et al. A novel anti-apoptosis gene: re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. **Journal of Clinical Oncology**, Badalona, v. 17, n. 7, p. 2100-2100, Jul, 1999.

MOORE, A. et al. BIRC5 (survivin) splice variant expression correlates with refractory disease and poor outcome in pediatric acute myeloid leukemia: A report from the Children's Oncology Group. **Pediatric blood & cancer**, Brisbane, v. 61, n. 4, p. 647-652, Apr, 2014.

MOORMAN, A. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, Newcastle, v. 101, n. 4, p. 407-416, Apr, 2016.

MORENO, D. et al. Differential expression of HDAC3, HDAC7 and HDAC9 is associated with prognosis and survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **British journal of haematology**, Ribeirão Preto, v. 150, n. 6, p. 665-673, Sep, 2010.

MORRISON, D. et al. Endogenous knockdown of survivin improves chemotherapeutic response in ALL models. **Leukemia**, v. 26, n. 2, p. 271-279, Feb, 2012.

MULLIGHAN, C. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 10, p. 3407-3415, Oct, 2012.

NA, Y. et al. YM155 induces EGFR suppression in pancreatic cancer cells. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38625, Jun, 2012.

NAHTA, R. et al. Mechanisms of environmental chemicals that enable the cancer hallmark of evasion of growth suppression. **Carcinogenesis**, v. 36, n. Suppl 1, p. S2-S18, Jun, 2015.

NAKAHARA, T. et al. Broad spectrum and potent antitumor activities of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in a wide variety of human cancer cell lines and xenograft models. **Cancer science**, v. 102, n. 3, p. 614-621, Mar, 2011.

NAKAHARA, T. et al. YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. **Cancer research**, Tsukuba-Shi, v. 67, n. 17, p. 8014-8021, Sep, 2007.

NAKAMURA, N. et al. Interleukin enhancer-binding factor 3/NF110 is a target of YM155, a suppressant of survivin. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 7, p. M111. 013243, Jul, 2012.

NGWENYA, S.; SAFE, S. Cell context-dependent differences in the induction of E2F-1 gene expression by 17 β -estradiol in MCF-7 and ZR-75 cells. **Endocrinology**, v. 144, n. 5, p. 1675-1685, May, 2003.

O'CONNOR, D. et al. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New Haven, v. 97, n. 24, p. 13103-13107, Nov, 2000.

ODA, E. et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. **Science**, Tokyo, v. 288, n. 5468, p. 1053-1058, May, 2000.

PALERMO, G. et al. Perspectives on the assessment of human sperm chromatin integrity. **Fertility and sterility**, New York, v. 102, n. 6, p. 1508-1517, Dec, 2014.

PARK, E. et al. Targeting survivin overcomes drug resistance in acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, Los Angeles, v. 118, n. 8, p. 2191-2199, Aug, 2011.

PAVLIDOU, A.; KROUPIS, C.; DIMAS, K. Association of survivin splice variants with prognosis and treatment of breast cancer. **World journal of clinical oncology**, Haidari, v. 5, n. 5, p. 883, Dec, 2014.

PETITJEAN, A. et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. **Human mutation**, Lyon, v. 28, n. 6, p. 622-629, Jun, 2007

PREMKUMAR, D. et al. Survivin Inhibitor YM-155 Sensitizes Tumor Necrosis Factor–Related Apoptosis-Inducing Ligand-Resistant Glioma Cells to Apoptosis through Mcl-1 Downregulation and by Engaging the Mitochondrial Death Pathway. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Pittsburgh, v. 346, n. 2, p. 201-210, Aug, 2013.

PUI, C. H. Recent research advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal of the Formosan Medical Association**, Memphis, v. 109, n. 11, p. 777-787, Nov, 2010.

PUI, C. H.; EVANS, W. A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. In: **Seminars in hematology**. WB Saunders, Jul, 2013. p. 185-196.

PUI, C. H.; JEHA, S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. **Nature reviews Drug discovery**, Memphis, v. 6, n. 2, p. 149-165, Feb, 2007.

PUI, C. H.; ROBISON, L.; LOOK, A. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, v. 371, n. 9617, p. 1030-1043, Mar, 2008.

RAUCH, A. et al. Survivin and YM155: how faithful is the liaison?. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, Jena, v. 1845, n. 2, p. 202-220, Apr, 2014.

REINHARDT, H.; SCHUMACHER, B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. **Trends in Genetics**, Cologne, v. 28, n. 3, p. 128-136, Mar, 2012.

RISS, T. et al. Cell viability assays. 2004.

ROSA, J. et al. Survivin modulates microtubule dynamics and nucleation throughout the cell cycle. **Molecular biology of the cell**, Worcester, v. 17, n. 3, p. 1483-1493, Mar, 2006.

SAKAMOTO, S. et al. The NF90-NF45 complex functions as a negative regulator in the microRNA processing pathway. **Molecular and cellular biology**, Kochi, v. 29, n. 13, p. 3754-3769, Jul, 2009.

SAMUDIO, I. et al. Transcriptional Activation of Deoxyribonucleic Acid Polymerase α Gene Expression in MCF-7 Cells by 17 β -Estradiol 1. **Endocrinology**, Heidelberg, v. 142, n. 3, p. 1000-1008, 2001.

SASAKI, R. et al. YM155 suppresses cell proliferation and induces cell death in human adult T-cell leukemia/lymphoma cells. **Leukemia research**, Morioka, v. 39, n. 12, p. 1473-1479, Dec, 2015.

SATOH, T. et al. Phase I study of YM155, a novel survivin suppressant, in patients with advanced solid tumors. **Clinical Cancer Research**, Osaka, v. 15, n. 11, p. 3872-3880, Jun, 2009.

SCRIDELI, C. et al. A simplified minimal residual disease polymerase chain reaction method at early treatment points can stratify children with acute lymphoblastic leukemia into good and poor outcome groups. **Haematologica**, Ribeirão Preto, v. 94, n. 6, p. 781-789, Jun, 2009.

SHI, L. et al. NF90 regulates inducible IL-2 gene expression in T cells. **The Journal of experimental medicine**, Stanford, v. 204, n. 5, p. 971-977, May, 2007.

SHI, Q. et al. Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma. **Cancer research**, Houston, v. 61, n. 10, p. 4143-4154, May, 2001.

SHIN, S. et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and-7. **Biochemistry**, Pohang, v. 40, n. 4, p. 1117-1123, Jan, 2001.

SMITH, A. et al. Targeting Survivin with YM155 (Sepantronium Bromide): A novel therapeutic strategy for paediatric acute myeloid leukaemia. **Leukemia research**, v. 39, n. 4, p. 435-444, Apr, 2015.

SONG, J. et al. Prognostic value of survivin expression in breast cancer patients: a meta-analysis. **Tumor Biology**, Hefei, v. 34, n. 4, p. 2053-2062, Aug, 2013.

STONER, M. et al. Estrogen regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ZR-75 breast cancer cells through interaction of estrogen receptor α and SP proteins. **Oncogene**, College Station, v. 23, n. 5, p. 1052-1063, Feb, 2004.

STURM, A. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, Hamburg, v. 313, n. 5791, p. 1287-1290, Sep, 2006.

SUTCLIFFE, M. et al. High concordance from independent studies by the Children's Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) associating favorable prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI Standard-Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: a Children's Oncology Group (COG) initiative. **Leukemia**, St Petersburg, v. 19, n. 5, May, 2005.

TANG, H. et al. Mcl-1 downregulation by YM155 contributes to its synergistic anti-tumor activities with ABT-263. **Biochemical pharmacology**, Guangzhou, v. 82, n. 9, p. 1066-1072, Nov, 2011.

TAO, Y. et al. Survivin selective inhibitor YM155 induce apoptosis in SK-NEP-1 Wilms tumor cells. **BMC cancer**, Suzhou, v. 12, n. 1, p. 619, Dec, 2012.

TOLCHER, A. et al. Phase I and pharmacokinetic study of YM155, a small-molecule inhibitor of survivin. **Journal of Clinical Oncology**, San Antonio, v. 26, n. 32, p. 5198-5203, Nov, 2008.

TYNER, J. et al. Targeting survivin and p53 in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, Portland, v. 26, n. 4, p. 623-632, Apr, 2012.

VASEVA, A.; MOLL, U. The mitochondrial p53 pathway. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1787, n. 5, p. 414-420, May, 2009.

VROOMAN, L.; SILVERMAN, L. Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. **Current opinion in pediatrics**, Boston, v. 21, n. 1, p. 1-8, Feb, 2009.

VUMBACA, F. et al. Double-stranded RNA-binding protein regulates vascular endothelial growth factor mRNA stability, translation, and breast cancer angiogenesis. **Molecular and cellular biology**, Farmington, v. 28, n. 2, p. 772-783, Jan, 2008.

VYHLIDAL, C. et al. Transcriptional activation of transforming growth factor alpha by estradiol: requirement for both a GC-rich site and an estrogen response element half-site. **Journal of Molecular Endocrinology**, College Station, v. 24, n. 3, p. 329-338, Jun, 2000.

WANG, H. et al. Acetylation directs survivin nuclear localization to repress STAT3 oncogenic activity. **Journal of Biological Chemistry**, Providence, v. 285, n. 46, p. 36129-36137, Nov, 2010.

WENG, A. et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. **Science**, Boston, v. 306, n. 5694, p. 269-271, Oct, 2004.

WHEATLEY, S. et al. INCENP is required for proper targeting of Survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. **Current Biology**, Edinburgh, v. 11, n. 11, p. 886-890, Jun, 2001.

WINTER, G. et al. The solute carrier SLC35F2 enables YM155-mediated DNA damage toxicity. **Nature chemical biology**, Vienna, v. 10, n. 9, p. 768-773, Sep, 2014.

XIE, W. et al. Transcriptional Activation of Thymidylate Synthase by 17 β -Estradiol in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. **Endocrinology**, College Station, v. 141, n. 7, p. 2439-2449, Jul, 2000.

XIE, W.; DUAN, R.; SAFE, S. Estrogen Induces Adenosine Deaminase Gene Expression in MCF-7 Human Breast Cancer Cells: Role of Estrogen Receptor-Sp1 Interactions. **Endocrinology**, College Station, v. 140, n. 1, p. 219-227, Jan, 1999.

YAHYA, R. et al. Serum survivin and tp53 gene expression in children with acute lymphoblastic leukemia. **Iranian journal of public health**, Mansoura, v. 41, n. 1, p. 37, Jan, 2012.

YAMANAKA, K. et al. Antitumor activity of YM155, a selective small-molecule survivin suppressant, alone and in combination with docetaxel in human malignant melanoma models. **Clinical Cancer Research**, Tsukuba-shi, v. 17, n. 16, p. 5423-5431, Aug, 2011.

YAMANAKA, K. et al. Therapeutic potential of YM155 alone and in combination with chemotherapeutics against human non-small cell lung cancer in carcinoma xenograft models. **EJC SUPPLEMENTS**, v. 6, n. 12, p. 112-112, 2008.

YAMAUCHI, T. et al. Sepantronium bromide (YM155) induces disruption of the ILF3/p54 nrb complex, which is required for survivin expression. **Biochemical and biophysical research communications**, Tsukuba-shi, v. 425, n. 4, p. 711-716, Sep, 2012.

YANG, M. et al. Analysis of the expression levels of survivin and VEGF in patients with acute lymphoblastic leukemia. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 5, n. 1, p. 305-307, Jan, 2013.

YANG, P. et al. SDF-1/CXCR4 signaling up-regulates survivin to regulate human sacral chondrosarcoma cell cycle and epithelial–mesenchymal transition via ERK and PI3K/AKT pathway. **Medical oncology**, Guangzhou, v. 32, n. 1, p. 1-7, Jan, 2015.

YARDEN, Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. **European journal of cancer**, Rehovot, v. 37, p. 3-8, Sep, 2001.

ZHANG, C. et al. Silencing of survivin by YM155 induces apoptosis and growth arrest in hepatocellular carcinoma cells. **Oncology letters**, Taizhou, v. 10, n. 3, p. 1627-1631, Sep, 2015.

ZHANG, S. et al. Targeted inhibition of survivin with YM155 promotes apoptosis of hypoxic human pulmonary arterial smooth muscle cells via the upregulation of voltage-dependent K⁺ channels. **Molecular medicine reports**, Beijing, v. 13, n. 4, p. 3415-3422, Apr, 2016.

ZHANG, Z. et al. The survivin suppressant YM155 reverses doxorubicin resistance in osteosarcoma. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, Nanguan District, v. 8, n. 10, p. 18032, Oct, 2015.

ZHAO, N. et al. YM155, a survivin suppressant, triggers PARP-dependent cell death (parthanatos) and inhibits esophageal squamous-cell carcinoma xenografts in mice. **Oncotarget**, Beijing, v. 6, n. 21, p. 18445, Jul, 2015.

ZHU, G.; LENZI, M.; SCHWARTZ, E. The Sp1 transcription factor contributes to the tumor necrosis factor-induced expression of the angiogenic factor thymidine phosphorylase in human colon carcinoma cells. **Oncogene**, Bronx, v. 21, n. 55, p. 8477-8485, Dec, 2002.

ZHU, N. et al. Inhibition of the Akt/survivin pathway synergizes the antileukemia effect of nutlin-3 in acute lymphoblastic leukemia cells. **Molecular cancer therapeutics**, Atlanta, v. 7, n. 5, p. 1101-1109, May, 2008.

ZUCKERMAN, T.; ROWE, J. Pathogenesis and prognostication in acute lymphoblastic leukemia. **F1000prime reports**, Haifa, v. 6, Jul, 2014.