

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO COMPOSTO LQB-223 EM LINHAGENS CELULARES DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA COM DIFERENTES FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA

Marcos Vinícius C. Magalhães^{1,4*}, Thaís Hancio^{1†}, Paula Sabbo Bernardo¹, Luciano Mazzoccoli¹, Camilla Buarque², Paulo R. Costa³, Raquel C. Maia¹, Fernanda Costas C. de Faria¹

1- Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ.

2- Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, RJ.

3- Laboratório de Química Bio-orgânica (LQB), IPPN, UFRJ, RJ.

4- Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ. *Estes autores contribuíram igualmente para esse trabalho

Introdução

Leucemia mieloide aguda (LMA) é uma doença clonal identificada pela presença de células precursoras mieloides que perderam a capacidade de se diferenciar e com elevado potencial proliferativo. O tratamento atual para pacientes com LMA envolve a associação da citarabina com antraciclinas. Contudo, esse tratamento se mostra ainda pouco eficiente dado às altas taxas de morte e baixa sobrevida global após cinco anos dos pacientes com LMA. Por essas razões, é essencial investigar novas estratégias para sobrepujar a resistência observada, incluindo o desenvolvimento de novas drogas. Nesse contexto, o LQB-223 é um novo composto que demonstrou um alto potencial antitumoral em linhagens celulares de diferentes modelos neoplásicos, incluindo LMA. Portanto, nosso objetivo é caracterizar o mecanismo de ação antitumoral do LQB-223 em linhagens celulares de LMA com diferentes fenótipos de resistência ao tratamento atual.

Metodologia

As linhagens celulares de LMA U937 (subtipo M4/M5 com cariótipo complexo, resistente às antraciclinas), HL60 (subtipo M2, responsivo a citarabina e às antraciclinas) e HL60R (derivada da HL60 e extrinsecamente resistente a citarabina) foram tratadas com 5 μ M de LQB-223 por 24 horas. Para investigar o possível dano ao DNA e a modulação das vias de progressão do ciclo celular, a técnica de Western Blotting foi utilizada após o tratamento com LQB-223. Para avaliar a localização subcelular do fator de transcrição FOXO3a, nós utilizamos a técnica de imunofluorescência após tratamento com LQB-223.

Resultados e Conclusões

Nossos resultados demonstram que o tratamento com o LQB-223 aumentou a expressão de p-H2AX em todas as linhagens testadas. Esses resultados indicam um possível dano ao DNA por quebra de dupla fita. Além disso, as linhagens celulares tratadas com LQB-223 apresentaram diminuição da expressão de proteínas alvo envolvidas em vias de regulação do ciclo celular, como MAPK e AKT. As linhagens celulares HL60 e U937 tratadas com LQB-223 apresentaram diminuição da expressão de ERK e p-ERK, mas não foi observada alteração de expressão das mesmas na linhagem HL60R. Também observamos uma diminuição dos níveis de expressão de AKT e p-AKT na linhagem HL60 e de mTOR e p-mTOR na linhagem HL60R. Esses dados sugerem que o tratamento com LQB-223 induz dano ao DNA e modula vias de regulação do ciclo celular, como as vias de MAPK e PI3K/AKT/mTOR. Contudo, não observamos modulação da localização subcelular do fator de transcrição FOXO3a na linhagem celular U937, um importante fator de regulação do ciclo celular. De forma geral, nossos dados sugerem que o mecanismo de ação do composto LQB-223 envolve a indução do dano ao DNA e a modulação de importantes vias de regulação do ciclo celular.

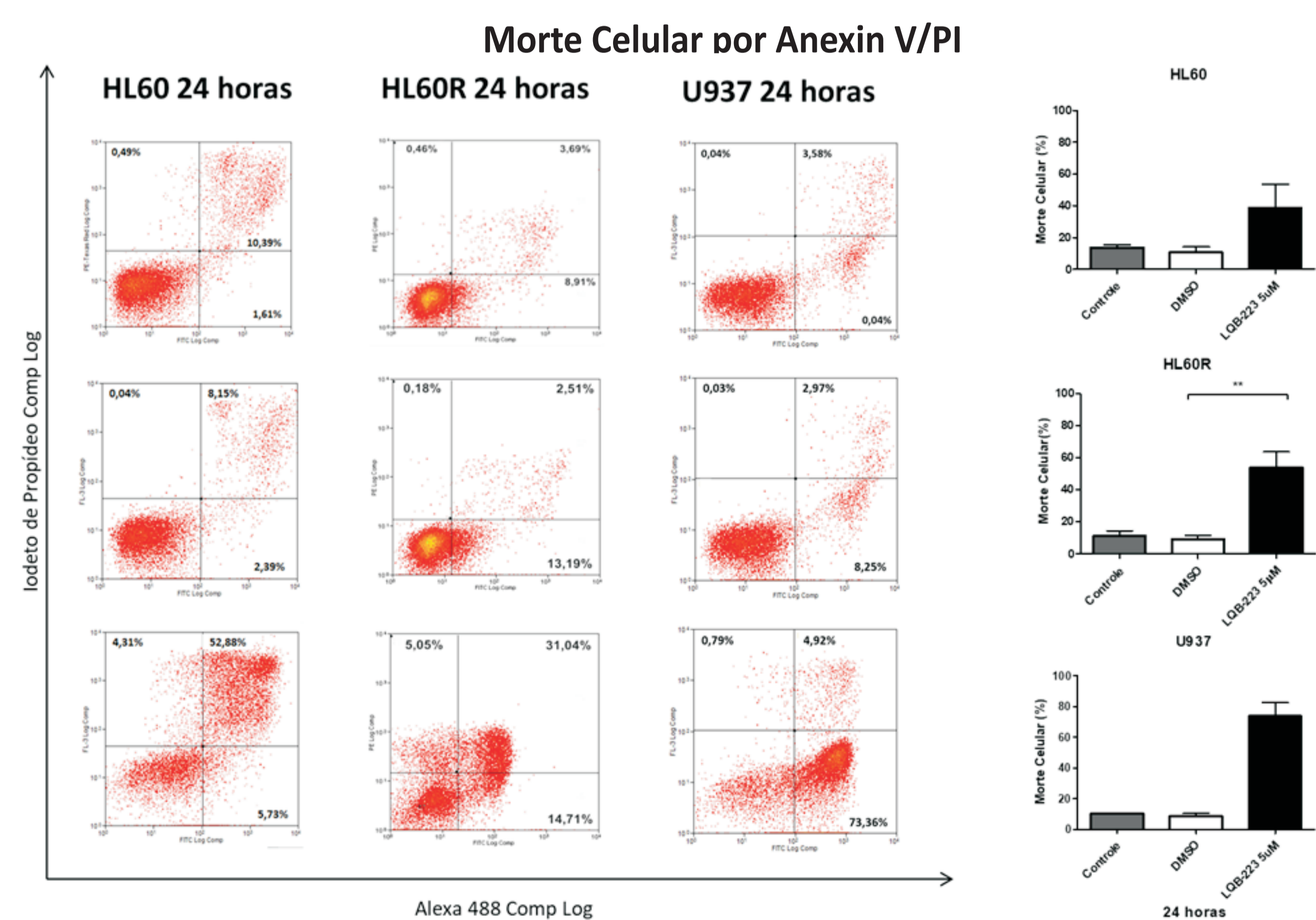


Figura 1: Análise de morte celular das linhagens celulares de LMA tratadas com LQB-223. Células Anexina V+ and Anexina V+ + PI das linhagens celulares HL60, HL60R e U937, após de 24h de tratamento com LQB-223.

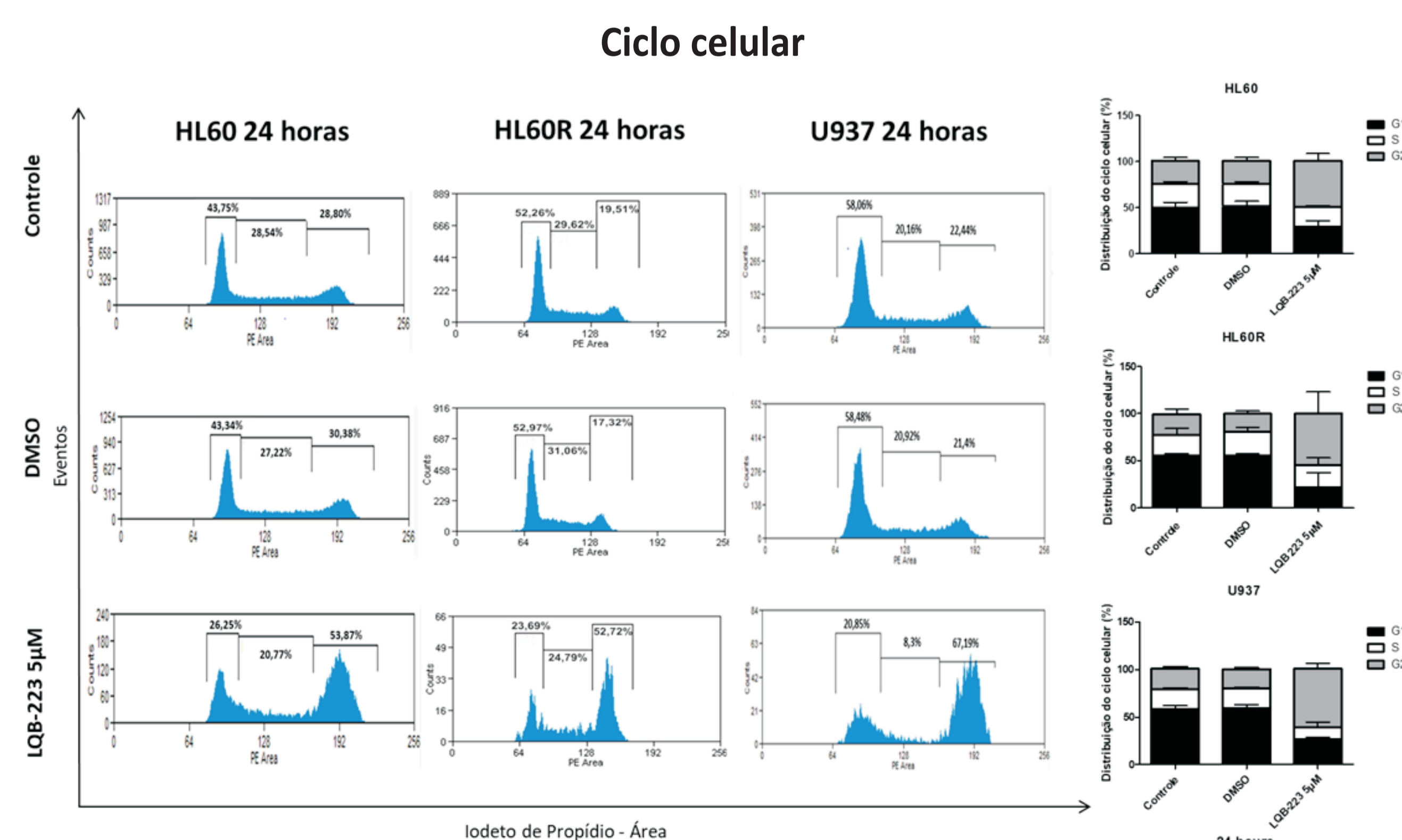


Figura 2: Distribuição do ciclo celular das linhagens celulares de LMA HL60, HL60R e U937 tratadas com LQB-223 por 24h.

Fragmentação do DNA

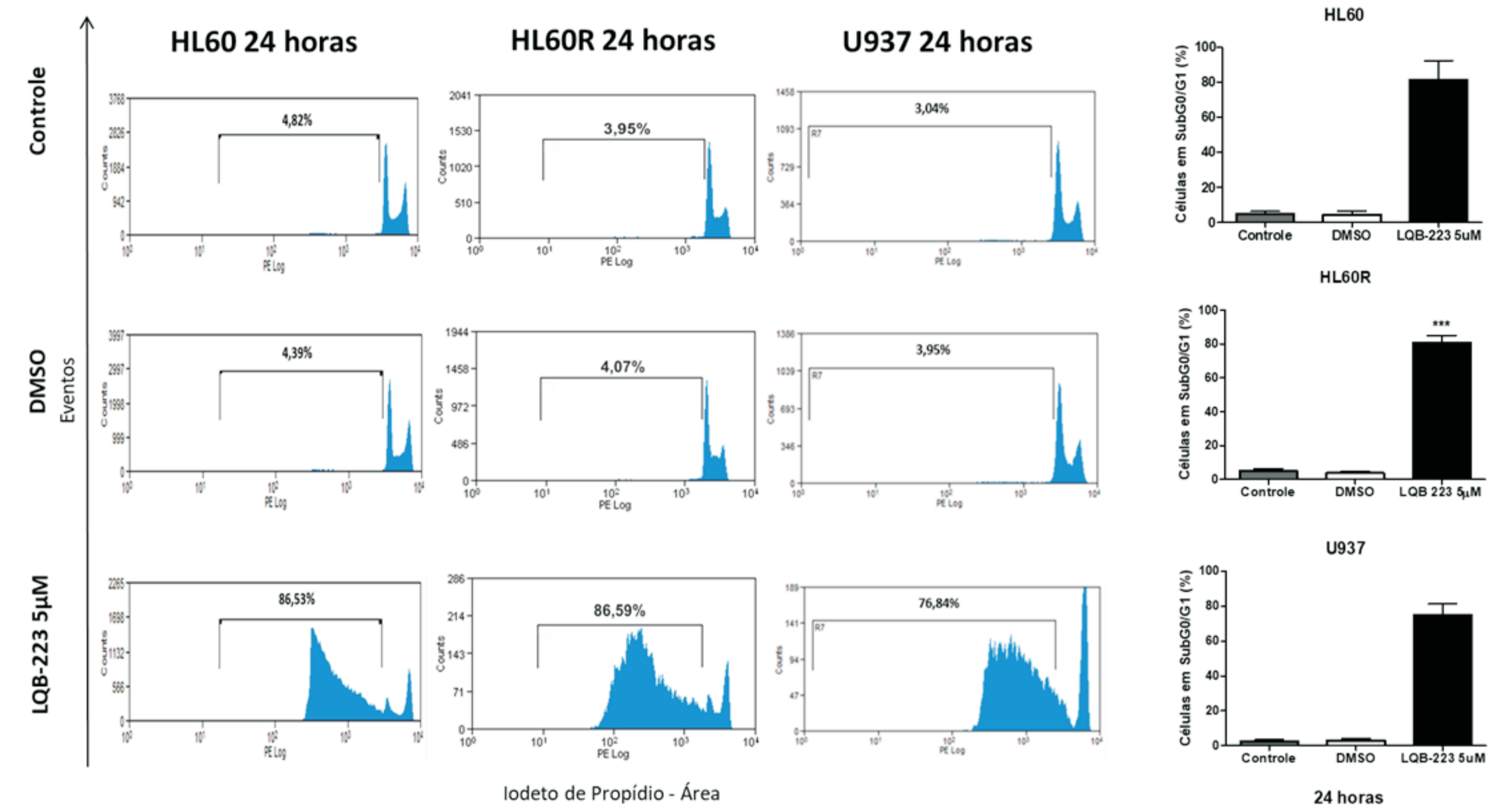


Figura 3: Análise de fragmentação do DNA após tratamento com LQB-223 por 24h das linhagens celulares HL60, HL60R e U937.

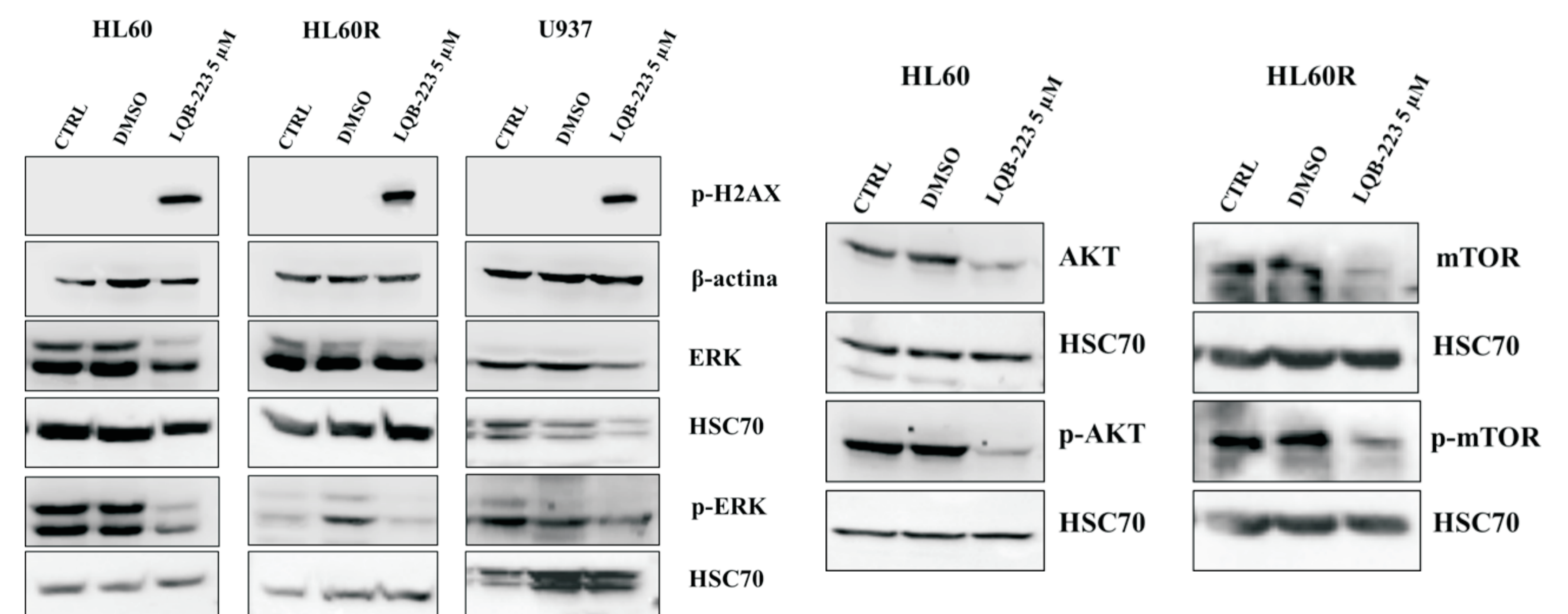


Figura 4: Expressão proteica da fosforilação de H2AX, ERK e fosforilação de ERK das linhagens celulares de LMA HL60 (2N), HL60R (2N) e U937 (1N) por Western Blotting após tratamento com LQB-223 por 24h.

Figura 5: Expressão proteica de AKT, AKT fosforilada (HL60, 2N), mTOR e fosforilação de mTOR (HL60R, 2N) por Western Blotting após tratamento com LQB-223 por 24h.

Localização de FOXOa

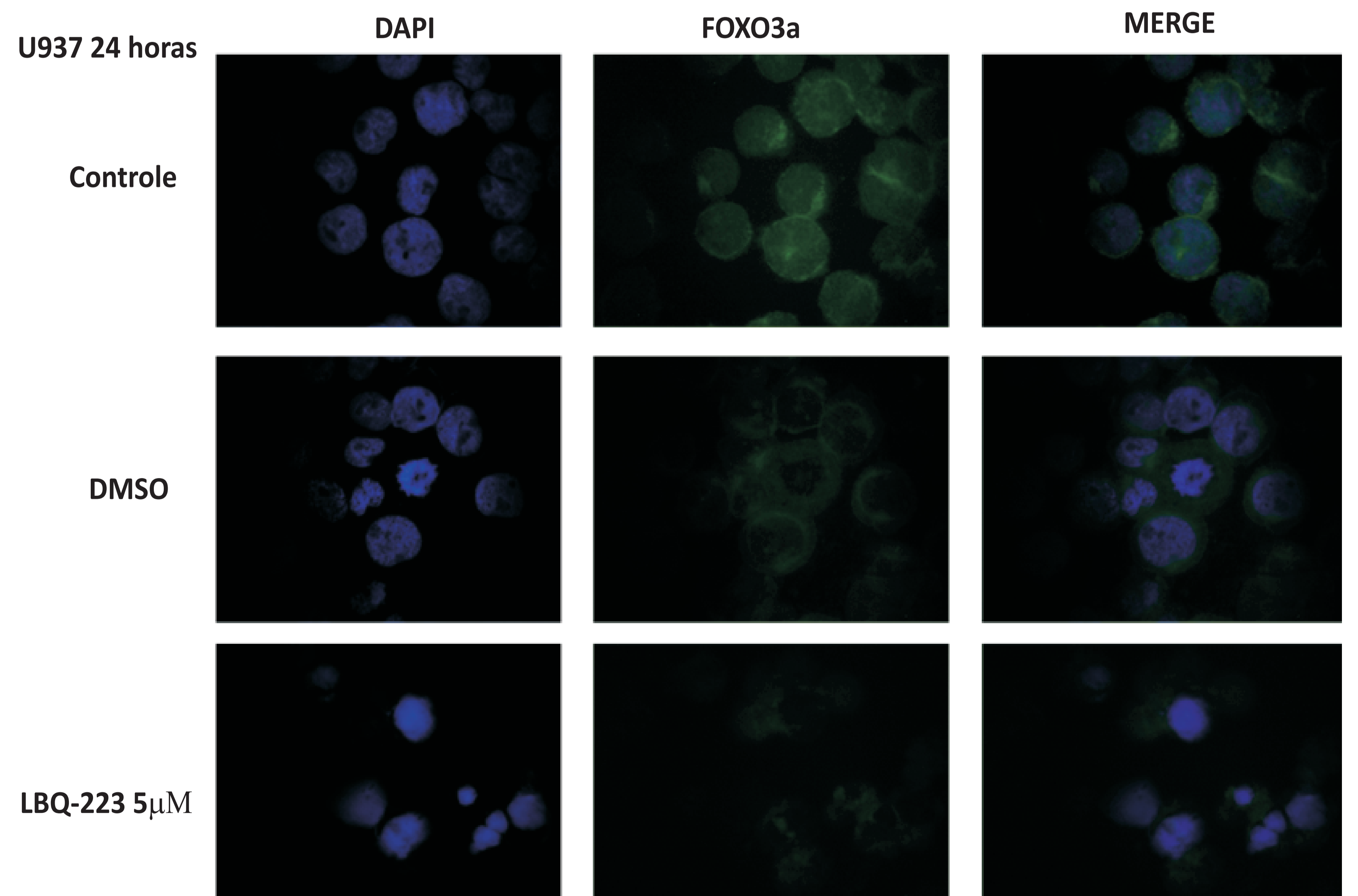


Figura 6: Localização subcelular de FOXO3a por imunofluorescência da linhagem U937 após tratamento com LQB-223 por 24h. Representativo de três experimentos.