

JAÍRA FERREIRA DE VASCONCELLOS

**Identificação e estudo de genes diferencialmente expressos pelo
estroma da medula óssea leucêmica**

Campinas

2010

JAÍRA FERREIRA DE VASCONCELLOS

**Identificação e estudo de genes diferencialmente expressos pelo
estroma da medula óssea leucêmica**

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas, departamento de Genética Médica da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas.

Orientador: Prof. Dr. José Andrés Yunes

**Campinas
2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

V441i	Vasconcellos, Jaíra Ferreira de Identificação e estudo de genes diferencialmente expressos pelo estroma da medula óssea leucêmica / Jaíra Ferreira de Vasconcellos. Campinas, SP: [s.n.], 2010. Orientador: José Andrés Yunes Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Leucemia linfocítica aguda. 2. Microambiente tumoral. I. Yunes, José Andrés. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	--

Título em inglês: Identification and study of genes differentially expressed by leukemic bone marrow stromal cells.

Keywords: • Acute lymphoid leukemia
• Tumor microenvironment

Titulação: Doutorado em Ciências Médicas
Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

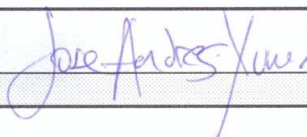
Prof. Dr. José Andrés Yunes
Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego
Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli
Profa. Dra. Patrícia da Silva Melo
Profa. Dra. Iscia Teresinha Lopes Cendes

Data da defesa: 26-02-2010

Banca examinadora de Tese de Doutorado

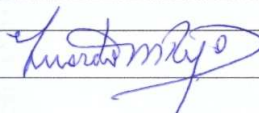
Jaira Ferreira de Vasconcellos

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). José Andrés Yunes

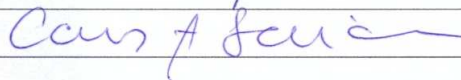


Membros:

Professor (a) Doutor (a) Eduardo Magalhães Rego



Professor (a) Doutor (a) Carlos Alberto Scrideli



Professor (a) Doutor (a) Patricia da Silva Melo



Professor (a) Doutor (a) Iscia Teresinha Lopes Cendes



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26/02/2010

*A Jaira Maria da Silva e Jayme
Vasconcellos Júnior. Sem vocês eu nada
seria...*

*Aos pacientes do Centro Infantil
Boldrini. Fontes de inspiração e
motivação.*

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Andrés Yunes pela orientação, apoio e confiança demonstrados no decorrer deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Fernando Zerbini pela co-orientação (não oficial, desculpa!) deste trabalho, além de todo estímulo, confiança, amizade e cafés.

Ao Dr. Towia Libermann pelo apoio, sugestões e suporte durante o período no exterior.

A Dra. Silvia Regina Brandalise responsável pelo tratamento e dados de evolução clínica dos pacientes deste estudo.

Ao Dr. Nilson Zanchin, Adriana Alves, Janaína Melo e Thaís Vaz pela colaboração no experimento de microarranjo das células mesenquimais.

Ao Dr. Edson Antunes e Lineu Baldissera Jr. pela colaboração no experimento de fluxo de cálcio.

Ao Dr. Rosendo Yunes, Dr. Ricardo Nunes e Dr. Paulo Leal pela colaboração na síntese do SB225002 e seus análogos.

Aos meus pais, Jaira Maria da Silva e Jayme Vasconcellos Júnior, pela dedicação e apoio incondicionais.

Ao meu irmão, Jayme Neto, por todo o carinho e amizade, que fazem minha vida mais feliz.

Ao Gabriel, Carla e Philip por todo o carinho e por me receberem sempre tão bem durante minhas passagens por São Paulo.

Ao Antonio por todo apoio, companheirismo, carinho, paciência e por existir em minha vida.

Aos companheiros e amigos dos laboratórios do Boldrini e do BIDMC: Marcela, Cris, Paty, Mônica, Aninha, Ana, Carol, Angelo, André, Lucas, Carlos, Juliana, Bárbara, Letícia, Hugo, Rafael, Marie, Xuesong, Manoj, Thao, Simon, Wiedja, Dong Xiu, Rodrigo e Gabriela, por toda ajuda e momentos de descontração que foram essenciais.

Aos amigos e colegas do Boldrini, em especial da Unidade de Laboratórios (melhor assim do que esquecer alguém...), por toda ajuda, paciência e confraternizações tão divertidas. E cafés, muitos cafés...

Aos amigos do Hemope, UPE e UFPE: Raul e Fátima Melo, Washington e Amélia Neves, Cintia Machado, Fernanda Souto, Éderson e Laureen Kido, Gilberto Alves, José Roberto Botelho, Tereza Cartaxo e tantos outros... Que muito me ensinaram e participaram de minha formação pessoal e profissional.

Ao Marcos André por ter sido meu procurador; a Cintia, Liliane, Hilde e Verena pelas conversas e companhia em casa; a Márcia e Carol pelos empréstimos de material de cultura e cafés.

Aos amigos conquistados ao longo da vida: Igor Teixeira, Tiago, Pedro, André, Cris, Antonio, Layhoon, Chico, Mirza, Georges, simplesmente pelo fato de existirem!

A Márcia, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, pela compreensão e ajuda em todos os momentos.

A Universidade Estadual de Campinas, Centro Infantil Boldrini, Beth Israel Deaconess Medical Center e Harvard Medical School pelo apoio institucional.

A FAPESP e a CAPES pela concessão de bolsa durante o período de desenvolvimento deste trabalho.

A Deus, pela existência.

*“Um dia é preciso parar de sonhar e,
de algum modo, partir.”*

Amyr Klink, Paratii - entre dois pólos

Essa nem todos vão entender, mas é de
grande significado para os que
conhecem...

“Que asco!”

William Shakespeare, O Rei Lear

RESUMO

A leucemia linfóide aguda (LLA) é a neoplasia mais freqüente na infância. As interações dos blastos da LLA com as células do estroma da medula óssea (MO) têm um impacto positivo na sobrevivência das células e resistência a quimioterapia. A LLA estimula as células do estroma da MO que reciprocamente promovem a sobrevivência da leucemia. Para identificar moléculas envolvidas na interação leucemia-microambiente foi realizada análise do perfil de expressão gênica de células mesenquimais (MSC) da MO estimuladas com células primárias da LLA. O estímulo da LLA nas MSC ativou várias quimiocinas pró-inflamatórias, incluindo *CCL2* e *IL-8*. Os níveis plasmáticos de *CCL2* e *IL-8* em crianças com LLA ao diagnóstico foram significativamente maiores do que em controles normais. A maioria das amostras de LLA primária expressou transcritos dos receptores de *CCL2* e *IL-8*. Ensaios funcionais *in vitro* demonstraram que a LLA não é afetada pela adição de *CCL2*, *IL-8* ou anticorpos neutralizantes. Porém ambas as quimiocinas demonstraram estimular a sobrevivência das MSC em meio sem soro e aumentar sua proliferação em meio com quantidades limitadas de soro. Para explorar o efeito da *IL-8* no microambiente da MO leucêmica foi sintetizado um antagonista do receptor *CXCR2* da *IL-8*, denominado SB225002 (N-(2-hydroxy-4-nitrophenyl)-N'-(2-bromophenyl)urea). O SB225002 demonstrou efeito deletério contra as linhagens da LLA (Nalm6, REH, Jurkat, CEM e Molt4). Mas nem todas as linhagens da LLA sensíveis ao SB225002 expressaram o receptor *CXCR2*, sugerindo que seu mecanismo de ação ocorreria através de receptor alternativo. Recentemente foi descrito que o SB225002 também se liga a outros receptores acoplados a proteína G, dentre eles os receptores da histamina e dos canabinóides. Ambos foram testados *in vitro* e o receptor CNR2 dos canabinóides demonstra desempenhar função no mecanismo de ação do SB225002. Além disso, para identificar moléculas envolvidas na resposta celular ao SB225002 foi realizada a análise do perfil de expressão gênica de células Jurkat tratadas com SB225002. Eventos celulares de resposta inicial ao SB225002 incluíram (i) ativação de *phospho-p44/42 ERK* e (ii) ativação de *GLIPR1* que demonstrou mediar a indução de morte do SB225002. Em conclusão, este trabalho indica a importância das quimiocinas *CCL2* e *IL-8* no microambiente da LLA, e demonstra o potencial do SB225002 como agente anti-leucêmico.

ABSTRACT

The interactions of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) blasts with bone marrow (BM) stromal cells have a positive impact on leukemia cell survival and resistance to chemotherapy. ALL stimulates BM stromal cells, which reciprocally promote leukemia cell survival. To identify molecules critically involved in leukemia–microenvironment crosstalk, we performed gene expression profiling analyses of primary BM mesenchymal stem cells (BMMSC) following stimulation by primary ALL cells. Leukemia stimulation of BMMSC up regulated the expression of several inflammatory chemokines, including CCL2 and IL-8. Secretion of these molecules was confirmed by ELISA assays of in vitro co-culture experiments and in BM plasma samples from pediatric ALL patients. Most primary ALL samples were found to express mRNA for CCL2 and IL-8 receptors. In vitro functional studies revealed that primary ALL cells co-cultured with BMMSC were not affected by addition of CCL2, IL-8 or neutralizing antibodies to these chemokines. On the other hand, both chemokines were found to enhance BMMSC survival in serum-free medium and to increase their proliferation in serum-starved conditions. To further explore the effect of IL-8 in the ALL-BM microenvironment the CXCR2 -IL-8 receptor- antagonist SB225002 (N-(2-hydroxy-4-nitrophenyl)-N'-(2-bromophenyl)urea) was synthesized. SB225002 had a deleterious effect against ALL cell lines (Nalm6, REH, Jurkat, CEM, and Molt4). Surprisingly, not all the ALL cells lines that were sensitive to SB225002 expressed CXCR2 receptor. This find suggested that the SB225002's mechanism of action occurred through a different receptor. SB225002 was recently described to also bind histamine and cannabinoid receptors that were investigated in ALL and the CNR2 cannabinoid receptor demonstrated to play a role in SB225002 mechanism of action. To identify molecules involved in the cellular effects promoted by SB225002, gene expression profiling analyses was performed of Jurkat cells treated with SB225002. Early cellular effects enhanced by SB225002 included (i) activation of phospho-p44/42 ERK and (ii) up regulation of GLIPR1 that shown to mediate SB225002-induced apoptosis. In conclusion, this work support a significant role for the chemokines CCL2 and IL-8 in the ALL-BM microenvironment, and demonstrate SB225002's therapeutic potential.

Lista de Abreviaturas

Bio-cRNA	RNA complementar biotinilado
BMEC	Célula endotelial da medula óssea (<i>Bone marrow endothelial cells</i>)
CCL2	Proteína da subfamília dos recrutadores de monócitos com dois resíduos cisteína (<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>)
CCR	Receptor de quimiocina com motivo C-C
cDNA	DNA complementar
CNR	Receptor dos canabinóides
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CXCR	Receptor de quimiocina com motivo C-X-C
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Meio Dulbecco modificado (<i>Dulbecco's modified eagle Medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfatado
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGM-2-MV	Meio para célula endotelial (<i>Endothelial cell growth medium</i>)
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i>
ERK	Quinase regulada em meio extracelular (<i>Extracellular regulated kinase</i>)
F	<i>Forward</i>
FAB	Grupo Franco-Americano-Britânico
FAK	Proteína quinase de adesão focal (<i>Focal adhesion kinase</i>)
GBTLI-99	Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil – Protocolo 1999
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green fluorescent protein</i>)
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GRO	Oncogene relacionado a crescimento (<i>Growth-related oncogene</i>)
HRH	Receptor da histamina
HRP	Enzima peroxidase (<i>Horseradish peroxidase</i>)
IC₅₀	Concentração máxima inibitória de metade da atividade biológica (<i>Half maximal inhibitory concentration</i>)

IL-8	Interleucina-8
JNK	<i>Jun NH₂-terminal kinase</i>
L	Litro
LCR	Líquor
LLA	Leucemia linfóide aguda
LLA-B	Leucemia linfóide aguda de linhagem B
LLA-T	Leucemia linfóide aguda de linhagem T
M	Molar
MAPK	Proteína quinase ativada por mitose (<i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
MCHR1	Receptor 1 do hormônio concentrador de melanina
MEK	Proteína quinase-quinase ativada por mitose (<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>)
MEM	Meio mínimo essencial
µg	Micrograma
Min	Minuto
µl	Microlitro
ml	Mililitro
µm	Micrômetro
M-MLV	Vírus <i>moloney</i> de leucemia murino (<i>Moloney murine leukemia virus</i>)
MO	Medula óssea
MSC	Célula mesenquimal da medula óssea (<i>Mesenchymal stem cell</i>)
MSCGM	Meio para célula mesenquimal (<i>Mesenchymal stem cell growth medium</i>)
MTS	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium</i>
MTT	<i>Thiazolyl blue tetrazolium bromide</i>
N	Normal
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PE	Ficoeritrina (<i>Phycoerythrin</i>)

pg	Picograma
PI3K	Fosfoinositol-3quinase
PKB	Proteína quinase B
PLIER	Erro logaritmo de intensidade da sonda (<i>Probe logarithmic intensity error</i>)
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
R	Reverso
RMA	Média de intensidade da sonda (<i>Robust multi-array average</i>)
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI-1640	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i> -1640
RQ-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RT-PCR	Transcrição reversa - Reação em cadeia da polimerase
SAv-HRP	Estreptoavidina conjugada a peroxidase (<i>Streptavidin-horseradish peroxidase</i>)
SDF-1	Fator-1 derivado de célula do estroma (<i>Stroma cell-derived factor-1</i>)
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio - Eletroforese em gel de poliacrilamida
SFB	Soro fetal bovino
SG	Sobrevida global
sh-RNA	<i>Small hairpin</i> RNA
SNC	Sistema nervoso central
SRCC	Sobrevida em remissão clínica completa
THC	Tetraidrocanabinol
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase (<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>)
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
V	Volt

Lista de Figuras

Figura 1 – Modelo da ação de CCL2 sobre a progressão tumoral.	25
Figura 2 – SB225002 e estratégia de síntese dos análogos 4-Bromo e o 3,4-Cloro seguindo método de Topliss.	42
Figura 3 – Células de leucemia primária em cultura com meio AIM-V.	50
Figura 4 – Efeito de diferentes células de suporte na sobrevivência de células de LLA primária.	51
Figura 5 – Vias de sinalização e agrupamentos de genes identificados em células mesenquimais da medula óssea após contato com a LLA.	52
Figura 6 – Níveis das proteínas CCL2 e IL-8 no plasma de amostras de LLA ao diagnóstico comparado a amostras de controles normais.	54
Figura 7 – Sobrevida Global de pacientes com baixo risco (critério do protocolo GBTLI-99) agrupados quanto à mediana de expressão do CCL2.	57
Figura 8 – Detecção de <i>CCR2alb</i> e <i>ABL</i> por RT-PCR em amostras de LLA ao diagnóstico.	57
Figura 9 – Análise por citometria de fluxo do receptor CCR2 em seis pacientes com LLA ao diagnóstico.	58
Figura 10 – Detecção de <i>CXCR1/2</i> e <i>ABL</i> por RT-PCR em amostras de LLA ao diagnóstico.	59
Figura 11 – Recuperação de células viáveis de três pacientes com LLA após co-cultura com células mesenquimais em meio acrescido de quimiocinas ou anticorpos neutralizantes.	60
Figura 12 – Recuperação de células viáveis de três pacientes com LLA sem células de suporte e em sistema de co-cultura com células mesenquimais em meio acrescido de quimiocinas ou anticorpos neutralizantes.	61
Figura 13 – Efeito do CCL2 e IL-8 sobre a migração de células primárias de LLA.	62
Figura 14 – Células de LLA primária tratadas com CCL2 e IL-8 não sofrem ativação das vias de transdução de sinal típicas dessas quimiocinas.	63
Figura 15 – Células Jurkat (LLA-T) tratadas com CCL2 e IL-8 não apresentam mobilização de cálcio intracelular.	64

Figura 16 – Efeito da CCL2 e IL-8 na sobrevivência e proliferação de células do estroma da medula óssea.	65
Figura 17 – Efeito do SB225002 na sobrevivência e proliferação das linhagens celulares de LLA (REH e CEM).	67
Figura 18 – Efeito dos análogos bromo e cloro do SB225002 na sobrevivência e proliferação de linhagem celular de LLA (REH).	67
Figura 19 – Efeito de dose resposta do SB225002 na sobrevivência e proliferação da linhagem de LLA (Jurkat).	68
Figura 20 – Efeito do SB225002 [10 e 100 µM] na sobrevivência e proliferação da LLA primária em sistema de co-cultura com células mesenquimais da medula óssea.	69
Figura 21 – Nível de IL-8 no meio de cultura de linhagem de LLA-T (Jurkat) e tratamento de linhagem de LLA-T (CEM) com IL-8.	69
Figura 22 – Perfil do ciclo celular de Jurkat tratada por 24 horas com DMSO (veículo) e SB225002.	70
Figura 23 – Análise da expressão do receptor <i>CXCR2</i> por RQ-PCR em linhagens de LLA.	71
Figura 24 – Análise da expressão de receptores candidatos a ligação com o SB225002 por RQ-PCR em linhagens de LLA.	72
Figura 25 – Associação dos tratamentos de SB225002 com histamina em linhagens de LLA-T (Jurkat e CEM).	73
Figura 26 – Detecção das proteínas CNR1 e CNR2 em amostras de Jurkat tratada com SB225002 [20µM] ao longo do tempo.	74
Figura 27 – Associação dos tratamentos de SB225002 com AM251 ou AM630 em linhagem de LLA-T (Jurkat).	75
Figura 28 – Efeito da dose 20 µM de SB225002 no decorrer do tempo em linhagem de LLA.	76
Figura 29 – Vias de sinalização ativadas em células Jurkat como resposta ao tratamento com SB225002 após 6 horas de incubação.	77
Figura 30 – Via de <i>JUN</i> proveniente da análise de expressão gênica de Jurkat tratada com SB225002.	79

Figura 31 – Via do <i>TNF-α</i> proveniente da análise de expressão gênica de Jurkat tratada com SB225002.	81
Figura 32 – Via de <i>NFκB</i> proveniente da análise de expressão gênica de Jurkat tratada com SB225002.	82
Figura 33 – Via de <i>p53</i> proveniente da análise de expressão gênica de Jurkat tratada com SB225002.	83
Figura 34 – Análise da expressão dos genes <i>Jun</i> e <i>BACH2</i> por RQ-PCR em linhagem de LLA.	84
Figura 35 – Detecção de CX3CR1 em células de LLA tratadas com SB225002.	86
Figura 36 – Análise da expressão de genes envolvidos/regulados pela via do NF κ B por RQ-PCR em linhagem de LLA (Jurkat) tratada com SB225002.	87
Figura 37 – Efeito de inibidores de NF κ B na sobrevivência e proliferação de Jurkat.	88
Figura 38 – Detecção de GLIPR1 em células de LLA tratadas com SB225002.	89
Figura 39 – Detecção de <i>GLIPR1</i> por RQ-PCR em linhagens celulares Jurkat <i>GLIPR1</i> -silenciada (Jurkat si75 e si76).	90
Figura 40 – Efeito do SB225002 na sobrevivência e proliferação das células Jurkat silenciadas com o shRNA si76 contra <i>GLIPR1</i> .	91
Figura 41 – Efeito do SB225002 na sobrevivência e proliferação das linhagens celulares de câncer renal (786-O e A498) e câncer de próstata (DU-145).	92
Figura 42 – Detecção da atividade quinase de JNK e da MAPK p38 em células Jurkat tratadas com SB225002 e DMSO.	93
Figura 43 – Detecção de <i>phospho</i> -MEK1/2, MEK 1/2, <i>phospho</i> -ERK1/2 e ERK1/2 e, da atividade quinase de ERK1/2 em Jurkat tratada com SB225002.	93
Figura 44 – Efeito do SB225002 associado a inibidores de MEK-ERK na sobrevivência e proliferação da linhagem celular Jurkat.	95

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Protocolos de termociclagem utilizados para amplificação dos genes <i>IL-8</i> , <i>CCL2</i> , <i>CCR2a</i> , <i>CCR2b</i> , <i>CXCR1</i> , <i>CXCR2</i> e <i>ABL</i> .	36
Tabela 2 – Genes analisados por RT-PCR para realização das análises com células primárias de LLA.	36
Tabela 3 – Genes analisados por RQ-PCR para realização das análises com linhagens de células da LLA.	46
Tabela 4 – Sequências de shRNA contra o gene <i>GLIPR1</i> (Sigma-Aldrich, SHCLNV-NM_006851).	49
Tabela 5 – Lista de genes secretados diferencialmente expressos nas células mesenquimais da medula óssea em co-cultura com células da LLA.	53
Tabela 6 – Característica clínicas e biológicas associadas com os níveis de <i>CCL2</i> e <i>IL-8</i> em amostras de plasma de pacientes com LLA ao diagnóstico.	55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. A leucemia linfóide aguda	21
1.2. As citocinas e quimiocinas	23
1.2.1. CCL2	23
1.2.2. IL-8	25
1.3. Os receptores acoplados a proteína G	27
1.4. O microambiente da medula óssea	28
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Local do estudo, pacientes e aspectos éticos	32
3.2. Obtenção, cultura e manutenção de células de estroma, mesenquimais e endoteliais	32
3.3. Ensaio de análise da expressão gênica (microarranjos de DNA) de células mesenquimais da medula óssea em sistema de co-cultura com LLA primária	33
3.4. Quantificação de CCL2 e IL-8 por ELISA em amostras de plasma de LLA	34
3.4.1. Análise estatística	34
3.5. Isolamento do RNA, tratamento com DNase I e transcrição reversa	34
3.6. Amplificação qualitativa de amostras de LLA primária	35
3.7. Imunofenotipagem de células por citometria de fluxo	37
3.8. Extração de proteínas de células de LLA primária	37
3.9. Western blot de amostras de células da LLA primária	38
3.10. Medida da concentração de cálcio intracelular	38
3.11. Experimentos de co-cultura de blastos leucêmicos com células de estroma, mesenquimais ou endoteliais da medula óssea	39
3.11.1. Preparação da camada de células do estroma, mesenquimal ou endotelial	39
3.11.2. Preparação das células leucêmicas e co-cultura	39
3.11.3. Contagem de células por citometria de fluxo	40
3.12. Ensaio de migração celular	40

3.13. Viabilidade de células do estroma da medula óssea	40
3.14. Cultura e manutenção das linhagens de células	41
3.15. Avaliação do SB225002, antagonista do receptor CXCR2 da IL-8	41
3.15.1. Ensaios de proliferação	43
3.15.2. Ensaio de ciclo celular	43
3.16. Quantificação de IL-8 por ELISA em amostras de meio de cultura	44
3.17. Ensaio de análise da expressão gênica (microarranjos de DNA) de linhagem de LLA tratada com SB225002	44
3.18. Amplificação quantitativa (RQ-PCR)	45
3.19. Extração de proteínas e western blot de linhagem de LLA tratada com SB225002	47
3.20. Ensaios de quinase	48
3.21. Silenciamento gênico através de vetor lentiviral	48
4. RESULTADOS	50
4.1. Efeito de diferentes células de suporte na proliferação da LLA primária	50
4.2. A LLA induz alta expressão de quimiocinas no microambiente da medula óssea	51
4.3. O microambiente da medula leucêmica é rico em CCL2 e IL-8	54
4.4. Valor prognóstico dos níveis de CCL2 e IL-8 no plasma da medula óssea leucêmica	56
4.5. LLA primária expressa os receptores das quimiocinas <i>CCL2</i> e <i>IL-8</i>	57
4.6. CCL2 e IL-8 não exercem efeito direto na LLA primária	59
4.7. CCL2 e IL-8 promovem sobrevivência das células mesenquimais da medula óssea	64
4.8. Avaliação do SB225002, antagonista do receptor CXCR2 da IL-8	66
4.8.1. Linhagens de células de LLA são sensíveis ao SB225002	66
4.8.2. CXCR2 não é o único responsável pelo efeito de SB225002	70
4.8.3. SB225002 modula as vias de <i>JUN</i> , <i>TNF-α</i> , <i>NFκB</i> e <i>p53</i>	76
4.8.4. A inibição da via de <i>NFκB</i> não está envolvida com a indução de morte mediada pelo SB225002	84

4.8.5. O processo de apoptose mediado por SB225002 é dependente da indução de <i>GLIPR1</i>	88
4.8.6. SB225002 ativa ERK 1/2	92
5. DISCUSSÃO	96
6. CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
ANEXO I	118
ANEXO II	120
ANEXO III	122
ANEXO IV	125

1. INTRODUÇÃO

A correta diferenciação celular e a arquitetura funcional dos tecidos são mantidas graças à constante troca de informação das células entre si e com a matriz extracelular. No processo cancerígeno, este equilíbrio é interrompido via interações defeituosas propagadas pelas células tumorais, muitas vezes mimetizando alguns dos eventos normalmente desencadeados por ferida ou infecção. A interação do tumor com o contexto celular do hospedeiro (microambiente tumoral) é recíproca, o tumor estimula o seu microambiente e este último potencializa a sobrevivência, proliferação e invasividade tumoral (1). A simples ocorrência de mutações gênicas não é suficiente para o desenvolvimento do câncer. De fato, indivíduos saudáveis podem apresentar células acometidas por alterações no DNA características do câncer (2-4), sem, contudo, vir a desenvolver a doença. Além disso, pequenos tumores quiescentes podem ser encontrados na necropsia de indivíduos sem sintomatologia clínica de câncer (5).

Apenas recentemente a progressão tumoral passou a ser compreendida como um processo de interação entre as células do tumor e as células adjacentes do tecido de suporte, também denominado de estroma tumoral. A matriz extracelular tumoral compreende células do sistema imune e inflamatórias, fibroblastos e células precursoras da angiogênese (6). O estudo do microambiente tumoral, e a identificação das moléculas mediadoras da interação do tumor com o microambiente circundante, têm permitido o desenvolvimento de novas drogas, anticorpos e peptídeos, alguns dos quais já em fase de testes clínicos, com o intuito de inibir a interação do tumor com as células normais do hospedeiro (7).

1.1. A leucemia linfóide aguda

A leucemia linfóide aguda (LLA) consiste em uma proliferação clonal maligna de células precursoras linfóides de etiologia desconhecida, que leva à substituição da hematopoese normal por células linfóides indiferenciadas -linfoblastos- capazes de infiltrar linfonodos, baço, fígado e outros órgãos (8). A patogênese da LLA está associada à ocorrência de várias alterações genéticas em células progenitoras linfóides, incluindo alterações celulares responsáveis por conferir uma capacidade ilimitada de auto-renovação, de bloqueio de diferenciação estágio-específico e de resistência aos sinais de apoptose (9,

10). A transformação maligna pode ocorrer durante qualquer estágio de diferenciação das células blásticas, característica que torna a doença muito heterôgenea (11), compondo vários “subtipos” de LLA que diferem quanto à resposta a quimioterapia (12).

A LLA é uma doença maligna que afeta crianças e adultos sendo, no entanto, mais comum entre menores de 15 anos, com pico de prevalência entre 2 e 5 anos (10). Entre as crianças a doença é mais comum em indivíduos de cor branca e do sexo masculino (13).

O uso intensivo e combinado de diferentes quimioterápicos tem permitido a cura em cerca de 70-80% das LLAs da infância, entretanto, novas modalidades terapêuticas são necessárias para os 20-30% dos pacientes restantes que atualmente sofrem recaída da doença. Aliado a isso, o uso combinado de terapia adicional poderia possibilitar a adoção de um regime quimioterápico menos intenso para cerca de 40-50% das LLAs consideradas de baixo risco, que se beneficiariam pela diminuição das seqüelas decorrentes do uso intensivo de quimioterápicos e dos gastos com internações e medicamentos.

A classificação da LLA baseia-se em aspectos morfológicos, imunofenotípicos e citogenéticos. A classificação morfológica do Grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) subdivide os linfoblastos leucêmicos em três subtipos: L1, L2 e L3, com base no diâmetro celular, na forma do núcleo, no número/protuberância dos nucléolos e na quantidade/aspecto do citoplasma (13).

A Organização Mundial de Saúde (14) propôs uma classificação para a LLA baseada em aspectos imunofenotípicos e citogenéticos dos blastos. Assim, a LLA-B pode ser classificada em: B sem alterações genéticas específicas e B com alterações genéticas recorrentes, sendo estas últimas: LLA-B com t(9;22)(q34;q11.2), *BCR-ABL 1*; LLA-B com t(v;11q23), rearranjo do *MLL*; LLA-B com t(12;21)(p13;q22), *TEL-AML1(ETV6-RUNX1)*; LLA-B com hiperdiploidia; LLA-B com hipodiploidia; LLA-B com t(5;14)(q31;q32), *IL3-IGH*; LLA-B com t(1;19)(q23;p13.3), *TCF3-PBX1*. A LLA-T, por sua vez, não foi subdividida de acordo com as alterações genéticas detectadas, pois, apesar de 50 a 70% dos pacientes com LLA-T apresentarem cariótipo anormal e de significado patogênico, estas alterações não são diretamente associadas com características biológicas da doença (14).

As alterações citogenéticas são as características de impacto prognóstico mais significativo nos resultados terapêuticos da LLA. Estas alterações cromossômicas ativam genes específicos, na sua maioria fatores de transcrição, que desencadeiam os fenômenos

de bloqueio de diferenciação e estímulo de proliferação e, frequentemente codificam proteínas centrais em importantes vias de sinalização celulares (10). A detecção de translocações cromossômicas é realizada ao diagnóstico, utilizada na estratificação de risco dos pacientes e também como marcadores biológicos para estudo de doença residual mínima.

1.2. As citocinas e quimiocinas

As citocinas são proteínas produzidas e secretadas por um vasto número de tipos celulares, incluindo leucócitos, células endoteliais, fibroblastos e células do estroma. Participam de várias funções celulares, dentre elas, reações imunes e inflamatórias (15). As quimiocinas são predominantemente pequenas moléculas (8 a 12 kDa) e formam uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas que desempenham importante papel na ativação, diferenciação e sobrevivência celular (16). Uma série de achados, discutidos por Struyf *et al.* (17), indicam que as quimiocinas e seus receptores desempenham importante papel na invasividade e sobrevivência de tumores hematológicos.

A família de quimiocinas inclui atualmente mais de 50 membros subdivididos em quatro subfamílias, com base no arranjo do resíduo de cisteína do peptídeo maduro. São elas: a família C possui uma única cisteína, a família CC possui duas cisteínas adjacentes próximas a porção amino-terminal da proteína, a família CXC possui um aminoácido separando as cisteínas e, a família CX₃C com três aminoácidos localizados entre os dois resíduos de cisteína (18, 19).

1.2.1. CCL2

Dentro da família de quimiocinas com resíduos CC, a subfamília dos recrutadores de monócitos (*monocyte chemoattractant protein*, MCP) inclui: CCL2 (também denominado MCP-1), CCL8 (MCP-2), CCL7 (MCP-3), CCL13 (MCP-4), MCP-5, CCL5 (RANTES), CCL20 (MIP- α) e CCL4 (MIP- β), revisado por Craig e Loberg (20).

Além de potente recrutador de monócitos, CCL2 também atua sob linfócitos T, basófilos e células *natural killer* (21). Em humanos, CCL2 é relacionado a CCL8, CCL7 e CCL13 por compartilharem atividade biológica e ativarem o mesmo receptor: CCR2 (22).

CCR2, receptor de CCL2, é uma molécula que possui sete domínios transmembrana, ligada à ativação da proteína G (23). Duas formas deste receptor são expressas na superfície celular, *CCR2a* e *CCR2b*, resultado de processamento alternativo do gene *CCR2* (23). As duas variantes diferem apenas no domínio citoplasmático c-terminal da proteína, e a transdução de sinal de CCR2 ocorre através do aumento dos níveis de íons cálcio intracelulares (24). A sinalização dos receptores de quimiocina também leva à ativação da via do AKT e, portanto, pode estimular a sobrevivência celular (25). *CCR2b* é a forma predominante do receptor embora ambas as formas possuam alta afinidade de ligação à CCL2 (26). Mesmo com alta afinidade à CCR2, a molécula CCL2 também pode ligar-se ao receptor CCR4. Por sua vez, CCR4 possui alta afinidade aos ligantes CCL5 e CCL20 (27).

Existem evidências de que CCL2 participa ativamente da formação de um microambiente favorável de metástases no osso. Diversos tipos tumorais (incluindo células de câncer de próstata e mama e, células de mieloma múltiplo) foram detectados expressando CCR2, bem como secretando elevados níveis de CCL2, promovendo assim um *looping* autócrino e parácrino no microambiente tumoral (28).

CCL2 também possui papel importante no processo de angiogênese e conseqüentemente na progressão tumoral (21). O papel de CCL2 na angiogênese pode ser direto, atuando sobre células do endotélio ou indireto, via efeito quimiotático e ativação de monócitos (21, 22). A ação de CCL2 na migração de células mononucleadas sugere sua importância como regulador da inflamação (22). Além disso, CCL2 pode ser secretado pelas próprias células tumorais ou por células do estroma, estas últimas quando estimuladas pelas células tumorais [**Figura 1**, modificado de Conti e Rollins (22)].

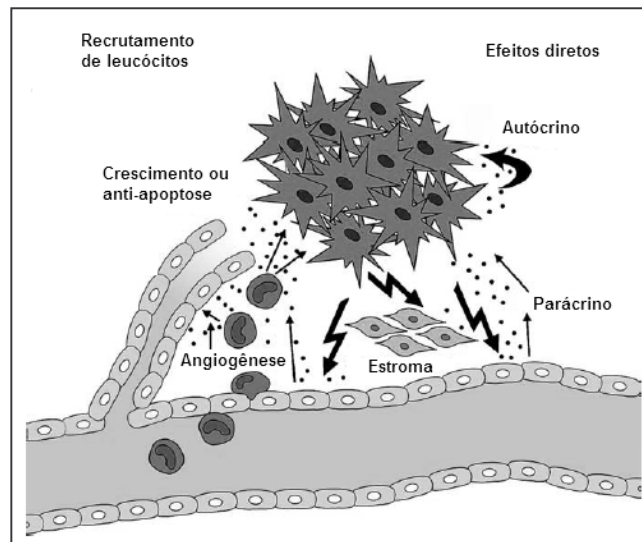


Figura 1 – Modelo da ação de CCL2 sobre a progressão tumoral. O processo pode ser *indireto* através do recrutamento de leucócitos que promovem sinais de crescimento ou anti-apoptóticos às células tumorais ou *direto*, com CCL2 agindo de forma autócrina, ou com as células tumorais estimulando o estroma a secretar CCL2 de forma parácrina [modificado de Conti e Rollins (22)].

Na leucemia ainda não está elucidado o perfil de expressão e o papel de várias quimiocinas e seus receptores. Na leucemia mielóide aguda foram detectados altos níveis plasmáticos de CCL2 em pacientes ao diagnóstico, comparados com grupo controle de indivíduos saudáveis ($p < 0,01$; referência 29). CCL2 também foi detectada em altos níveis na LLA pediátrica em amostras de líquido de pacientes com envolvimento de sistema nervoso central (SNC) comparados com pacientes sem envolvimento de SNC ($p = 0,0008$; referência 30). Corcione *et al.* (31) não detectaram a expressão de CCR1, CCR2, CCR5 e CCR6 em casos de LLA-B analisados por citometria de fluxo mas detectaram CXCR3, ao contrário do publicado anteriormente por Wong e Fulcher (32).

1.2.2. IL-8

A IL-8 é uma quimiocina membro da subfamília CXC com função principal na atração de neutrófilos, monócitos e eosinófilos a local de injúria, inflamação ou infecção (33). As principais células a produzirem IL-8 são monócitos, neutrófilos, fibroblastos e células endoteliais ativadas (34). A IL-8 tem papel fundamental na patofisiologia de

diversos processos incluindo defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas, doenças auto-imunes e estímulo da angiogênese (35).

Dois receptores funcionais foram descritos para a IL-8, e atuam ligados à ativação da proteína G: CXCR1 e CXCR2 (36, 37). CXCR1 liga-se com alta afinidade a IL-8 e a GCP-2, enquanto CXCR2 liga-se a IL-8 e a outras quimiocinas da família CXC, sendo elas: GRO- α , GRO- β , GRO- γ , peptídeo 2 ativador de neutrófilos e peptídeo 78 ativador de neutrófilos derivado de células epiteliais. A desensitização e internalização de CXCR2 ocorrem mais rapidamente e dependem de menores concentrações de IL-8 quando comparada à CXCR1 (38). CXCR1 e CXCR2 compartilham 78% de homologia na sequência de aminoácidos (39).

As quimiocinas que se ligam ao CXCR2 são sabidamente pró-angiogênicas (40, 41). O implante de tumores em camundongos *knock-out* para CXCR2 tem crescimento reduzido, áreas necróticas por falta de vascularização e menor incidência de metástases (42). Neutrófilos, monócitos e diversas outras células, incluindo neurônios e vários tipos de câncer, respondem a IL-8. A ação da IL-8 sobre as células endoteliais e seu papel na angiogênese também são conhecidos há muito tempo (43). Estratégias bloqueando a atividade angiogênica da IL-8 demonstraram ser efetivas na inibição da angiogênese, metástase e progressão tumoral em modelos animais (44).

A literatura demonstra que a LLA expressa os receptores da IL-8. Moser *et al.* (45) detectaram a presença de CXCR2 em células Jurkat, linhagem de LLA-T. Wu *et al.* (46) detectaram, em pacientes com LLA ao diagnóstico, a presença de CXCR1 e CXCR2 em linfoblastos, e não nas células do estroma. Além disso, dados recentes de Corcione *et al.* (31) obtidos através de citometria de fluxo demonstraram a presença de CXCR2 em casos de LLA-B.

A IL-8 tem sido bastante estudada nas leucemias mielóides, mas muito pouco se sabe sobre seu papel nas leucemias linfóides apesar da expressão de seus receptores pela LLA. Contudo, resultados da literatura têm sugerido uma associação desta quimiocina com a progressão das leucemias linfóides. Níveis plasmáticos de IL-8 estão associados à pior evolução clínica na leucemia linfóide crônica (47). A expressão de transcritos da IL-8 diferencia um grupo de LLA-T de adultos com pior evolução clínica (48). Níveis de IL-8

acima de 100 ng/L no sangue periférico caracterizam pacientes de LLA com pior taxa de remissão (49).

1.3. Os receptores acoplados a proteína G

Um grande espectro de moléculas, como neurotransmissores, quimiocinas, hormônios, entre outros, exercem seus efeitos em células e organismos através da ligação a receptores acoplados a proteína G. As proteínas G são moléculas heterotriméricas constituídas de subunidades α , β e γ . Cada subunidade é codificada por vários produtos gênicos, sendo a subunidade α por 20, β por 6 e γ por 12 produtos gênicos (50). Quatro classes principais de proteínas G podem ser identificadas: $G_{\alpha s}$, que ativa a via da adenilil ciclase; $G_{\alpha i/o}$, que inibe a via da adenilil ciclase; $G_{q/11}$, que ativa a via da fosfolipase C e, $G_{\alpha 12/13}$, envolvido na sinalização por GTPase através da família de proteínas Rho. Foi recentemente demonstrado que subunidades $G\alpha$ podem, de forma independente, alterar a conformação do seu receptor para afetar a afinidade e a sinalização do ligante (51).

Resumidamente, a sinalização através da proteína G ocorre quando um ligante associa-se ao recetor acoplado a proteína G (GPCR) e provoca uma mudança alostérica na subunidade $G\alpha$, que causa a substituição de uma molécula de GDP (localizado no sítio de ligação da subunidade $G\alpha$ quando do receptor em seu estado inativo) por uma molécula de GTP. A presença do GTP ativa a subunidade $G\alpha$, levando a sua dissociação das subunidades $G\beta\gamma$ e, ativa a molécula efetora de uma cascata de sinalização e, consequentemente, seus respectivos mensageiros secundários (50).

Os GPCRs com sete domínios transmembrana correspondem a maior família de receptores de superfície celular (52). Estes receptores são conhecidos por exercerem suas atividades de sinalização intracelular através da ligação a uma proteína G. Os GPCRs apresentam diferentes conformações estruturais, entre elas conformações capazes de ativar proteínas G, e conformação incapaz de ativar uma proteína G (53). Em geral, na ausência de um ligante os receptores adotam um estado inativo. Entretanto, muitos GPCRs apresentam uma ativação constitutiva, detectada independente da presença de um ligante (54, 55). Nos casos de ativação constitutiva, um ligante agonista funciona estabilizando

conformacionalmente o receptor ativo e aumentando a proporção de receptores ativos em comparação a receptores inativos. Por outro lado, um ligante agonista inverso atua reduzindo a ativação constitutiva do receptor (53).

Foi demonstrado que os GPCRs podem formar homodímeros e heterodímeros com outros GPCRs e, estas interações podem influenciar a funcionalidade dos receptores (56-58). A sinalização decorrente de heterodímeros de GPCRs é um alvo terapêutico recentemente especulado para o desenvolvimento de novas drogas, pois sua atividade funcional é dependente do estado ativo de cada receptor do dímero e, portanto, altamente específico (56, 57).

1.4. O microambiente da medula óssea

O microambiente da medula óssea (MO) compreende o estroma e as células do sangue. O estroma da MO é formado por células endoteliais, fibroblastos, reticulócitos, monócitos, osteoclastos, osteoblastos e adipócitos. Os efeitos que as células do microambiente exercem sob as células progenitoras hematopoéticas são tanto por contato direto célula-célula como através da liberação de fatores solúveis no ambiente (16). Deste modo, as células do microambiente desempenham, além da função estrutural, um importante papel na proliferação, maturação e tráfego das células hematopoéticas na MO, através da secreção de diversos fatores de crescimento e expressão de componentes da matriz extracelular e moléculas de adesão (59-62).

O controle da auto-renovação e diferenciação de progenitores hematopoéticos é realizado por interações específicas entre estas células e o microambiente da MO (63). Em reciprocidade, as células hematopoéticas também produzem fatores tróficos para as células do estroma (64). Acredita-se que as células do estroma organizam-se em nichos sendo capazes de regular a hematopoese *in vivo* (16).

Diversos fatores solúveis são altamente expressos por células do estroma, independente de sua origem (a saber, medula óssea, cordão umbilical e tecido adiposo), entre eles: IL-6, IL-8, CCL2, G-CSF, GRO (*growth-related oncogene*), TIMP-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinase*) e TIMP-2 (63). Estes fatores interagem com as células do

microambiente e, associados ao contato célula-célula, determinam eventos específicos de interação destas células com seu nicho (63).

Especificamente, as células do estroma da MO secretam um interessante conjunto de quimiocinas no microambiente, sendo elas: CCL2, CCL4, CCL5, CCL17, CCL20, CCL21, CCL25, CXCL8, CXCL12 e CXCL13 (16). É interessante notar que as células do estroma e mesenquimais da MO também apresentaram a expressão dos receptores de quimiocinas CCR1, CCR2, CCR7, CCR8, CCR9, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5 e CXCR6 (16, 64). A expressão destes receptores pelas células do estroma suporta a idéia de que os fatores solúveis produzidos e liberados no microambiente da MO não são essenciais apenas para a hematopoese normal, mas também num *looping* autócrino, possuem um importante papel no desenvolvimento das células do estroma da MO (16).

As quimiocinas secretadas no microambiente da MO e que encontram receptores funcionais na superfície das células do estroma, são responsáveis por induzir a ativação de importantes vias de sinalização celulares, entre elas a *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) e/ou *focal adhesion kinase* (FAK) e a ativação seletiva de fatores de transcrição da via STAT (16). Além disso, células mesenquimais da MO migram de maneira dose-dependente quando estimuladas com IL-8 mas não migram quando estimuladas com CCL2 (64).

Sabe-se que são necessárias alterações nas células do estroma para que existam formação e progressão tumoral. A expansão de células da LLA na MO está associada ao rompimento da arquitetura celular normal e ao desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (65, 66). Mas o estroma não atua isoladamente, sendo necessário que as células leucêmicas estimulem as células do estroma. Esta relação de dependência pode ser comprovada pela ocorrência de angiogênese na medula leucêmica, processo caracterizado pela ativação das células endoteliais da MO (BMEC, *bone marrow endothelial cells*), formação de novos vasos, e aumento dos níveis plasmáticos de fatores angiogênicos como VEGF, β -FGF, TNF- α e HGF (65, 66). A inibição das células endoteliais com agentes anti-angiogênicos provoca diminuição na progressão da leucemia em modelos animais (67-70), indicando, portanto, que a leucemia não apenas estimula como se torna dependente da angiogênese.

A interação leucemia-estroma ocorre em nichos celulares especializados, caracterizados pela expressão de E-selectina e SDF-1 (71), lembrando os nichos das células

tronco hematopoéticas. Este é um processo dinâmico, com a participação de várias moléculas que atuam progressivamente, à medida que vai se estabelecendo uma interação (72). A interação da LLA com o microambiente da MO contribui para a proliferação e resistência das células leucêmicas ao regime quimioterápico. Desvendar o papel que o microambiente desempenha na progressão e proteção das células tumorais alojadas na medula pode ajudar no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas.

2. OBJETIVOS

1. Identificar genes diferencialmente expressos pelas células de estroma da medula óssea, ao contato com células de leucemia linfóide aguda primária (LLA);
2. Selecionar genes de proteínas secretadas, com possível papel na modificação pró-leucemia do microambiente da medula óssea;
3. Confirmar expressão diferencial de alguns dos genes (objetivo 2) quanto a sua tradução em proteína, analisando amostras de plasma de pacientes com LLA;
4. Realizar estudos funcionais *in vitro* com células de LLA e do estroma da medula óssea, avaliando efeito das proteínas em estudo na proliferação, sobrevivência e/ou migração das células, e avaliando também o efeito de possíveis inibidores.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local do estudo, pacientes e aspectos éticos

Amostras de pacientes com LLA coletadas para o Laboratório de Biologia Molecular do Centro Infantil Boldrini foram objeto deste trabalho. Como previsto no projeto, as coletas foram realizadas como rotina e não foram feitas coletas adicionais específicas para o presente estudo. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro Infantil Boldrini em 16/12/2005 (CAAE - 0004.0.144.000-05) e pelo CONEP em parecer 246/2006 a 07 de abril de 2006 (**Anexo I**). O termo de consentimento livre e esclarecido foi entregue ao paciente ou responsável quando da confirmação do diagnóstico, antes da coleta de amostra biológica.

3.2. Obtenção e manutenção em cultura de células de estroma, mesenquimais e endoteliais

Para obtenção de células do estroma, mesenquimais e endoteliais da medula óssea foram usadas amostras obtidas de doadores normais do Centro Infantil Boldrini. As bolsas contendo o sangue com a medula foram lavadas com soro fisiológico 0,9% seguido de centrifugação a 1600 rpm. O *pellet* precipitado foi ressuspensão e foram adicionados soro fisiológico e HESPAN (Frezenium) na proporção de 6:1, este último utilizado para a exclusão das hemácias através da sedimentação diferencial. Aproximadamente 1×10^7 células foram semeadas em frascos de cultura contendo meio DMEM-10 (Sigma) acrescido de 10% de soro fetal bovino – SFB (Cultilab) e 0,2% de penicilina e estreptomicina (Cultilab) para as células do estroma, e MSCGM (Cambrex) para as células mesenquimais. Para a obtenção de células endoteliais, cada 10^7 células foram marcadas com 20 μ l de micro esferas imunomagnéticas CD105 (Miltenyi), de acordo com as especificações do fabricante. As células CD105+ foram mantidas em meio EGM-2-MV (Cambrex). Todas as células foram cultivadas a 37°C e 5% CO₂. Após sete dias as células não aderidas foram removidas e o meio de cultura renovado. A replicagem e subcultura das células foi feita com tripsina na concentração de 0,25% (GibcoBRL) e EDTA 1 mM. Alíquotas de 1 a 2×10^6 células foram criopreservadas entre a primeira e terceira passagens em 10% DMSO (Sigma) e 90% SFB e descongeladas quando da utilização nos experimentos.

3.3. Análise da expressão gênica (microarranjos de DNA) de células mesenquimais da medula óssea em sistema de co-cultura com LLA primária

Células mesenquimais da medula óssea foram estimuladas por 1×10^7 células blásticas primárias de três pacientes com LLA por 6 horas. Células mesenquimais não estimuladas, incubadas nas mesmas condições, foram utilizadas como controle. Após incubação, as células de LLA foram separadas gentilmente das células mesenquimais por pipetagem e as células mesenquimais foram utilizadas para extração de RNA total (Qiagen). As amostras de RNA foram analisadas no Bioanalyzer 2100 (Agilent) quanto à qualidade e concentração. Uma alíquota contendo 10 µg foi utilizada na preparação da sonda de RNA complementar biotilado (Bio-cRNA), através de síntese de cDNA seguida de amplificação por transcrição *in vitro*, segundo recomendações da Affymetrix (www.affymetrix.com/products/small_sample_prep_tn.html). Uma alíquota contendo 15 µg da sonda foi hibridizada contra microarranjos de oligonucleotídeos HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix). Foram hibridizados um total de seis microarranjos HG-U133 Plus 2.0, sendo 3 com amostras de células mesenquimais estimuladas com a LLA e 3 com amostras controles de células mesenquimais.

As lavagens, revelação e digitalização foram feitas seguindo recomendações do fabricante. As imagens digitalizadas dos arrays foram analisadas com o auxílio do *software* GeneSpring (versão 10.0.2, Agilent) e o algoritmo RMA foi utilizado para normalização. Foram considerados genes diferencialmente expressos aqueles que apresentaram *fold change* (nível de expressão do transcrito como múltiplo do controle) ≥ 2 ou < 2 , para hiper ou hipo-expressão, respectivamente. Os *softwares* GeneSpring e Ingenuity Pathways Analysis (IPA 4.0, www.ingenuity.com) foram utilizados para termos de ontologia e análise de vias de sinalização. A localização sub-celular de cada gene de interesse foi identificada através do banco de dados UniProt Knowledgebase (<http://www.uniprot.org>). Os experimentos de microarranjos das células mesenquimais foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas/SP, em colaboração com o Dr. Nilson Zanchin.

3.4. Quantificação de CCL2 e IL-8 por ELISA em amostras de plasma de LLA

O plasma de amostras consecutivas de LLA ao diagnóstico foi separado por centrifugação (1100 rpm por 10 min.) do sangue total, filtrado (22 μ M, Millipore) e estocado a -70°C . Os ensaios de ELISA foram feitos com os kits *Human MCP-1 ELISA Set* e *Human IL-8 ELISA Set* (BD), seguindo as recomendações do fabricante, consistindo de: incubação do anticorpo de captura em tampão de carbonato de sódio 0,1M (pH=9,5), bloqueio com PBS acrescido de 10% de SFB, incubação das amostras de plasma ou diluições da curva padrão (fornecida pelo kit), incubação da solução de detecção (anticorpo de detecção acrescido de SAV-HRP), incubação da solução do substrato TMB (tetrametilbenzidina) e peróxido de hidrogênio, e da solução de parada de reação (H_2SO_4 1N). A leitura foi realizada a 450 nm, com referência em 570 nm.

3.4.1. Análise estatística: diferenças entre os grupos (plasma de pacientes com LLA ao diagnóstico *versus* plasma de doadores saudáveis) foram calculados pelo teste de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$). A associação dos níveis plasmáticos de CCL2 ou IL-8 com características clínicas e biológicas dos pacientes com LLA foram analisados pelos testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$). As variáveis biológicas analisadas foram: idade, sexo, leucometria ao diagnóstico, envolvimento de sistema nervoso central ao diagnóstico, imunofenótipo e ocorrência de evento desfavorável. O seguimento dos pacientes foi analisado através de resposta completa à indução (remissão), sobrevida global e sobrevida livre de evento. As curvas de sobrevida foram construídas no programa GraphPad Prism 4, plotadas de acordo com o método de Kaplan-Meier e comparadas com o teste de log-rank ($\alpha=5\%$).

3.5. Isolamento do RNA, tratamento com DNase I e transcrição reversa

Amostras de aspirado de medula óssea ou sangue periférico foram processadas para isolamento do RNA total, pelo método fenol-isotiocianato de guanidina e hidratado em água Milli-Q tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC). A quantificação das amostras foi realizada através de leitura em espectrofotômetro (BioPhotometer, Eppendorf), sendo a concentração estimada a partir de leitura a 260 nm e, corrida eletroforética (100 V, 20 min. em tampão Tris-Borato-EDTA) utilizando padrões de esperma de salmão com concentração

conhecidas. A digitalização da imagem e quantificação comparativa da intensidade de banda foi realizada através do programa Kodak 1D versão 3.5.4.

Uma alíquota contendo 2 µg do RNA quantificado foi tratada com a enzima DNase I (Fermentas) a 37°C por 1 hora. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total tratado usando a enzima transcriptase reversa M-MLV (Promega) convenientemente diluída em seu tampão de reação e adicionado de 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP's (Invitrogen), iniciador randômico N(6) e água Milli-Q tratada com DEPC para um volume final de 20 µl. Após incubação por 5 min. à temperatura ambiente as reações foram submetidas às seguintes condições de incubação: 42°C por 60 min. e 70°C por 15 min. Uma alíquota de 5 µl do cDNA sintetizado foi diluído em 20 µl de água Milli-Q tratada com DEPC para uso nas reações de amplificação.

Para as amostras de linhagens de LLA, o RNA total foi extraído utilizando-se os kits QIAshredder (Qiagen) e RNeasy Mini Kit (Qiagen). O RNA foi quantificado no NanoDrop (Thermo Scientific) e a síntese de cDNA foi realizada a partir de 3 µg de RNA total usando Ready-to-Go™ You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare).

3.6. Amplificação qualitativa de amostras de LLA primária

A amplificação qualitativa dos genes *CCL2* (n = 50), *IL-8* (n = 50), *CCR2a* (n = 96), *CCR2b* (n = 96), *CXCR1* (n = 50), *CXCR2* (n = 50) e *ABL*, este último utilizado como controle de amplificação de todas as amostras, foi realizada em amostras de LLA ao diagnóstico. As condições de amplificação (**Tabela 1**) foram otimizadas de acordo com o conteúdo de bases guanina e citosina (conteúdo GC) de cada *primer* (descritos na **Tabela 2**). Os iniciadores de amplificação (*primers*) para *CCL2*, *IL-8*, *CXCR1*, *CXCR2* e *ABL* foram baseados em Do *et al.* (73), Wu *et al.* (74), Wu *et al.* (46), Ringe *et al.* (64) e Lion (75), respectivamente. Os *primers* para *CCR2a* e *CCR2b* foram desenhados no *software* Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>).

Tabela 1 – Protocolos de termociclagem utilizados para amplificação dos genes *IL-8*, *CCL2*, *CCR2a*, *CCR2b*, *CXCR1*, *CXCR2* e *ABL*.

Etapas	Protocolos		
	<i>CCR2a/b</i> e <i>CXCR1/2</i>	<i>CCL2 / IL-8</i>	<i>ABL</i>
Desnaturação Inicial	94°C – 60s	94°C – 60s	94°C – 30s
Desnaturação*	94°C – 30s	94°C – 30s	94°C – 30s
Anelamento*	55°C – 30s	52°C – 30s	60°C – 30s
Extensão*	72°C – 30s	72°C – 30s	72°C – 30s
Extensão Final	72°C – 7 min.	72°C – 7 min.	72°C – 7 min.

*Ciclos repetidos 33 vezes para todos os genes, exceto para *CXCR1/2* que foram repetidos por 35 vezes.

Para amplificação foram utilizados os seguintes reagentes: Taq DNA Polimerase (VJR, São Paulo, SP, Brasil) convenientemente diluída em seu tampão de reação acrescido de 2 mM MgCl₂, 10 mM dNTP's (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), *primers* específicos, cDNA diluído (1:4) e água Milli-Q tratada com DEPC para um volume final de 25µl.

Tabela 2 – Genes analisados por RT-PCR para realização das análises com células primárias de LLA.

Gene	Seqüência do <i>primer</i> (5'-3')	Tamanho do produto	
<i>CCL2</i>	GCCTCCAGCATGAAAGTCTC	F	233pb
	CAGATCTCCTTGGCCACAATG	R	
<i>IL-8</i>	CTGTGTGAAGGTGCAGTTTT	F	176pb
	CAGAGCTCTCTTCCATCAG	R	
<i>CCR2a</i>	AACTGTGAAAGCACCAGTCAA	F	248pb
	TTTCCTTTTCCACGACCATC	R	
<i>CCR2b</i>	AACTGTGAAAGCACCAGTCAA	F	174pb
	TGGACATTGTTTGCAGAAGC	R	
<i>CXCR1</i>	CCGGTGCTTCAGTTAGATCA	F	186pb
	GGCATAGGCGATGATCACAA	R	

<i>CXCR2</i>	AGGTCAGAAGTTTCATCGTCAAG	F	227pb
	AAAGCTGTCACTCTCCATGTTAA	R	
<i>ABL</i>	TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTA	F	193pb
	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA	R	

F = *forward*; R = reverso; pb = pares de bases.

Os produtos amplificados foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta, após corrida eletroforética em gel de agarose 1 ou 2%, corado com Brometo de Etídio.

3.7. Imunofenotipagem de células por citometria de fluxo

A detecção da percentagem de células que expressam o receptor de superfície CCR2 foi realizada por citometria de fluxo, com o anticorpo monoclonal para CCR2 marcado com *Phycoerythrin* - PE (R&D Systems) ou *Alexa Fluor 647* (BD Pharmingen). Noventa e três amostras de aspirado de medula óssea de pacientes com LLA ao diagnóstico foram submetidas à separação por gradiente de *Ficoll* e a três lavagens, sendo uma com PBS e duas com PBS azida. Com a concentração de células ajustada para 1×10^5 foi adicionado 10 μ l do anticorpo anti-CCR2 conjugado a PE ou Alexa. A incubação das células com o anticorpo foi realizada por 10 min. em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada uma lavagem com PBS azida para remoção do anticorpo conjugado não ligado e, então, realizada a leitura em citômetro FACSCalibur (Becton-Dickinson). Os controles utilizados foram os anticorpos de camundongo IgG_{2B} conjugados a PE (Chemicon International) ou *Alexa 647* (BD Pharmingen).

3.8. Extração de proteínas de células de LLA primária

Blastos leucêmicos de dez casos de LLA ao diagnóstico foram separados a partir do gradiente formado com *Ficoll*. Às células leucêmicas foram adicionados 500 μ l de tampão fosfato (PBS) 1x, que foram estimuladas com a adição de 1 μ l de solução de CCL2 [1 μ g/ 10 μ l] (R&D Systems) ou IL-8 [1 μ g/ 10 μ l] (Chemicon International) por incubação a 37°C por 5, 10 e 20 min. Como controle, células não estimuladas também foram incubadas durante 5 min. Após sedimentação, as células foram lisadas com tampão *RIPA-like* [50 mM Tris pH=7,7; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% *phosphatase inhibitor cocktail I* (Sigma);

1% *phosphatase inhibitor cocktail II* (Sigma); 1% *protease inhibitor cocktail* (Sigma); 1% NP40; 0,1% SDS; 0,5% deoxicolato de sódio e PBS 1x].

Nas amostras de LLA ao diagnóstico, a quantidade de células utilizadas variou de acordo com a contagem de blastos do paciente ao diagnóstico (3 a 10 milhões de células), mas manteve-se a proporção de tampão *RIPA-like* em função da quantidade de células. As amostras foram estocadas em *freezer* a -70°C para análise por western blot.

3.9. Western blot de amostras de células da LLA primária

Os ensaios de western blot foram realizados de acordo com técnicas rotineiras descritas em manual de laboratório (76). A quantificação das amostras protéicas foi estimada em curva de *Bradford* obtida por espectrofotometria a 595 nm. De cada amostra, 100 µg foram aplicadas em gel de SDS-PAGE (Acrilamida 10%) e submetidas à eletroforese 100 V, 1 hora em tampão Tris-Glicina-SDS.

Em seguida, realizou-se a transferência para membrana de nitrocelulose. Quando necessário, para verificação da eficiência de transferência, algumas membranas foram coradas por 5 min. com *Ponceau*. Seguiram bloqueio, incubação com anticorpo primário, incubação com anticorpo secundário, revelação com kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) e exposição a filme (Kodak) por tempos variáveis (30 seg. a 60 min). Os anticorpos primários utilizados, adquiridos da Cell Signaling, foram: *phospho-AKT*^(Ser473), AKT não fosforilado, *phospho-p44/42 MAP Kinase*^(Thr202/Tyr204) e *p44/42 MAP kinase* (ERK 1/2).

3.10. Medida da concentração de cálcio intracelular

A medida da concentração de cálcio intracelular foi realizada utilizando-se o indicador fluorescente de cálcio fura-2, descrito por Grynkiewicz *et al.* (77). A linhagem celular Jurkat foi centrifugada (1200 rpm por 10 min.), lavada uma vez com tampão PBS e ressuspendida em tampão KREBS sem cálcio, suplementado com Pluronic 68. As células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ com 4 µM de fura-2 por 45 min., com homogeneização delicada a cada 10 min. Após incubação, as células foram centrifugadas (1200 rpm por 10 min.) e o *pellet* de células ressuspendido em tampão KREBS sem cálcio suplementado com Pluronic 68 para concentração de 2x10⁶ células/ml. Alíquotas de 1 ml da suspensão de células foram utilizadas para estímulo e leituras. A concentração de cálcio

foi medida em fluorímetro, usando como comprimento de onda de excitação 340 e 380 nm e, comprimento de onda de emissão 510 nm. A concentração de cálcio foi calculada através da equação de Grynkiewicz *et al.* (77), como se segue: $[Ca^{2+}] = K_d (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$. Para calcular a intensidade máxima de fluorescência ($F_{max.}$) em cada amostra, uma leitura foi realizada com Triton X-100, para destruir as membranas celulares. O quelante de cálcio EGTA foi adicionado a cada amostra lisada para obtenção do nível mínimo de fluorescência ($F_{min.}$).

3.11. Co-cultura de blastos leucêmicos com células de estroma, mesenquimais ou endoteliais da medula óssea

Para os ensaios foram realizadas as etapas descritas a seguir:

3.11.1. Preparação da camada de células do estroma, mesenquimal ou endotelial: por serem aderentes, células de estroma, mesenquimais ou endoteliais foram digeridas com tripsina a 0,25% e EDTA 1 mM, e em seguida lavadas com meio RPMI-1640-10% SFB e plaqueadas a uma densidade de 3.000 células/poço em placas para 96 amostras de fundo plano, no meio específico de cada tipo celular. Os experimentos de co-cultura foram iniciados quando as células apresentaram 80 a 90% de confluência.

3.11.2. Preparação das células leucêmicas e co-cultura: células de LLA foram rapidamente descongeladas a 37°C, lavadas em meio RPMI-1640-10% SFB, avaliadas quanto à viabilidade por exclusão de *trypan blue* (solução 0,2%) e células mortas foram removidas por seleção imunomagnética (MACS, Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany), seguindo as recomendações do fabricante. Os blastos leucêmicos foram diluídos em meio AIM-V (GIBCO/Invitrogen) sem soro. O acréscimo de CCL2 (R&D Systems) foi testado nas concentrações finais de 1, 10 e 50 ng/ml e IL-8 (Chemicon International) nas concentrações de 10, 100 e 500 ng/ml. O anticorpo neutralizante anti-CCL2 (R&D Systems) e anti-IL-8 (R&D Systems) foi testado na concentração final recomendada pelo fabricante. Cada tratamento foi realizado em triplicata, tendo como controle células semeadas em co-cultivo não tratadas.

3.11.3. Contagem de células por citometria de fluxo: após a recuperação de cada amostra, por pipetagem vigorosa, e raspagem das células aderidas, as células foram transferidas para tubo de 5 mL, e dissolvidas em 500 µL de paraformaldeído a 0,5%. A contagem consistiu em determinar o número de células viáveis (delimitado por *gate*) que passaram pelo leitor em um intervalo de 30 segundos. Como controle, foi retirado o tempo 1h em triplicata de cada amostra.

3.12. Ensaio de migração celular

A quimiotaxia da população de células leucêmicas foi analisada através de ensaio de migração celular em placas de cultura tipo *transwell* (membrana de policarbonato com poros de 5-µm, Corning Life Sciences). As células de LLA foram descongeladas a 37°C, lavadas com PBS e a viabilidade analisada pela exclusão de azul de *trypan*. Células mortas foram removidas por seleção imunomagnética (Miltenyi), seguindo as recomendações do fabricante. Entre 2,5 e 3x10⁵ células foram dispensadas na câmara superior e diferentes tratamentos ou meio foram adicionados à câmara inferior, à câmara superior ou a ambas. Os controles adicionados à câmara inferior foram meio de incubação (controle negativo) ou meio adicionado de 100 ng/ml de SDF-1 (controle positivo para quimiotaxia de monócitos). As quimiocinas foram testadas nas concentrações finais de 50 ng/ml (CCL2) e 300 ng/ml (IL-8 72aa e 77aa).

As placas foram incubadas a 37°C por 2 horas e as células de LLA foram detectadas por marcação com o anticorpo monoclonal CD19, imediatamente antes e após a recuperação das células que migraram.

Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados analisados de acordo com a percentagem de células que migraram da câmara superior para a inferior (razão entre o número de células dispensadas na câmara superior e o número de células recuperadas na câmara inferior), durante o período de incubação. A comparação entre os grupos foi realizada através de 2-way Anova.

3.13. Viabilidade de células do estroma da medula óssea

Células mesenquimais e endoteliais primárias foram tripsinizadas e semeadas em placas de 96 amostras (na proporção de 3.000 células/poço) com meio MSCGM ou EGM-2-MV (Cambrex), respectivamente. Após incubação por uma noite, as células foram

lavadas com tampão PBS e cultivadas em 100 µl de meio RPMI-1640 sem soro, RPMI-1640 com 1% de soro ou RPMI-1640 com 10% de soro na presença das quimiocinas CCL2, IL-8 72aa ou IL-8 77aa nas concentrações de 50, 100 e 300 ng/ml. O número e a viabilidade de células foi estimado em diferentes tempos de incubação (2 e 4 dias) através do ensaio de MTS (Promega). Brevemente, foram adicionados 20 µl do reagente MTS [1,90 mg/ml] por amostra e a absorbância a 570/620 nm dosada em intervalos de uma hora, até o limite de 4 horas de incubação. O número de células foi calculado em comparação a uma curva padrão para cada tipo celular.

3.14. Cultura e manutenção das linhagens de células

As linhagens de LLA utilizadas no estudo foram: Nalm6 e REH (LLA-B); Jurkat, CEM e Molt-4 (LLA-T). A linhagem celular Jurkat foi gentilmente cedida pelo Dr. George C. Tsokos, do Beth Israel Deaconess Medical Center (Boston) e, a linhagem REH foi gentilmente cedida pela Dra. Leslie E. Silberstein, do Children's Hospital (Boston). As linhagens Nalm6, CEM e Molt4 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Alexandre Nowill, CIPDI/UNICAMP.

As células foram mantidas em meio RPMI-1640 (Fisher/Thermo Scientific/Cultilab) suplementado com 10% SFB e 50 U/ml penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina (GIBCO). A contagem de células e a troca de meio foram realizadas a cada dois dias. As células adicionais aos experimentos foram criopreservadas em alíquotas de 1 a 2×10^7 /célula em 90% SFB acrescido de 10% DMSO.

Outras linhagens de células utilizadas no estudo foram: 786-O (câncer renal), A498 (câncer renal) e DU-145 (câncer de próstata). Os meios de cultura utilizados para estas linhagens foram DMEM (Thermo Scientific) suplementado com 10% SFB e 50 U/ml penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina (GIBCO) para 786-O; e MEM (Thermo Scientific) suplementado com 10% SFB e 50 U/ml penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina (GIBCO) para A498 e DU-145. A sub-cultura foi realizada através de digestão com tripsina a 0,25% e EDTA 1 mM. Todas as células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂.

3.15. Avaliação do SB225002, antagonista do receptor CXCR2 da IL-8

Uma molécula antagonista do CXCR2, conhecida por SB225002 (N-(2-hydroxy-4-nitrophenyl)-N'-(2-bromophenyl)urea), foi sintetizada segundo o método descrito por

White *et al.* (78) pelos nossos colaboradores Dr. Paulo C. Leal, Dr. Ricardo J. Nunes e Dr. Rosendo A. Yunes, do Depto. de Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Em alguns momentos o SB225002 foi adquirido comercialmente (Calbiochem). Além da síntese do SB225002, moléculas análogas foram sintetizadas de acordo com procedimento de Topliss (**Figura 2**). Tais análogos foram testados pelo grupo do Dr. João B. Calixto (UFSC) em modelo animal de inflamação e dois dos análogos que mostraram alguma atividade antiinflamatória (comunicação pessoal) foram escolhidos para testes contra a leucemia, a saber, o 4-Bromo e o 3,4-Cloro. O resultado de análise de RMN da molécula de SB225002 sintetizada, demonstrando o sucesso da síntese e a pureza do produto obtido encontra-se no **Anexo II**.

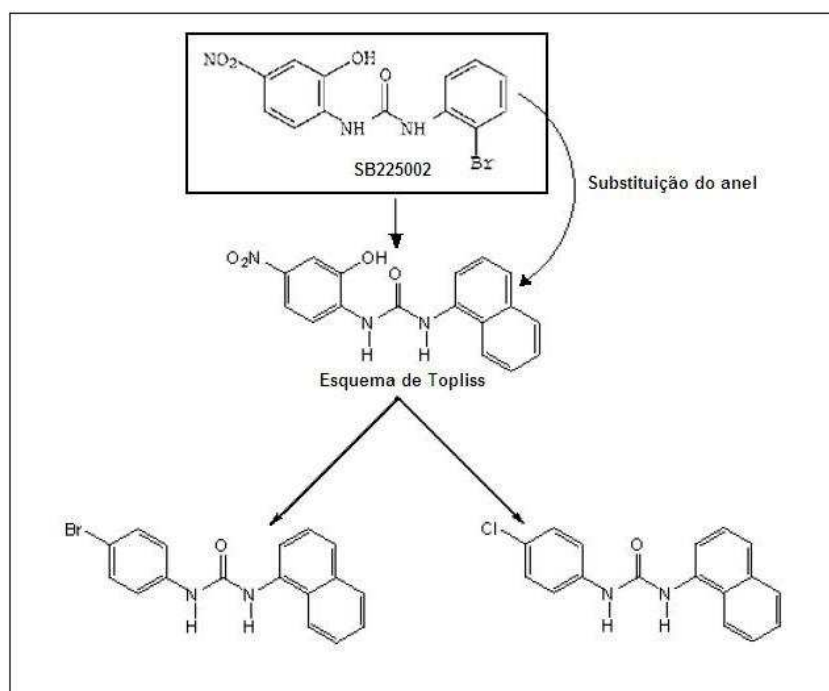


Figura 2 – SB225002 e estratégia de síntese dos análogos 4-Bromo e o 3,4-Cloro seguindo método de Topliss. Trabalho feito por colaboradores do Depto. de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (Dr. Paulo C. Leal, Dr. Ricardo J. Nunes e Dr. Rosendo A. Yunes).

As linhagens de células de LLA foram contadas em câmara de *neubauer*, ressuspensas em meio RPMI 1640 - 10% SFB - 0,2% penicilina/streptomicina e distribuídas em placas de 96 amostras de fundo chato, na densidade de 30.000 células/poço.

O SB225002 foi testado nas concentrações de 1 a 100 μM e os análogos 4-Bromo e 3,4-Cloro foram testados nas concentrações 1, 10 e 100 μM . A IL-8 (Chemicon International) foi testada nas linhagens de LLA-T nas concentrações de 10 e 100 ng/ml e a histamina foi testada nas concentrações de 10 e 100 μM . As moléculas AM251 (Sigma) e AM630 (Tocris), antagonistas dos receptores CNR1 e CNR2, respectivamente, foram testados nas concentrações 10, 20, 30 e 50 μM para o AM251 e, 1, 2,5 e 5 μM para o AM630. Os inibidores da via de NF κ B (Calbiochem) testados foram Wedelolactone (10 e 20 μM) e 6-Amino-4-(4-phenoxyphenylethylamino) quinazoline (11 e 20 nM). Os inibidores de MEK-ERK testados foram PD98059 (5 e 10 μM , Cell Signaling), U0126 (10 e 20 μM , Cell Signaling) e 3-(2-Aminoethyl)-5-((4-ethoxyphenyl)methylene)-2,4-thiazolidinedione (25 e 50 μM , Calbiochem). Todas as incubações foram realizadas por 48 horas a 37°C e 5% de CO₂.

3.15.1. Ensaios de proliferação: foi adicionado a cada amostra 20 μl do reagente MTT (5mg/ml, Sigma) ou MTS (1,90 mg/ml, Promega), sendo a placa incubada por 4,5 h e 4h a 37°C, respectivamente. Para o MTS, como o composto formado é solúvel em meio de cultura, após a incubação foi feita a leitura da placa a 570 nm com referência 620 nm. Para o MTT, foi adicionado a cada amostra 100 μl de SDS 10%-0,01 M HCl e a placa incubada por uma noite a 37°C. A leitura da placa foi realizada, após esta incubação, a 570 nm sem referência.

3.15.2. Ensaio de ciclo celular: células Jurkat foram tratadas com SB225002 [20 μM] ou DMSO por 6, 9 e 24 horas como descrito no item 3.14. Após o período de incubação, as células foram lavadas com tampão PBS, fixadas em etanol 70% e estocadas a -20°C até o dia seguinte. As células foram então lavadas duas vezes em tampão PBS e, marcadas com 1 ml de solução de iodeto de propídeo [3,8 mM de citrato de sódio; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de iodeto de propídeo (Sigma) em PBS] suplementado com 50 μl de RNase A [10 $\mu\text{g}/\text{ml}$] por 3 horas a 4°C. A análise foi realizada em citômetro de fluxo FACScan cell sorter (Becton Dickinson) com a aquisição de 1×10^4 células por tratamento. O perfil de ciclo celular foi calculado através do *software* FCS Express (versão 3.0, De Novo Software).

3.16. Quantificação de IL-8 por ELISA em amostras de meio de cultura

Amostras de meio de cultivo de células Jurkat tratadas com SB225002 nas concentrações finais de 20 μ M e 100 μ M, ou veículo (DMSO) por 6h, 9h, 24h e 48h foram utilizadas para quantificação dos níveis de IL-8 através de ensaio de ELISA (kit Human IL-8, BioLegend), seguindo as recomendações do fabricante.

3.17. Análise da expressão gênica (microarranjos de DNA) de linhagem de LLA tratada com SB225002

Células Jurkat foram tratadas em duplicata com 20 μ M de SB225002 ou veículo (DMSO), durante 6h e 9h, em meio RPMI-1640 com 10% de SFB. O RNA total foi extraído utilizando-se os kits QIAshredder (Qiagen) e RNeasy Mini Kit (Qiagen), quantificado em NanoDrop (Thermo Scientific) e verificado quanto à integridade em gel de agarose a 1%.

O RNA complementar biotilado (Bio-cRNA) foi preparado na Affymetrix GeneChip Array Station usando os kits GeneChip HT One-Cycle cDNA Synthesis e GeneChip HT IVT Labeling (Affymetrix). Os cRNAs biotilados foram hibridizados aos chips HG-U133A24 e HG-U133B24 (Affymetrix). Foram hibridizadas um total de 8 amostras, sendo elas: Jurkat tratada com 20 μ M de SB225002 incubada por 6h e 9h e, Jurkat tratada com 20 μ M de veículo incubada por 6h e 9h. Todos os tratamentos foram realizados em duplicata. As lavagens e a hibridização dos microarranjos foram efetuadas com a GeneChip Array Station seguindo protocolo robótico, de acordo com as instruções do fabricante (Affymetrix). Os microarranjos foram digitalizados no GeneChip HT scanner (Affymetrix). As imagens digitalizadas foram examinadas visualmente para detecção de possíveis defeitos do *chip* ou artefatos na hibridização e então analisadas com o *software* Affymetrix GeneChip Microarray Analysis Suite 5.0 - MAS5 (Affymetrix). Os microarranjos com alta qualidade de imagem foram analisados através do algoritmo Probe Logarithmic Intensity Error (PLIER). Quando dois grupos de amostras foram comparados para identificação de genes enriquecidos (hiper ou hipo expressos) em determinado fenótipo, se 90% do menor intervalo de confiança de ligação (LCB) do *fold change* entre os dois grupos foi acima de 1,2, o gene correspondente foi considerado diferencialmente expresso.

Além disso, para compreensão dos mecanismos biológicos afetados pelos transcritos que foram hipo ou hiper regulados pelo tratamento com SB225002, foram realizadas análises funcionais *in silico* e de vias de sinalização no *software* Ingenuity Pathways Analysis (IPA 4.0) (www.ingenuity.com). Os experimentos de microarranjos das células Jurkat tratadas com SB225002 foram realizados no Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston/MA, sob a co-orientação do Dr. Luiz Zerbini e em colaboração com o Dr. Towia Libermann.

3.18. Amplificação quantitativa (RQ-PCR)

Amostras de linhagens de LLA foram quantificadas em termociclador LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science). Em um volume final de 25 µl por reação, adicionaram-se os seguintes reagentes, para as concentrações finais citadas: tampão de reação [10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl e 2 mM MgCl₂], 250 µM dNTP (Roche), 5 pmol de cada *primer* (**Tabela 3**), 0,5X SYBR Green I (Molecular Probes) e 1U Taq DNA polymerase (Promega) com 2 µl cDNA [0,1 µg]. Os ciclos de termociclagem consistiram de desnaturação inicial a 95°C por 3 min.; seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 seg., anelamento a 56°C por 30 seg., e extensão a 72°C por 1 min. Foi adicionado um ciclo de curva de *melting* a 95°C por 15 seg., 65°C por 2 min., 97°C contínuo e etapa final de refrigeração a 10°C por 30 seg. A curva de *melting* foi utilizada para análise da especificidade da amplificação e o gene *GAPDH* ou *ABL* amplificado como controle endógeno para normalização das amostras. Para cada corrida, diluições seriadas de DNA plasmidial do gene *GAPDH* foram utilizadas como padrões para construção de curva padrão e estimativa do número de transcritos de cada gene. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os dados apresentados como a razão gene/*GAPDH*. Para as amostras amplificadas com o gene *ABL* como controle endógeno, a estimativa do número de transcritos foi realizada através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (79, 80).

Tabela 3 – Genes analisados por RQ-PCR para realização das análises com linhagens de células da LLA.

Gene	Seqüência do <i>primer</i> (5'-3')		Tamanho do produto
<i>CXCR2</i>	AGGTCAGAAAGTTTCATCGTCAAG	F	227pb
	AAAGCTGTCACTCTCCATGTAA	R	
<i>CX3CR1</i>	GACGGTTGCATTTAGCCATT	F	182pb
	TGCTCAGAACACTTCCATGC	R	
<i>GLIPR1</i>	AGCTGCACCCAAACTTCACT	F	173pb
	ATCTGCCCAAACAACCTGAG	R	
<i>BACH2</i>	GAAAACGATGCTGCCATTTT	F	199pb
	TTGGTGCACACTTCTGCTTC	R	
<i>JUN</i>	CCCCAAGATCCTGAAACAGA	F	168pb
	CCGTTGCTGGACTGGATTAT	R	
<i>HCRT1</i>	CGATGCTCCATCTCCAAAAT	F	159pb
	GACTGAAGCCACAGCCTTTC	R	
<i>MC4R</i>	CCAGTGAGTCCCTTGGA AAA	F	216pb
	ATCCATTTGAAACGCTCACC	R	
<i>MCHR1</i>	AGCCCAGTTTGCTAGGAGGT	F	208pb
	ACACCGGGCACTAGAAATGAC	R	
<i>CCR8</i>	GTGGCCTCTGAAGATGGTGT	F	188pb
	GCCTTGGTCTTGTTGTGGTT	R	
<i>CNR1</i>	AAGACCCTGGTCCTGATCCT	F	188pb
	CGCAGGTCCTTACTCCTCAG	R	
<i>HTR1B</i>	GTGATTGCCACAGTGTACCG	F	171pb
	CAGCCAGAAGTCACAGACCA	R	
<i>HRH1</i>	CACACTGAACCCCCTCATCT	F	151pb
	GGCCTTCGTCCTCTATTTCC	R	
<i>HRH2</i>	AGGAACGAGACCAGCAAGGGCAAT	F	198pb
	GGTGGCTGCCTTCCAGGAGCTAAT	R	

HRH3	ATGGTGTCCCAGAGCTTCAC	F	188pb
	AGGAGCCAGAAGGAGGTTTC	R	
HRH4	GACAAAAACCTTAGACATCGAAG	F	164pb
	AACAGATAGTCAGTAGTGAGCCA	R	
IL-1	GGGCCTCAAGGAAAAGAATC	F	205pb
	TTCTGCTTGAGAGGTGCTGA	R	
CX3CL1	GACCCCTAAGGCTGAGGAAC	F	205pb
	CTCTCCTGCCATCTTTCGAG	R	
TNF	TCCTTCAGACACCCTCAACC	F	173pb
	AGGCCCCAGTTTGAATTCTT	R	
GAPDH	CCATGGAGAAGGCTGGGG	F	377pb
	CAAAGTTGTCATGGATGACC	R	
ABL	TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTA	F	193pb
	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA	R	

F = *forward*; R = *reverso*; pb = pares de bases.

3.19. Extração de proteínas e western blot de linhagem de LLA tratada com SB225002

Lisado de células totais de amostras de Jurkat tratada com SB225002 [20 µM] ou veículo (DMSO) por 3h, 6h, 9h e 12h foram preparados com tampão de lise (Cell Signaling) suplementado com inibidor de fosfatase e protease (Roche). Um controle de células não estimuladas também foi realizado. Foram utilizadas de 1 a 2×10^7 /célula por tratamento. Seguiu-se eletroforese em gel de SDS-PAGE (10% acrilamida, Bio-Rad) de amostras contendo de 100 a 300 µg de proteína e, após corrida, realizou-se a transferência para membrana de PVDF (Millipore) em tampão 50 mM Tris-base, 20% metanol e 40 mM glicina. As membranas foram incubadas em tampão PBST (fosfato 100 mM, KCl 27 mM, NaCl 1,37 M, pH 7,4 após diluição 1X; 0,2% Tween-20) suplementado com 5% de leite sem gordura (Sigma) por 1 hora. As membranas foram incubadas com anticorpo primário por uma noite a 4°C em PBST com 2% BSA e, posteriormente, incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (Cell Signaling). A detecção foi realizada com o kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce/Thermo Scientific) e visualizada através de autoradiografia após exposição de 30 seg. a 30 min. Os anticorpos

primários utilizados, adquiridos das empresas Santa Cruz Biotechnology, Novus Biologicals e Cell Signaling, foram: *phospho*-p44/42 MAPK (ERK1/2), p44/42 MAPK (ERK1/2), *phospho*-MEK1/2 e MEK1/2, anti-GLIPR1, CX3CR1, CNR1, CNR2 e β -actin.

3.20. Ensaios de quinase

O ensaio de quinase para MAPK p44/42 foi realizado utilizando a proteína de fusão Elk-1 como substrato da quinase. Amostras de Jurkat (500 μ g de lisado celular) tratadas com SB225002 [20 μ M] ou veículo (DMSO) por 3h, 6h, 9h e 12h, foram recuperadas por imunoprecipitação usando 15 μ l de *phospho*-p44/42 MAPK imobilizado em microesferas (Cell Signaling) por uma noite a 4°C. As microesferas foram lavadas duas vezes com tampão de lise e duas vezes com tampão de quinase (25 mM Tris (pH 7,5), 5 mM β -Glicerolfosfato, 2 mM DTT, 0,11 mM Na_3VO_4 , 10 mM MgCl_2). Em seguida, as microesferas foram ressuspensas em 50 μ l de tampão de quinase suplementado com 200 μ M ATP e 1 μ l da proteína de fusão Elk-1 (substrato da quinase) e incubado por 30 minutos a 30°C. As reações foram interrompidas com a adição de 25 μ l de tampão de amostra SDS-3X e as proteínas submetidas a eletroforese em gel de SDS-PAGE (10% acrilamida, Bio-Rad). O anticorpo primário utilizado foi *phospho*-Elk-1^{Ser383} (Cell Signaling). A atividade quinase é correlacionada diretamente com aumento da fosforilação de Elk (Ser383).

A atividade quinase de JNK/SAPK e MAPK p38 foi dosada utilizando os kits SAPK/JNK assay e p38 MAP kinase assay (Cell Signaling), de acordo com as instruções do fabricante.

3.21. Silenciamento gênico através de vetor lentiviral

Os vetores lentivirais contendo seqüências de shRNA contra o gene *GLIPR1* foram adquiridos da Sigma-Aldrich (**Tabela 4**). O controle lentivíral contendo seqüência de shRNA GFP foi gentilmente doado pelo Dr. Oded Singer (Salk Institute). A validação do silenciamento foi realizada por RQ-PCR (*primers* descritos anteriormente no item 3.18). Com a inibição do gene *GLIPR1* confirmada, a linhagem infectada foi testada quanto à resistência a diferentes doses de SB225002 pelo método do MTT (procedimentos de cultura e ensaio de viabilidade descrito anteriormente nos itens 3.15 e 3.15.1, respectivamente). Células adicionais aos experimentos foram criopreservadas.

Tabela 4 – Sequências de shRNA contra o gene *GLIPR1* (Sigma-Aldrich, SHCLNV-NM_006851).

Gene	Número da Sequência	Sequência de shRNA	Eficiência TU/ml* (x10 ⁶)
<i>GLIPR1</i>	75	CCGGCTCTTTCCAATGGAGCACATTCTCG	3,9
		AGAATGTGCTCCATTGGAAAGAGTTTTTG	
	76	CCGGCGTTTCGAATCCATAACAAGTTCTCG	9,7
		AGAACTTGTTATGGATTCTGAACGTTTTTG	

*TU/ml = titulação funcional do vetor lentivíral. Eficiência calculada através de ensaio de ELISA para o antígeno p24 (~2000 moléculas de p24 por partícula física de lentivírus).

4. RESULTADOS

4.1. Efeito de diferentes células de suporte na proliferação da LLA primária

Células de LLA primária entram em apoptose rapidamente quando colocadas em cultura, havendo morte de todas as células em 2 a 4 dias (**Figura 3**). A sobrevivência, e em alguns casos a proliferação, da LLA em cultura, pode ser alcançada se cultivada com uma camada de células de estroma da medula óssea. O método de co-cultura de LLA sobre camada de estroma, segundo estabelecido por Manabe *et al.* (81) faz uso de meio AIM-V (Invitrogen), meio sem soro com formulação de base igual ao DMEM.

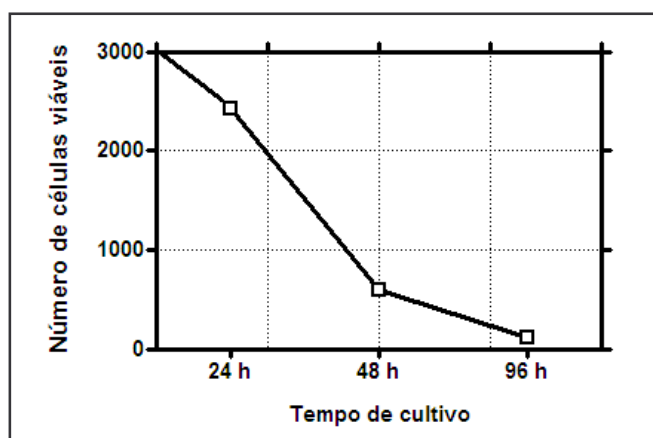


Figura 3 – Células de leucemia primária em cultura com meio AIM-V (37°C; 5% CO₂).

Inicialmente foi comparada a sobrevivência e proliferação de células primárias da LLA em sistema de co-cultura nas três camadas de células de “suporte” da medula óssea: (i) células de estroma, que na sua grande maioria são fibroblastos da medula óssea (82), (ii) células mesenquimais da medula óssea, e (iii) células endoteliais da medula óssea (**Figura 4**). Foi possível concluir que as células de LLA sobrevivem melhor em contato com a camada de células mesenquimais ou endoteliais do que em contato com células de estroma ($p=0,013$, 2-way Anova). Deste modo, os ensaios de co-cultura subsequentes foram realizados com células mesenquimais ou endoteliais.

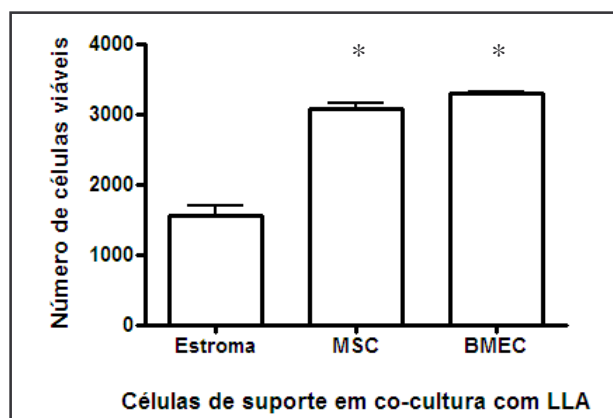


Figura 4 – Efeito de diferentes células de suporte na sobrevivência de células de leucemia linfóide aguda primária após 48 horas de co-cultura a 37°C; 5% CO₂. MSC = células mesenquimais da medula óssea; BMEC = células endoteliais da medula óssea. *p = 0,013 (2-way Anova).

4.2. A LLA induz alta expressão de quimiocinas no microambiente da medula óssea

O efeito da leucemia nas células mesenquimais da medula óssea (MSC) foi investigado através do ensaio *in vitro* de co-cultura das MSC com células primárias de LLA, seguido da análise de genes diferencialmente expressos por microrranjos de DNA. Estratégia idêntica foi utilizada com sucesso, por exemplo, para a identificação de genes implicados na interação de células tronco hematopoéticas normais (83) e células de câncer de pulmão (84), com as células dos seus respectivos microambientes.

Análises funcionais dos dados de microarranjos mostraram a ativação significativa 94 genes nas MSC cultivadas com a LLA (**Anexo III**), genes estes que fazem parte de 12 vias de sinalização intracelular (**Figura 5A**). A via de sinalização do NFκB foi a via mais ativada após o estímulo. Além disso, foi possível identificar vários agrupamentos de genes modulados significativamente devido ao contato das MSC com a LLA. Entre os agrupamentos de genes significativos (**Figura 5B**), chamou a atenção o grupo de genes envolvidos na resposta inflamatória, que apresentou vários fatores secretados e solúveis superexpressos (**Tabela 5**), que poderiam beneficiar as células leucêmicas no microambiente tumoral.

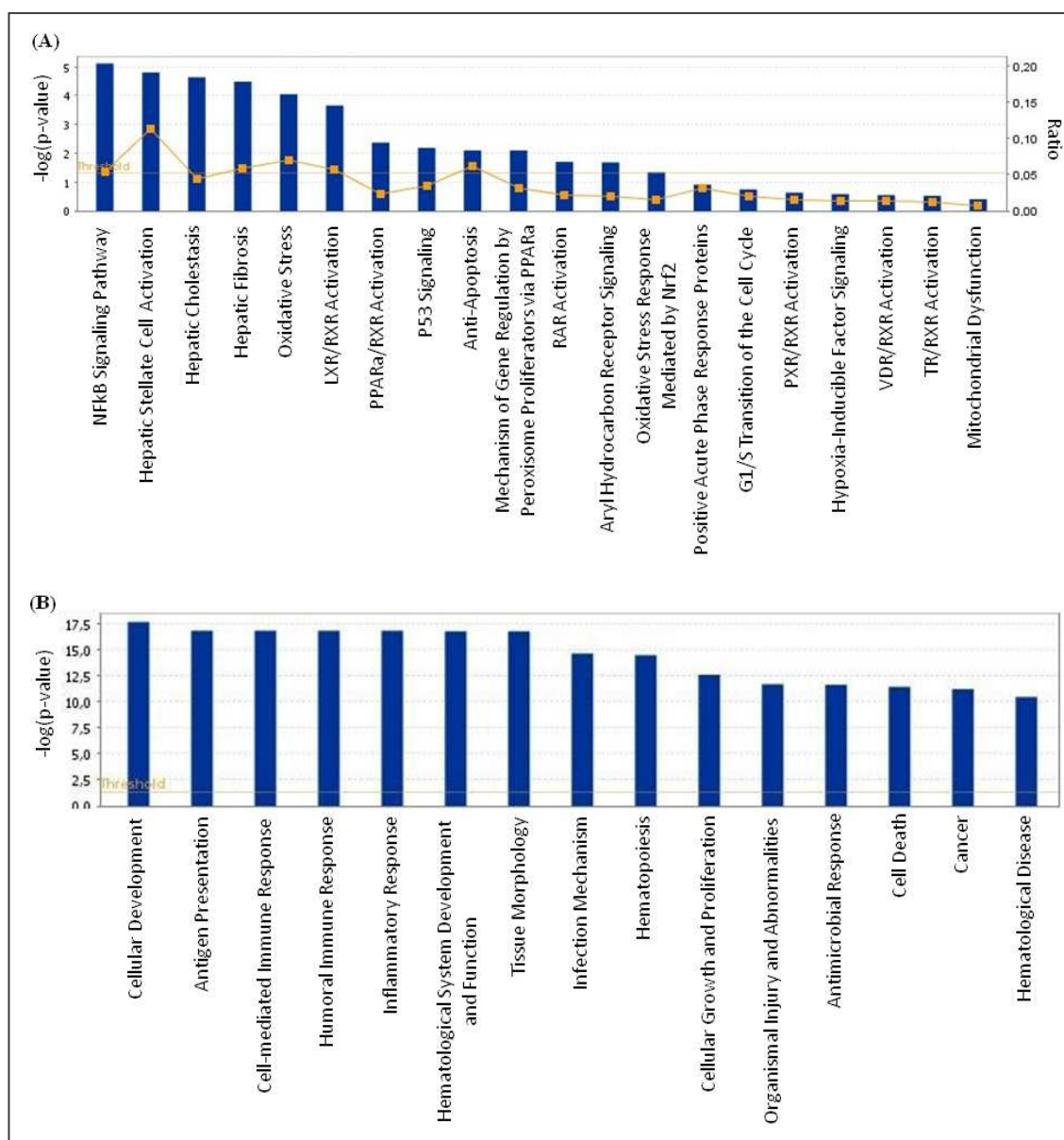


Figura 5 – (A) Vias de sinalização e (B) agrupamentos de genes identificados em células mesenquimais da medula óssea após contato com células da LLA. Em (A) doze vias de sinalização demonstraram alterações significativas e, os quinze agrupamentos de genes mais significativos estão demonstrados em (B). O threshold estatístico (linha laranja sem quadrados) representa o ponto de corte para significância na escala log (eixo y, lado esquerdo). A razão (linha laranja com quadrados) do número de genes significativos de um grupo de dados relacionado a uma via de sinalização dividida pelo número total de genes da via de sinalização também é demonstrado (eixo y, lado direito). As análises foram realizadas no software Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems).

Tabela 5 – Lista de genes secretados diferencialmente expressos nas células mesenquimais da medula óssea em co-cultura com células da leucemia linfóide aguda.

Identificação da sonda	Símbolo do Gene	Nome do Gene	FC	Regulação
204533_at	<i>CXCL10</i>	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 10</i>	12.80	ativado
216598_s_at	<i>CCL2</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>	9.12	ativado
202859_x_at	<i>IL8</i>	<i>interleukin 8</i>	5.88	ativado
223501_at	<i>TNFSF13B</i>	<i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b, soluble form</i>	3.34	ativado
214038_at	<i>CCL8</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 8</i>	2.84	ativado
205207_at	<i>IL6</i>	<i>interleukin 6 (interferon, beta 2)</i>	2.61	ativado
211122_s_at	<i>CXCL11</i>	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 11</i>	2.43	ativado
209774_x_at	<i>CXCL2</i>	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 2</i>	2.40	ativado
205483_s_at	<i>ISG15</i>	<i>ISG15 ubiquitin-like modifier</i>	2.16	ativado

A análise foi realizada no *software* GeneSpring (Stratagene) e o ponto de corte foi ≥ 2.0 ou < 2.0 . A localização sub-celular de cada gene foi identificada através do banco de dados UnitProt Knowledgebase (<http://www.uniprot.org>). FC = *fold change* (coeficiente de variação).

Dentre os genes secretados diferencialmente expressos demonstrados na **Tabela 5**, *CXCL10*, *CCL2*, *IL-8*, *TNFSF13B* e *CCL8* são genes do agrupamento de resposta inflamatória e constituíam os cinco fatores solúveis mais expressos.

CCL2 e *CCL8* estão agrupados em um conjunto de genes que atuam na quimiotaxia de monócitos, células T ativadas e células dendríticas. Neste estudo, *CCL2* apresentou-se superexpresso quando comparado a *CCL8* (diferença de 6,2 entre os valores de *fold change*). Embora ambas as quimiocinas apresentem funções semelhantes, o fato de *CCL2* estar superexpresso foi intrigante e conduziu à hipótese de que desempenharia um papel no contexto do microambiente leucêmico. *TNFSF13B* já foi descrito como hiper expresso em neoplasias hematológicas e associado a prognóstico adverso (85). *CXCL10* é o ligante do receptor CXCR3. Ainda é controverso se CXCR3 é expresso por blastos na LLA (31, 32). Wong e Fulcher (32) relataram uma grande variabilidade na expressão de CXCR3 em amostras de LLA e mesmo em amostras frescas de controles normais, e consideraram seu

método por citometria de fluxo não confiável para análise conclusiva dos resultados. Devido à possibilidade de limitações metodológicas para ensaios *in vitro* com o receptor CXCR3 e, ao papel importante demonstrado pela IL-8 na resposta inflamatória, foi escolhido conduzir os experimentos funcionais com a quimiocina IL-8, cujos receptores já haviam sido descritos anteriormente na LLA (31, 46) e foram confirmados neste estudo.

4.3. O microambiente da medula leucêmica é rico em CCL2 e IL-8

A quantificação de CCL2 e IL-8 solúvel foi realizada em plasma de amostras de medula óssea de pacientes com LLA ao diagnóstico através da técnica de ELISA (**Figura 6**). Para CCL2 foram analisadas amostras de 163 pacientes e 20 controles normais com mediana de 490,5 pg/ml (extremos de 25,4 - 2684,8) e 168,3 pg/ml (23,1 - 701,4), respectivamente. A diferença encontrada entre os grupos de pacientes e controles foi estatisticamente significativa através do teste de Mann-Whitney ($p = 0,00001$). Não foram encontradas diferenças significativas entre os valores de CCL2 e variáveis clínicas e biológicas ao diagnóstico (**Tabela 6**, pacientes tratados no protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil - GBTLI-99, com dados de seguimento disponíveis).

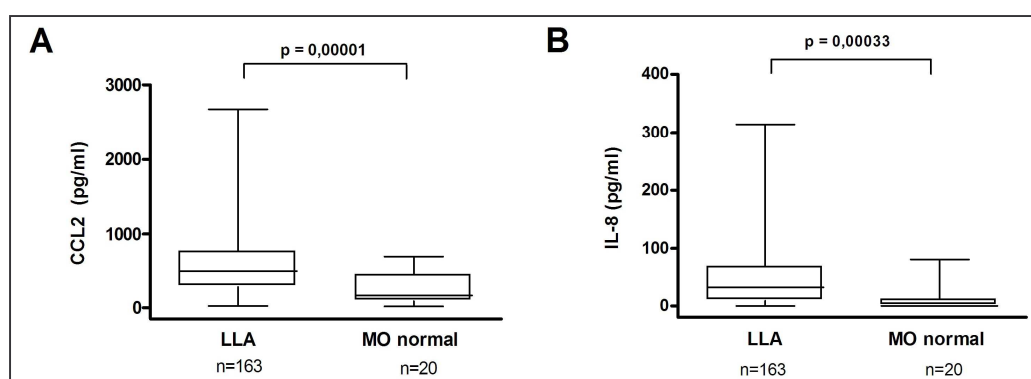


Figura 6 – Níveis das proteínas (A) CCL2 e (B) IL-8 no plasma de amostras de leucemia linfóide aguda (n = 163) ao diagnóstico comparado a amostras de controles normais (n = 20). Valores de p foram calculados através do teste exato de Fisher ($\alpha = 5\%$).

Para a IL-8, foram analisadas 163 amostras com mediana de 31,6 pg/ml (extremos de 0 a 314,2) e 20 controles normais com mediana de 0 pg/ml (extremos de 0 a 79,1). A diferença encontrada entre os grupos de pacientes e controles foi estatisticamente

significativa através do teste de Mann-Whitney ($p = 0,00033$). Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre os níveis plasmáticos da IL-8 e as variáveis clínicas e biológicas ao diagnóstico (**Tabela 6**).

Tabela 6 – Característica clínicas e biológicas associadas com os níveis de CCL2 e IL-8 em amostras de plasma de pacientes com leucemia linfóide aguda ao diagnóstico.

Variável	Estratificação	Mediana CCL2 (pg/ml)	p*	Mediana IL-8 (pg/ml)	p*
Idade (n = 106)	<1 ano (n = 02)	699,40	0,614	116,75	0,184
	≥1 a < 9 anos (n = 73)	530,23		29,80	
	≥9 anos (n = 31)	735,85		19,78	
Sexo (n = 107)	Masculino (n = 59)	691,29	0,721	31,48	0,965
	Feminino (n = 48)	561,03		28,07	
Leucometria (n = 107)	<10.000/mm ³ (n = 33)	688,81	0,546	38,11	0,330
	≥10.000/mm ³ a <50.000/mm ³ (n = 38)	540,65		31,85	
	≥50.000/mm ³ a <100.000/mm ³ (n = 20)	688,24		23,67	
	>100.000/mm ³ (n = 16)	500,66		11,93	
Infiltração de SNC (n = 101)	Positiva (n = 03)	323,67	0,065	44,29	0,400
	Negativa (n = 98)	638,52		29,46	
Imumofenó- tipo (n = 105)	Pré-B/comum (n = 92)	599,94	0,640	35,34	0,039
	LLA-T (n = 13)	728,68		9,91	
Evento desfavorável (n = 106)	Sim (n = 19)	622,09	0,963	38,11	0,333
	Não (n = 87)	564,94		29,80	

*Testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis foram utilizados nas análises estatísticas. Pacientes tratados no protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil - GBTLI-99.

Estes resultados mostram que o microambiente da medula óssea leucêmico apresenta níveis mais elevados de CCL2 e IL-8 quando comparado à medula normal. Tanto as células leucêmicas quanto as do estroma da medula óssea podem contribuir para os níveis de CCL2 e IL-8.

4.4. Valor prognóstico dos níveis de CCL2 e IL-8 no plasma da medula óssea leucêmica

Foram analisados em 105 pacientes com LLA consecutivos, tratados no Centro Infantil Boldrini com o protocolo GBTLI-99. Para as análises de associação dos valores de CCL2 e IL-8 com a sobrevida global (SG) e a sobrevida em remissão clínica completa (SRCC) foram utilizados como ponto de corte entre os grupos o valor mediano de CCL2 (490,5 pg/ml) ou IL-8 (31,6 pg/ml). Não foram encontradas associações estatisticamente significativas.

Quando considerados apenas os pacientes do grupo de baixo risco (n = 52) a mediana de CCL2 foi de 577,79 pg/ml. Utilizando este valor mediano como ponto de corte para estratificação de pacientes dentro do grupo de baixo risco, foi observado que pacientes com níveis de CCL2 abaixo da mediana tiveram uma tendência a melhor taxa de sobrevida se comparados àqueles com níveis de CCL2 acima da mediana (p = 0,08, teste de LogRank, **Figura 7**). O período de seguimento mediano dos pacientes vivos foi de 1,7 anos. Estudos adicionais com um maior número de pacientes são necessários para confirmar esta descoberta.

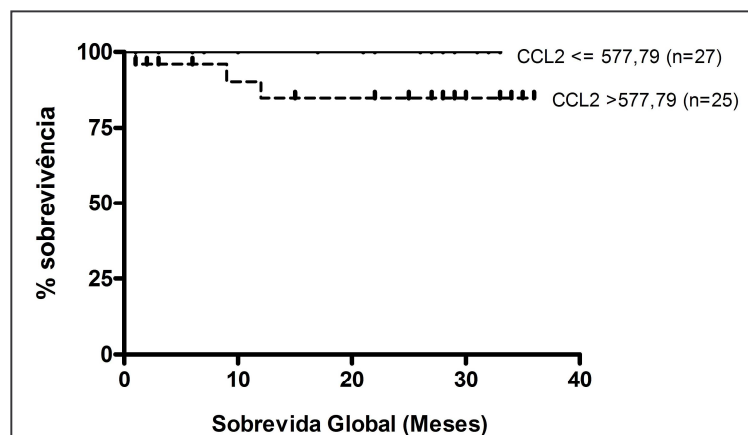


Figura 7 – Sobrevida Global de pacientes com baixo risco (critério do protocolo GBTLI-99), agrupados quanto à mediana de expressão do CCL2 do grupo de baixo risco (577,79 pg/ml), com tendência estatisticamente significativa ($p = 0,08$, teste de LogRank).

4.5. LLA primária expressa os receptores das quimiocinas CCL2 e IL-8

Para investigar se as células da LLA poderiam se beneficiar diretamente dos elevados níveis de CCL2 e IL-8 do microambiente da medula óssea, foi analisada a expressão dos receptores destas quimiocinas em células primárias de LLA ao diagnóstico. *CCR2a* e *CCR2b*, ambos receptores de CCL2, foram detectados por RT-PCR em 10 (10,4%) e 64 (66,6%) de 96 casos, respectivamente (**Figura 8**). Além disso, a análise por citometria de fluxo em 93 casos de LLA ao diagnóstico demonstrou uma positividade fraca deste receptor na maioria dos casos analisados (**Figura 9**).

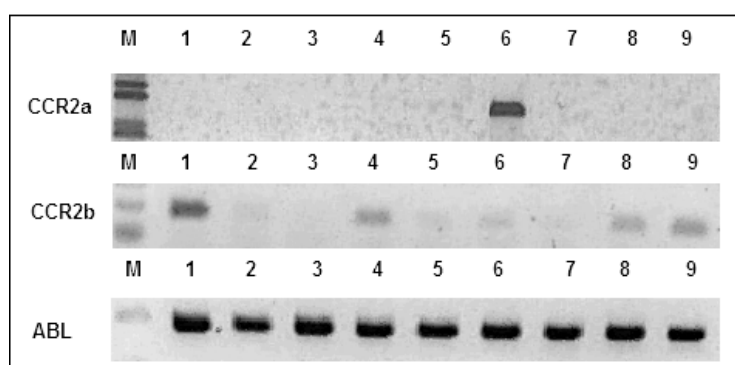


Figura 8 – Detecção de *CCR2a/b* e *ABL* (controle endógeno) por RT-PCR em amostras ($n = 09$) de LLA ao diagnóstico.

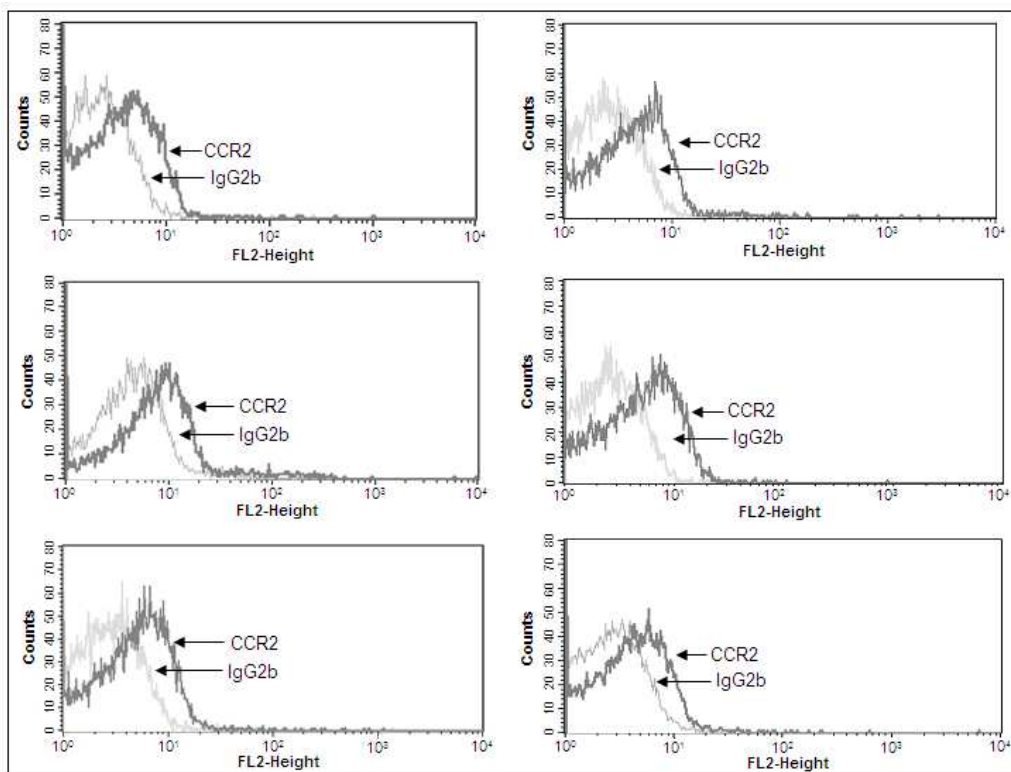


Figura 9 – Análise por citometria de fluxo do receptor CCR2 em seis pacientes com LLA ao diagnóstico. A expressão de CCR2 foi analisado com anticorpo monoclonal conjugado a PE e IgG2B-PE foi utilizado como controle isotípico. Lado esquerdo: LLA-B; Lado direito: LLA-T.

Em concordância com dados anteriormente publicados (34, 46), transcritos para os receptores da IL-8 (*CXCR1* e *CXCR2*) foram detectados em 40 (80%) e 38 (76%) de 50 casos, respectivamente (**Figura 10**). Além disso, Corcione *et al.* (31) detectou a expressão de *CXCR1/2* na LLA-B por citometria de fluxo.

Não foram encontradas associações significativas entre os transcritos de *CCR2a/b* ou *CXCR1/2* e características clínicas ou biológicas dos pacientes com LLA ao diagnóstico.

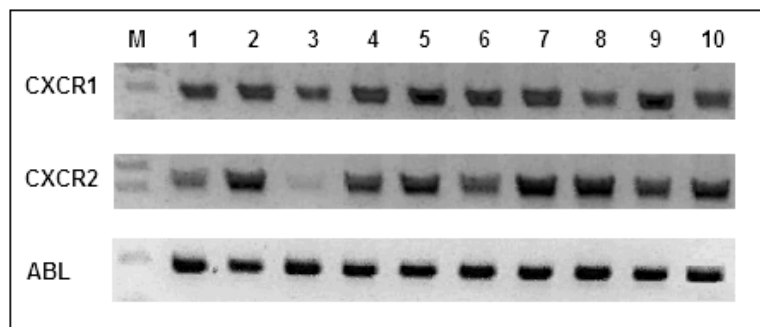


Figura 10 – Detecção de *CXCR1/2* e *ABL* (controle endógeno) por RT-PCR em amostras (n = 10) de LLA ao diagnóstico.

4.6. CCL2 e IL-8 não exercem efeito direto na LLA primária

Dada a expressão dos receptores *CCR2a/b* e *CXCR1/2* pelas células primárias de LLA foi investigado se estas quimiocinas exerceriam efeito direto na sobrevivência, proliferação, migração ou ativação de cascatas de sinalização na LLA.

Inicialmente, cultivos *in vitro* de células primárias de nove pacientes com LLA-B em sistema de co-cultura com células mesenquimais da medula óssea foram realizados em meio AIM-V suplementado ou não com diferentes concentrações de CCL2, IL-8 ou anticorpos neutralizantes de ambas as quimiocinas. Após 2 e 5 dias de incubação o número de células viáveis foi analisado por citometria de fluxo. Nenhuma diferença significativa foi detectada como resultado dos tratamentos em relação aos controles (**Figuras 11 e 12**).

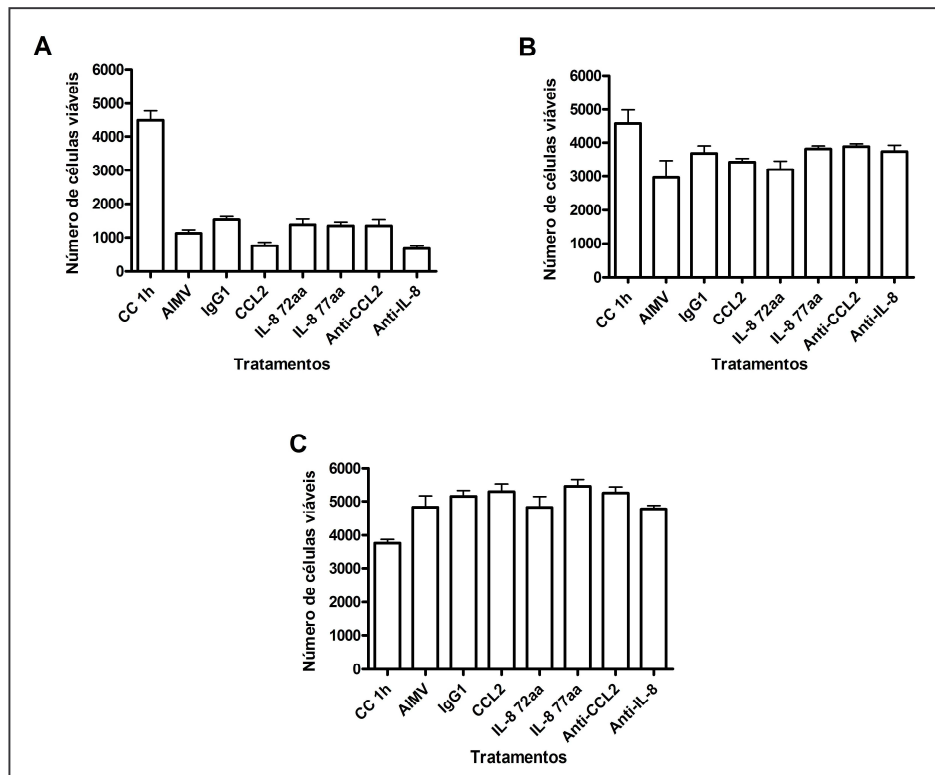


Figura 11 – Recuperação de células viáveis de três pacientes com LLA após 48 horas em co-cultura com células mesenquimais em meio acrescido de quimiocinas (50 ng/ml de CCL2 ou 500 ng/ml de IL-8 72 ou 77 aa) ou anticorpos neutralizantes (500 µg/ml). O número de células viáveis foi medido por citometria de fluxo. CC 1h = células em co-cultura incubadas sem tratamento por 1h; AIMV = células controle incubadas sem tratamento por 48 horas; IgG1 = controle isotípico.

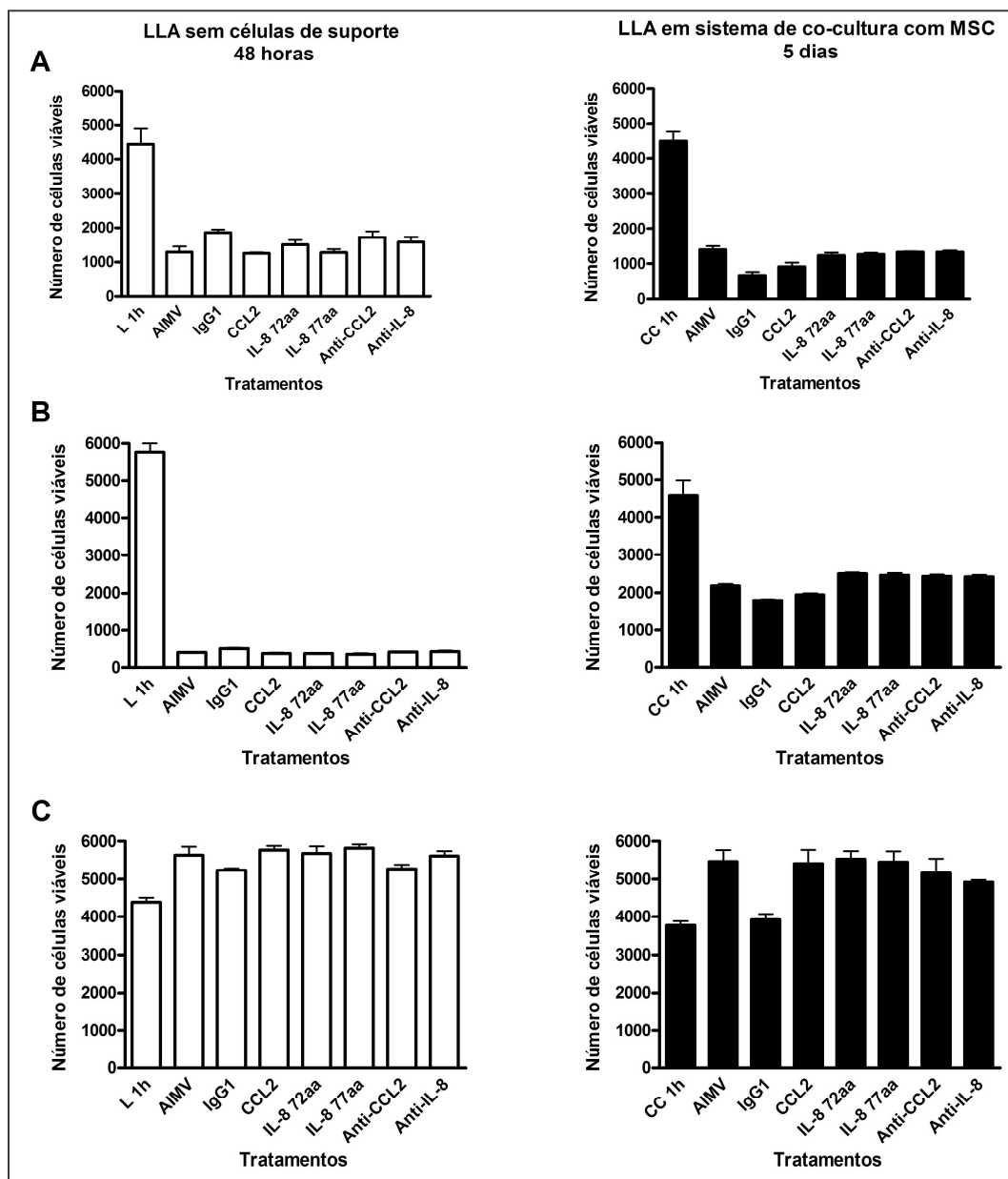


Figura 12 – Recuperação de células viáveis de três pacientes com LLA após 48 horas sem células de suporte e após 5 dias em sistema de co-cultura com células mesenquimais em meio acrescido de quimiocinas (50 ng/ml de CCL2 ou 500 ng/ml de IL-8 72 ou 77 aa) ou anticorpos neutralizantes (500 µg/ml). O número de células viáveis foi medido por citometria de fluxo. MSC = células mesenquimais; CC 1h = células em co-cultura incubadas sem tratamento por 1h; L 1h = células de leucemia sem células de suporte e sem tratamento incubadas por 1h; AIMV = células controle incubadas sem tratamento por 48 horas ou 5 dias; IgG1 = controle isotípico.

O efeito de CCL2 e IL-8 na quimiotaxia de blastos da LLA primária foi avaliado através de ensaio de migração celular em sistema de *transwell*. Tanto a CCL2 quanto a IL-8 são conhecidas pelo seu papel na atração de monócitos, função que poderia ser importante no *homing* da LLA na medula e/ou infiltração de outros órgãos. Como mostra a **Figura 13**, CCL2 e IL-8 não tiveram qualquer efeito quimiotático sobre as células primárias de LLA, isoladamente ou em conjunto com a SDF-1.

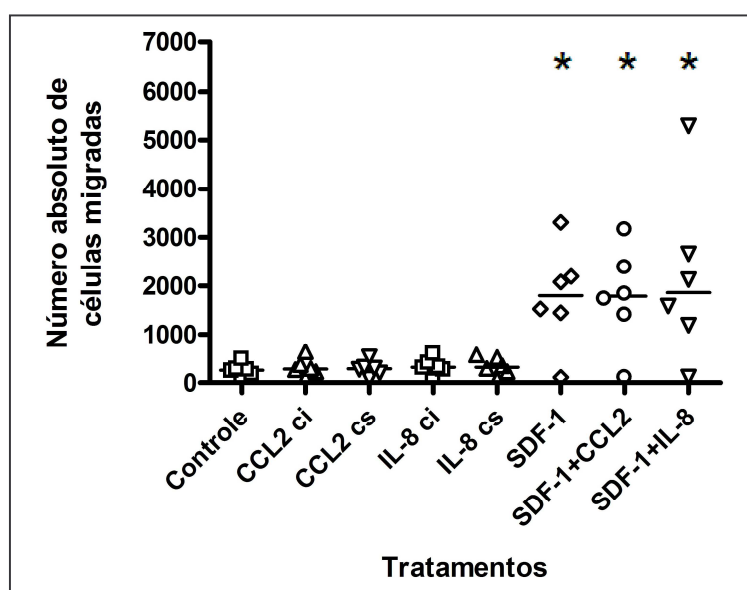


Figura 13 – Efeito do CCL2 e IL-8 sobre a migração de células primárias de LLA. Células leucêmicas de 6 diferentes pacientes foram acondicionadas no compartimento superior (inserto *transwell* com poros de 5µm de diâmetro), e as diferentes quimiocinas (CCL2, IL-8 e/ou SDF-1) foram adicionadas no compartimento inferior (ci) ou superior (cs). Após 2 horas, o número de células CD19+ presentes no compartimento inferior foi contado através de citometria de fluxo. Valores médios de ensaios feitos em duplicata. As concentrações das quimiocinas foram: CCL2 50 ng/ml, IL-8 300 ng/ml e SDF-1 100 ng/ml. A SDF-1 sem associações foi utilizada como controle positivo. * $p < 0,001$ (2-way Anova).

Foi também avaliado se CCL2 e IL-8 seriam capazes de desempenhar papel funcional na ativação de vias de transdução de sinal. A padronização do *western blot* foi realizada testando ação do CCL2 [100 ng/ml] sobre monócitos normais, tendo sido detectada ativação da via do *phospho-AKT*, como esperado (resultado não mostrado). Nenhuma

ativação das vias de sinalização analisadas foi detectada quando blastos de LLA primária foram estimulados com CCL2 ou IL-8 (**Figura 14**).

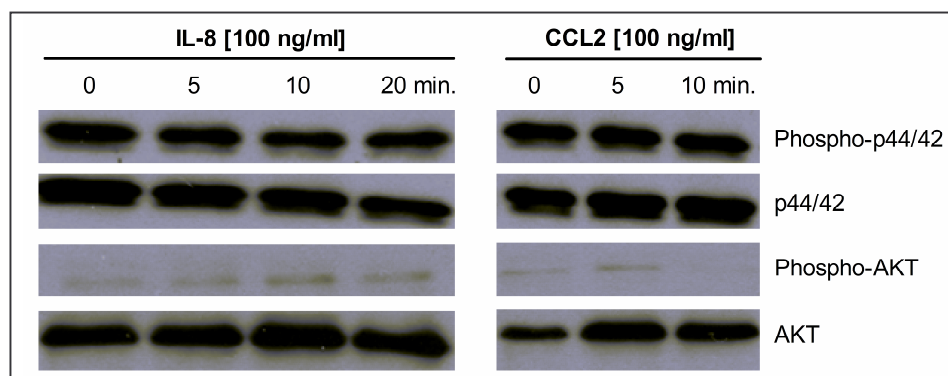


Figura 14 – Células de LLA primária tratadas com CCL2 e IL-8 não sofrem ativação das vias de transdução de sinal típicas dessas quimiocinas. Resultados de um caso representativo de lisados de células de LLA primária ao diagnóstico estimulada com CCL2 [100 ng/ml] e IL-8 [100 ng/ml] ao longo do tempo. 0, 5, 10 e 20 = LLA estimulada com quimiocinas (tempo de incubação em minutos).

Além disso, receptores acoplados a proteína G estão envolvidos em mobilização de cálcio intracelular (86). No entanto, nenhuma mobilização de cálcio intracelular foi detectada (**Figura 15**) quando do estímulo de Jurkat com CCL2 ou IL-8, embora esta célula apresente a expressão de transcritos dos receptores *CCR2b*, *CXCR1* e *CXCR2*.

Estes resultados demonstram que a expressão dos receptores *CCR2a/b* e *CXCR1/2* pela LLA primária provavelmente resulta em receptores não funcionais e, conseqüentemente, indicam que a LLA não se beneficia diretamente dos altos níveis de CCL2 e IL-8 presentes no microambiente da medula óssea.

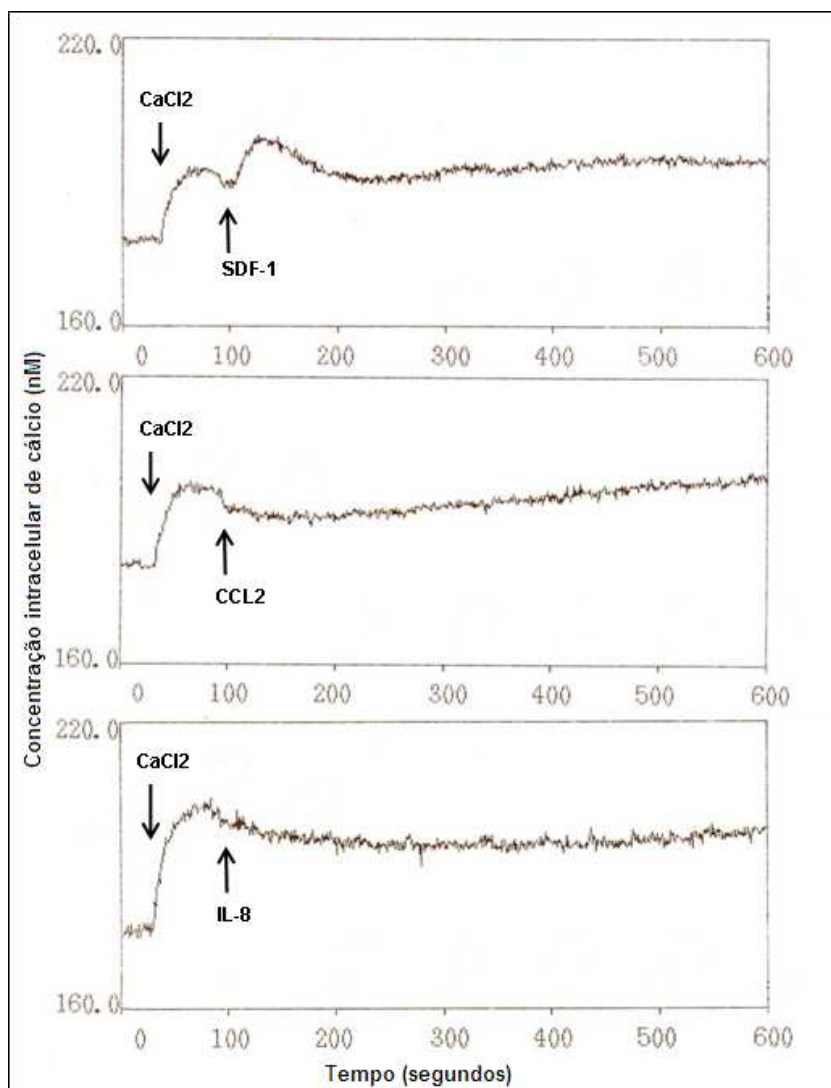


Figura 15 - Células Jurkat (LLA-T) tratadas com CCL2 e IL-8 não apresentam mobilização de cálcio intracelular. As células foram estimuladas com SDF-1 [100 ng/ml], CCL2 [100 ng/ml] ou IL-8 [100 ng/ml]. O momento da adição de CaCl₂ e das quimiocinas é indicado (flecha). O aumento de fluorescência após estímulo indica aumento dos níveis intracelulares de cálcio. SDF-1 foi utilizado como controle positivo.

4.7. CCL2 e IL-8 promovem sobrevivência das células mesenquimais da medula óssea

Mesmo que CCL2 e IL-8 não atuem diretamente sobre a LLA, estas moléculas poderiam atuar sobre as demais células do microambiente da medula, e assim, indiretamente, acabariam favorecendo a LLA. Para investigar esta possibilidade, células mesenquimais da medula óssea em estágio de sub-confluência foram cultivadas em meio

sem soro fetal bovino ou com quantidade reduzida de soro. Como mostra a **Figura 16**, a adição de CCL2 ou IL-8 ao meio de cultura sem soro promove a sobrevivência das células, ao passo que em conjunto com quantidades reduzidas de soro fetal bovino a adição de CCL2 ou IL-8 estimula a proliferação celular. Dados similares foram observados com células endoteliais da medula óssea (resultados não mostrados). Desses resultados pode-se sugerir que o papel direto de CCL2 e IL-8 na medula leucêmica seja na manutenção e ativação das células do estroma da medula óssea.

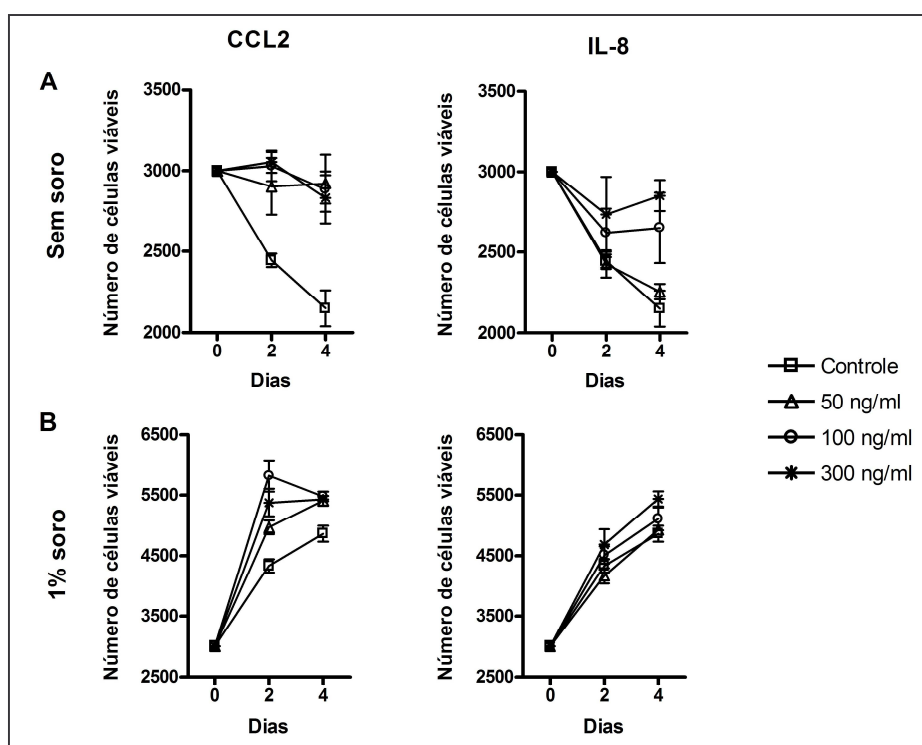


Figura 16 – Efeito da CCL2 e IL-8 na sobrevivência e proliferação de células do estroma da medula óssea. Células mesenquimais da medula óssea foram cultivadas em meio (A) sem soro ou meio (B) suplementado com 1% de soro, e doses crescentes de CCL2 ou IL-8 [50, 100 e 300 ng/ml] por 2 e 4 dias. A viabilidade celular foi analisada pelo método do MTT. Dados correspondem a média e desvio padrão de triplicatas biológicas.

4.8. Avaliação do SB225002, antagonista do receptor CXCR2 da IL-8

4.8.1. Linhagens de células de LLA são sensíveis ao SB225002

As células mesenquimais da medula estimuladas pela co-cultura com células de LLA apresentaram, na análise de microarranjos descrita no item 4.2, ativação das quimiocinas *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL5*, *CXCL6* e *IL-8*, ligantes do receptor CXCR2. Devido a convergência em relação ao receptor CXCR2, foi sintetizado e avaliado o efeito de uma molécula antagonista do CXCR2, conhecida por SB225002 (N-(2-hydroxy-4-nitrophenyl)-N'-(2-bromophenyl)urea), segundo método descrito por White *et al.* (78). O trabalho de síntese foi realizado pelo Dr. Paulo C. Leal, Dr. Ricardo J. Nunes e Dr. Rosendo A. Yunes, do Depto. de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, nossos colaboradores. Em alguns momentos a molécula SB225002 também foi adquirida comercialmente (Calbiochem).

Além da síntese do SB225002, moléculas análogas foram sintetizadas de acordo com procedimento de Topliss, e apresentaram atividade antiinflamatória em cobaias (Dr. João Calixto, UFSC, informação pessoal). Os análogos testados nas linhagens de células de LLA foram 4-Bromo e 3,4-Cloro.

Para padronizar o uso do SB225002 foram realizados experimentos preliminares com linhagens celulares de LLA-B (Nalm6 e REH) e LLA-T (Jurkat, Molt4 e CEM), tratadas com SB225002 e seus análogos, nas concentrações de 1, 10 e 100 μ M, por 48 horas. O ensaio de MTS foi utilizado para medida de sobrevivência/proliferação celular. Foi muito interessante observar que as linhagens de LLA foram sensíveis ao SB225002 na concentração de 100 μ M (**Figura 17**). Nenhuma das células foi sensível aos análogos cloro e bromo (**Figura 18**), muito embora um desses análogos (bromo) apresente grande atividade antiinflamatória em estudos com cobaias (Dr. João B. Calixto, UFSC, informação pessoal). O motivo pelo qual as células de LLA são resistentes aos análogos cloro e bromo ainda é desconhecido.

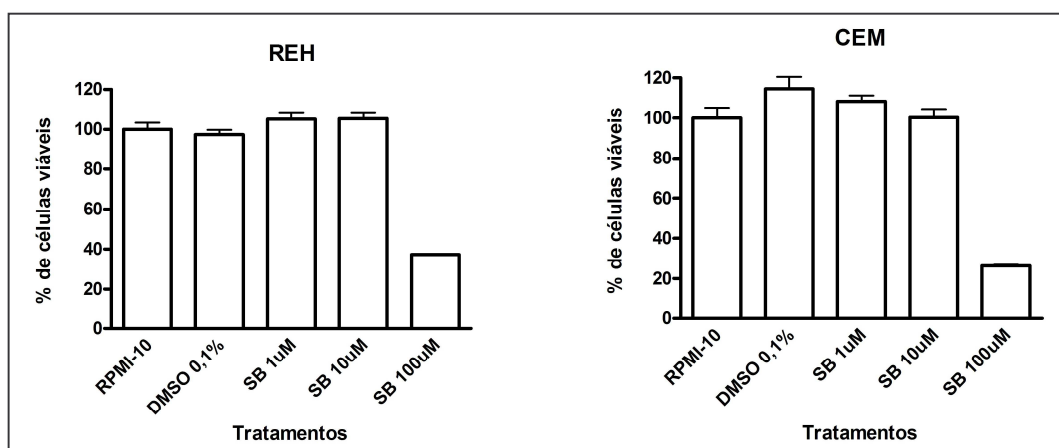


Figura 17 – Efeito do SB225002 [1, 10 e 100 µM] na sobrevivência e proliferação das linhagens celulares de LLA: REH (LLA-B) e CEM (LLA-T). A incubação foi realizada por 48 horas e os controles foram RPMI-10% soro fetal bovino (RPMI-10) e DMSO 0,1%. SB = SB225002.

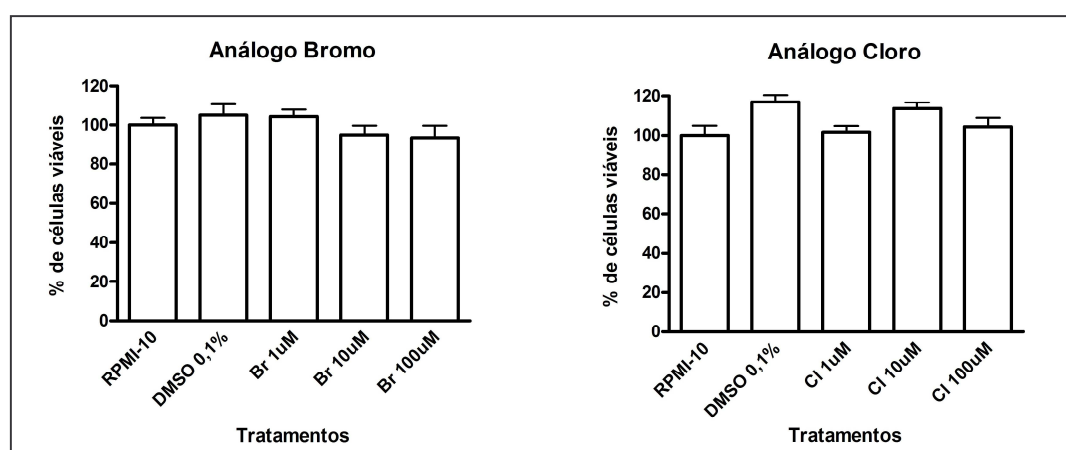


Figura 18 – Efeito dos análogos bromo e cloro do SB225002 [1, 10 e 100 µM] na sobrevivência e proliferação da linhagem celular de LLA REH (LLA-B). A incubação foi realizada por 48 horas e os controles foram RPMI-10% soro fetal bovino (RPMI-10) e DMSO 0,1%. Br = análogo bromo; Cl = análogo cloro.

Foi realizado ensaio de dose resposta do SB225002 nas linhagens de células da LLA [10, 20, 40, 60, 80 e 100 µM]. Concentrações de SB225002 em torno de 20 µM causam inibição de aproximadamente 50% na sobrevivência/proliferação das células (**Figura 19**). Cabe ressaltar que as células mesenquimais da medula óssea não são sensíveis ao

SB225002, enquanto que as células Jurkat, mesmo no sistema de co-cultura com células mesenquimais, são sensíveis ao SB225002 (resultados não mostrados).

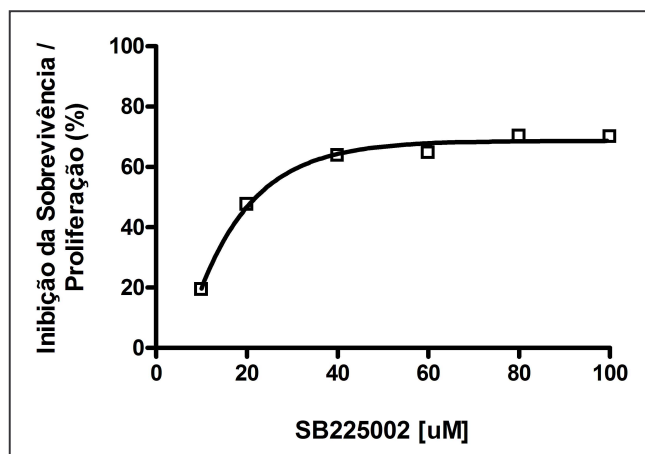


Figura 19 – Efeito de dose resposta do SB225002 [10, 20, 40, 60, 80 e 100 μM] na sobrevivência e proliferação da linhagem de LLA Jurkat (LLA-T). São apresentados resultados de % de inibição em relação ao controle após 48 horas de cultura. Foram utilizados como controle: RPMI-10% soro fetal bovino (RPMI-10) e DMSO 0,1%.

Surpreendentemente, o SB225002 não mostrou atividade citotóxica contra células primárias de LLA em co-cultura com células mesenquimais da medula óssea (**Figura 20**). Uma possível diferença entre células de LLA primária e as células de linhagem (como Jurkat) é que as primeiras raramente proliferam em cultura. Por outro lado, como as células de linhagem são geralmente derivadas de recaídas da doença, ou seja, de casos de LLA mais agressivos e resistentes ao tratamento quimioterápico, tornou-se interessante desvendar o mecanismo de ação do SB225002, que poderia tornar-se uma droga útil para o tratamento de casos de LLA refratária ou pós-recaída.

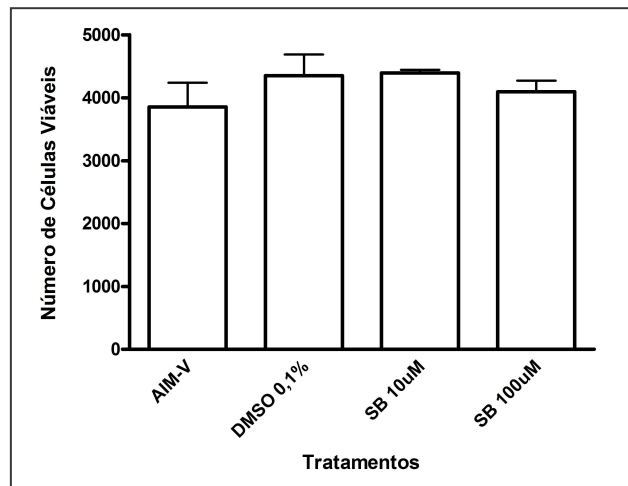


Figura 20 – Efeito do SB225002 [10 e 100 µM] na sobrevivência e proliferação da LLA primária em sistema de co-cultura com células mesenquimais da medula óssea. O número de células viáveis foi medido por citometria de fluxo. Foram utilizados como controle: AIM-V (células controle incubadas sem tratamento por 48 horas) e DMSO 0,1%.

Uma primeira hipótese testada para o efeito do SB225002 era a de que as células de linhagens de LLA seriam dependentes de IL-8 autócrino. Ensaio de ELISA indicaram que as células Jurkat secretam níveis desprezíveis de IL-8 no meio de cultura (**Figura 21A**). Além disso, apesar de expressar o *CXCR2*, as células Jurkat não parecem responder à adição de IL-8 (**Figura 21B**).

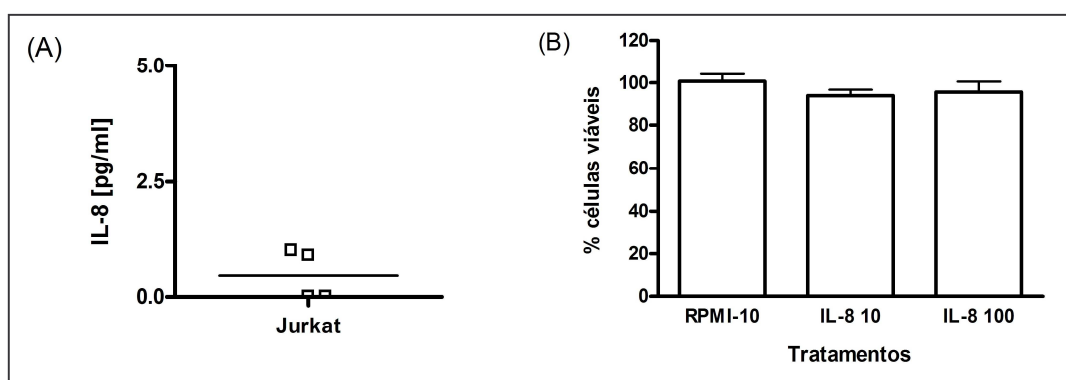


Figura 21 – **(A)** Nível de IL-8 no meio de cultura de linhagem de LLA-T (Jurkat). Cada ponto representa a média de duplicatas. **(B)** Tratamento da linhagem de LLA-T (CEM) com IL-8 [10 e 100 ng/ml]. A incubação foi realizada por 48 horas e o controle foi RPMI-10% soro fetal bovino (RPMI-10). IL-8 10 = IL-8 10 ng/ml; IL-8 100 = IL-8 100 ng/ml.

A análise de ciclo celular de células Jurkat tratadas com SB225002 [20 μ M] por 24 horas mostrou que o SB225002 induziu morte preferencial de células em G1 (**Figura 22**).

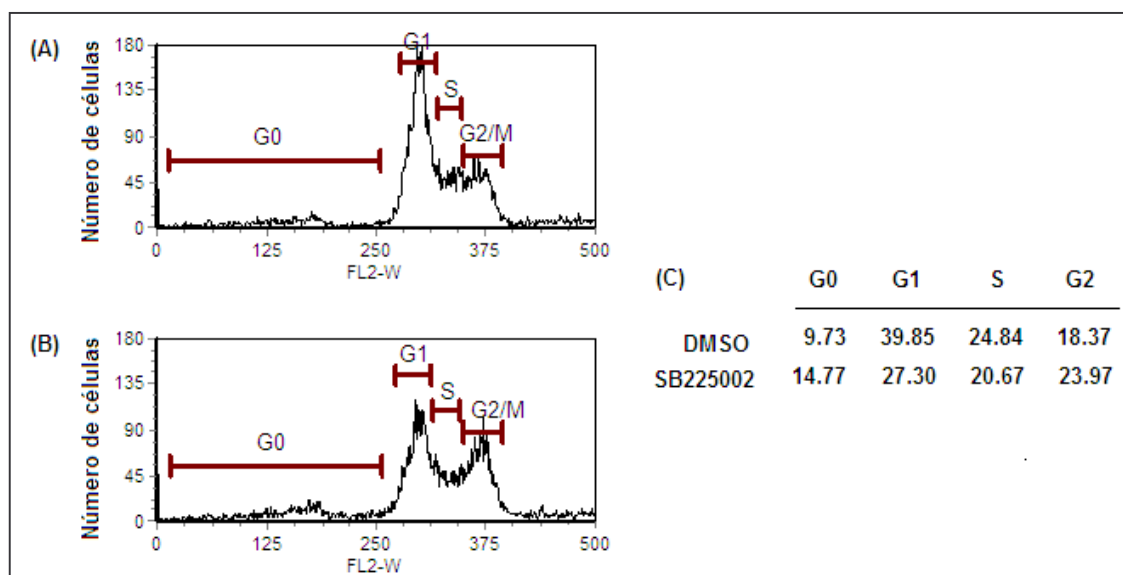


Figura 22 – Perfil do ciclo celular de Jurkat tratada por 24 horas com (A) DMSO (veículo) e (B) SB225002 [20 μ M]. Em (C) foi determinada a percentagem de células em cada fase do ciclo após 24 horas de tratamento.

4.8.2. CXCR2 não é o único responsável pelo efeito de SB225002

O SB225002 é descrito na literatura como antagonista específico do receptor CXCR2 (78). No entanto, foi interessante observar que nem todas as linhagens de LLA sensíveis ao SB225002 expressam transcritos para o receptor *CXCR2* (**Figura 23**).

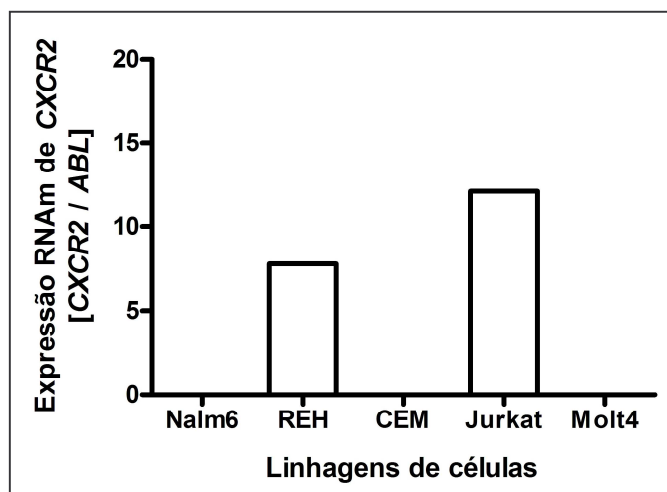


Figura 23 – Análise da expressão do receptor *CXCR2* por RQ-PCR em linhagens de LLA.

Apenas recentemente, um trabalho apresentado como pôster (The Society of Biomolecular Sciences Conference, 2007) e disponível na internet no endereço <[http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/5099fee823d8aa852573be005537cd/\\$FILE/ps3008en00.pdf](http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/5099fee823d8aa852573be005537cd/$FILE/ps3008en00.pdf)> reporta que o SB225002 pode ser capaz de se ligar a receptores distintos do *CXCR2*, a saber: receptores de histamina (1, 2 e 3), receptor 1 da orexina, receptor 4 da melanocortina, receptor 1 do hormônio concentrador de melanina, receptor 8 de quimiocina (motivo C-C), receptor 1 dos canabinóides e receptor da serotonina. A expressão desses receptores foi investigada em células REH e Jurkat. O receptor 4 da melanocortina (*MC4R*), receptor 1 da orexina (*OX1R*) e o receptor da serotonina (*HTR1*) não foram detectados nas linhagens de LLA analisadas. Todos os outros receptores tiveram transcritos detectáveis por RQ-PCR (**Figura 24**) sendo, portanto, possíveis alvos da ação do SB225002.

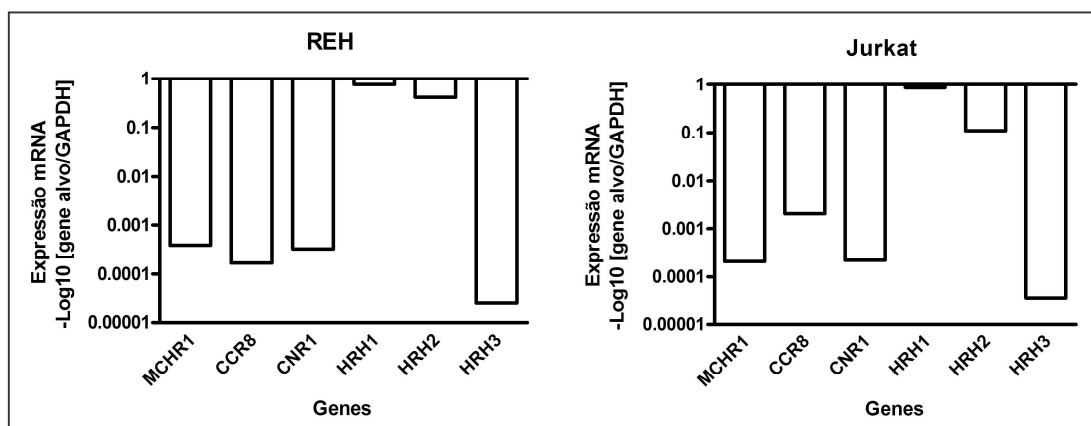


Figura 24 – Análise da expressão de receptores candidatos a ligação com o SB225002 por RQ-PCR em linhagens de LLA (REH e Jurkat). *MCHR1* = receptor 1 do hormônio concentrador de melanina, *CCR8* = receptor 8 de quimiocina (motivo C-C), *CNR1* = receptor 1 dos canabinóides, *HRH1* = receptor 1 da histamina, *HRH2* = receptor 2 da histamina e *HRH3* = receptor 3 da histamina. Eixo y em escala de -Log 10.

Dentre os genes com transcritos detectados por RQ-PCR, *CCR8* e *MCHR1* não são descritos como receptores funcionais na LLA. *CCR8* está envolvido com sinais celulares de sobrevivência em timócitos e células Th2, e quando bloqueado por CCL1 (seu ligante) impede a apoptose induzida pela dexametasona em timócitos (87). *MCHR1* teve sua expressão detectada em regiões do sistema nervoso central e tem como ligante o hormônio concentrador de melanina, que atua na regulação da homeostase de energia, sendo possivelmente um dos fatores envolvidos na regulação do consumo de alimentos em humanos e, consequentemente, tem sido associado ao processo de obesidade (88). Por outro lado, os receptores da histamina e dos canabinóides eram descritos como receptores funcionais na LLA (89, 90) e, por isso, foram inicialmente investigados.

A histamina foi sugerida como um regulador autócrino da proliferação celular na LLA (91). Além disso, a difenidramina, um antagonista do receptor 1 da histamina foi capaz de induzir apoptose em linhagens de LLA-T, sugerindo o papel da histamina na regulação da sobrevivência das células leucêmicas (89). Neste estudo, linhagens celulares de LLA-T foram tratadas com doses mínimas de SB225002 em meio acrescido ou não de histamina. A histamina, na concentração de 100 μ M, teve um efeito aditivo ao efeito da sub-dose de SB225002 (**Figura 25**).

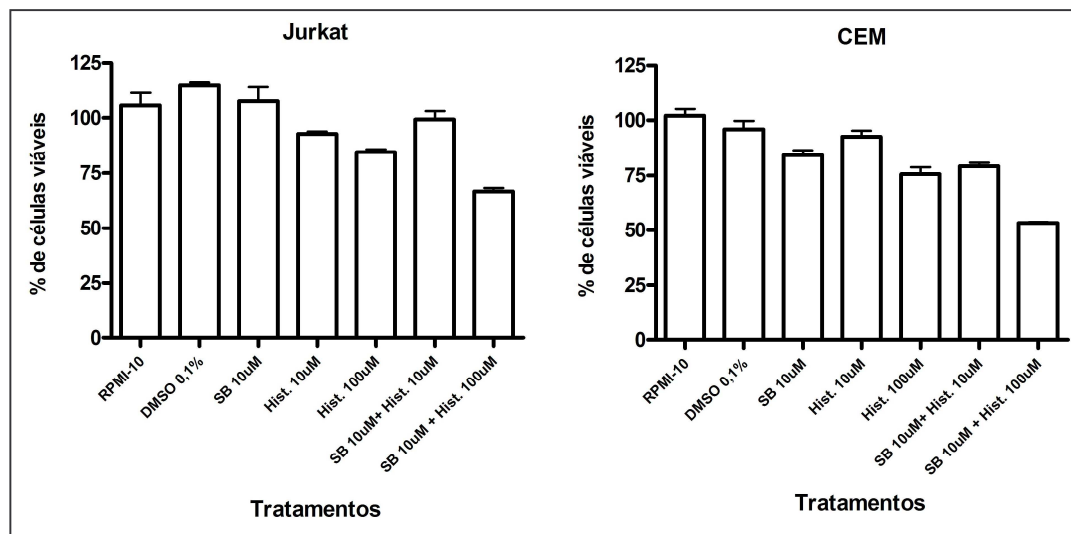


Figura 25 – Associação dos tratamentos de SB225002 [10 μ M] com histamina [10 e 100 μ M] em linhagens de LLA-T (Jurkat e CEM). A incubação foi realizada por 48 horas e os controles foram RPMI-10% soro fetal bovino (RPMI-10) e DMSO 0,1%. SB = SB225002.

Os canabinóides possuem dois receptores funcionais, CNR1 e CNR2. Seu ligante, tetraidrocanabinol (THC), foi descrito como indutor de apoptose através da translocação de citocromo c mitocondrial e ativação de caspase-3 (92). A literatura reporta a expressão de CNR1 como sendo preferencial no sistema nervoso central, enquanto CNR2 é preferencialmente expresso em células hematopoéticas (93). As linhagens de células de leucemia CEM (LLA-T), HEL-92 (leucemia eritroblástica) e HL-60 (leucemia mielóide) apresentam ambos os receptores dos canabinóides funcionais e são induzidas a apoptose em resposta ao THC (90). Além disso, em Jurkat (LLA-T) o tratamento com THC causou a liberação de citocromo c e a clivagem das caspases-8, -9, -2, -10, e Bid, demonstrando ao menos parte do mecanismo de indução de apoptose mediado pelo THC na LLA (94).

Nesta tese, a expressão dos receptores CNR1 e CNR2 foi investigada através de western blot. Confirmando dados da literatura, a LLA expressa ambos os receptores (**Figura 26**). O SB225002 não parece provocar diferença nas quantidades de proteína CNR1 e CNR2 em diferentes tempos de tratamento.

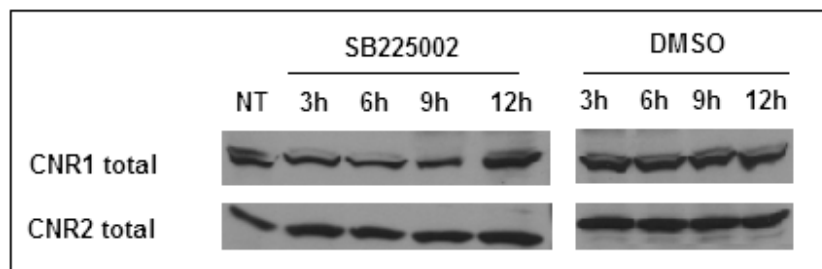


Figura 26 – Detecção das proteínas CNR1 e CNR2 em amostras de Jurkat tratada com SB225002 [20 μ M] ao longo do tempo. O tratamento com DMSO (veículo) foi utilizado como controle. NT = não tratado.

Para testar o envolvimento destes receptores na resposta ao SB225002, células de LLA-T (Jurkat) foram tratadas com as moléculas AM251 e AM630, antagonistas dos receptores CNR1 e CNR2, respectivamente. Como demonstra a **Figura 27**, o AM251 associado ao SB225002 tem efeito aditivo, enquanto o AM630 demonstra efeito sinérgico quando associado ao SB225002, especialmente na combinação de SB225002 [5 μ M] e AM630 [1 μ M], onde o efeito sinérgico observado foi de 33,68%. Estes resultados indicam o CNR2 como possível receptor funcional do SB225002 na LLA.

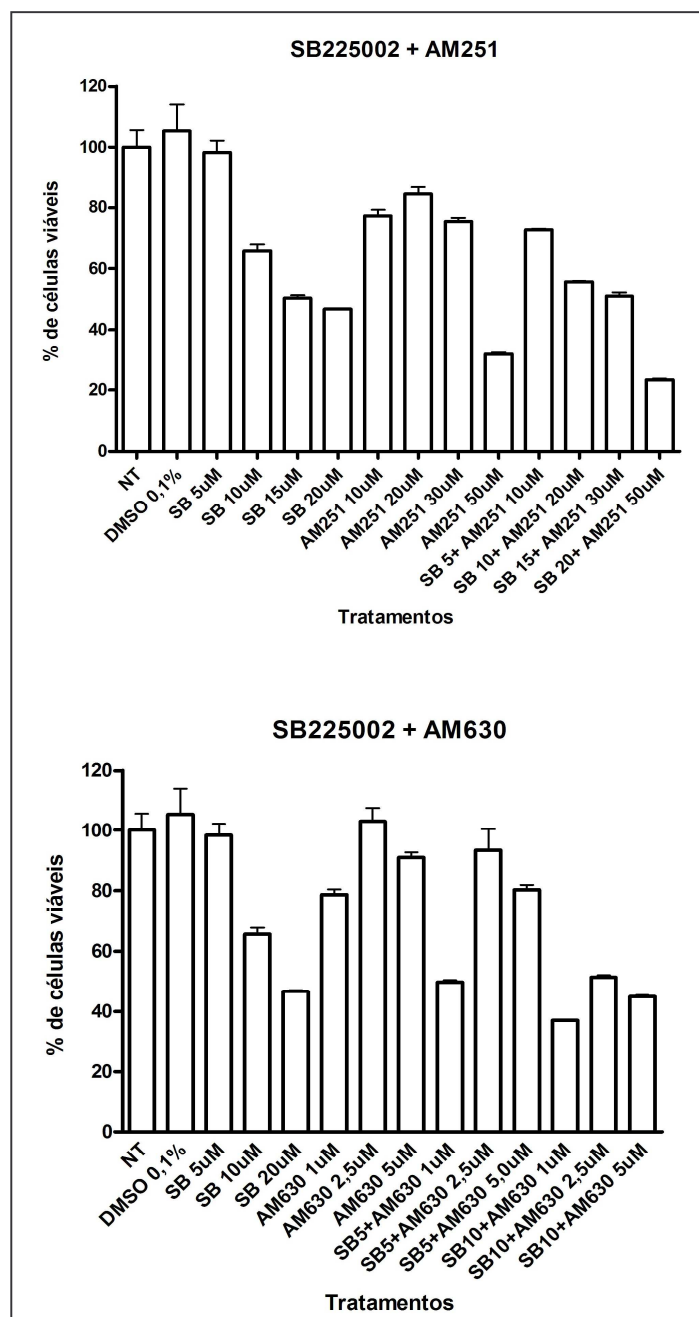


Figura 27 – Associação dos tratamentos de SB225002 [5, 10, 15 ou 20 μ M] com AM251 [10, 20, 30 ou 50 μ M] ou AM630 [1, 2,5 ou 5 μ M] em linhagem de LLA-T (Jurkat). A incubação foi realizada por 48 horas e os controles foram RPMI-10% soro fetal bovino (RPMI-10) e DMSO 0,1%. SB = SB225002.

4.8.3. SB225002 modula as vias de *JUN*, *TNF α* , *NF κ B* e *p53*

Com o objetivo de investigar em mais detalhes o mecanismo de ação e identificar vias de sinalização implicadas na resposta celular da LLA ao SB225002, o perfil global de expressão gênica foi analisado em Jurkat tratada com SB225002 [20 μ M] por 6 e 9 horas. Os tempos de incubação foram definidos a partir de ensaio onde foi observada morte celular a partir de 9 horas de incubação (**Figura 28**).

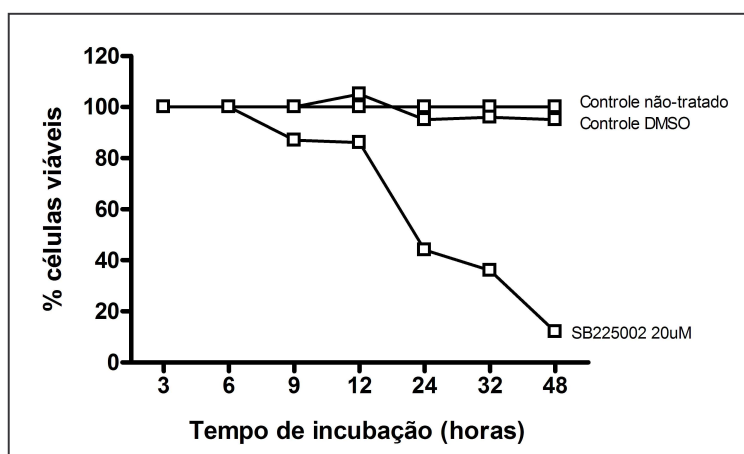


Figura 28 – Efeito da dose 20 μ M de SB225002 no decorrer do tempo em linhagem de LLA. Os controles foram células não-tratadas e tratadas com DMSO (veículo). Resultados similares foram observados nas linhagens REH e Jurkat.

O tratamento das células com SB225002 levou à expressão diferencial de 215 genes (concordantes entre os tempos de 6h e 9h de tratamento), sendo 174 genes hiper expressos e 41 hipo expressos em comparação com o controle. A lista destes genes encontra-se descrita no **Anexo IV**. As análises funcionais dos dados de microarranjo revelaram 10 vias de sinalização com ativação significativa (**Figura 29**), e vias de interação de gene efetores da resposta celular ao SB225002 (**Figuras 30-33**). Dentre as vias de sinalização significativas a via de biossíntese de colesterol foi a mais ativada, uma provável resposta da célula ao stress provocado pela droga. Na LLA-T a ativação da biossíntese do colesterol e de outras vias do metabolismo bioenergético foi associada com a resistência a glucocorticóides, sendo que a indução do perfil proliferativo poderia suprimir o potencial apoptótico dos glucocorticóides (95). Além da via de biossíntese do colesterol, destacaram-se as vias de p53, envolvida em vários mecanismos celulares, incluindo a indução de apoptose, e a via de

resposta a stress oxidativo mediada por Nrf2, mecanismo de defesa da célula contra stress oxidativo ou eletrolítico através de reações químicas conjugadas ou pelo aumento da capacidade antioxidante da célula (96).

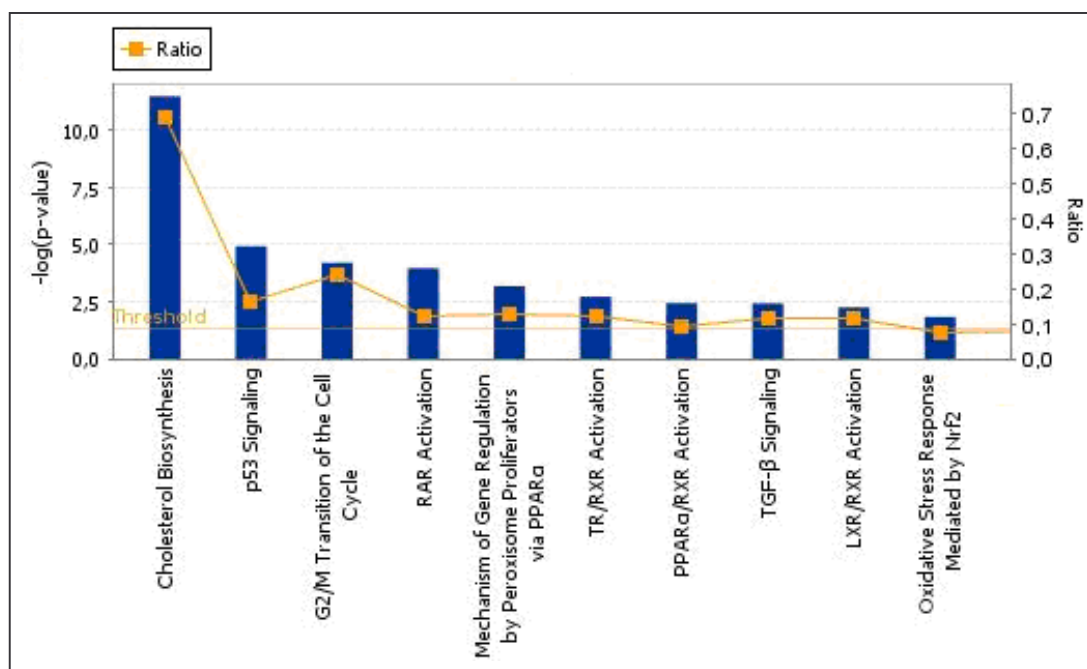


Figura 29 – Vias de sinalização ativadas em células Jurkat como resposta ao tratamento com SB225002 [20 μ M] após 6 horas de incubação. O *threshold* estatístico (linha laranja sem quadrados) representa o ponto de corte para significância na escala log (eixo y, lado esquerdo). A razão (linha laranja com quadrados) do número de genes significativos de um grupo de dados relacionado a uma via de sinalização dividida pelo número total de genes da via de sinalização também é demonstrado (eixo y, lado direito). As análises foram realizadas no *software* Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems).

Como mostram as **Figuras 30 a 32**, o SB225002 ativou genes afetados pela via de *JUN* e inibiu genes afetados pelas vias de *TNF α* e *NF κ B*.

A via de JUN (c-Jun quinase, **Figura 30**) está envolvida tanto na indução de apoptose, quanto na proteção da célula contra a apoptose induzida por outras vias (97). A quinase c-Jun pode ser ativada pelo *TNF α* através de um sistema de mensageiro secundário, que também pode ativar a via do *NF κ B* (97). Tanto c-Jun quanto *NF κ B* são

considerados fatores de transcrição de resposta a stress e que governam a expressão de uma variedade de genes pró-inflamatórios e citotóxicos (98). Nesta via destacou-se além da ativação de *c-Jun* (*fold change* = 2,99), a ativação do gene *BACH2* (*fold change* = 3,31), dado ao maior valor de *fold change*. O gene *BACH2* é um fator de transcrição associado à indução de apoptose em resposta a stress oxidativo.

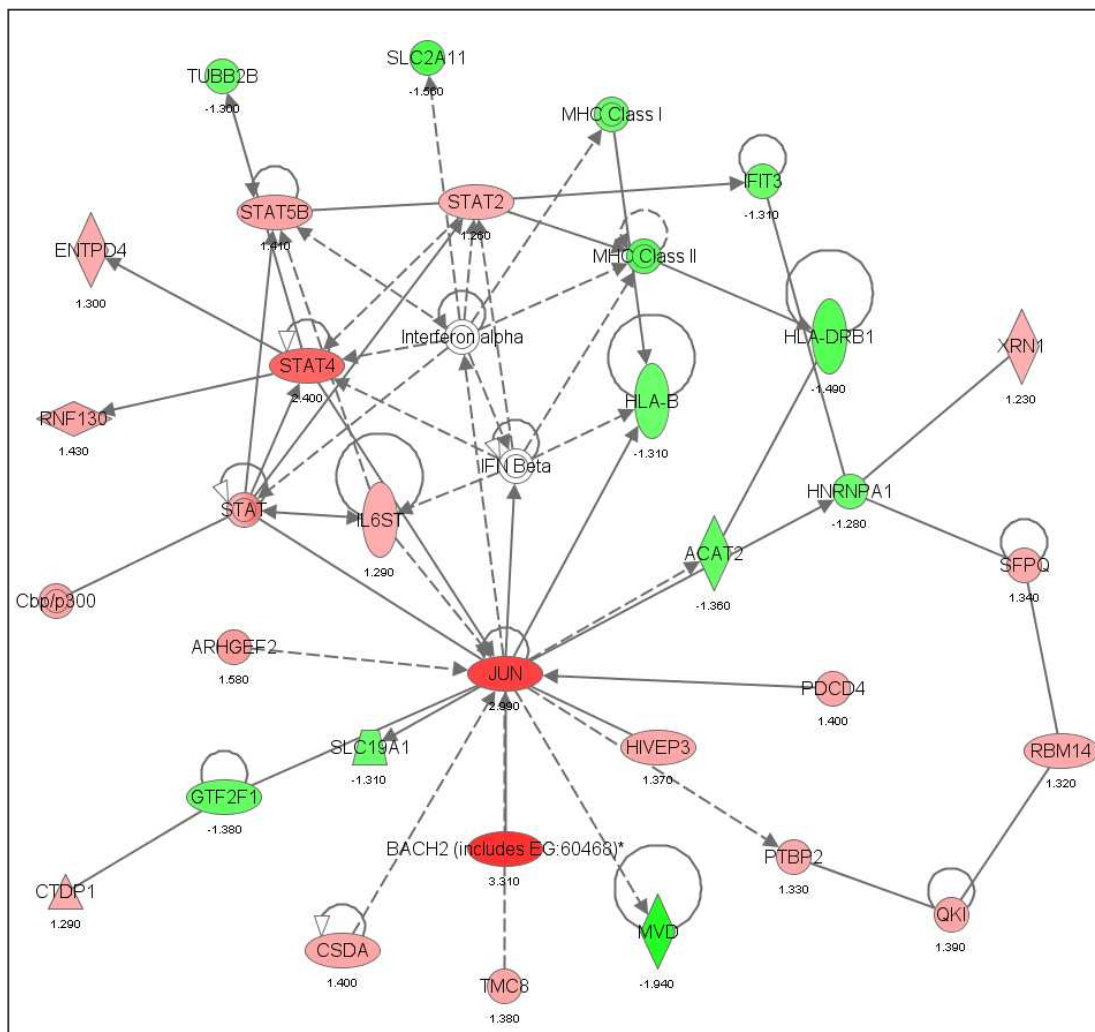
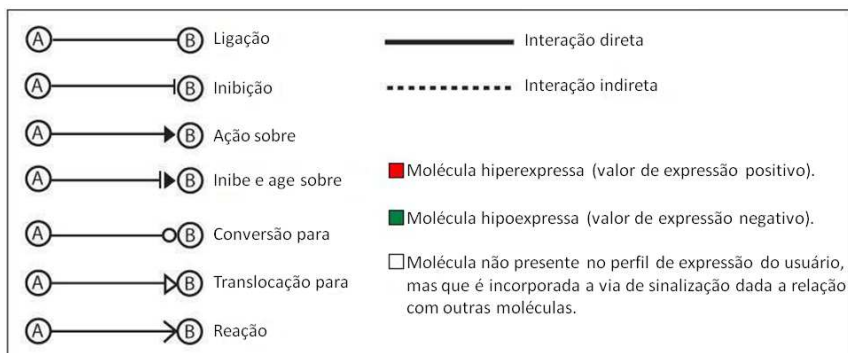


Figura 30 – Via de *JUN* proveniente da análise de expressão gênica de Jurkat tratada com SB225002 [20 μ M] por 6 horas. Análise realizada no *software* Ingenuity Pathways Analysis.

Legenda:



Como mostra a **Figura 31**, o SB225002 desencadeou uma resposta inibitória em vários genes afetados pela via do *TNF α* , que está envolvida na regulação de diversos processos biológicos, entre eles proliferação celular, diferenciação, apoptose, metabolismo de lipídios, e coagulação. Além disso, *TNF α* é um dos efetores da via do *NF κ B* (99), que também apresentou alvos inibidos em resposta ao tratamento com SB225002 (**Figura 32**). *NF κ B* é um fator de transcrição com amplo espectro de funções celulares, entre eles inflamação, diferenciação, proliferação e apoptose. Em linhagens de células de diferentes tumores, a inibição da via do *NF κ B* foi associada à ativação de *c-Jun NH₂-terminal kinase* (JNK) e a indução destas células a apoptose (100).

A ativação da via de *c-Jun* quinase e a inibição das vias do *TNF α* e de alguns alvos da via de *NF κ B* foram intrigantes, e conduziram a hipótese de que a modulação destas vias seria parte das respostas celulares responsáveis pela indução de apoptose mediada pelo SB225002.

Como mostra a **Figura 33**, o SB225002 desencadeou a ativação de vários genes afetados pela via do *p53*, que está envolvido na resposta celular a stress, regulando genes que induzem apoptose, senescência, reparo do DNA, parada do ciclo celular, entre outros. Dentre os genes ativados pelo *p53*, o gene *GLIPR1* (*fold change* = 3,25) destacou-se por apresentar o maior *fold change* nesta via. Foi descrito que a proteína GLIPR1 apresenta atividade pró-apoptótica em células de câncer de próstata e bexiga (101). A hiper expressão de *GLIPR1* associada à informação de sua função pró-apoptótica conduziu a hipótese de que a ativação de *GLIPR1* seria um dos efetores da morte celular induzida pelo SB225002.

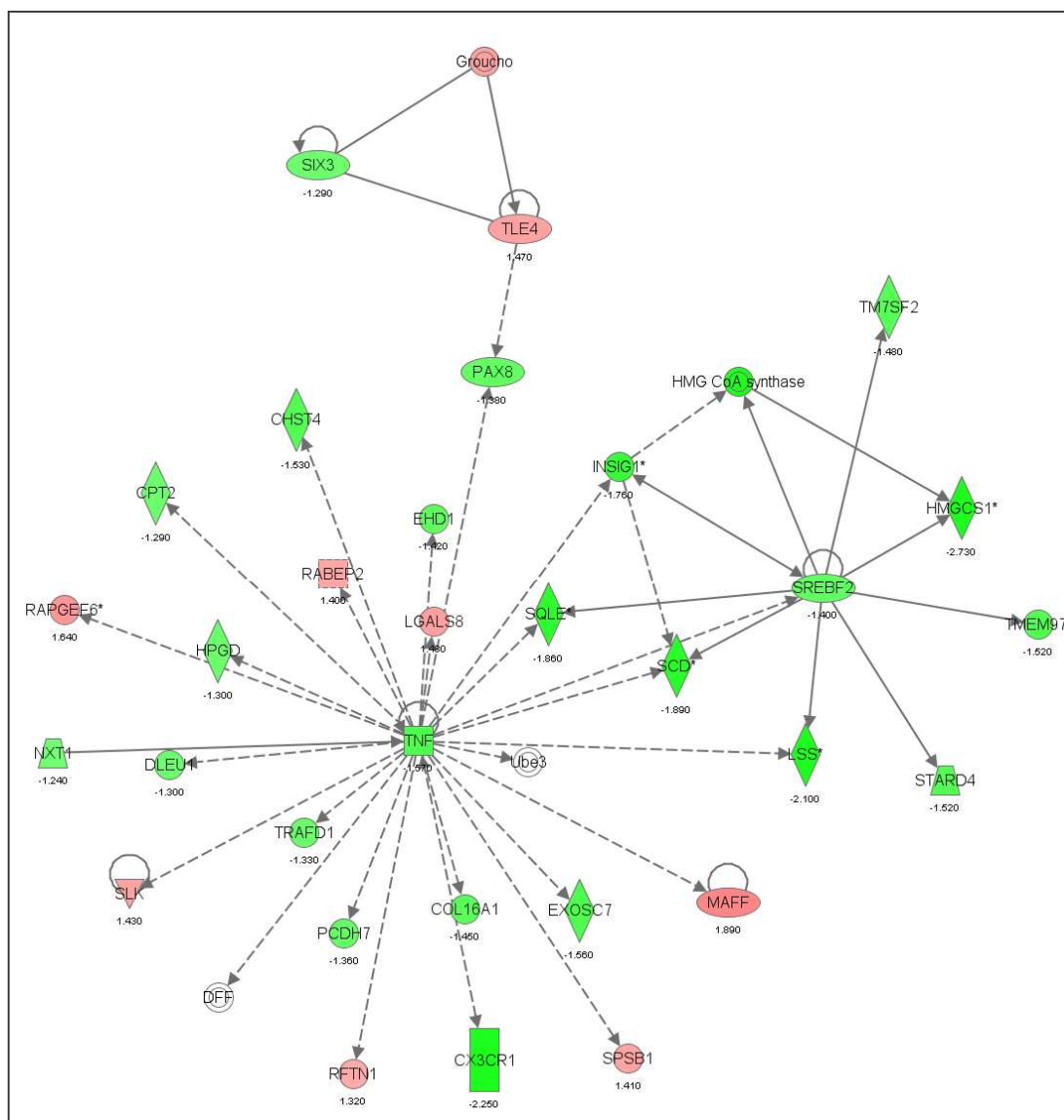
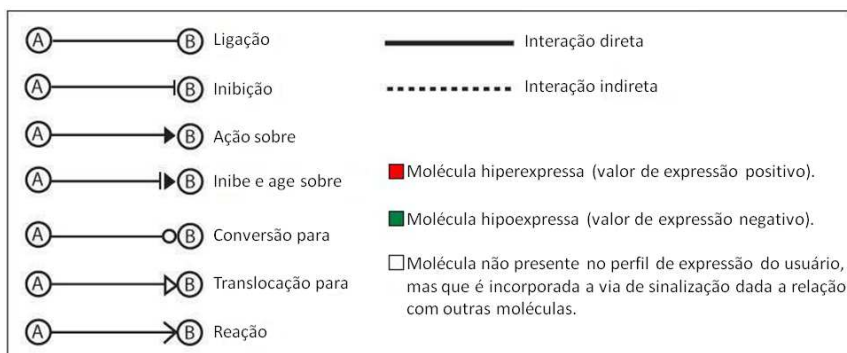


Figura 31 – Via do $TNF\alpha$ proveniente da análise de expressão gênica de Jurkat tratada com SB225002 [20 μ M] por 6 horas. Análise realizada no *software* Ingenuity Pathways Analysis.

Legenda:



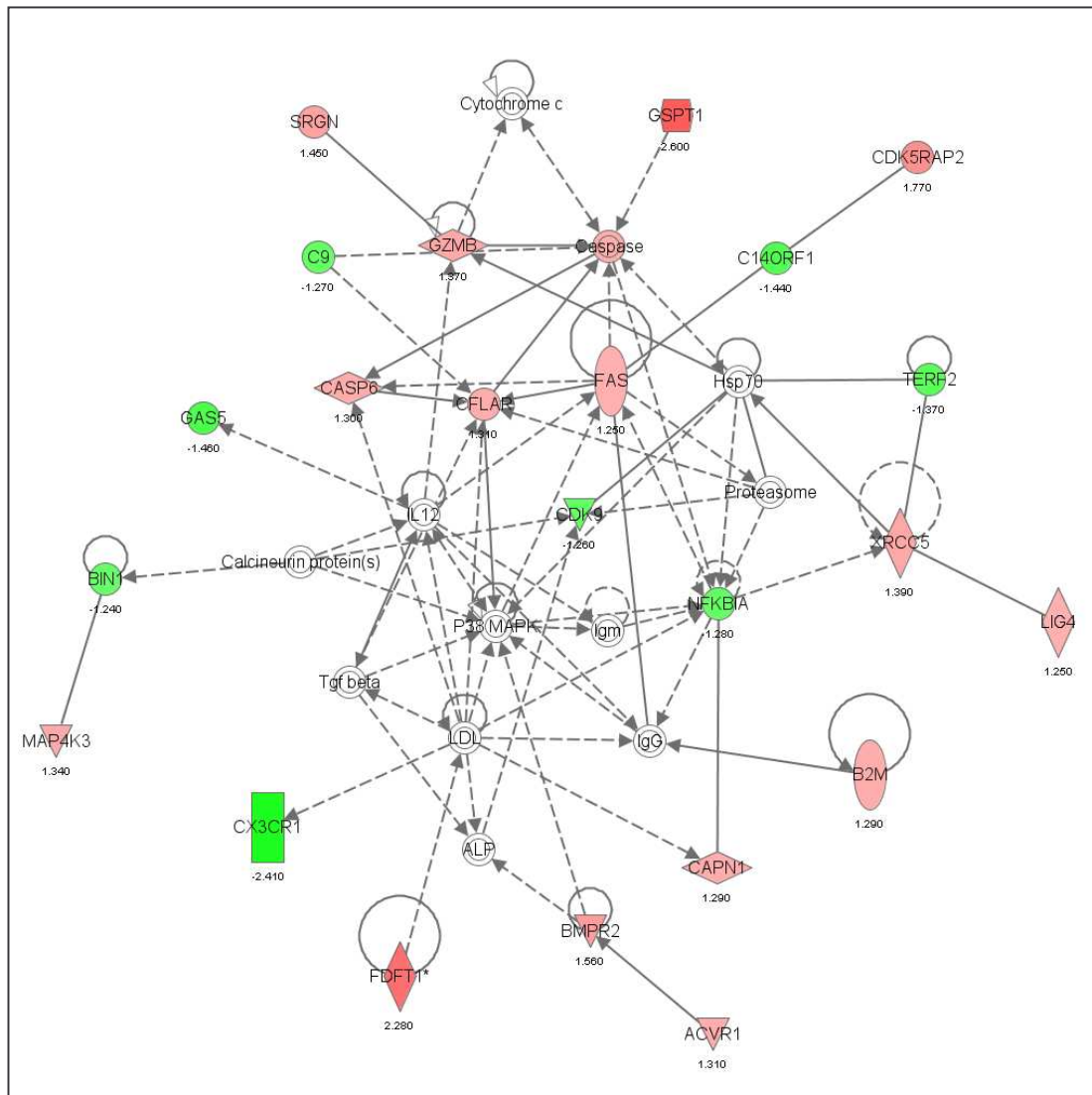
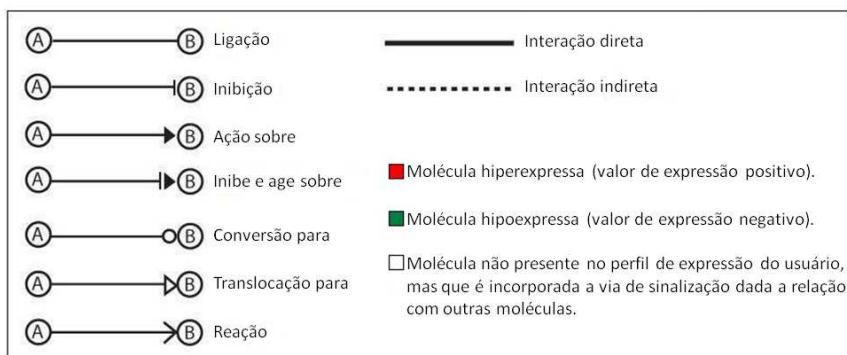


Figura 32 – Via de *NFκB* proveniente da análise de expressão gênica de Jurkat tratada com SB225002 [20 μM] por 9 horas. Análise realizada no *software* Ingenuity Pathways Analysis.

Legenda:



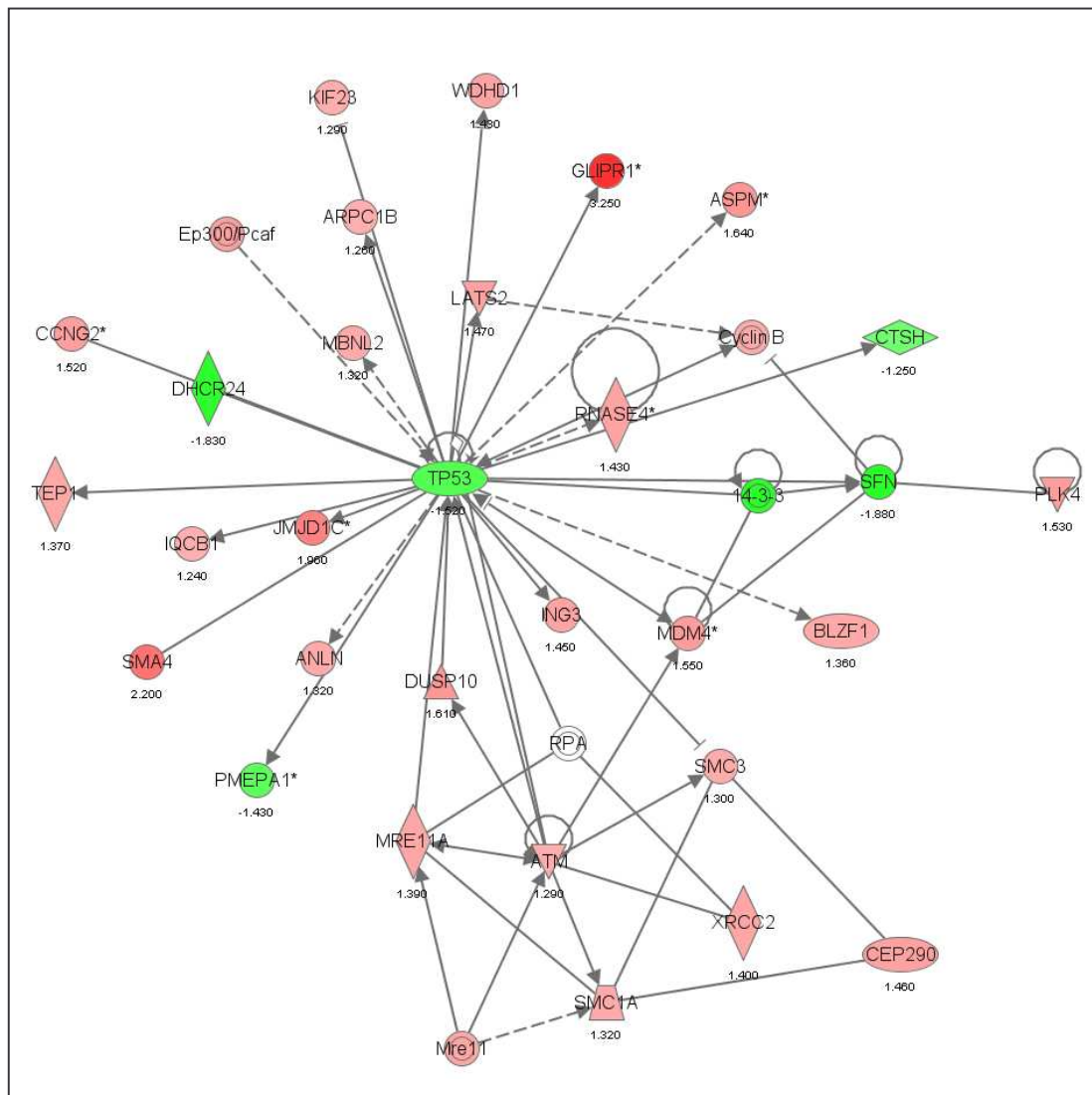
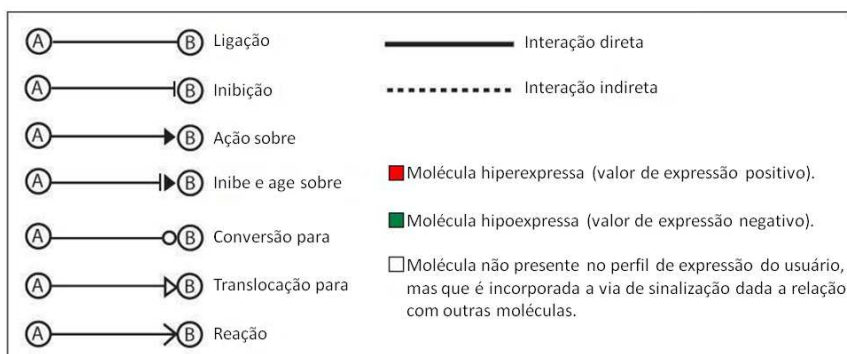


Figura 33 – Via de *p53* proveniente da análise de expressão gênica de Jurkat tratada com SB225002 [20 μ M] por 6 horas. Análise realizada no *software* Ingenuity Pathways Analysis.

Legenda:



4.8.4. A inibição da via de *NFκB* não está envolvida com a indução de morte mediada pelo SB225002

Nos resultados apresentados neste trabalho, foi detectada ativação de *Jun* e *BACH2* em resposta ao SB225002. *Jun* media tanto processos de indução de apoptose, quanto de proteção da célula a apoptose induzida por outras vias (97). Tanto c-*Jun* quanto *NFκB* são considerados fatores de transcrição de resposta a stress e que governam a expressão de uma variedade de genes pró-inflamatórios e citotóxicos (98).

BACH2, um dos genes efetores das respostas celulares mediadas por *Jun*, é um fator de transcrição que forma heterodímeros com membros da família de onco-proteínas Maf, e estes heterodímeros ligam-se a elementos reconhecedores de Maf (MAREs). Os elementos MAREs podem ligar-se a membros das famílias de proteínas Fos e Jun (102). Na hematopoese *BACH2* é expresso especificamente por células B, e a indução da expressão de *BACH2* em células que não o expressam de maneira endógena (como a linhagem de células RAJI) induziu a redução da proliferação destas células e a ao processo de apoptose espontâneo (103).

Neste trabalho, a ativação de *Jun* e *BACH2* mediada pela ação do SB225002 foi confirmada através de RQ-PCR (**Figura 34**). Em relação ao controle DMSO, *Jun* teve aumento de 289 e 395%, e *BACH2* de 216 e 133%, nos tempos 6 e 9 horas após o tratamento, respectivamente.

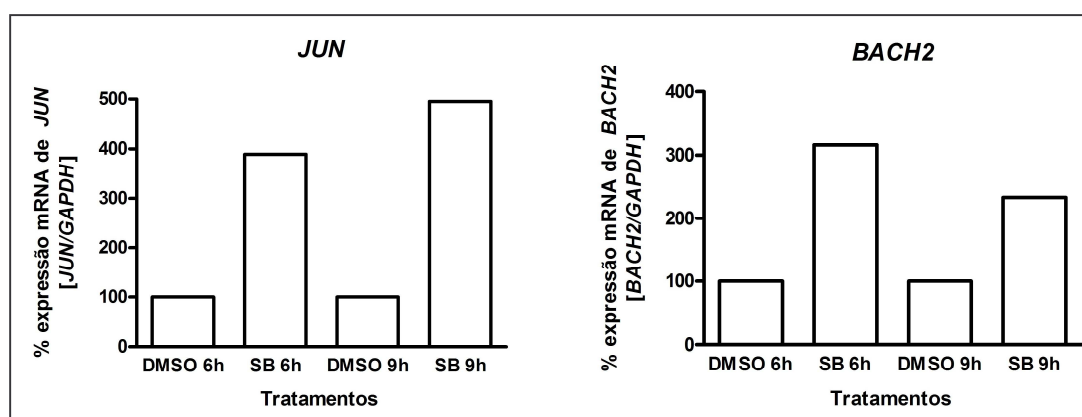


Figura 34 – Análise da expressão dos genes *Jun* e *BACH2* por RQ-PCR em linhagem de LLA (Jurkat) tratada com SB225002 [20 μM] ou DMSO (controle veículo) por 6 e 9 horas. Valores de expressão em relação ao controle DMSO (DMSO = 100%).

A quinase Jun pode ser ativada por $TNF\alpha$ através de um sistema de mensageiro secundário, que também pode ativar a via do $NF\kappa B$ (97). Na via de $TNF\alpha$, que se apresentou consistentemente inibida, destacou-se a inibição de *CX3CR1* (*fold change* = - 2,25), gene com um dos menores valores de *fold change*.

O gene *CX3CR1* é descrito como um importante receptor mediador de mecanismos da imunidade inata e tem como ligante o CX3CL1, que pode permanecer ancorado a membrana ou ser secretado após processamento. O CX3CL1 é funcional mesmo enquanto ancorado a membrana, podendo reconhecer na superfície de outras células seu receptor - CX3CR1- e ligar-se a ele, funcionando como uma molécula de adesão e favorecendo a comunicação, por exemplo, entre células tumorais e células vasculares endoteliais (104).

A inativação de *CX3CR1* foi confirmada por RQ-PCR e western blot (**Figura 35**). *CX3CR1* apresentou queda de 78 e 28% em relação ao controle após 6 e 9 horas de tratamento, respectivamente. A diminuição do nível de expressão com 6 horas de tratamento corrobora o resultado obtido com o ensaio de microarranjo de DNA e provavelmente reflete a diminuição no nível de proteína com 9 horas de tratamento, que é, no entanto, detectada novamente com 12 horas de incubação.

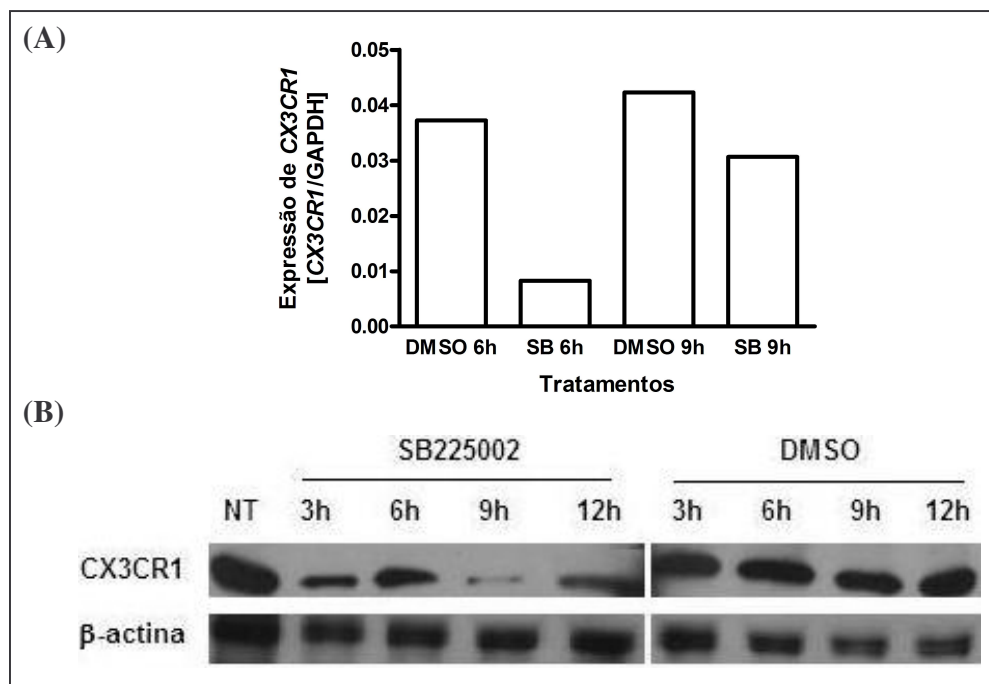
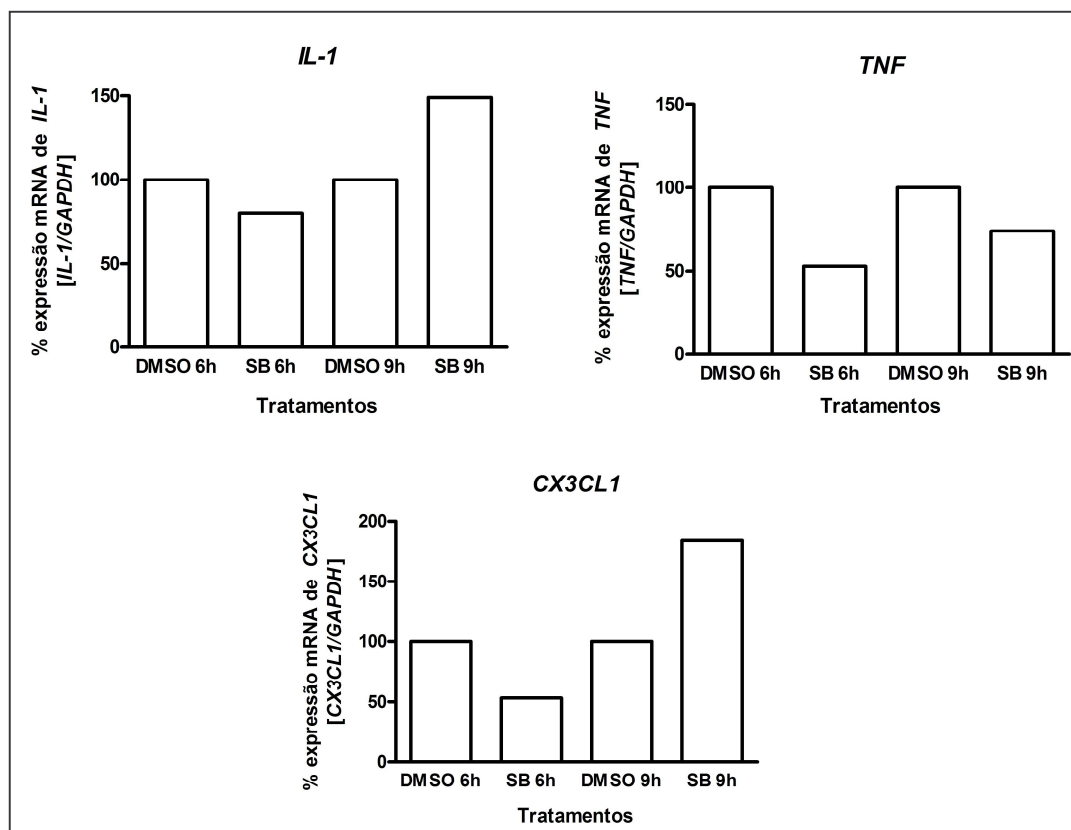


Figura 35 – Detecção de CX3CR1 em células de LLA (Jurkat) tratadas com SB225002 [20 μ M]. (A) RQ-PCR de amostras tratadas por 6 e 9 horas e (B) western blot de amostras tratadas por 3, 6, 9 e 12 horas. O controle dos tratamentos foi o DMSO (veículo). NT = não-tratado.

O *CX3CR1* é um dos genes sabidamente regulados positivamente por *TNF α* (99). Uma alta expressão de *TNF α* foi detectada na LLA-T, mas não foi associada à taxa de proliferação destas células (105). *TNF α* é sabidamente um dos efetores da via do *NF κ B* (106). Por sua vez, o *NF κ B* é importante na hematopoese normal e na LLA, sendo que na leucemia está envolvido na sobrevivência e resistência a drogas (revisado na ref. 107). Além disso, a inibição da via do *NF κ B* também foi associada à ativação de JNK e a indução de células tumorais a apoptose (100).

A inativação de *TNF α* evidenciada pelo ensaio de microarranjo de DNA bem como, o efeito do tratamento com SB225002 em outros genes efetores da via do *NF κ B* (a saber, *IL-1* e *CX3CL1*) foi analisado por RQ-PCR (**Figura 36**) com o objetivo de obter evidências que confirmassem a inativação da via do *NF κ B*. A hipótese que conduziu a estes ensaios era de que a inativação da via do *NF κ B* estaria relacionada à indução de apoptose mediada pelo SB225002.



Figuras 36 – Análise da expressão de genes envolvidos/regulados pela via do $NF\kappa B$ por RQ-PCR em linhagem de LLA (Jurkat) tratada com SB225002 [20 μM] ou DMSO (controle veículo) por 6 e 9 horas. Valores de expressão em relação ao controle DMSO (DMSO = 100%).

Os resultados indicaram a inibição da via do $NF\kappa B$ após 6 horas de tratamento. A inibição observada foi de 20% para a *IL-1* e 47% para ambos *TNF* e *CX3CL1*, em relação ao controle DMSO 6 horas. No entanto, os resultados não foram concordantes após 9 horas de tratamento, tendo sido observado a inibição de *TNF* em 26%, e a ativação da *IL-1* em 49% e da *CX3CL1* em 84%, em relação ao controle DMSO 9 horas.

A via do $NF\kappa B$ é normalmente ativada em resposta a stress. Os resultados parecem indicar que o SB225002 é capaz de bloquear apenas temporariamente a ativação desta via, pois tanto o *IL-1* quanto o *CX3CL1* não apresentaram inibição após 9 horas de tratamento (**Figura 37**). Apenas o gene do *TNF* demonstrou uma diminuição na expressão em ambos os tempos de incubação. Porém, *TNF* responde a outras vias além do $NF\kappa B$ (15).

Estes resultados foram confirmados pelo uso de inibidores de NFκB [Wedelolactone e 6-Amino-4-(4-phenoxyphenylethylamino)quinazoline] em células Jurkat. Como mostra a **Figura 37**, o uso conjunto de subdose de SB225002 [5 μM] e os inibidores de NFκB resultam apenas em efeito aditivo, descartando-se o envolvimento desta via no mecanismo de ação do SB225002.

Em relação ao *CX3CR1*, resta saber se a inibição do mesmo pelo SB225002 tem relação direta com a atividade anti-leucêmica da droga.

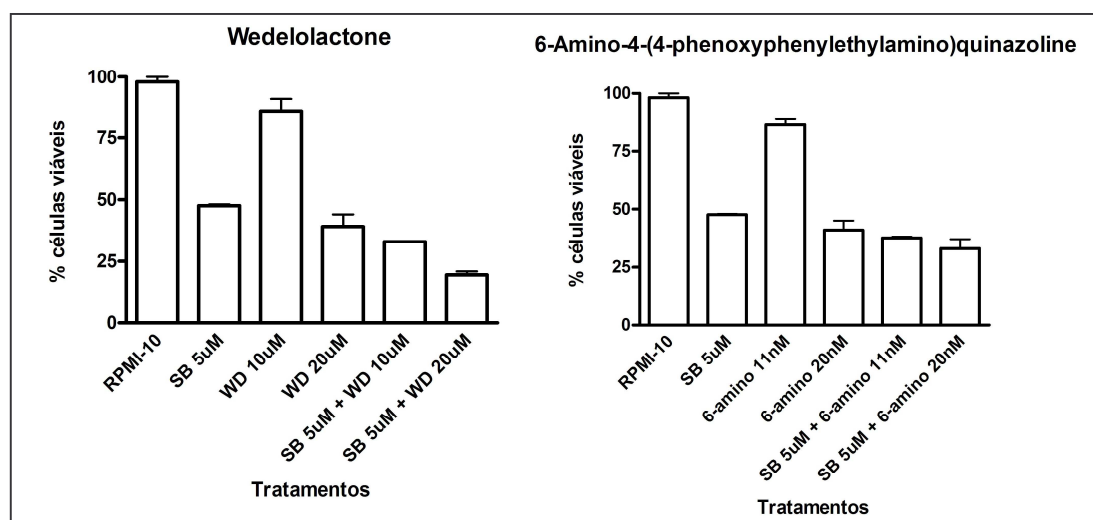


Figura 37 – Efeito de inibidores de NFκB na sobrevivência e proliferação de Jurkat. Os inibidores utilizados foram: Wedelolactone (10 e 20 μM) e 6-Amino-4-(4-phenoxyphenylethylamino)quinazoline (11 e 20 nM). A incubação foi realizada por 48 horas. RPMI-10 = RPMI-10% soro fetal bovino.

4.8.5. O processo de apoptose mediado por SB225002 é dependente da indução de *GLIPR1*

O gene *GLIPR1* foi detectado em vários tecidos humanos, tendo maior expressão observada em pulmão, testículo, medula óssea, próstata, bexiga e rim (108). Foi demonstrado que a hiper expressão de *GLIPR1* está associada ao aumento de morte celular em alguns tumores, como no câncer de próstata, onde a indução de apoptose foi associada à via dependente e independente de p53 (101). A indução de apoptose mediada pelo *GLIPR1* foi descrita como dependente de sinalização através da produção de espécies reativas de oxigênio, fosforilação de ASK1 e MEK4/7, e ativação da via de JNK (109).

A hiper expressão de *GLIPR1* induzida pelo tratamento com SB225002 foi confirmada por RQ-PCR e western blot (**Figura 38**). *GLIPR1* apresentou aumento de 6741 e 5603 vezes em relação ao controle após 6 e 9 horas de tratamento, respectivamente. Estes resultados mostram que o aumento da expressão de *GLIPR1* em 6 horas não está associado ao imediato aumento de tradução da proteína. Níveis elevados da proteína GLIPR1 foram detectados a partir de 9 horas de incubação de Jurkat com SB225002. Vale ressaltar que 9 horas foi o tempo de incubação associado ao início da detecção de morte celular (demonstrado anteriormente na **Figura 28**). Com estes resultados, foi possível sugerir que a indução de morte celular causada pelo SB225002 na LLA estava associada ao aumento da proteína GLIPR1.

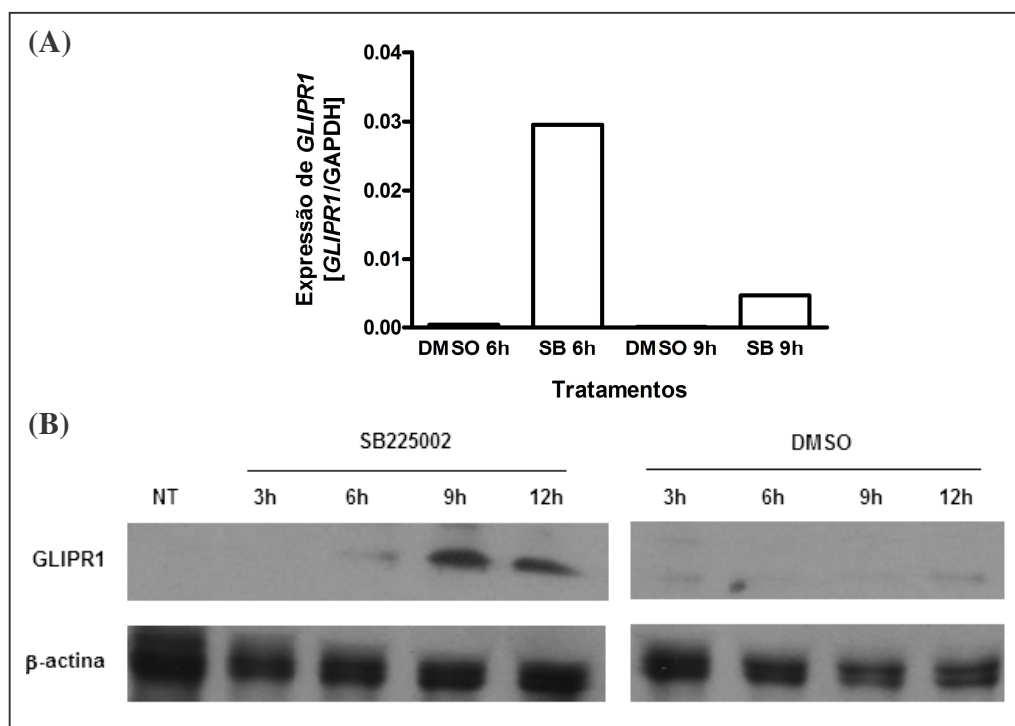


Figura 38 – Detecção de GLIPR1 em células de LLA (Jurkat) tratadas com SB225002 [20 μ M]. (A) RQ-PCR de amostras tratadas por 6 e 9 horas e (B) western blot de amostras tratadas por 3, 6, 9 e 12 horas. O controle dos tratamentos foi o DMSO (veículo). NT = não-tratado.

O *GLIPR1* tem efeitos inversos, dependendo do tipo de célula tumoral. No câncer renal e em tumores derivados de astrócitos, como o glioblastoma, tem-se a super expressão de *GLIPR1* associada a aumento da proliferação celular e invasividade tumoral. Nestas

células (glioma), o silenciamento de *GLIPR1* resulta em elevados níveis de apoptose (110). Contrariamente, em células de câncer de próstata, a expressão elevada de *GLIPR1*, induzida pela ligação direta de p53 ou por via independente de p53, está associada ao aumento de morte celular (101). Na LLA não foi encontrada diferença significativa no nível de expressão de *GLIPR1* comparada à medula óssea do grupo controle normal (111), demonstrando que na LLA o gene *GLIPR1* não está hiper expresso. O aumento da expressão do *GLIPR1* quando do tratamento com SB225002 conduziu este trabalho a sugerir que a ativação de *GLIPR1* na LLA exerceria papel na indução de apoptose, semelhante ao observado nas células de câncer de próstata.

Para estabelecer a associação entre o *GLIPR1* e o SB225002, células Jurkat de LLA-T foram infectadas com vetor lentiviral de expressão de shRNA contra *GLIPR1* seguido de tratamento com SB225002 [10, 20 e 100 μ M]. O silenciamento do gene *GLIPR1* em Jurkat com vetor lentiviral foi confirmado por RQ-PCR (**Figura 39**), tendo sido detectada uma redução na expressão de *GLIPR1* em relação aos controles *wild-type* e GFP, respectivamente, de 91% e 89% em Jurkat si75 e 73% e 71% em Jurkat si76.

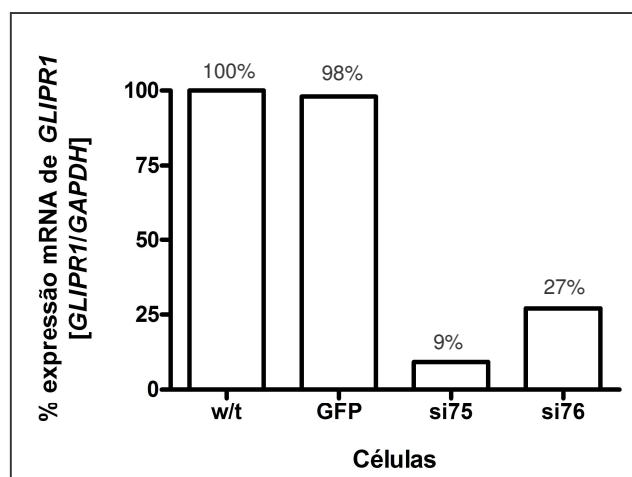


Figura 39 – Detecção de *GLIPR1* por RQ-PCR em linhagens celulares Jurkat *GLIPR1*-silenciada (Jurkat si75 e si76). w/t = Jurkat não-tratada; GFP = Jurkat infectada com vetor lentiviral GFP; si75 = Jurkat infectada com vetor lentiviral 75; si76 = Jurkat infectada com vetor lentiviral 76. Jurkat w/t corresponde a 100% de expressão. w/t = *wild type*.

As células Jurkat *GLIPR1*-silenciadas foram resistentes a ação do SB225002 (**Figura 40**). Este resultado demonstra, pela primeira vez, o papel do *GLIPR1* na indução de apoptose mediada pelo SB225002.

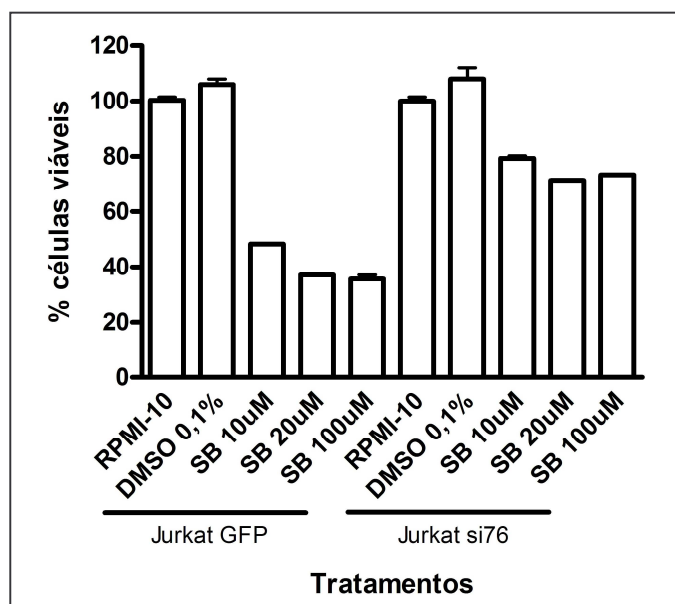


Figura 40 – Efeito do SB225002 [10, 20 e 100 μ M] na sobrevivência e proliferação das células Jurkat silenciadas com o shRNA si76 (Sigma-Aldrich) contra *GLIPR1*. Dados semelhantes foram obtidos com Jurkat silenciada com o shRNA 75 (si75, Sigma-Aldrich). O controle de infecção lentiviral foi realizado com vetor sh-GFP (Jurkat GFP). A incubação foi realizada por 48 horas e os controles foram RPMI-10% soro fetal bovino (RPMI-10) e DMSO 0,1%. SB = SB225002.

Com o objetivo de avaliar a dependência da indução de morte mediada pelo SB225002 à expressão de *GLIPR1*, as linhagens 786-O e A498 de câncer renal (que apresentam alta expressão de *GLIPR1*) e a linhagem DU-145 de câncer de próstata (que apresenta baixa expressão de *GLIPR1*) foram testadas quanto a sensibilidade ao SB225002 [10 a 100 μ M]. As células de câncer renal, onde o *GLIPR1* induz proliferação, mostraram-se resistentes a ação do SB225002. Contrariamente, as células de câncer de próstata, onde a hiper expressão de *GLIPR1* está associada ao aumento de morte celular, foi sensível a ação do SB225002 (**Figura 41**). Este é um achado importante, pois demonstra que a indução de morte celular mediada pelo SB225002 e *GLIPR1* dependente é um processo que não ocorre

apenas na LLA, mas também em outros tumores, e sugere que este mecanismo não seja restrito a tipos tumorais específicos.

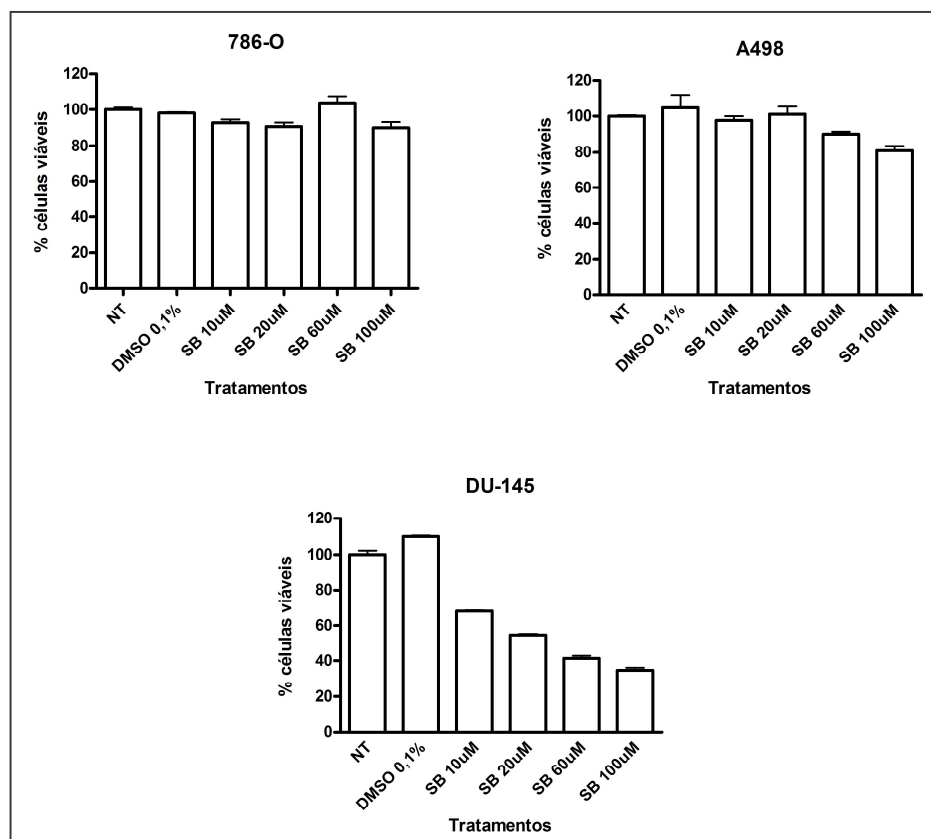


Figura 41 – Efeito do SB225002 [10, 20, 60 e 100 µM] na sobrevivência e proliferação das linhagens celulares de câncer renal (786-O e A498) e câncer de próstata (DU-145). A incubação foi realizada por 48 horas e os controles foram RPMI-10% soro fetal bovino (RPMI-10) e DMSO 0,1%. SB = SB225002.

4.8.6. SB225002 ativa ERK 1/2

Para preescrutar os efeitos intracelulares do SB225002 em termos de transdução de sinal, células Jurkat foram tratadas com SB225002 e analisadas quanto à ativação de JNK/SAPK e da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) p38 através de ensaio de quinase. Nos ensaios realizados, não foi detectada atividade quinase de JNK ou da MAPK p38 (**Figura 42**).

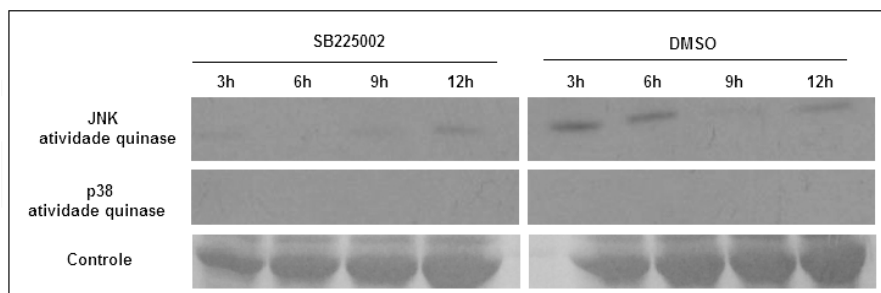


Figura 42 – Detecção da atividade quinase de JNK e da MAPK p38 em células Jurkat tratadas com SB225002 [20 μM] e DMSO (controle). O controle corresponde a quantidade de proteína aplicada em cada gel, verificado após transferência e coloração da membrana com *Ponceau*.

Por outro lado, células de LLA tratadas com SB225002 apresentaram indução da fosforilação de MEK1/2 e ERK1/2 (p44/42) após 6 horas de tratamento (**Figura 43A**). O efeito do SB225002 sobre a via MEK/ERK foi confirmado por detecção de atividade enzimática (quinase), como observado na **Figura 43B**.

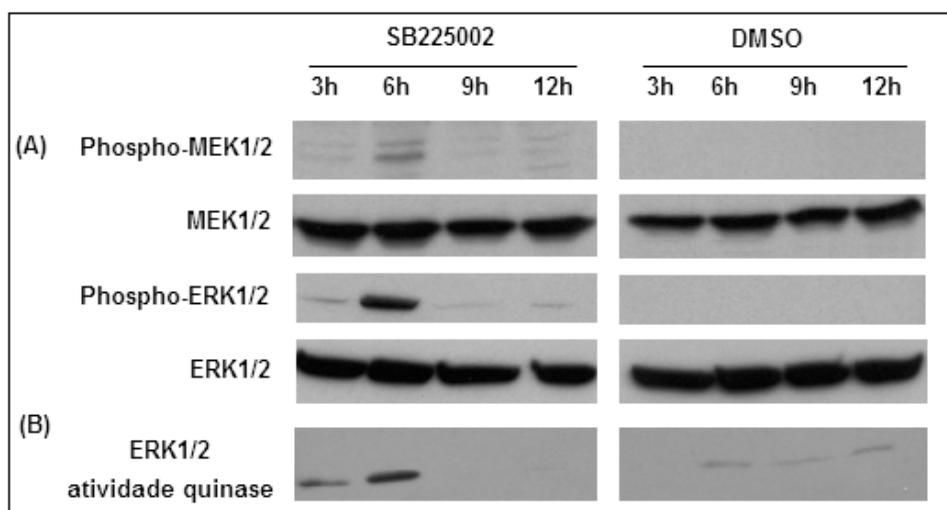


Figura 43 – (A) Detecção por western blot de *Phospho*-MEK1/2, MEK 1/2, *Phospho*-ERK1/2 e ERK1/2 em células Jurkat tratadas com SB225002 [20 μM] e DMSO (controle). (B) Detecção da atividade quinase de ERK1/2 em células Jurkat tratadas com SB225002 [20 μM] e DMSO (controle).

De posse dessa informação, células Jurkat foram tratadas com inibidores de MEK-ERK em conjunto com SB225002. Como mostra a **Figura 44**, dois dos inibidores de MEK-ERK testados [*3-(2-Aminoethyl)-5-((4-ethoxyphenyl)methylene)-2,4-thiazolidinedione* e U0126] mostraram efeito antileucêmico nas células tratadas com SB225002. Quanto ao mecanismo de inibição destas moléculas, *3-(2-Aminoethyl)-5-((4-ethoxyphenyl)methylene)-2,4-thiazolidinedione* liga-se preferencialmente a ERK2, U0126 liga-se a MEK1 e MEK2, e PD98059 liga-se a MEK1. Além disso, U0126 comparado a PD98059 demonstra maior afinidade de ligação a MEK1. A ausência de efeito quando da utilização de PD98059 pode indicar que a afinidade de ligação deste inibidor a MEK1 não foi suficiente para bloquear completamente, ao longo do tempo experimental, a fosforilação de MEK1.

Como mostrado na **Figura 43**, a ativação (fosforilação) de MEK-ERK ocorreu mais fortemente após 6h. Esse resultado em conjunto com os dados da **Figura 44** indica que a via MEK-ERK é ativada na leucemia como forma de resistir ao stress provocado pelo SB225002, ou seja, não é uma via que media o efeito do SB225002, mas ao contrário, uma via de mecanismo compensatório da célula aos efeitos provocados pelo SB225002. A ativação de MEK-ERK é um achado importante e sugere que inibidores específicos de MEK-ERK [como, por exemplo, *3-(2-Aminoethyl)-5-((4-ethoxyphenyl)methylene)-2,4-thiazolidinedione* e U0126] possam ser utilizados para a amplificação da indução de morte celular mediada pelo SB225002.

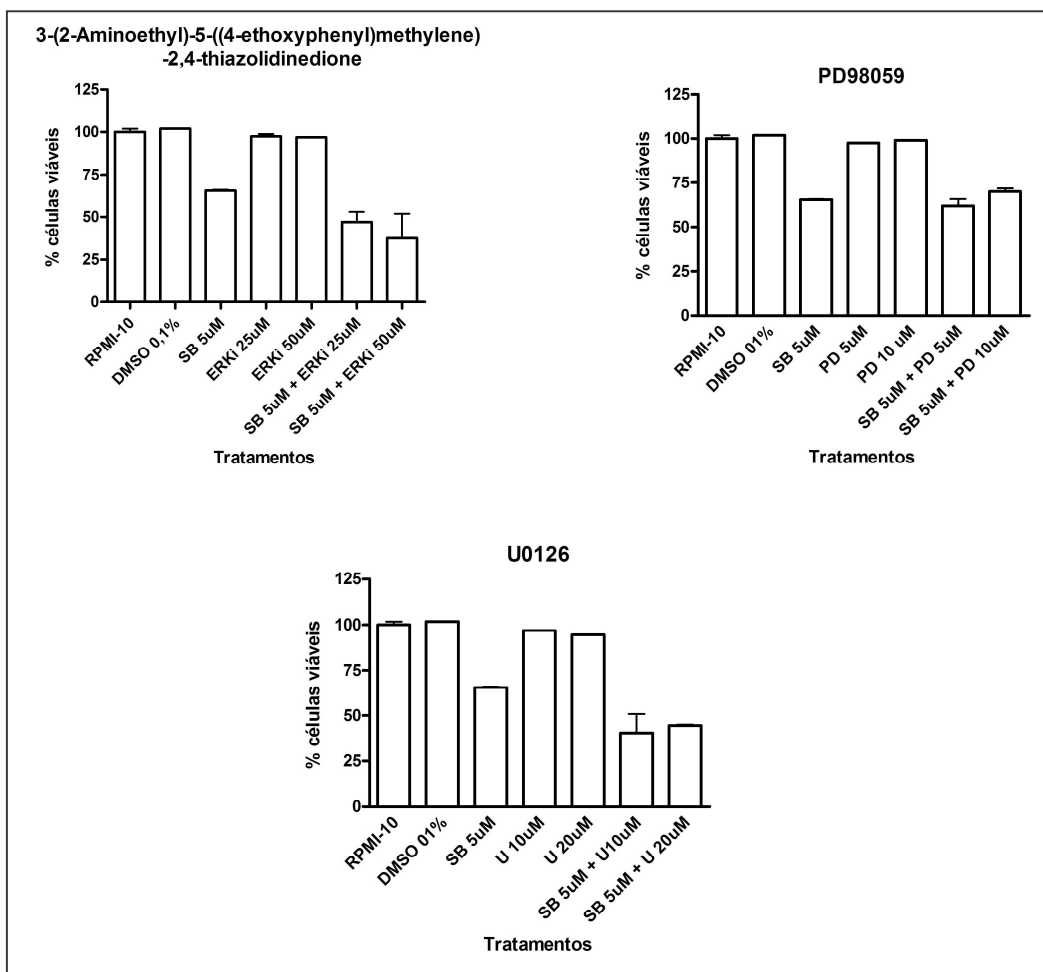


Figura 44 – Efeito do SB225002 [5 μM] associado a inibidores de MEK-ERK na sobrevivência e proliferação da linhagem celular Jurkat. A incubação foi realizada por 48 horas e os controles foram RPMI-10% soro fetal bovino (RPMI-10) e DMSO 0,1%. SB = SB225002; ERKi = 3-(2-Aminoethyl)-5-((4-ethoxyphenyl)methylene)-2,4-thiazolidinedione; PD = PD98059 e U = U0126.

5. DISCUSSÃO

A evolução do câncer depende da interação do tumor com o contexto celular do hospedeiro (microambiente tumoral). Esta interação é recíproca: o tumor estimula o seu microambiente e este último potencializa a sobrevivência, proliferação e invasividade tumoral. As células do estroma da medula óssea (MO) favorecem a sobrevivência e resistência da leucemia linfóide aguda (LLA) contra os quimioterápicos. Ainda não se conhecem todas as moléculas e mecanismos pelos quais o microambiente é estimulado e colabora com a progressão e proteção das células de LLA alojadas na medula. Neste estudo foi fornecida evidência de que as células do estroma da MO quando estimuladas pela LLA apresentam um perfil de resposta pró-inflamatória, através da ativação de diversos genes do grupo de resposta inflamatória e da via de sinalização do *NFκB*, que tem importante papel no sistema imune e também na indução de sobrevivência, apoptose, invasão e metástase no microambiente tumoral (112). A ativação constitutiva da via do *NFκB* foi descrita anteriormente em diferentes tipos câncer, incluindo na leucemia linfóide crônica e mieloma múltiplo, e representa para a leucemia uma etapa fundamental no processo de escape aos estímulos pró-apoptóticos no microambiente tumoral (113).

Diversos fatores secretados pelas células do estroma da MO podem beneficiar de direta ou indiretamente as células da LLA. O estudo do microambiente tumoral e a identificação de moléculas mediadoras da interação do tumor com o microambiente circundante podem permitir, por exemplo, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. No presente estudo, foram estudadas em mais detalhes duas moléculas solúveis secretadas pelo estroma da MO quando estimulado pela LLA, sendo elas: CCL2 e IL-8.

Os resultados demonstraram que o microambiente da MO é rico em CCL2 e IL-8. Além disso, que as células do estroma do microambiente leucêmico são uma das fontes de secreção destas quimiocinas. Os resultados de microarranjos de DNA demonstraram que *CCL2* e *IL-8* estavam entre os cinco fatores secretados mais expressos (com maior *fold change*) do agrupamento de genes de resposta inflamatória. As células do estroma da medula óssea normal também secretam quantidades importantes de CCL2 (106,8 ng/ml) e IL-8 (500,2 ng/ml), dentre outras quimiocinas (16). A LLA também expressa *CCL2* e *IL-8*, detectados por RT-PCR na maioria dos casos analisados neste estudo e, confirmando dados

da literatura relativos à expressão de IL-8 por linfoblastos (46). Considerando que a MO leucêmica é praticamente dominada por blastos leucêmicos, estes devem contribuir significativamente para a quantidade final de moléculas secretadas no microambiente.

Descobertas clínicas preliminares sugerem que a IL-8 pode ter um papel na patofisiologia da LLA. Os níveis de proteína plasmática da IL-8 e a expressão de transcritos da *IL-8* por blastos leucêmicos foram associados a um pior prognóstico na LLA do adulto (48, 49, 114), porém, a biologia e progressão da LLA em adultos diferem da LLA pediátrica o que dificulta a extrapolação dos resultados. Os níveis plasmáticos da IL-8 na LLA foram associados com pior evolução clínica na leucemia linfóide crônica (47) e, foram detectadas concentrações menores de IL-8 em pacientes com LLA fora de terapia a 1, 6, 9 e 12 meses quando comparados ao grupo controle (115). Além disso, Wu *et al.* (74) analisaram os níveis de expressão de *IL-8* por PCR quantitativa na LLA em recaída e não encontraram diferenças significativas entre os grupos de pacientes e a sobrevida global ou livre de eventos. Neste estudo não foram encontradas associações entre os níveis de IL-8 na MO leucêmica e o prognóstico dos pacientes.

Eisenkraft *et al.* (30) detectaram CCL2 no líquor de crianças com LLA, demonstrando um aumento significativo na quantidade de CCL2, no decorrer do tratamento, nos pacientes com envolvimento de SNC comparados aos pacientes sem envolvimento de SNC. Neste trabalho, não foi encontrada a associação de CCL2 com a presença de blastos no LCR ao diagnóstico, provavelmente, devido ao pequeno número de casos positivos (8 em 105 casos analisados).

Não existem relatos anteriores da associação de CCL2 e o seguimento de pacientes com LLA. Neste trabalho, com um limitado número de pacientes, foi encontrado que o grupo de pacientes de baixo risco (pacientes estratificados segundo os critérios do protocolo GBTLI-99) com maiores níveis de CCL2 na MO teve uma tendência a pior evolução clínica.

Foram detectados neste estudo a expressão de transcritos dos receptores *CCR2b*, *CXCR1* e *CXCR2* nos blastos leucêmicos, o que poderia permitir que a leucemia se beneficiasse dos elevados níveis de CCL2 e IL-8 do microambiente leucêmico. Não existe um consenso quanto à expressão de receptores de quimiocinas pela LLA. Na amostra de pacientes analisada neste trabalho foi encontrada em um grande número de casos uma

expressão fraca de CCR2 na superfície celular por citometria de fluxo, contradizendo dados anteriores de Corcione *et al.* (31), que detectaram na LLA-B a presença de CXCR1, CXCR2 e CXCR3 e, consideraram a LLA negativa para CCR1, CCR2, CCR5 e CCR6. Wu *et al.* (46) detectaram a expressão dos receptores *CXCR1* e *CXCR2* em linfoblastos por PCR quantitativa. Os baixos níveis de expressão bem como, as diferenças dos anticorpos utilizados podem contribuir para estas diferenças.

Em leucócitos de amostras normais foi demonstrado que CCL2 pode afetar numerosos mensageiros secundários, ativando tirosinas quinases, induzindo mudanças no cálcio intracelular, ativando MAPKs p42/44-p38-JNK, entre outros (116). Este estudo demonstra que as células da LLA, apesar de expressarem transcritos para os receptores de CCL2 e IL-8, não se beneficiam diretamente da secreção destas quimiocinas no microambiente. Os ensaios *in vitro* de proliferação/sobrevivência, migração e ativação das vias de transdução de sinal são as principais evidências desta afirmativa.

A hematopoese normal é regulada através de complexas interações de fatores e mecanismos. Citocinas e quimiocinas são responsáveis por promover estímulos de proliferação e sobrevivência na hematopoese normal (revisado na ref. 117). Algumas destas moléculas inibem a proliferação de precursores hematopoéticos normais e agem como quimiocinas supressoras. CCL2 e IL-8 são descritos como inibidores de progenitores mielóides, afetando a hematopoese normal (118-122). Considerando que os efeitos inibitórios destas quimiocinas não desempenham papel nas células da LLA, os elevados níveis destas quimiocinas no microambiente da MO leucêmica pode conferir vantagem seletiva para as células da LLA comparadas às células normais da MO. Deste modo, a expressão de CCL2 e IL-8 pode desempenhar papel inibindo a hematopoese normal, o que pode favorecer indiretamente a LLA.

Além disso, foram mostradas evidências de que CCL2 e IL-8 promovem a sobrevivência das células mesenquimais da MO em meio de cultura sem soro e, estimulam a proliferação das células mesenquimais em meio com quantidades limitadas de soro. Estes resultados corroboram o benefício indireto obtido pelas células leucêmicas dos níveis elevados de CCL2 e IL-8 do microambiente e reforçam o importante papel destas quimiocinas no contexto do microambiente tumoral.

As células mesenquimais da MO estimuladas pela LLA em sistema de co-cultura apresentaram, na análise de microarranjos descrita neste trabalho, ativação das quimiocinas *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL5*, *CXCL6* e *IL-8*, ligantes do receptor CXCR2. Dada a convergência de ligantes do receptor CXCR2 ativados, foi sintetizado e avaliado o efeito de uma molécula antagonista do CXCR2, conhecida por SB225002 (N-(2-hydroxy-4-nitrophenyl)-N'-(2-bromophenyl)urea), segundo método descrito por White *et al.* (78). A avaliação de novas moléculas que causem impacto no microambiente da MO leucêmica é de extrema importância, visto que de 20 a 30% das crianças com LLA sofrem recaída da doença. As células de LLA da recaída fazem parte da mesma população de células encontrada ao diagnóstico, porém apresentam maior resistência aos quimioterápicos e por isso, as crianças que recaem da doença dificilmente são curadas, apresentando sobrevida global estimada em 40%.

A avaliação do SB225002 foi realizada em linhagens de células da LLA e demonstrou resultados relevantes nestas células. O SB225002 induziu morte celular ($IC_{50} \sim 20 \mu M$) preferencialmente em células na fase G1 do ciclo celular. O SB225002 foi descrito por White *et al.* (78) como antagonista específico do receptor CXCR2. Apenas recentemente, um resumo apresentado em conferência internacional (The Society of Biomolecular Sciences Conference, 2007) descreveu receptores alternativos ao CXCR2 para o SB225002. Este estudo havia também detectado indiretamente a existência de receptor alternativo ao CXCR2 envolvido no mecanismo de ação do SB225002. A evidência indireta demonstrada foi que células da LLA que não expressavam transcritos do receptor CXCR2 também foram sensíveis à ação do SB225002, a saber: Nalm6 (LLA-B), CEM e Molt-4 (LLA-T). Dentre os receptores alternativos descritos na literatura e com expressão de transcritos detectada na LLA neste estudo, foram analisados em ensaios *in vitro* os receptores da histamina e dos canabinóides, ambos descritos como receptores funcionais na LLA (89-90).

Até o momento, foram descritos quatro receptores da histamina, denominados H1 a H4. Os receptores H1 e H2 são expressos em monócitos, linfócitos B e T, entre outras células, estando envolvidos em manifestações biológicas às reações alérgicas e atividades de supressão da histamina, respectivamente (123). O receptor H3 está principalmente envolvido em funções cerebrais (tem baixa expressão em tecidos além do sistema nervoso central) e, o receptor H4, expresso em mastócitos, células T e precursores hematopoéticos,

tem função associada a processos inflamatórios, hematopoese e imunidade (123). Pouco se sabe sobre a funcionalidade da histamina na LLA. Malaviya e Uckun (91) detectaram a histamina por ELISA em casos de LLA-B e sugeriram sua ação como um regulador autócrino da proliferação celular na LLA. Além disso, foi descrito que as linhagens celulares Jurkat e CEM (LLA-T) não respondem a histamina, mas morrem na presença da difenidramina, um antagonista do receptor H1 da histamina, sugerindo o papel da histamina na regulação da sobrevivência das células leucêmicas (89). Outro achado interessante é que a linhagem de células Jurkat não responde a antagonista do receptor H2 (124). Neste estudo, a histamina associada a sub-dose de SB225002 apresentou efeito aditivo, sugerindo que os receptores da histamina não desempenham um papel na indução de apoptose mediada pelo SB225002.

Os canabinóides exercem uma série de efeitos fisiológicos e farmacológicos em humanos através da interação com algum de seus receptores funcionais, sendo eles: CNR1 e CNR2. O tetraidrocanabinol, o principal composto psicoativo da *Cannabis*, foi descrito como indutor de apoptose através da translocação de citocromo c mitocondrial e ativação de caspase-3 (92) e também como indutor das vias da proteína quinase B (PKB) e fosfoinositol-3 quinase (PI3K) e, da translocação de Raf-1 para membrana e fosforilação de p44/42 ERK em células de câncer de próstata PC-3 (125). As linhagens de células de leucemia CEM (LLA-T), HEL-92 (leucemia eritroblástica) e HL-60 (leucemia mielóide) apresentam ambos os receptores dos canabinóides funcionais e são induzidas a apoptose em resposta ao tetraidrocanabinol (90). Além disso, em Jurkat (LLA-T) o tratamento com tetraidrocanabinol causou a liberação de citocromo c e a clivagem das caspases-8, -9, -2, -10, e Bid, demonstrando ao menos parte do mecanismo de indução de apoptose mediado pelo tetraidrocanabinol na LLA (94).

No presente estudo os receptores CNR1 e CNR2 foram detectados na LLA, independente do tratamento com SB225002. O antagonista do receptor CNR1 - AM251 - demonstrou um efeito aditivo quando associado ao SB225002 enquanto o antagonista de CNR2 - AM630 - demonstrou efeito sinérgico, especialmente na associação de AM630 [1 µM] com SB225002 [5 µM]. Além disso, foi demonstrado que o estímulo de Jurkat com SB225002 ativou a via de *phospho*-p44/42 ERK, que também foi demonstrada por Sanchez *et al.* (125) e Powles *et al.* (90) como resposta celular da LLA ao tetraidrocanabinol. Em

conjunto estes resultados sugerem que o efeito citotóxico do SB225002 seja mediado pela ativação do receptor CNR2 dos canabinóides.

Para a investigação da resposta da LLA ao tratamento com SB225002 foi analisada a mudança no perfil de expressão gênica da LLA tratada em dois tempos de incubação, 6 e 9 horas. Embora a morte induzida pelo SB225002 tenha sido observada após 9 horas de tratamento das células, o tempo de incubação 6 horas também foi selecionado para investigar mudanças iniciais causadas pelo SB225002 e, não apenas mudanças inespecíficas associadas com a indução de apoptose. Esta investigação revelou modulação das vias de *Jun*, *TNF α* , *NF κ B* e *p53* em resposta ao tratamento com SB225002. O SB225002 consistentemente inibiu a via de *TNF α* e ativou as vias de *Jun* e *p53*.

A via de Jun está envolvida tanto na indução de apoptose, quanto na proteção da célula contra a apoptose induzida por outras vias (97). A quinase c-Jun pode ser ativada pelo TNF α através de um sistema de mensageiro secundário, que também pode ativar a via do NF κ B (97). Tanto c-Jun quanto NF κ B são considerados fatores de transcrição de resposta a stress e que governam a expressão de uma variedade de genes pró-inflamatórios e citotóxicos (98). Na via de *Jun* destacou-se também a ativação do gene *BACH2*, um fator de transcrição associado à indução de apoptose em resposta a stress oxidativo. A ativação de ambos *Jun* e *BACH2* foi confirmada por RQ-PCR em amostras de linhagem de LLA tratadas com SB225002.

Uma resposta inibitória foi detectada em vários genes afetados pela via do *TNF α* , que está envolvida na regulação de diversos processos biológicos, entre eles proliferação celular, diferenciação, apoptose, metabolismo de lipídios, e coagulação. Além disso, *TNF α* é um dos efetores da via do *NF κ B* (99), que também apresentou alvos inibidos em resposta ao tratamento com SB225002. NF κ B é um fator de transcrição com amplo espectro de funções celulares, entre eles inflamação, diferenciação, proliferação e apoptose. Em linhagens de células de diferentes tumores, a inibição da via do NF κ B também foi associada à ativação de *c-Jun NH₂-terminal kinase* (JNK) e a indução destas células a apoptose (100).

Na via de *TNF α* destacou-se a inativação de *CX3CR1*. CX3CL1 é o ligante do receptor CX3CR1 e atua na quimiotaxia e como molécula de adesão de monócitos e células *natural killer*, constituintes da resposta imune inata (126). O mecanismo de adesão de

CX3CL1 é importante no microambiente tumoral e ocorre através da ligação do CX3CL1 ancorado a membrana à superfície das células que expressam CX3CR1, favorecendo a comunicação entre células tumorais e células vasculares endoteliais (104). O receptor CX3CR1 foi associado ao direcionamento de células de câncer de próstata e mama a sítios específicos durante o processo de metástase (127, 128) e, teve hiper expressão detectada em vários subtipos de linfoma de células B (129).

Os resultados de microarranjos de DNA apresentados demonstraram a inibição de *TNF α* , *CX3CR1* e *NF κ B* como eventos celulares iniciais de resposta ao SB225002. A inibição de *CX3CR1* em resposta ao SB225002 foi confirmada por RQ-PCR e western blot nesta tese. A expressão de CX3CR1 foi descrita como regulada por *TNF α* (106). Além disso, foi descrito um *looping* autócrino de regulação e ativação de *TNF α* , CX3CL1 e *NF κ B* (106). A inativação de *TNF α* e o efeito do tratamento com SB225002 em outros genes efetores da via de *NF κ B* (a saber, *IL-1* e *CX3CL1*) foi analisado por RQ-PCR neste estudo, tendo sido demonstrada a inibição da via de *NF κ B* após 6 horas de tratamento. Os resultados indicaram que o SB225002 é capaz de bloquear apenas temporariamente a ativação desta via, pois tanto o *IL-1* quanto o *CX3CL1* não apresentaram inibição após 9 horas de tratamento. Além disso, o uso de inibidores da via de *NF κ B* associado ao SB225002 não demonstrou efeito sinérgico. Assim, apesar da resposta inibitória detectada após 6 horas de tratamento, foi descartada a hipótese de que a inibição da via do *NF κ B* seria uma das respostas celulares mediadoras da morte celular induzida pelo SB225002.

A partir do ensaio de microarranjo de DNA da LLA tratada com SB225002 também foi detectada a ativação da via de *p53*, que está envolvida na resposta celular a stress, regulando genes que induzem apoptose, senescência, reparo do DNA, parada do ciclo celular, entre outros. Dentre os genes ativados por *p53* se destacou pelo elevado valor de *fold change* o gene *GLIPR1*. O *GLIPR1* foi detectado em vários tecidos humanos, tendo maior expressão observada em pulmão, testículo, medula óssea, próstata, bexiga e rim (108). O aumento da expressão de *GLIPR1* está associado ao aumento de morte celular em alguns tumores (101), a saber, no câncer de próstata, onde a indução de apoptose foi associada a vias dependente e independente de *p53* (101). A *GLIPR1* tem efeitos inversos, dependendo do tipo de célula tumoral. No câncer renal e em tumores derivados de astrócitos, como o glioblastoma, tem-se superexpressão de *GLIPR1*, associada a aumento

da proliferação celular e invasividade tumoral. Nestas células (glioma), o silenciamento de *GLIPRI* resulta em elevados níveis de apoptose (110). Contrariamente, em células de câncer de próstata, a expressão elevada de *GLIPRI*, induzida pela ligação direta de p53 ou por via independente de p53, está associada ao aumento de morte celular (101). Na LLA não foi encontrada diferença significativa no nível de expressão de *GLIPRI* comparada à medula óssea do grupo controle normal (111).

A ativação de *GLIPRI* foi confirmada por RQ-PCR e western blot neste estudo e o silenciamento de *GLIPRI* em célula Jurkat, que resultou em uma célula resistente a ação do SB225002, demonstram, pela primeira vez, que a indução de morte mediada pelo SB225002 é dependente da ativação de *GLIPRI*. Além disso, as células de duas linhagens de câncer renal, tumor que hiper expressa *GLIPRI*, foram resistentes a ação do SB225002 e as células de uma linhagem de câncer de próstata, tumor que hipo expressa *GLIPRI*, foi sensível a ação do SB225002, sugerindo que a dependência da indução de morte mediada pelo SB225002 à ativação de *GLIPRI* é um mecanismo não restrito a tipos tumorais específicos.

A indução de apoptose mediada pelo *GLIPRI* foi descrita como dependente de sinalização através da produção de espécies reativas de oxigênio, fosforilação de ASK1 e MEK4/7, e ativação da via de JNK (109). Os resultados obtidos com o SB225002 não detectaram a ativação da via de JNK bem como, da MAPK p38 de modo que este trabalho sugere a existência de outros mecanismos associados à morte celular mediada pelo *GLIPRI*.

No entanto, o envolvimento da via de MAPK foi detectado em resposta ao SB225002, através da fosforilação e atividade de p44/42 ERK. As ERK quinases são, na sua maioria, associadas à ativação de fatores de crescimento e envolvidas na ativação do processo de mitose. No entanto, a ativação de ERK pode resultar tanto em sinais anti- quanto pró-apoptóticos, dependendo do estímulo e do tipo celular (130). Neste estudo, os resultados obtidos sugerem que a via MEK-ERK é ativada na LLA como forma de resistir ao stress provocado pelo SB225002, não sendo uma via que media o efeito de apoptose do SB225002, mas ao contrário, um mecanismo compensatório da célula a indução de apoptose.

De modo semelhante a este estudo, a inibição de p44/42 ERK foi associada à amplificação da morte celular induzida pelo *phenylbenzo-gama-pyrone-derivative quercetin 3-methyl ether tetracetate* na linhagem de leucemia mielóide HL-60 e na linhagem celular U937 (131). Os resultados desta tese com o uso de inibidores específicos da via MEK-ERK sugerem que alguns destes inibidores possam ser utilizados para a amplificação do sinal de morte celular mediada pelo SB225002.

Em síntese, os resultados alcançados indicam que a LLA expressa os receptores *CCR2* e *CXCR1/CXCR2*, porém não responde a CCL2 ou IL-8. Este fato pode representar uma vantagem para a LLA em relação às demais células do sangue, pois é sabido que o CCL2 e a IL-8 inibem a hematopoese normal. Além disso, foi verificado que a CCL2 e a IL-8 promovem a sobrevivência e proliferação de células mesenquimais e células endoteliais da MO, de cujo suporte depende a LLA. Neste sentido, foi encontrado que pacientes do grupo de baixo risco, com maiores níveis de CCL2 no plasma da MO, apresentam tendência a uma pior evolução clínica. Foi também detectado que o SB225002, antagonista do receptor CXCR2 da IL-8, promove morte das linhagens de LLA, mas que nem todas as linhagens de LLA sensíveis ao SB225002 expressavam transcritos para o receptor *CXCR2*. Neste sentido, foram avaliados como receptores alternativos ao *CXCR2*, os receptores da histamina e dos canabinóides, ambos descritos como ativos na LLA, tendo sido detectado que o receptor CNR2 dos canabinóides está envolvido no processo de resposta celular ao SB225002. Outros resultados importantes com relação ao mecanismo de ação do SB225002 foram: (i) a ativação de *GLIPR1*, evidenciando que o mecanismo de morte induzido pelo SB225002 é *GLIPR1*-dependente, e (ii) a ativação de MEK-ERK como via de resistência a indução de apoptose mediada pelo SB225002.

6. CONCLUSÕES

- As células mesenquimais da medula óssea quando estimuladas pela LLA apresentam um perfil pró-inflamatório.
- A medula leucêmica é rica nas quimiocinas pró-inflamatórias CCL2 e IL-8.
- A LLA expressa os receptores *CCR2*, *CXCR1* e *CXCR2*, porém não responde a CCL2 e IL-8.
- CCL2 e IL-8 promovem a sobrevivência e proliferação de células mesenquimais da medula óssea.
- O SB225002 induz morte de linhagens de células da LLA.
- O mecanismo de ação do SB225002 implica as vias de *TNF α* , *JUN* e *p53*.
- O *GLIPR1* é efector do mecanismo de morte induzido pelo SB225002 na LLA.
- A ativação de MEK-ERK é uma resposta de resistência da célula a indução de apoptose mediada pelo SB225002.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(1):46-54.
- 2- Liu Y, Hernandez AM, Shibata D, Cortopassi GA. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(19):8910-4.
- 3- Limpens J, Stad R, Vos C, de Vlaam C, de Jong D, van Ommen GJ, et al. Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood*. 1995;85(9):2528-36.
- 4- Bose S, Deininger M, Gora-Tybor J, Goldman JM, Melo JV. The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood*. 1998;92(9):3362-7.
- 5- Black WC, Welch HG. Advances in diagnostic imaging and overestimations of disease prevalence and the benefits of therapy. *N Engl J Med*. 1993;328(17):1237-43.
- 6- Mueller MM, Fusenig NE. Friends or Foes – bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature Rev*. 2004;4:839-49.
- 7- Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*. 2001;411(6835):375-9.
- 8- Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. *Hematologia: Fundamentos e Prática*. São Paulo: Atheneu, 2004.
- 9- Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2004;350(15):1535-48.
- 10- Pui CH, Robison LL, Look TA. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008;371:1030-43.
- 11- Uckun FM, Sensel MG, Sather HN, Gaynon PS, Arthur DC, Lange BJ, et al. Clinical significance of translocation t(1;19) in childhood acute lymphoblastic leukemia in the context of contemporary therapies: a report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol*. 1998;16(2):527-35.
- 12- Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 1998;339(9): 605-15.
- 13- Falcão RP, Rego EM. Leucemia linfóide aguda em adultos e crianças - características morfológicas e imunofenotípicas. *Ser Monogr Esc Bras Hematol*. 2002; 9:25-35.

- 14- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al, eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC, 2008.
- 15- Abbas AK, Pober JS, Lichtman AH. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Revinter; 2002. p. 235-69.
- 16- Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells*. 2006;24:1030-41.
- 17- Struyf S, Schutyser E, Gouwy M, Gijsbers K, Proost P, Benoit Y, et al. PARC/CCL18 is a plasma CC chemokine with increased levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol*. 2003;163(5):65-2075.
- 18- Posner LJ, Miligkos T, Gilles JA, Carnes DL, Taddeo DR, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 induces monocyte recruitment that is associated with an increase in numbers of osteoblasts. *Bone*. 1997;21(4):321-7.
- 19- Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997;90(3):909-28.
- 20- Craig MJ, Loberg RD. CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) in cancer bone metastases. *Cancer Metastasis Rev*. 2006;25:611-19.
- 21- Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, et al. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood*. 2000;96(1):34-40.
- 22- Conti I, Rollins BJ. CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer. *Semin Cancer Biol*. 2004;14(3):149-54.
- 23- Charo IF, Myers SJ, Herman A, Franci C, Connolly AJ, Coughlin SR. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci*. 1994;91:2752-56.
- 24- Graves DT, Jiang Y. Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995;6(2):109-18.
- 25- Tilton B, Ho L, Oberlin E, Loetscher P, Baleux F, Clark-Lewis I, et al. Signal Transduction by CXC Receptor Stromal Cell-derived Factor 1 Stimulates Prolonged Protein Kinase B and Extracellular Signal-regulated Kinase 2 Activation in T Lymphocytes. *Exp Med*. 2000;192(3):313-24.

- 26- Wong LM, Myers SJ, Tsou CL, Gosling J, Arai H, Charo IF. Organization and differential expression of the human monocyte chemoattractant protein 1 receptor gene. Evidence for the role of the carboxyl-terminal tail in receptor trafficking. *J Biol Chem*. 1997; 272(2):1038-45.
- 27- Graves DT, Jiang Y, Valente AJ. Regulated expression of MCP-1 by osteoblastic cells in vitro and in vivo. *Histol Histopathol*. 1999;14(4):1347-54.
- 28- Loberg RD, Day LL, Harwood J, Ying C, St John LN, Giles R, et al. CCL2 is a potent regulator of prostate cancer cell migration and proliferation. *Neoplasia*. 2006;8(7):578-86.
- 29- Mazur G, Wrobel T, Butrym A, Kapelko-Slowik K, Poreba R, Kuliczowski K. Increased monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1/CCL2) serum level in acute myeloid leukemia. *Neoplasma*. 2007;54(4):285-9.
- 30- Eisenkraft A, Keidan I, Bielorai B, Keller N, Toren A, Paret G. MCP-1 in the cerebrospinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2006;30:1259-61.
- 31- Corcione A, Arduino N, Ferretti E, Pistorio A, Spinelli M, Ottonello L, et al. Chemokine receptor expression and function in childhood acute lymphoblastic leukemia of B-lineage. *Leuk Res*. 2006;30:365-72.
- 32- Wong SWJ, Fulcher DA. Chemokine Receptor Expression in B-cell Lymphoproliferative Disorders. *Leuk & Lymphoma*. 2004;45(12):2491-6.
- 33- Govindaraju V, Michoud M, Al-Chalabi M, Ferraro P, Powell WS, Martin JG. Interleukin-8: novel roles in human airway smooth muscle cell contraction and migration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;291: C957–C965.
- 34- Tobler A, Moser B, Dewald B, Geiser T, Studer H, Baggiolini M, et al. (1993). Constitutive expression of interleukin-8 and its receptor in human myeloid and lymphoid leukemia. *Blood*. 1993;82(8):2517-25.
- 35- Harada A, Mukaida N, Matsushima K. Interleukin 8 as a novel target for intervention therapy in acute inflammatory diseases. *Mol Med Today*. 1996;2(11):482-9.
- 36- Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science*. 1991;253(5025):1278-80.
- 37- Murphy PM, Tiffany HL. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science*. 1991;253(5025):1280-3.

- 38- Chuntharapai A, Kim KJ. Regulation of the expression of IL-8 receptor A/B by IL-8: possible functions of each receptor. *J. Immunol.* 1995;155:2587-94.
- 39- Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, Liu H, Ehlert JE, Xue YY, et al. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol.* 2000;165(9):5269-77.
- 40- Vicari AP, Caux C. Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002; 13(2):143-54.
- 41- Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, Rafiee P, Maaser C, Gockel HR, et al. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem.* 2003;278(10):8508-15.
- 42- Keane MP, Belperio JA, Xue YY, Burdick MD, Strieter RM. Depletion of CXCR2 inhibits tumor growth and angiogenesis in a murine model of lung cancer. *J Immunol.* 2004;172(5):2853-60.
- 43- Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elnor VM, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science.* 1992;258(5089):1798-1801.
- 44- Huang S, Mills L, Mian B, Tellez C, McCarty M, Yang XD, et al. Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma. *Am J Pathol.* 2002;161(1):125-34.
- 45- Moser B, Barella L, Mattei S, Schumacher C, Boulay F, Colombo M, et al. Expression of transcripts for two interleukin 8 receptors in human phagocytes, lymphocytes and melanoma cells. *Biochem J.* 1993;294:285-92.
- 46- Wu S, Korte A, Kebemann-Betzing C, Gessner R, Henze G, Seeger K. Interaction of bone marrow stromal cells with lymphoblasts and effects of prednisolone on cytokine expression. *Leuk Res.* 2005;29:63-72.
- 47- Wierda WG, Johnson MM, Do KA, Manshouri T, Dey A, O'Brien S, et al. Plasma interleukin 8 level predicts for survival in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2003;120(3):452-6.
- 48- Chiaretti S, Li X, Gentleman R, Vitale A, Vignetti M, Mandelli F, Ritz J, et al. Gene expression profile of adult T-cell acute lymphocytic leukemia identifies distinct subsets of patients with different response to therapy and survival. *Blood.* 2004;103(7):2771-8.

- 49- Liu J, Zeng H, Zhang Y. Study on the expression of interleukin-8 and its receptors in acute leukemia. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 1999;20(1):24-6.
- 50- Hamm HE. The Many Faces of G Protein Signaling. *J Biol Chem*. 1998;273(2):669-72.
- 51- Yan F, Mosier PD, Westkaemper RB, Roth BL. $G\alpha$ -subunits differentially alter the conformation and agonist affinity of κ -opioid receptors. *Biochemistry*. 2008;47:1567-78.
- 52- Jacoby E, Bouhelal R, Gerspacher M, Seuwen K. The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem*. 2006;1:761-82.
- 53- Kenakin T. Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *FASEB J*. 2001;15:598-611.
- 54- Chidiac P, Hebert TE, Valiquette M, Dennis M, Bouvier M. Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol Pharmacol*. 1994;45:490-9.
- 55- Bond RA, Ijzerman AP. Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27:92-6.
- 56- Panetta R, Greenwood MT. Physiological relevance of GPCR oligomerization and its impact on drug discovery. *Drug Discov Today*. 2008;13:1059-66.
- 57- Dalrymple MB, Pflieger KD, Eidne KA. G protein-coupled receptor dimers: functional consequences, disease states and drug targets. *Pharmacol Ther*. 2008;118:359-71.
- 58- Terrillon S, Bouvier M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep*. 2004;5:30-4.
- 59- Rafii S, Mohle R, Shapiro F, Frey BM, Moore MA. Regulation of hematopoiesis by microvascular endothelium. *Leuk Lymphoma*. 1997;27(5-6):375-86.
- 60- Sensebe L, Deschaseaux M, Li J, Herve P, Charbord P. The Broad Spectrum of Cytokine Gene Expression by Myoid Cells from the Human Marrow Microenvironment. *Stem Cells*. 1997;15(2):133-43.
- 61- Torok-Storb B, Iwata M, Graf L, Gianotti J, Horton H, Byrne MC. Dissecting the marrow microenvironment. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;872:164-70.
- 62- Wolf NS. The hematopoietic microenvironment: stromal cell types: characterization and function in situ and in vitro. *Hematol*. 1999;4(3):241-54.

- 63- Wagner W, Roderburg C, Wein F, Diehlmann A, Frankhauser M, Schubert R, et al. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells*. 2007;25(10):2638-47.
- 64- Ringe J, Strassburg S, Neumann K, Endres M, Notter M, Burmester G, et al. Towards in situ tissue repair: Human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem*. 2007;101(1):135-46.
- 65- Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, Connors S, Allred E, Folkman J. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol*. 1997;150(3):815-21.
- 66- Aguayo A, Kantarjian H, Manshour T, Gidel C, Estey E, Thomas D, et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2000;96(6):2240-45.
- 67- Scappaticci FA, Smith R, Pathak A, Schloss D, Lum B, Cao Y, et al. Combination angiostatin and endostatin gene transfer induces synergistic antiangiogenic activity in vitro and antitumor efficacy in leukemia and solid tumors in mice. *Mol Ther*. 2001;3(2):186-96.
- 68- Iversen PO, Drevon CA, Reseland JE. Prevention of leptin binding to its receptor suppresses rat leukemic cell growth by inhibiting angiogenesis. *Blood*. 2002a; 100(12):4123-8.
- 69- Iversen PO, Sorensen DR, Benestad HB. Inhibitors of angiogenesis selectively reduce the malignant cell load in rodent models of human myeloid leukemias. *Leukemia*. 2002b;16(3):376-81.
- 70- Noren-Nystrom U, Eriksson M, Eriksson B, Roos G, Bergh A, Holmberg D. Antitumor activity of the angiogenesis inhibitor TNP-470 on murine lymphoma/leukemia cells in vivo and in vitro. *Exp Hematol*. 2003;31(2):143-9.
- 71- Sipkins DA, Wei X, Wu JW, Runnels JM, Cote D, Means TK, et al. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature*. 2005;435(7044):969-73.
- 72- Ohlstein B, Kai T, Decotto E, Spradling A. The stem cell niche: theme and variations. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16(6):693-9.
- 73- Do M, Jeong H, Choi B, Hunter L, Langley S, Pazmany L, et al. Inflammatory Gene Expression Patterns Revealed by DNA Microarray Analysis in TNF- α -treated SGBS Human Adipocytes. *Yonsei Med J*. 2006;47(5):729-36.

- 74- Wu S, Gessner R, Taube T, Korte A, von Stackelberg A, Kirchner R, et al. Chemokine IL-8 and Chemokine Receptor CXCR3 and CXCR4 Gene Expression in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia at First Relapse. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2006;28(4):216-0.
- 75- Lion T. Appropriate controls for RT-PCR. *Leukemia*. 1998;12:1983-93.
- 76- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al. *Cur Protoc Mol Biol*. Indianapolis: John Wiley & Sons, Inc; 1997.
- 77- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RH. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The J Biol Chem*. 1985;260(6):3440-50.
- 78- White JR, Lee JM, Young PR, Hertzberg RP, Jurewicz AJ, Chaikin MA, et al. Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *J Biol Chem*. 1998;273(17):10095-8.
- 79- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25:402-408.
- 80- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 29(9):e45.
- 81- Manabe A, Coustan-Smith E, Behm FG, Raimondi SC, Campana D. Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1992;79(9):2370-7.
- 82- Murti KG, Brown PS, Kumagai M, Campana D. Molecular Interactions between Human B-Cell Progenitors and the Bone Marrow Microenvironment. *Exp Cell Res*. 1996;226(1):47-58.
- 83- Wagner W, Saffrich R, Wirkner U, Eckstein V, Blake J, Ansorge A, et al. Hematopoietic Progenitor Cells and Cellular Microenvironment - Behavioral and Molecular Changes upon Interaction. *Stem Cells*. 2005;23(8):1180-91.
- 84- Fromigue O, Louis K, Dayem M, Milanini J, Pages G, Tartare-Deckert S, et al. Gene expression profiling of normal human pulmonary fibroblasts following coculture with non-small-cell lung cancer cells reveals alterations related to matrix degradation, angiogenesis, cell growth and survival. *Oncogene*. 2003;22(52):8487-97.
- 85- Moreaux J, Veyrune J, Vos JD, Klein B. APRIL is overexpressed in cancer: link with tumor progression. *BMC Cancer*. 2009;9:83-91.

- 86- Gouwy M, Struyf S, Catusse J, Proost P, Van Damme J. Synergy between proinflammatory ligands of G protein-coupled receptors in neutrophil activation and migration. *J Leuk Biol.* 2004;76:185-94.
- 87- Spinetti G, Bernardini G, Camarda G, Mangoni A, Santoni A, Capogrossi MC, et al. The chemokine receptor CCR8 mediates rescue from dexamethasone-induced apoptosis via an ERK-dependent pathway. *J Leukoc Biol.* 2003;73:201-7.
- 88- Fry D, Dayton B, Brodjian S, Ogiela C, Sidorowicz H, Frost LJ, et al. Characterization of a neuronal cell line expressing native human melanin concentrating hormone receptor 1 (MCHR1). *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38:1290-9.
- 89- Jangi S, Asumendi A, Arlucea J, Nieto N, Perez-Yarza G, Morales M, et al. Apoptosis of human T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells by Diphenhydramine, an H1 Histamine Receptor Antagonist. *Oncol Res.* 2004;14:363-72.
- 90- Powles T, Poole R, Shamash J, Chaplin T, Propper D, Joel S, et al. Cannabis-induced cytotoxicity in leukemic cell lines: the role of the cannabinoid receptors and the MAPK pathway. *Blood.* 2005;105:1214-21.
- 91- Malaviya R, Uckun FM. Histamine as an autocrine regulator of leukemic cell proliferation. *Leuk Lymphoma.* 2000;36:367-73.
- 92- Campbell V. Tetrahydrocannabinol-induced apoptosis of cultured cortical neurones is associated with cytochrome c release and caspase-3 activation. *Neuropharmacology.* 2001;40:702-9.
- 93- Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem.* 1995; 232(1):54-61.
- 94- Lombard C, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Targeting cannabinoid receptors to treat leukemia: Role of cross-talk between extrinsic and intrinsic pathways in Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC)-induced apoptosis of Jurkat cells. *Leuk Res.* 2005;29:915-22.
- 95- Beesley AH, Firth MJ, Ford J, Weller RE, Freitas JR, Perera KU, et al. Glucocorticoid resistance in T-lineage acute lymphoblastic leukaemia is associated with a proliferative metabolism. *Br J Cancer.* 2009;100(12):1926-36.
- 96- Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem.* 2009;284(20):13291-5.
- 97- Rushing GD, Britt LD. Inhibition of NF- κ B Does Not Induce C-Jun N-Terminal Kinase-Mediated Apoptosis in Reperfusion Injury. *J Am Coll Surg.* 2007;204(5):964-7.

- 98- Karin M, Delhase M. JNK or IKK, AP-1 or NF-kappaB, which are the targets for MEK kinase 1 action? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(16):9067-9.
- 99- Valdivia-Silva JE, Franco-Barraza J, Silva AL, Pont GD, Soldevila G, Meza I, et al. Effect of pro-inflammatory cytokine stimulation on human breast cancer: implications of chemokine receptor expression in cancer metastasis. *Cancer Lett*. 2009;283(2):176-85.
- 100- Zerbini LF, Wang Y, Czibere A, Correa RG, Cho J, Ijiri K, et al. NF-κB-mediated repression of growth arrest- and DNA-damage-inducible proteins 45α and γ is essential for cancer cell survival. *PNAS*. 2004; 101(37):13618-23.
- 101- Ren C, Li L, Goltsov AA, Timme TL, Tahir SA, Wang J, et al. mRTVP-1, a novel p53 target gene with proapoptotic activities. *Mol Cell Biol*. 2002;22:3345–3357.
- 102- Kataoka K, Noda M, Nishizawa M. Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun. *Mol Cell Biol*. 1994;14:700-12.
- 103- Kamio T, Toki T, Kanezaki R, Sasaki S, Tandai S, Terui K, et al. B-cell-specific transcription factor BACH2 modifies the cytotoxic effects of anticancer drugs. *Blood*. 2003;102(9):3317-22.
- 104- Ren T, Chen Q, Tian Z, Wei H. Down-regulation of surface fractalkine by RNA interference in B16 melanoma reduced tumor growth in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;364(4):978-84.
- 105- Pituch-Noworolska A, Gawlicka M, Wotoszyn M, Balwierz W, Strojny W, Zembala M. Tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) and leukaemic cells: secretion and response. *Clin Lab Haematol*. 1998;20(4):231-8.
- 106- Barlic J, Zhang Y, Murphy PM. Atherogenic Lipids Induce Adhesion of Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells to Macrophages by Up-regulating Chemokine CX3CL1 on Smooth Muscle Cells in a TNFα-NFκB-dependent Manner. *J Biol Chem*. 2007;282(26):19167-76.
- 107- Stankovic T, Marston E. Molecular mechanisms involved in chemoresistance in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Srp Arh Celok Lek*. 2008;136(3-4):187-92.
- 108- Ren C, Ren CH, Li L, Goltsov AA, Thompson TC. Identification and characterization of RTVP1/GLIPR1-like genes, a novel p53 target gene cluster. *Genomics*. 2006;88:163–172

- 109- Li L, Fattah EA, Cao G, Ren C, Yang G, Goltsov AA, et al. Glioma Pathogenesis-Related Protein 1 Exerts Tumor Suppressor Activities through Proapoptotic Reactive Oxygen Species–c-Jun–NH2 Kinase Signaling. *Cancer Res.* 2008;68(2):434-43.
- 110- Rosenzweig T, Ziv-Av A, Xiang C, Lu W, Cazacu S, Taler D, et al. Related to testes-specific, vespid, and pathogenesis protein-1 (RTVP-1) is overexpressed in gliomas and regulates the growth, survival, and invasion of glioma cells. *Cancer Res.* 2006;66:4139-48.
- 111- Liang T, Tan T, Xiao Y, Yi H, Li C, Peng F, et al. Methylation and expression of glioma pathogenesis-related protein 1 gene in acute myeloid leukemia. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2009;34(5):388-94.
- 112- Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(10):725-34.
- 113- Chauhan D, Uchiyama H, Akbarali Y, Urashima M, Yamamoto K, Libermann TA, et al. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood.* 1996;87:1104–12.
- 114- Faderl S, Do K, Johnson MM, Keating M, O'Brien S, Jilani I, et al. Angiogenic factors may have a different prognostic role in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2005;106(13):4303-7.
- 115- Mazur B, Mertas A, Sonta-Jakimczyk D, Szczepanski T, Janik-Moszant A. Concentration of IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-alpha in children with acute lymphoblastic leukemia after cesation of chemotherapy. *Hematol Oncol.* 2004; 22:27-34.
- 116- Arefieva TI, Kukhtina NB, Antonova OA, Krasnikova TL. MCP-1-stimulated chemotaxis of monocytic and endothelial cells is dependent on activation of different signaling cascades. *Cytokine.* 2005;31:439-46.
- 117- Van Etten RA. Aberrant cytokine signaling in leukemia. *Oncogene.* 2007;26(47):6738-49.
- 118- Broxmeyer HE, Sherry B, Cooper S, Lu L, Maze R, Beckmann MP, et al. Comparative Analysis of the Human Macrophage Inflammatory Protein Family of Cytokines (Chemokines) on Proliferation of Human Myeloid Progenitor Cells. *J Immunol.* 1993;150:3448-58.
- 119- Broxmeyer HE, Cooper S, Cacalano G, Hague NL, Bailishfl E, Moore MW. Involvement of Interleukin (IL) 8 Receptor in Negative Regulation of Myeloid Progenitor Cells In Vivo: Evidence from Mice Lacking the Murine IL-8 Receptor Homologue. *J Exp Med.* 1996;184:1825-32.

- 120- Cashman JD, Eaves CJ, Sarris AH, Eaves AC. MCP-1, not MIP-1 α , Is the Endogenous Chemokine That Cooperates (CML) Progenitors in Long-Term Human Marrow Cultures With TGF- β to Inhibit the Cycling of Primitive Normal but not Leukemic. *Blood*. 1998;92:2338-44.
- 121- Merendino RA, Arena A, Gangemi S, Ruello A, Losi E, Bene A, et al. In vitro interleukin-8 production by monocytes treated with lithium chloride from breast cancer patients. *Tumori*. 2000;86(2):149-52.
- 122- Schwartz GN, Kammula U, Warren MK, Park MK, Yan X, Marincola FM, et al. Thrombopoietin and chemokine mRNA expression in patient post-chemotherapy and in vitro cytokine-treated marrow stromal cell layers. *Stem Cells*. 2000;18:331-42.
- 123- Dy M, Schneider E. Histamine-cytokine connection in immunity and hematopoiesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15:393-410.
- 124- Radvany Z, Darvas Z, Kerekes K, Prechl J, Szalai C, Pallinger E, et al. H1 histamine receptor antagonist inhibits constitutive growth of Jurkat T cells and antigen-specific proliferation of ovalbumin-specific murine T cells. *Semin Cancer Biol*. 2000;10(1):41-5.
- 125- Sanchez MG, Ruiz-Llorente L, Sanchez AM, Diaz-Laviada I. Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB1 and CB2 cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. *Cell Signalling*. 2003;15:851-9.
- 126- Yu YR, Fong AM, Combadiere C, Gao JL, Murphy PM, Patel DD. Defective antitumor responses in CX3CR1-deficient mice. *Int J Cancer*. 2007;121(2):316-22.
- 127- Shulby SA, Dolloff NG, Stearns ME, Meucci O, Fatatis A. CX3CR1-fractalkine expression regulates cellular mechanisms involved in adhesion, migration, and survival of human prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2004;64:4693-8.
- 128- Andre F, Cabioglu N, Assi H, Sabourin JC, Delaloge S, Sahin A, et al. Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer. *Ann. Oncol*. 2006;17:945-51.
- 129- Andreasson U, Ek S, Merz H, Rosenquist R, Andersen N, Jerkeman M, et al. B cell lymphomas express CX3CR1 a non-B cell lineage adhesion molecule. *Cancer Letters*. 2008;259:138-45.
- 130- Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J*. 1995;9(9):726-35.

131- Rubio S, Quintana J, Eiroa JL, Triana J, Estévez F. Acetyl derivative of quercetin 3-methyl ether-induced cell death in human leukemia cells is amplified by the inhibition of ERK. *Carcinogenesis*. 2007;28(10):2105-13.

ANEXO I



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 246/2006

Registro CONEP: 12647 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0004.0.144.000-05

Processo nº 25000.004856/2006-89

Projeto de Pesquisa: *“Ação da CCL2 e IL-8 na sobrevivência e proliferação da leucemia linfóide aguda pediátrica em sistema de co-cultura com células do estroma da medula óssea”*

Pesquisador Responsável: Dr. José Andrés Yunes

Instituição: Centro Infantil Boldrini /SP

Área Temática Especial: Genética humana

Patrocinador: FAPESP

Objetivos

Determinar se alguns genes contribuem com a manutenção da atividade angiogênica e/ou estimulação de células leucêmicas. Pretende-se ainda quantificar a quantidade de CCL2 e IL-8 no plasma, e expressão do CCR2 pelos blastos em casos de Leucemia Linfóide Aguda – LLA – pediátrica, associando com dados biológicos e clínicos dos pacientes.

Sumário

A evolução do câncer depende da interação do tumor com o contexto celular do hospedeiro. As células do estroma da medula óssea favorecem a sobrevivência e resistência da LLA (leucemia linfóide aguda) contra os quimioterápicos e ainda não se conhece quais moléculas e mecanismos do microambiente tumoral é estimulado e colabora com a progressão e proteção das células de LLA na medula. Em trabalhos preliminares foram observados vários genes que são ativados nas células do estroma quando estimuladas pela LLA. Entre estes notou-se alta ativação das quimiocinas CCL2 e IL-8, ligantes dos receptores CCR2 e CXCR1/2.

Trata-se de um estudo prospectivo. Participarão 60 pacientes com LLA, dos quais será utilizado material de apenas 20 na cultura de células. Serão utilizadas amostras de pacientes com LLA, de linhagem B, que derem entrada no Centro Boldrini, sem tratamento prévio. A pesquisa será feita com o restante do material colhido na rotina e não utilizado nos diagnósticos, não sendo necessária coleta adicional.

As células de estroma também serão obtidas de doadores normais, submetidos à coleta de medula óssea (MO) para fins de transplante de irmãos ou parentes, sendo que a maior parte de doadores de MO do Centro infantil Boldrini são crianças, coletando-se entre 10 e 20 mL de MO/Kg do doador. Uma alíquota de 3 mL é enviada como rotina ao laboratório.

Comentários/considerações

Os pesquisadores apresentam os dois modelos de Termos de Consentimento Livre e Esclarecidos – TCLEs, tanto para os doadores de medula como para os pacientes com leucemia. Ambos estão claros e informam sobre armazenamento do

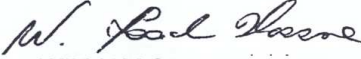
Cont. Parecer CONEP 246/2006.

material biológico de acordo com a Res. CNS 347/2005. Contudo, faz-se necessário que seja informado o título da pesquisa no início do documento.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto com a recomendação acima citada, devendo esta ser acompanhada pelo CEP, para posterior início da pesquisa.

Situação: Protocolo aprovado com recomendação.

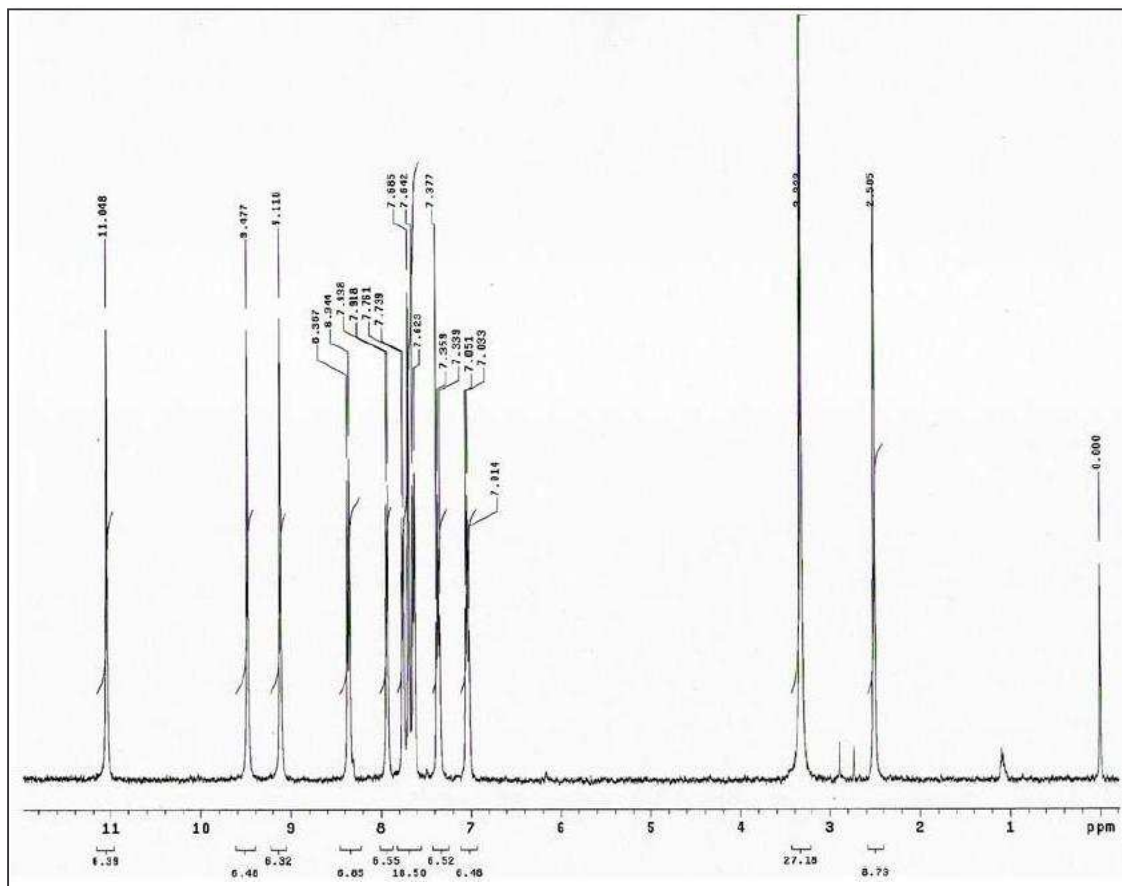
Brasília, 7 de abril de 2006.


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

ANEXO II

Valores dos deslocamentos químicos do SB225002. Dados publicados de RMN do SB225002 comparados com dados obtidos pela análise do SB225002 sintetizado para este trabalho.

¹ H RMN (Me ₂ SO) δ (ppm) Literatura	¹ H RMN (Me ₂ SO- <i>d</i> ₆ , 400MHz) δ (ppm) Trabalho Atual
δ 11,05 (s)	δ 11,04 (s)
9,49 (s)	9,47 (s)
9,12 (s)	9,11 (s)
8,47 (d)	8,35 (d)
7,93 (d)	7,92 (d)
7,74 (d)	7,75 (d)
7,68 (s)	7,68 (s)
-	7,63 (d)
7,34 (t)	7,35 (t)
7,00 (t)	7,03 (t)



Resultado de análise de RMN do SB225002 sintetizado para este trabalho. O perfil dos picos corresponde aos dados publicados dessa molécula (tabela acima). A ausência de picos contaminantes indica pureza. Resultados obtidos por colaboradores do Depto. de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (Dr. Paulo C. Leal, Dr. Ricardo J. Nunes e Dr. Rosendo A. Yunes).

ANEXO III

Genes ativados em células mesenquimais primárias após 6 horas de co-cultivo com células de leucemia linfóide aguda primária.

Identificação da sonda	Símbolo do gene	Nome do gene	Coefficiente de variação
204533_at	<i>CXCL10</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	12.80
216598_s_at	<i>CCL2</i>	chemokine (C-C motif) ligand 2	9.12
202859_x_at	<i>IL8</i>	interleukin 8	5.88
226757_at	<i>IFIT2</i>	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	5.82
226702_at	<i>CMPK2</i>	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial	5.49
242625_at	<i>RSAD2</i>	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	5.48
229450_at	<i>IFIT3</i>	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	4.42
210538_s_at	<i>BIRC3</i>	baculoviral IAP repeat-containing 3	4.36
202086_at	<i>MX1</i>	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	4.01
210487_at	<i>DNTT</i>	deoxynucleotidyltransferase, terminal	3.89
205552_s_at	<i>OAS1</i>	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	3.83
202531_at	<i>IRF1</i>	interferon regulatory factor 1	3.82
202688_at	<i>TNFSF10</i>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	3.80
204798_at	<i>MYB</i>	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)	3.77
219209_at	<i>IFIH1</i>	interferon induced with helicase C domain 1	3.69
202638_s_at	<i>ICAM1</i>	intercellular adhesion molecule 1	3.62
206398_s_at	<i>CD19</i>	CD19 molecule	3.43
219684_at	<i>RTP4</i>	receptor (chemosensory) transporter protein 4	3.42
204224_s_at	<i>GCH1</i>	GTP cyclohydrolase 1	3.42
218943_s_at	<i>DDX58</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	3.35
223502_s_at	<i>TNFSF13B</i>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	3.34
209116_x_at	<i>HBB</i>	hemoglobin, beta	3.31
202643_s_at	<i>TNFAIP3</i>	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	3.23
204439_at	<i>IFI44L</i>	interferon-induced protein 44-like	3.05
239294_at			2.99
205660_at	<i>OASL</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	2.97
204972_at	<i>OAS2</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	2.90
242234_at	<i>XAF1</i>	XIAP associated factor 1	2.90
209863_s_at	<i>TP63</i>	tumor protein p63	2.90
202269_x_at	<i>GBP1</i>	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	2.89
205205_at	<i>RELB</i>	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	2.87

214038_at	<i>CCL8</i>	chemokine (C-C motif) ligand 8	2.84
221477_s_at	<i>SOD2</i>	superoxide dismutase 2, mitochondrial	2.81
35974_at	<i>LRMP</i>	lymphoid-restricted membrane protein	2.78
204286_s_at	<i>PMAIP1</i>	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced	2.75
204994_at	<i>MX2</i>	myxovirus (influenza virus) resistance 2	2.75
215177_s_at	<i>ITGA6</i>	integrin, alpha 6	2.70
219863_at	<i>HERC5</i>	hect domain and RLD 5	2.67
222549_at	<i>CLDN1</i>	claudin 1	2.64
205207_at	<i>IL6</i>	interleukin 6 (interferon, beta 2)	2.61
208891_at	<i>DUSP6</i>	dual specificity phosphatase 6	2.60
235643_at	<i>SAMD9L</i>	sterile alpha motif domain containing 9-like interferon-induced protein with	2.60
203153_at	<i>IFIT1</i>	tetratricopeptide repeats 1	2.59
214059_at	<i>IFI44</i>	CDNA FLJ56519 complete cds, highly similar to Interferon-induced protein 44	2.54
202307_s_at	<i>TAP1</i>	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	2.51
223553_s_at	<i>DOK3</i>	docking protein 3	2.50
212750_at	<i>PPP1R16B</i>	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 16B	2.49
201502_s_at	<i>NFKBIA</i>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	2.48
242907_at			2.46
202510_s_at	<i>TNFAIP2</i>	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	2.46
211122_s_at	<i>CXCL11</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	2.43
205619_s_at	<i>MEOX1</i>	mesenchyme homeobox 1	2.42
209201_x_at	<i>CXCR4</i>	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	2.40
209774_x_at	<i>CXCL2</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	2.40
212587_s_at	<i>PTPRC</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C inhibitor of DNA binding 1, dominant negative	2.40
208937_s_at	<i>ID1</i>	helix-loop-helix protein	- 2.39
235287_at	<i>CDK6</i>	cyclin-dependent kinase 6	2.35
217414_x_at	<i>HBA1</i>	hemoglobin, alpha 1 /// hemoglobin, alpha 2	2.34
220518_at	<i>ABI3BP</i>	ABI family, member 3 (NESH) binding protein poly (ADP-ribose) polymerase family, member	2.32
223220_s_at	<i>PARP9</i>	9	2.28
205049_s_at	<i>CD79A</i>	CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha	2.27
232375_at			2.27
218543_s_at	<i>PARP12</i>	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12	2.23
241869_at	<i>APOL6</i>	apolipoprotein L, 6	2.20
218807_at	<i>VAV3</i>	vav 3 guanine nucleotide exchange factor	2.19
223217_s_at	<i>NFKBIZ</i>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta	2.19
204913_s_at	<i>SOX11</i>	SRY (sex determining region Y)-box 11	2.17
205483_s_at	<i>ISG15</i>	ISG15 ubiquitin-like modifier	2.16
218400_at	<i>OAS3</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	2.16
228531_at	<i>SAMD9</i>	sterile alpha motif domain containing 9	2.16
235157_at			2.15
239328_at			2.15

205267_at	<i>POU2AF1</i>	POU class 2 associating factor 1	2.14
209995_s_at	<i>TCL1A</i>	T-cell leukemia/lymphoma 1A	2.14
223322_at	<i>RASSF5</i>	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 5	2.14
214022_s_at	<i>IFITM1</i>	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	2.13
239979_at			2.13
225415_at	<i>DTX3L</i>	deltex 3-like (Drosophila)	2.12
205349_at	<i>GNA15</i>	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 15 (Gq class)	2.12
202747_s_at	<i>ITM2A</i>	integral membrane protein 2A	2.11
207535_s_at	<i>NFKB2</i>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	2.10
230391_at			2.10
229629_at			2.09
212249_at	<i>PIK3R1</i>	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)	2.08
36711_at	<i>MAFF</i>	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	2.08
207510_at	<i>BDKRB1</i>	bradykinin receptor B1	2.07
210057_at	<i>SMG1</i>	SMG1 homolog, phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase (C. elegans)	2.07
244599_at			2.07
206932_at	<i>CH25H</i>	cholesterol 25-hydroxylase	2.06
229437_at	<i>BIC</i>	BIC transcript	2.02
208965_s_at	<i>IFI16</i>	interferon, gamma-inducible protein 16	2.02
221087_s_at	<i>APOL3</i>	apolipoprotein L, 3	2.01
208436_s_at	<i>IRF7</i>	interferon regulatory factor 7	2.01
218986_s_at	<i>DDX60</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60	2.01

Coeficiente de variação = *fold change*.

ANEXO IV

Genes ativados em células Jurkat tratada com SB225002 [20 µM] nos tempos de incubação 6 horas e 9 horas.

Identificação da sonda	Símbolo do gene	Nome do gene	Coefficiente de variação
244766_at	<i>LOC440345</i>	hypothetical protein LOC440345	5.36
238735_at	---	---	3.70
233595_at	<i>USP34</i>	ubiquitin specific peptidase 34	3.23
216109_at	<i>MED13L</i>	Mediator complex subunit 13-like	3.27
226101_at	<i>PRKCE</i>	protein kinase C, epsilon	3.26
230387_at	---	---	3.09
232889_at	---	---	2.82
233303_at	---	---	3.01
235959_at	---	---	2.97
203910_at	<i>ARHGAP29</i>	Rho GTPase activating protein 29	2.47
240452_at	<i>GSPT1</i>	G1 to S phase transition 1	2.60
235023_at	<i>VPS13C</i>	Vacuolar protein sorting 13 homolog C (S. cerevisiae)	2.62
239228_at	---	---	2.82
228105_at	---	---	2.44
242673_at	---	---	2.91
239930_at	<i>GALNT2</i>	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (GalNAc-T2)	2.32
242431_at	---	---	2.41
237239_at	---	---	2.33
239735_at	---	---	2.21
213605_s_at	<i>LOC100134401</i>	hypothetical protein LOC100134401	2.48
227884_at	<i>TAF15</i>	TAF15 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 68kDa	2.23
239238_at	---	---	2.32
221234_s_at	<i>BACH2</i>	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2	2.43
239937_at	<i>ZNF207</i>	Zinc finger protein 207	2.21
238429_at	<i>TMEM71</i>	transmembrane protein 71	2.07
240383_at	<i>UBE2D3</i>	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast)	2.26
223494_at	<i>MGEA5</i>	meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase)	2.00
240451_at	---	---	2.09
219906_at	<i>FLJ10213</i>	hypothetical protein FLJ10213	2.03
221899_at	<i>N4BP2L2</i>	NEDD4 binding protein 2-like 2	2.13
236907_at	---	---	2.11
228613_at	<i>RAB11FIP3</i>	RAB11 family interacting protein 3 (class	2.00

		II)	
215521_at	<i>PHC3</i>	polyhomeotic homolog 3 (Drosophila)	1.94
242121_at	<i>RNF12</i>	Ring finger protein 12	2.24
226840_at	<i>H2AFY</i>	H2A histone family, member Y	2.32
242974_at	<i>CD47</i>	CD47 molecule	1.93
225239_at	---	---	2.17
231956_at	<i>KIAA1618</i>	KIAA1618	2.23
234989_at	<i>TncRNA</i>	trophoblast-derived noncoding RNA	2.03
214964_at	---	---	1.82
243869_at	---	---	1.99
202274_at	<i>ACTG2</i>	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	2.24
229434_at	---	---	1.97
		ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0	
220197_at	<i>ATP6V0A4</i>	subunit a4	1.92
231005_at	---	---	2.03
215252_at	---	---	2.06
244808_at	<i>GRAMD1A</i>	GRAM domain containing 1A	1.88
235927_at	<i>XPO1</i>	exportin 1 (CRM1 homolog, yeast)	2.08
244185_at	---	---	2.14
215123_at	<i>LOC348162</i>	hypothetical protein 348162	1.92
238714_at	---	---	1.85
		eukaryotic translation initiation factor 3,	
242550_at	<i>EIF3B</i>	subunit B	1.77
228793_at	<i>JMJD1C</i>	jumonji domain containing 1C	2.15
		protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor)	
41577_at	<i>PPP1R16B</i>	subunit 16B	1.82
240105_at	---	---	1.74
236431_at	<i>SR140</i>	U2-associated SR140 protein	2.18
		metastasis associated lung adenocarcinoma	
224558_s_at	<i>MALAT1</i>	transcript 1 (non-protein coding)	2.44
239071_at	<i>RBBP4</i>	Retinoblastoma binding protein 4	2.01
235094_at	---	---	1.88
201464_x_at	<i>JUN</i>	jun oncogene	2.03
		adenylate cyclase activating polypeptide 1	
230237_at	<i>ADCYAP1</i>	(pituitary)	1.68
225227_at	---	---	1.67
242059_at	---	---	1.75
230761_at	---	---	2.09
		Eukaryotic translation initiation factor 4A,	
214805_at	<i>EIF4A1</i>	isoform 1	1.84
		catenin (cadherin-associated protein), beta	
223679_at	<i>CTNNB1</i>	1, 88kDa	1.91
242712_x_at	<i>RANBP2</i>	RAN binding protein 2	1.67
237246_at	---	---	2.26
235757_at	---	---	1.86
		metastasis associated lung adenocarcinoma	
224559_at	<i>MALAT1</i>	transcript 1 (non-protein coding)	2.30
		eukaryotic translation initiation factor 3,	
215190_at	<i>EIF3M</i>	subunit M	1.79
242467_at	---	---	1.90
240221_at	<i>CSNK1A1</i>	Casein kinase 1, alpha 1	2.17

242191_at	<i>NBPF10</i>	neuroblastoma breakpoint family, member 10	1.80
213089_at	<i>LOC100132134</i>	similar to LOC653391 protein	1.89
242403_at	---	---	1.77
242749_at	---	---	1.88
232890_at	---	---	1.66
209210_s_at	<i>FERMT2</i>	fermitin family homolog 2 (Drosophila)	1.63
215599_at	<i>SMA4</i>	glucuronidase, beta pseudogene	2.05
		PI-3-kinase-related kinase SMG-1	
238449_at	<i>LOC595101</i>	pseudogene	1.82
237746_at	<i>SFRS11</i>	Splicing factor, arginine/serine-rich 11	2.13
		ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)	
221773_at	<i>ELK3</i>		1.50
224811_at	---	---	1.58
235926_at	---	---	1.70
		PRP38 pre-mRNA processing factor 38 (yeast) domain containing B	
230270_at	<i>PRPF38B</i>		1.64
243410_at	---	---	1.77
244778_x_at	---	---	1.70
235716_at	---	---	1.65
		PDS5, regulator of cohesion maintenance, homolog B (S. cerevisiae)	
215888_at	<i>PDS5B</i>		1.78
226142_at	<i>GLIPR1</i>	GLI pathogenesis-related 1	1.62
240231_at	---	---	2.02
235138_at	---	---	1.70
236114_at	---	---	1.67
		bromodomain and WD repeat domain containing 2	
229694_at	<i>BRWD2</i>		1.55
230712_at	<i>KIAA1245</i>	KIAA1245	1.77
215268_at	<i>KIAA0754</i>	hypothetical LOC643314	1.54
219025_at	<i>CD248</i>	CD248 molecule, endosialin	1.54
226663_at	<i>ANKRD10</i>	ankyrin repeat domain 10	1.42
204774_at	<i>EVI2A</i>	ecotropic viral integration site 2A	1.51
		guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	
202270_at	<i>GBP1</i>		1.62
238156_at	---	---	1.87
244165_at	<i>C10orf18</i>	chromosome 10 open reading frame 18	1.64
239243_at	<i>ZNF638</i>	Zinc finger protein 638	2.05
		Proprotein convertase subtilisin/kexin type 7	
232521_at	<i>PCSK7</i>		1.58
200878_at	<i>EPAS1</i>	endothelial PAS domain protein 1	1.57
236974_at	---	---	1.60
240307_at	---	---	1.46
226980_at	<i>DEPDC1B</i>	DEP domain containing 1B	1.44
235646_at	---	---	1.49
233445_at	---	---	1.74
		granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)	
210164_at	<i>GZMB</i>		1.37
		Rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	
235595_at	<i>ARHGEF2</i>		1.63
230493_at	<i>SHISA2</i>	shisa homolog 2 (Xenopus laevis)	1.37

222266_at	<i>C19orf2</i>	Chromosome 19 open reading frame 2	1.40
230713_at	---	---	1.51
		potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 1	
209948_at	<i>KCNMB1</i>		1.57
239545_at	---	---	1.62
228692_at	---	---	1.42
214657_s_at	<i>TncRNA</i>	Trophoblast-derived noncoding RNA	1.78
		NUF2, NDC80 kinetochore complex component, homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	
223381_at	<i>NUF2</i>		1.38
238142_at	---	---	1.68
238988_at	---	---	1.76
228723_at	---	---	1.40
206584_at	<i>LY96</i>	lymphocyte antigen 96	1.38
241242_at	---	---	1.36
		asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (<i>Drosophila</i>)	
239002_at	<i>ASPM</i>		1.55
228180_at	---	---	1.79
224875_at	<i>C5orf24</i>	chromosome 5 open reading frame 24	1.43
202949_s_at	<i>FHL2</i>	four and a half LIM domains 2	1.46
236462_at	---	---	1.58
237561_x_at	---	---	1.46
228729_at	<i>CCNB1</i>	cyclin B1	1.33
238311_at	---	---	1.43
228087_at	<i>CCDC126</i>	coiled-coil domain containing 126	1.39
242060_x_at	<i>PHF11</i>	PHD finger protein 11	1.43
204491_at	<i>PDE4D</i>	phosphodiesterase 4D	1.42
		microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 1	
218376_s_at	<i>MICAL1</i>		1.48
218646_at	<i>C4orf27</i>	chromosome 4 open reading frame 27	1.32
		protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator	
237107_at	<i>PRKRA</i>		1.61
244219_at	---	---	1.50
232356_at	---	---	1.48
233678_at	---	---	1.74
		v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1	
202932_at	<i>YES1</i>		1.29
221985_at	<i>KLHL24</i>	kelch-like 24 (<i>Drosophila</i>)	1.39
224799_at	<i>NDFIP2</i>	Nedd4 family interacting protein 2	1.30
		Mdm4 p53 binding protein homolog (mouse)	
236814_at	<i>MDM4</i>		1.40
215012_at	<i>ZNF451</i>	zinc finger protein 451	1.49
200808_s_at	<i>ZYX</i>	zyxin	1.33
		protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B", gamma triple functional domain (PTPRF interacting)	
239188_at	<i>PPP2R3C</i>		1.35
208178_x_at	<i>TRIO</i>		1.28
226181_at	<i>TUBE1</i>	tubulin, epsilon 1	1.38
242310_at	---	---	1.32
243388_at	---	---	1.47
227198_at	<i>AFF3</i>	AF4/FMR2 family, member 3	1.58

204035_at	<i>SCG2</i>	secretogranin II (chromogranin C)	1.46
226184_at	<i>FMNL2</i>	formin-like 2	1.32
224917_at	<i>MIRN21</i>	microRNA 21	1.55
217653_x_at	---	---	1.39
236841_at	<i>LOC100133859</i>	hypothetical protein LOC100133859	1.34
211559_s_at	<i>CCNG2</i>	cyclin G2	1.28
204780_s_at	<i>FAS</i>	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	1.25
		RNA binding motif, single stranded	
225265_at	<i>RBMS1</i>	interacting protein 1	1.27
217989_at	<i>HSD17B11</i>	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 11	1.25
214918_at	<i>HNRNPM</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	1.34
235028_at	---	---	1.56
		serine palmitoyltransferase, long chain base	
216202_s_at	<i>SPTLC2</i>	subunit 2	1.36
230489_at	<i>CD5</i>	CD5 molecule	1.31
		dishevelled associated activator of	
216060_s_at	<i>DAAM1</i>	morphogenesis 1	1.28
		AHA1, activator of heat shock 90kDa	
226665_at	<i>AHSA2</i>	protein ATPase homolog 2 (yeast)	1.36
212384_at	<i>BAT1</i>	HLA-B associated transcript 1	1.46
239151_at	<i>CTGLF6</i>	centaurin, gamma-like family, member 6	1.42
238119_at	---	---	1.28
223966_at	<i>LOC100128180</i>	PRO2116	1.40
218762_at	<i>ZNF574</i>	zinc finger protein 574	-1.41
210130_s_at	<i>TM7SF2</i>	transmembrane 7 superfamily member 2	-1.48
209706_at	<i>NKX3-1</i>	NK3 homeobox 1	-1.29
236196_at	---	---	-1.24
203761_at	<i>SLA</i>	Src-like-adaptor	-1.32
228049_x_at	---	---	-1.22
206727_at	<i>C9</i>	complement component 9	-1.30
212186_at	<i>ACACA</i>	acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha	-1.38
218897_at	<i>TMEM177</i>	transmembrane protein 177	-1.48
240089_at	---	---	-1.27
209806_at	<i>HIST1H2BK</i>	histone cluster 1, H2bk	-1.49
237563_s_at	<i>LOC440731</i>	similar to hCG1817424	-1.32
209372_x_at	<i>TUBB2A</i>	tubulin, beta 2A	-1.30
		heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	
222040_at	<i>HNRNPA1</i>	A1	-1.28
		stearoyl-CoA desaturase (delta-9-	
223839_s_at	<i>SCD</i>	desaturase)	-1.40
		nuclear factor of kappa light polypeptide	
201502_s_at	<i>NFKBIA</i>	gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	-1.37
209608_s_at	<i>ACAT2</i>	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2	-1.36
231088_at	<i>LOC340544</i>	Hypothetical protein LOC340544	-1.30
208647_at	<i>FDFT1</i>	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1	-1.29
239848_at	---	---	-1.46
224185_at	---	---	-1.52
227778_at	<i>KIAA1833</i>	hypothetical protein KIAA1833	-1.46
223707_at	<i>RPL27A</i>	ribosomal protein L27a	-1.42
212218_s_at	<i>FASN</i>	fatty acid synthase	-1.47
230944_at	---	---	-1.45

222449_at	<i>PMEPAI</i>	prostate transmembrane protein, androgen induced 1	-1.43
202245_at	<i>LSS</i>	lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)	-1.66
225826_at	<i>MMAB</i>	methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblB type	-1.57
212242_at	<i>TUBA4A</i>	tubulin, alpha 4a	-1.53
210010_s_at	<i>SLC25A1</i>	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; citrate transporter), member 1	-1.65
213787_s_at	<i>EBP</i>	emopamil binding protein (sterol isomerase)	-1.50
213577_at	<i>SQLE</i>	squalene epoxidase	-1.58
240546_at	<i>LOC389043</i>	hypothetical gene supported by AK125982; BC042817	-1.56
221750_at	<i>HMGCS1</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)	-1.88
238725_at	<i>IRF1</i>	interferon regulatory factor 1	-1.63
202562_s_at	<i>C14orf1</i>	chromosome 14 open reading frame 1	-1.51
228854_at	---	---	-1.80
227044_at	---	---	-1.69
200862_at	<i>DHCR24</i>	24-dehydrocholesterol reductase	-1.83
205898_at	<i>CX3CR1</i>	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	-2.25
201790_s_at	<i>DHCR7</i>	7-dehydrocholesterol reductase	-1.95

Coeficiente de variação = *fold change*.