

# Mecanismos de resistência as antraciclinas e a citarabina em leucemia mielóide aguda

Aline Rangel Pozzo (Doutorado)<sup>1</sup>, Thais H. Pereira<sup>1</sup>, Marcos A.M. Scheiner<sup>1</sup>, Yung Gonzaga<sup>2</sup>, Ingrid Arcuri<sup>2</sup>, Flavia C. Vasconcelos<sup>1</sup>, Raquel C. Maia<sup>1,2</sup>

1 - Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular; INCA, RJ, Brazil.

2 - Serviço de Hematologia, INCA, RJ, Brazil.

## INTRODUÇÃO

A leucemia mielóide aguda (LMA) é uma doença heterogênea em relação às características citogenéticas, moleculares, resposta ao tratamento, sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD). Uma parcela significativa de pacientes apresenta recidiva precoce e evolui para o óbito devido à aquisição de resistência à quimioterapia. O tratamento atual, baseado na associação das antraciclinas, idarubicina (IDA) ou daunorrubicina (DNR) com a citarabina (Ara-c), se mantém por mais de 40 anos apesar dos resultados insatisfatórios.

## OBJETIVO

Avaliar os mecanismos de resistência aos quimioterápicos: IDA, DNR e Ara-c, em particular a via de sinalização das MAPKs JNK e p38, em linhagens celulares e em amostras de pacientes com LMA.

## METODOLOGIA E RESULTADOS

O perfil de resistência das linhagens de LMA: HL60, Kasumi e U937 foi comparado por citogenética (Figura 1), expressão e atividade das proteínas transportadoras de efluxo: glicoproteína-P (Pgp, codificado pelo gene MDR1), MRP1 e BCRP (Figura 2) e a expressão de proteínas envolvidas com a evasão da apoptose (Figura 3) Para avaliar a sensibilidade aos quimioterápicos foram utilizados os ensaios de viabilidade celular (MTT) (Figura 4), fragmentação do DNA (Figura 5) e ativação de caspase-3 (Figura 6). As linhagens celulares foram tratadas com as doses equivalentes às utilizadas na clínica e comparadas, entre si em relação à sensibilidade e resistência aos fármacos. A IDA foi mais eficiente em reduzir a viabilidade celular na linhagem HL60, a IDA e a DNR na linhagem Kasumi, sendo o Ara-c o mais eficiente em reduzir a viabilidade na linhagem U937. A resistência a DNR foi induzida na linhagem U937 resultando na linhagem resistente U937R (Figura 7). A linhagem U937R não apresentou alterações no ciclo celular, quando comparada com a linhagem sensível, nem alteração nos níveis de expressão das proteínas de efluxo (Figura 9). O perfil de resistência da linhagem U937R foi analisado por Western blot e apresentou alterações no padrão de expressão de proteínas envolvidas com a evasão da apoptose e proteínas relacionadas com a indução de proliferação, como Survivina e Nrf2 (Figura 10). Verificamos que as vias de sinalização das MAPKs JNK e p38, importantes para o processo de indução de apoptose pelos quimioterápicos, não eram mais ativadas pelos quimioterápicos nas linhagens resistentes HL60R e U937R em comparação com as linhagens sensíveis (Figura 11, 12, 13 e 14). Em seguida, as vias de sinalização de JNK e p38 nas linhagens de LMA foram inibidas com RNA de interferência (Figura 15). Tal inibição resultou na redução da sensibilidade aos quimioterápicos nas linhagens de LMA após inibição. Posteriormente verificamos, em amostras de pacientes com LMA, os níveis do miR-27a, responsável pela indução da expressão de MDR1/Pgp foi avaliado por PCR em tempo real e comparado com as características clínicas (Tabela 1), citogenéticas, expressão e função de Pgp, SLD e SG. Verificamos que os níveis do miR-27a são mais elevados nos pacientes com LMA em relação aos indivíduos saudáveis ( $p=0.003$ ) e que os níveis de expressão do miR-27a e da Pgp aumentam ou diminuem simultaneamente em 80% dos pacientes com LMA (Figura 16). Além disso, altos níveis de expressão deste miRNA foi associado a uma menor SG ( $p=0.038$ ) (Figura 17). A hipótese de que a apoptose induzida pelas antraciclinas e pelo Ara-c é dependente da ativação das vias de MAPKs JNK e/ou p38 também esta sendo avaliada em amostras de pacientes com LMA. Nossos dados preliminares sugerem que alterações na fosforilação de proteínas envolvidas no processo de indução de apoptose estão associadas à resistência aos quimioterápicos na LMA.

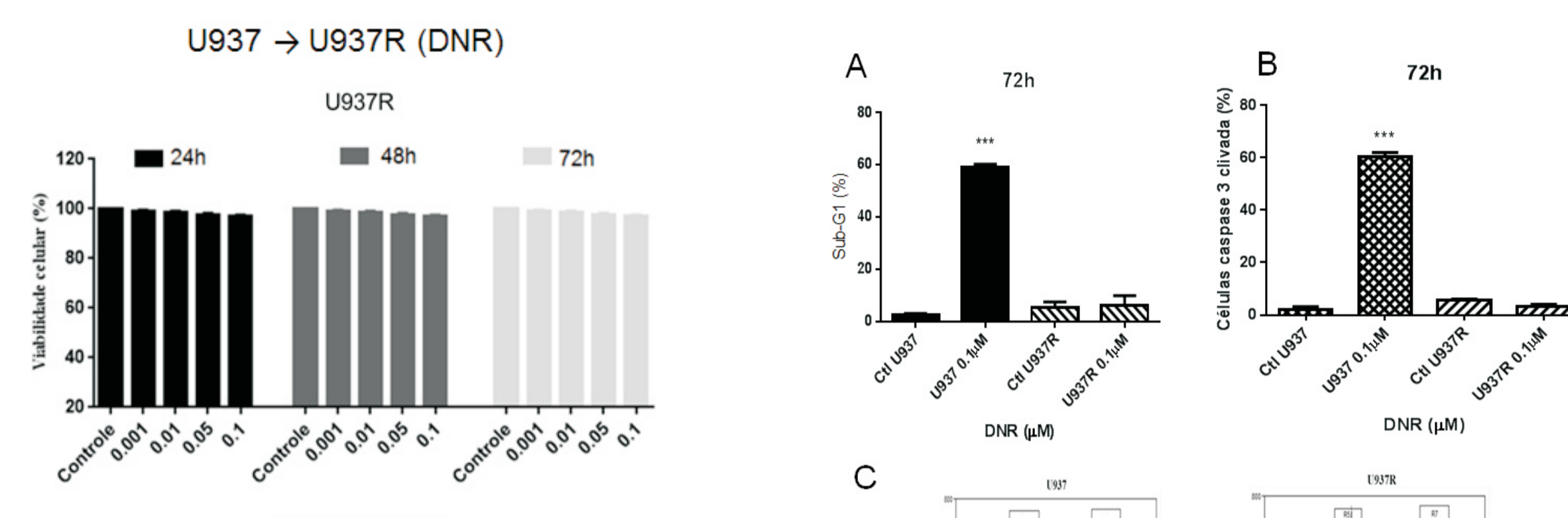


Figura 7: Perfil de sensibilidade da linhagem resistente U937R ao tratamento com concentrações crescentes de Daunorrubicina (DNR) por 24, 48 e 72 horas, respectivamente, analisado pelo ensaio de MTT. Os gráficos mostram que a linhagem U937R é resistente até a concentração de 0.1 µM de DNR (B). \*\*\* $p<0.001$ .

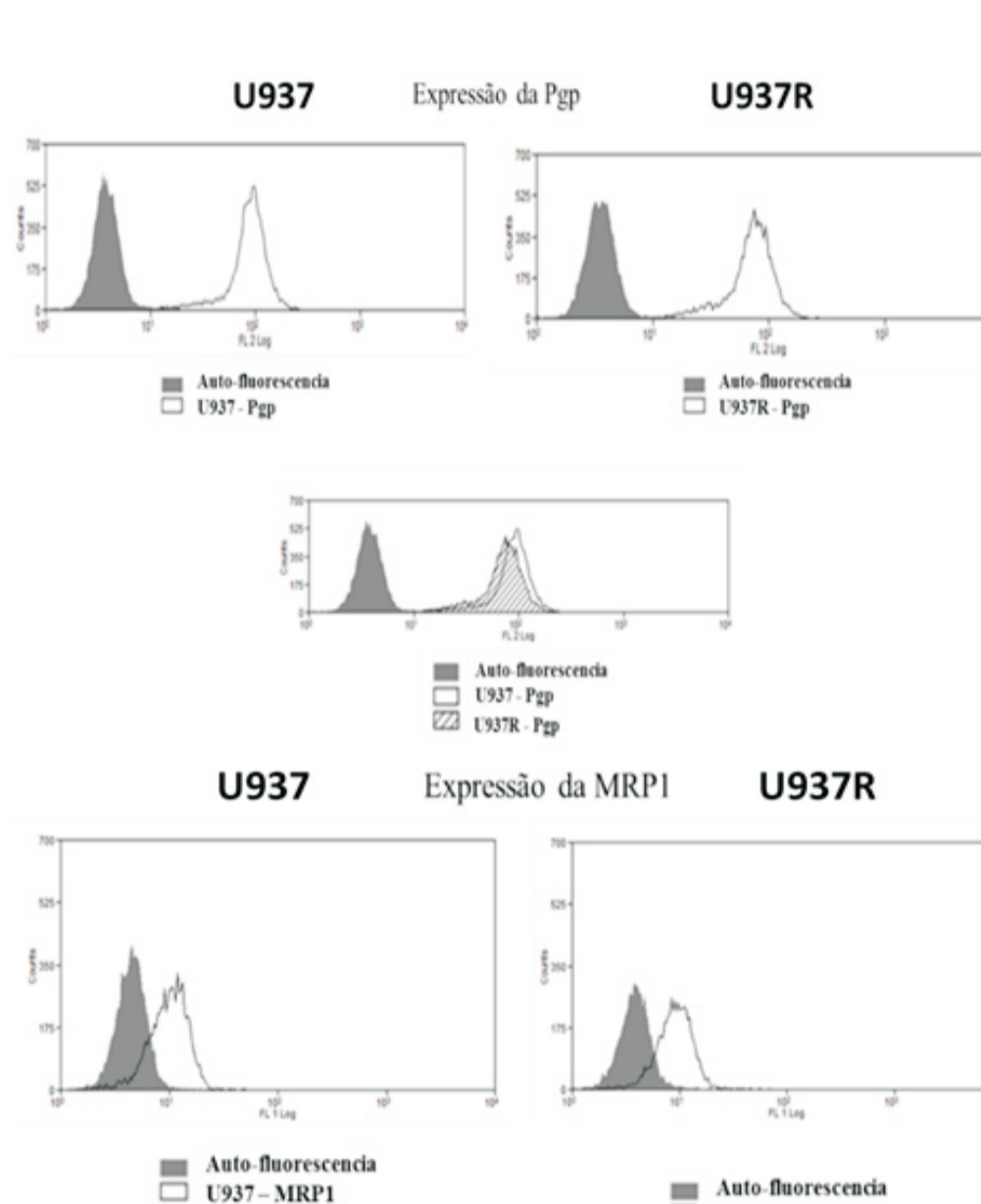


Figura 9: Perfil de expressão da proteína transportadora de efluxo Pgp na linhagem resistente de leucemia mielóide aguda. A expressão da Pgp na linhagem U937R foi avaliada por citometria de fluxo. A expressão da Pgp é representada pelo desvio para a direita (curva na cor branca) em relação ao controle negativo/sem anticorpo (pico cinza).

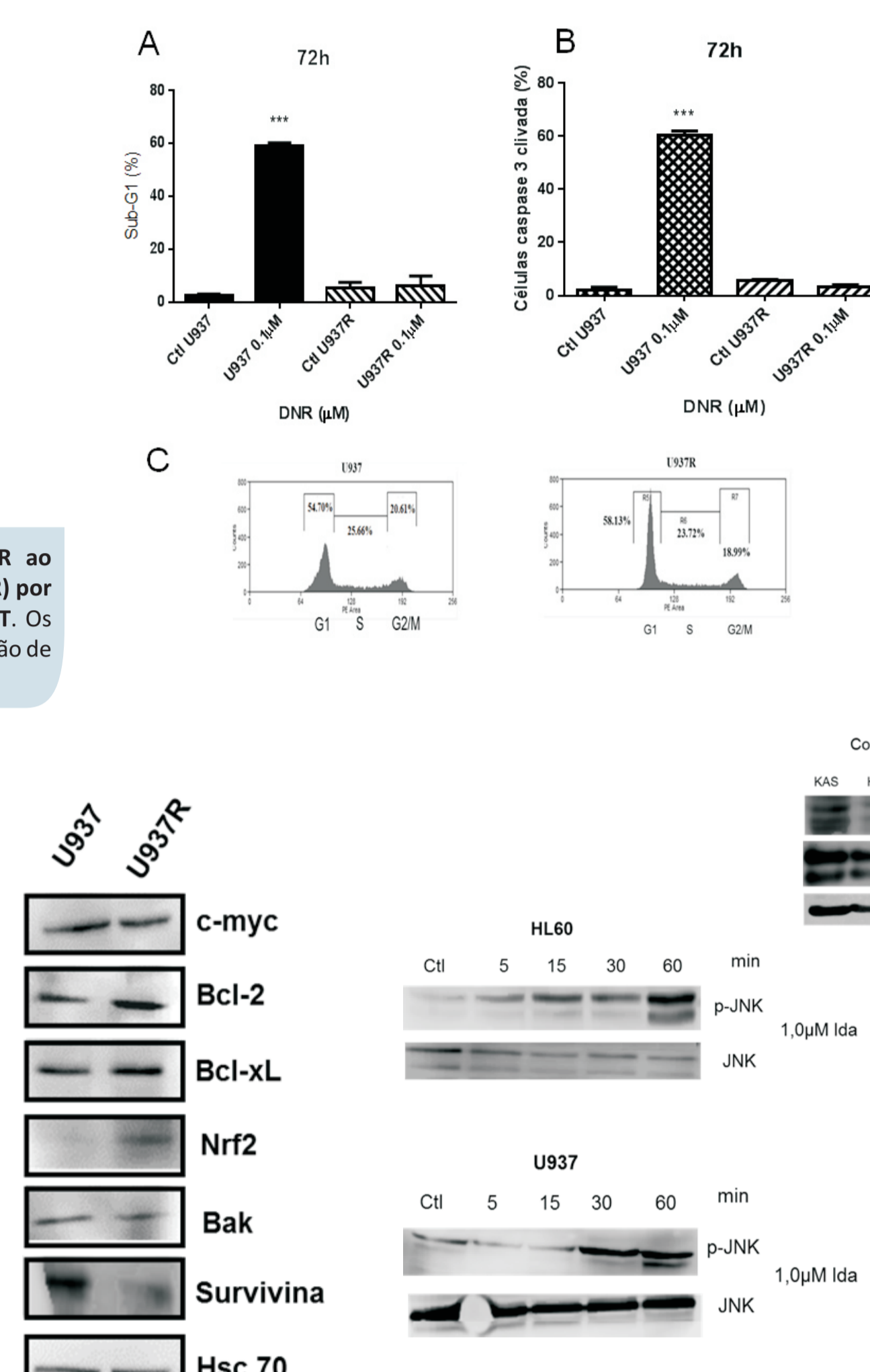


Figura 10: Expressão de proteínas envolvidas com a evasão da apoptose e aumento da proliferação na linhagem de LMA resistente por Western blotting. A expressão das proteínas c-myc, Bcl-2, Nrf2, Bak e Survivina foram comparadas nas linhagens U937 e U937R. Os níveis de Hsc 70 foram utilizados como controle endógeno.

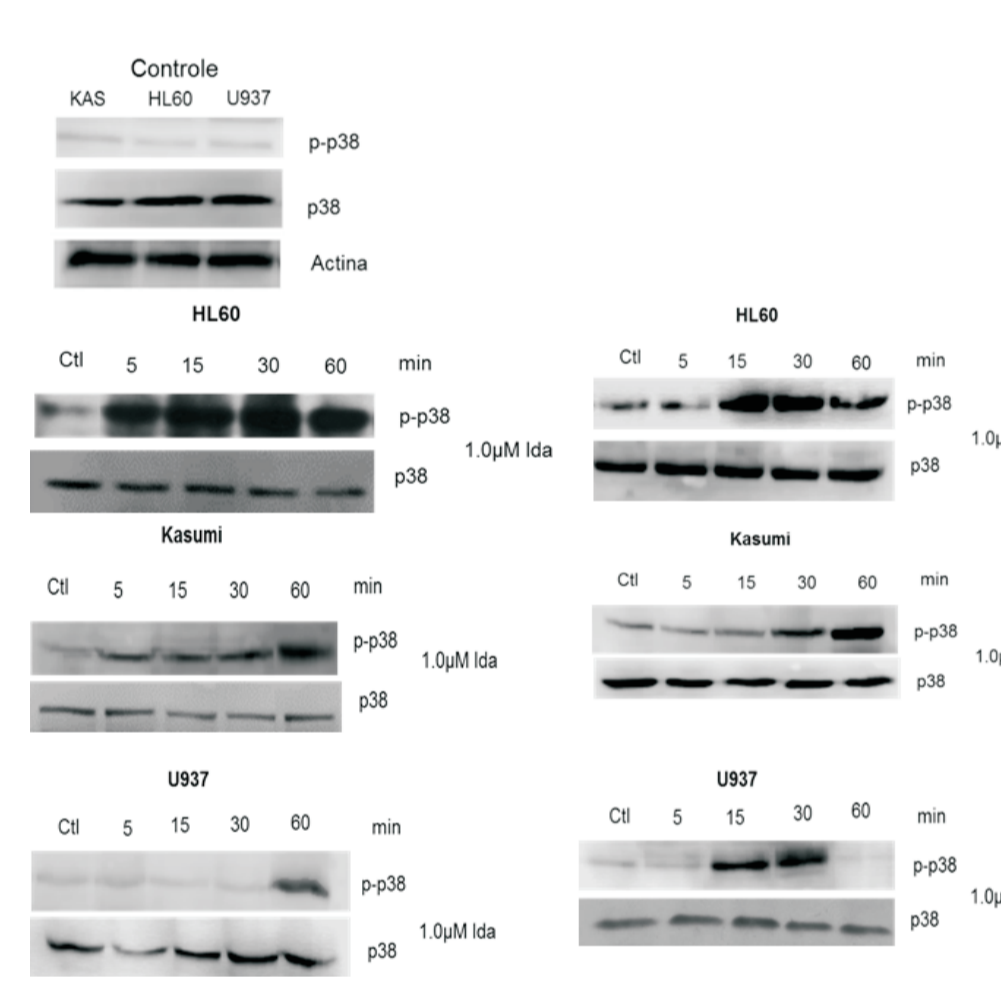


Figura 12: Cinética de indução de fosforilação de p38 pelas antraciclinas em linhagens de LMA por Western blotting. Os blots mostram a indução de fosforilação de p38 após o tratamento com as antraciclinas IDA e DNR nas linhagens HL60, Kasumi e U937. As células foram expostas a uma maior concentração equivalente utilizada na clínica (1.0 µM) tanto para a IDA quanto para a DNR por 5, 15, 30 e 60 minutos. As figuras são representativas de três experimentos independentes. p-p38: JNK fosforilado e p38: p38 total.

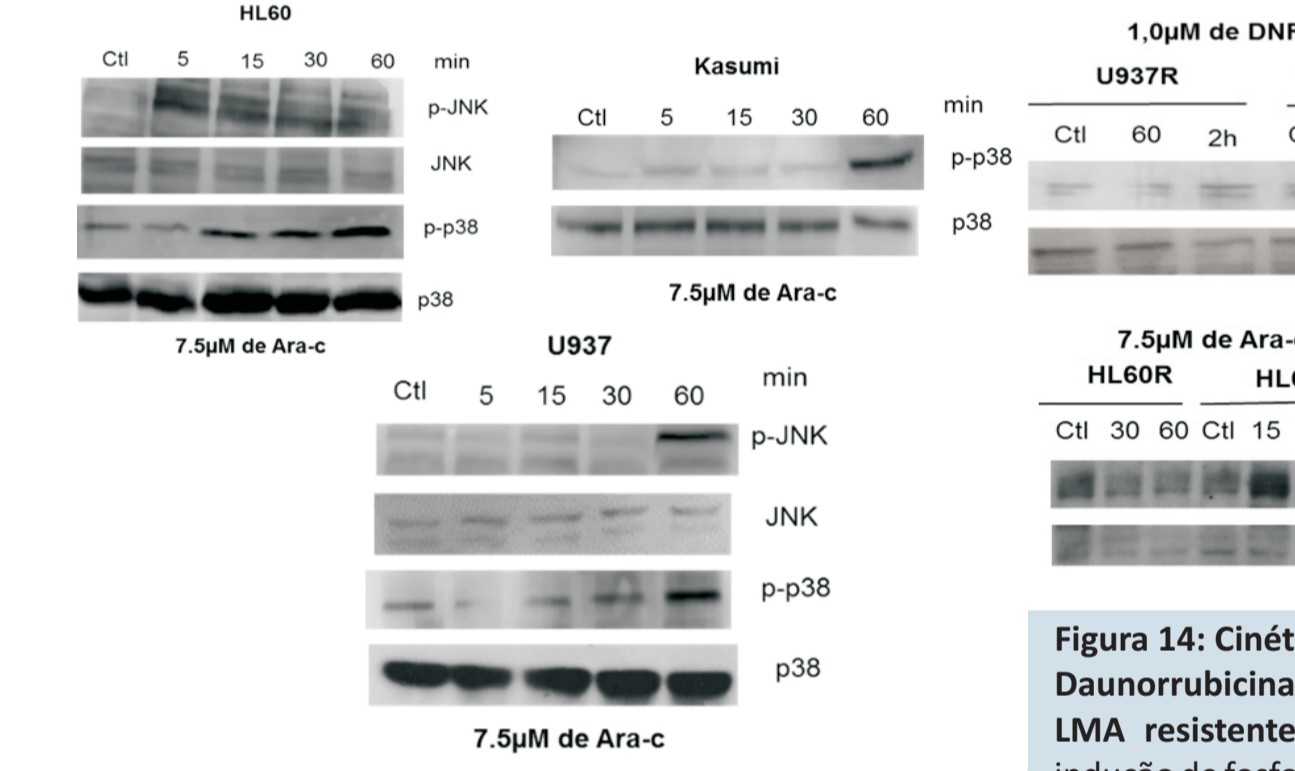


Figura 13: Cinética de indução de fosforilação de JNK e p38 pela citarabina (Ara-c) em linhagens de leucemia mielóide aguda, por Western blotting. Os blots mostram a indução de fosforilação de JNK e p38 após o tratamento com o Ara-c nas linhagens HL60, Kasumi e U937. As células foram expostas a uma maior concentração equivalente utilizada na clínica (7.5 µM) para o Ara-c por 5, 15, 30 e 60 minutos.

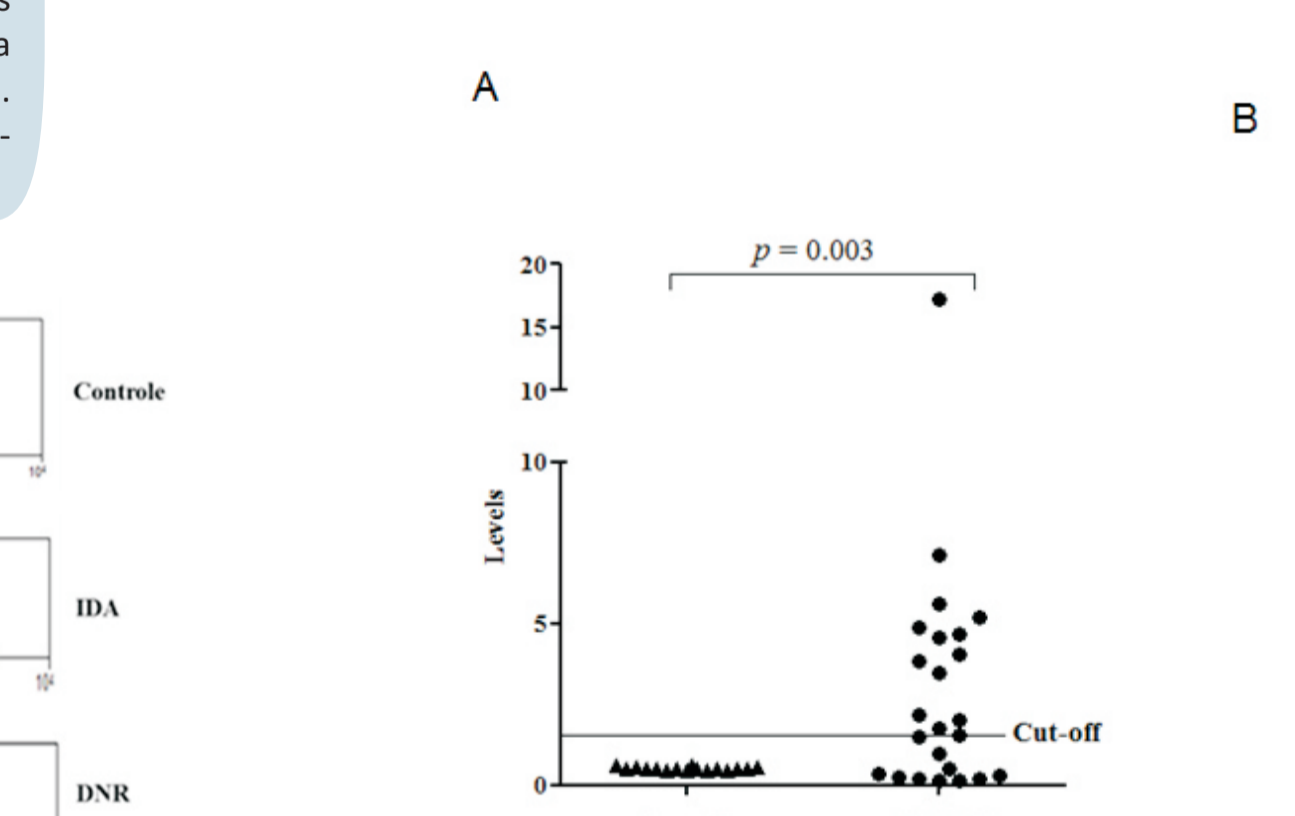


Figura 14: Cinética de indução de fosforilação de JNK e p38 pela Daunorrubicina (DNR) e pela citarabina (Ara-c) nas linhagens de LMA resistentes, por Western blotting. Os blots mostram a indução de fosforilação de JNK e p38 após o tratamento com o Ara-c na linhagem HL60R e com DNR na linhagem U937R. As células foram expostas a uma maior concentração equivalente utilizada na clínica (1.0 µM) para a DNR e (7.5 µM) para o Ara-c por 5, 15, 30 e 60 minutos.

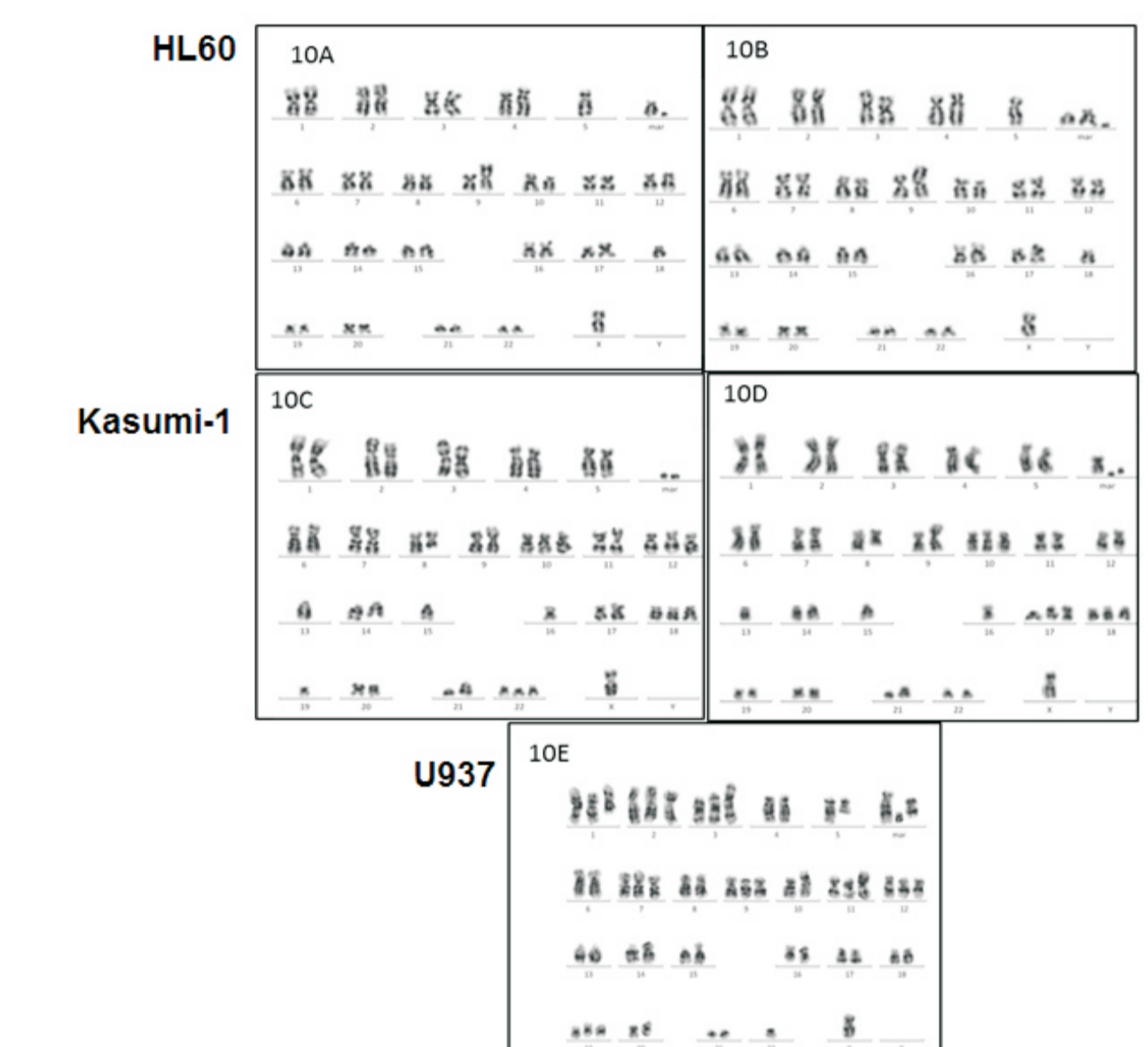


Figura 1: Análise por citogenética clássica (Bandeamento GTG) mostrando alterações cromossômicas encontradas na HL60 (1A e 1B), Kasumi (1C e 1D) e U937 (1E). Os cromossomos foram classificados e identificados de acordo com a nomenclatura internacional de citogenética ISCN (2013). As imagens foram adquiridas utilizando o sistema de cariotipagem cytovision.

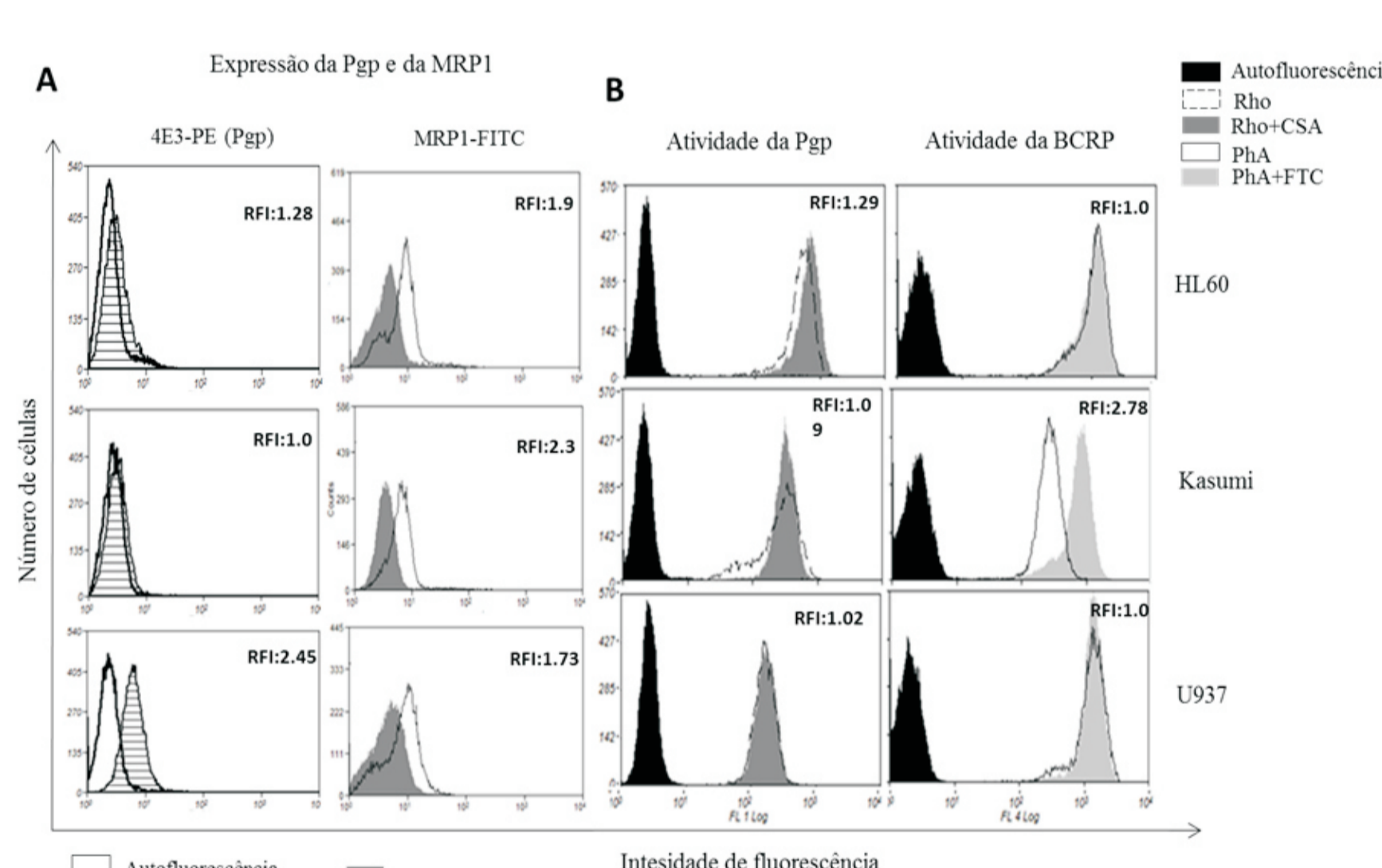


Figura 2: Expressão da glicoproteína P (Pgp), da MRP1 (multidrug resistance protein 1) e atividade da Pgp e da BCRP (Breast cancer resistance protein) em linhagens de leucemia mielóide aguda. A expressão da Pgp e MRP1 nas linhagens HL60, Kasumi e U937. Amostras apresentando RFI maior do que 1.1 foram consideradas positivas.

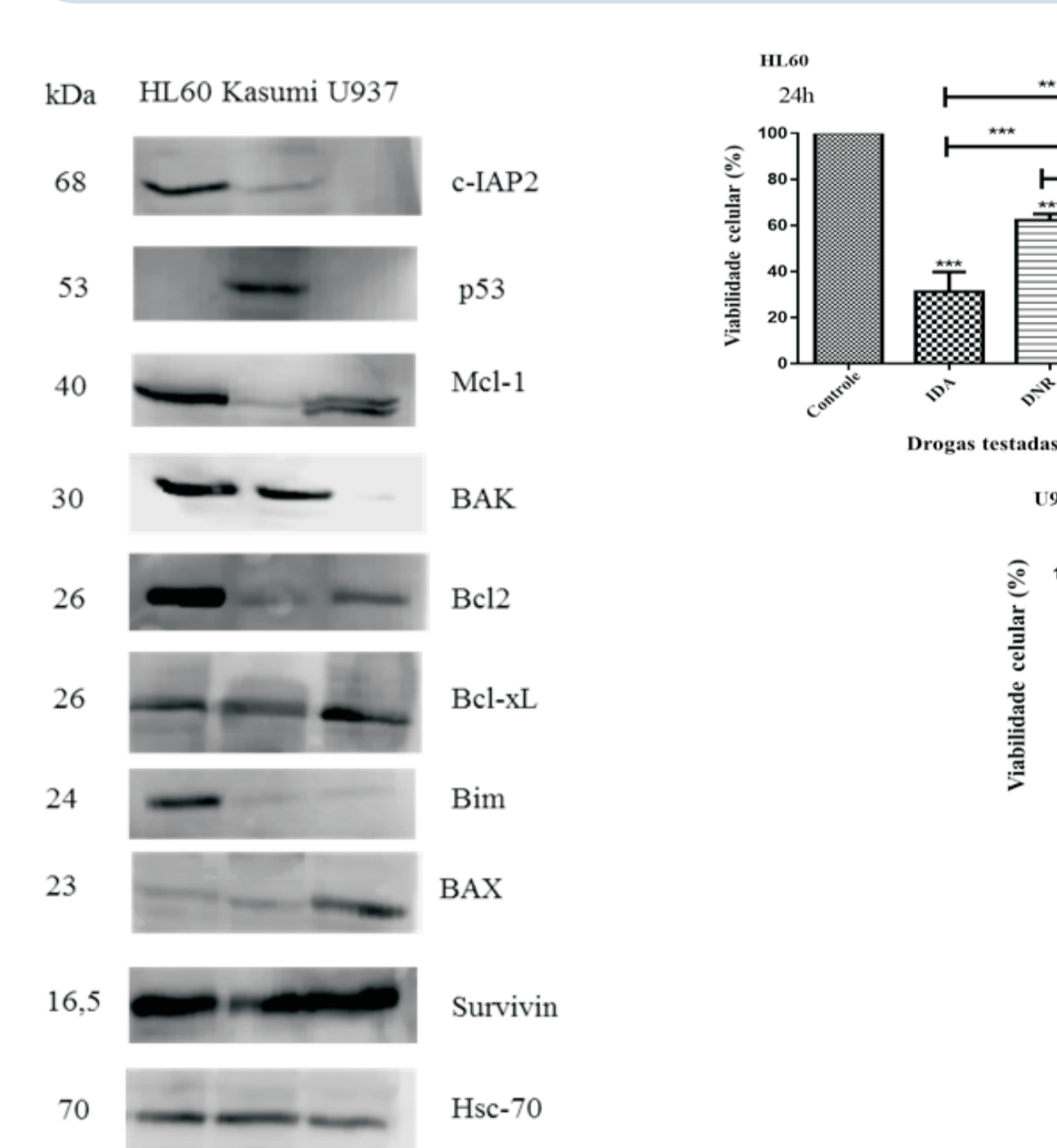


Figura 3: Perfil de expressão de proteínas anti e pró-apoptóticas em linhagens celulares de LMA, por Western blotting. As linhagens celulares HL60, Kasumi e U937 expressam diferentemente as proteínas anti-apoptóticas c-IAP2, Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL e Survivina e as proteínas pró-apoptóticas p53, Bak, Bim e Bax. Hsc 70 foi utilizado como um controle endógeno.

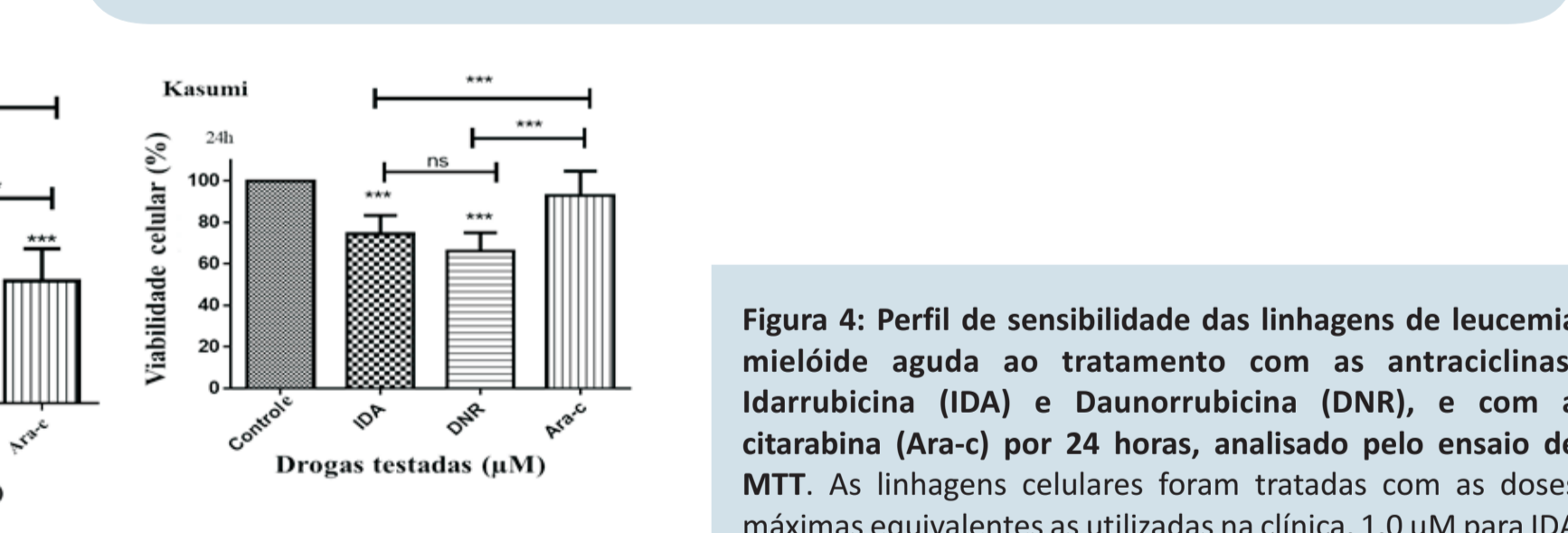


Figura 4: Perfil de sensibilidade das linhagens de leucemia mielóide aguda ao tratamento com as antraciclinas, idarubicina (IDA) e Daunorrubicina (DNR), e com a citarabina (Ara-c) por 24 horas, analisado pelo ensaio de MTT. As linhagens celulares foram tratadas com as doses máximas equivalentes às utilizadas na clínica, 1.0 µM para IDA e DNR e 7.5 µM para o Ara-c por 24h e comparadas em relação a sua efetividade. Os resultados estão expressos através da média ± desvio padrão de três experimentos independentes. \*\*\* $p<0.001$ , ns: Sem significância estatística. Teste ANOVA, seguido do pós-teste Turkey.

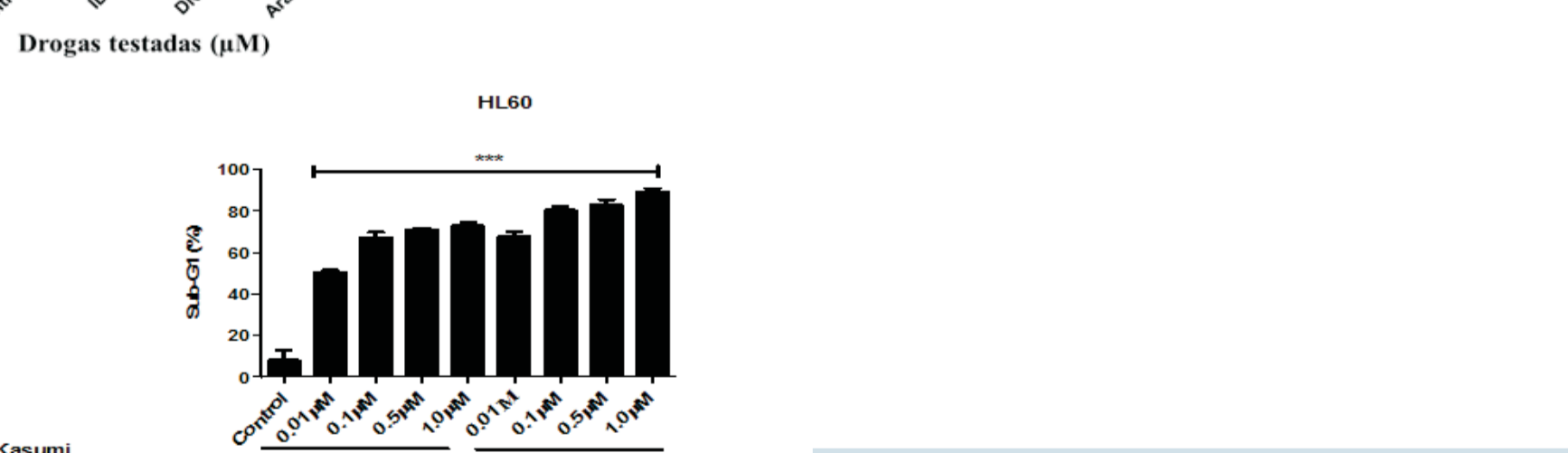


Figura 5: Indução de morte celular pela Idarubicina (IDA) e Daunorrubicina (DNR) nas linhagens celulares HL60 (A), Kasumi (B) e U937 (C) pela análise da população em sub-G0/G1, por citometria de fluxo. As linhagens de LMA foram expostas a concentrações crescentes de IDA e DNR (0.01; 0.1; 0.5 e 1.0 µM) por 24h e teve seu conteúdo de DNA avaliado. \*\*\* $p<0.001$ .



Figura 6: Indução de apoptose pelas antraciclinas e pelo Ara-c e avaliação dos níveis de caspase-3 clivada nas linhagens de leucemia mielóide aguda, por citometria de fluxo. As células foram expostas a duas concentrações de Idarubicina (IDA) e Daunorrubicina (DNR) (0.01 e 0.1 µM) (A) e Ara-c (1.0, 10 e 50 µM) por 24h (B). Concentrações maiores de IDA ou DNR não foram testadas devido a fluorescência da droga. \*\*\* $p<0.001$ .

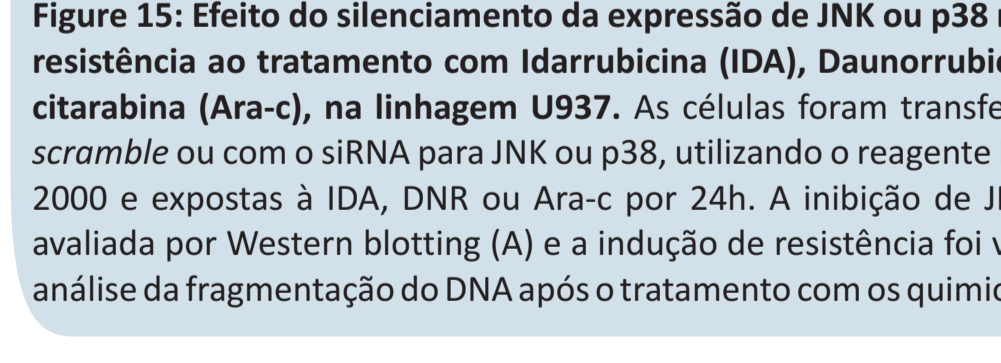


Figura 15: Efeito do silenciamento da expressão de JNK ou p38 na indução de resistência ao tratamento com Idarubicina (IDA), Daunorrubicina (DNR) ou citarabina (Ara-c), na linhagem U937. As células foram transfectadas com o scramble ou com o siRNA para JNK ou p38, utilizando o reagente Lipofectamina 2000 e expostas à IDA, DNR ou Ara-c por 24h. A inibição de JNK ou p38 foi avaliada por Western blotting (A) e a indução de resistência foi verificada pela análise da fragmentação do DNA após o tratamento com os quimioterápicos (B).

Characteristics	Number	%
Age at diagnosis		
1 – 18 years	7/24	29.2
19 – 69 years	17/24	70.8
Gender		
Male	13/24	54.2
Female	11/24	45.8
Cytogenetic*		
Favorable	4/21	19.0
Adverse	17/21	81.0
Status after induction therapy		
Complete remission	20/24	83.3
Without remission	3/24	12.5
Partial remission	1/24	4.2

\*Three cases of unavailable data

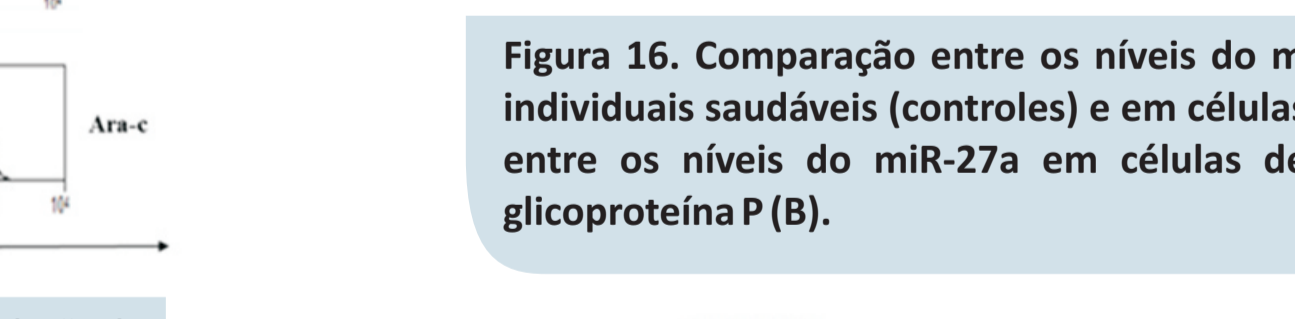


Figura 16: Comparação entre os níveis de miR-27a das células de medula óssea de indivíduos saudáveis (controles) e em células de pacientes com LMA (A) e correlação entre os níveis de miR-27a em células de pacientes com LMA e expressão da glicoproteína P (B).

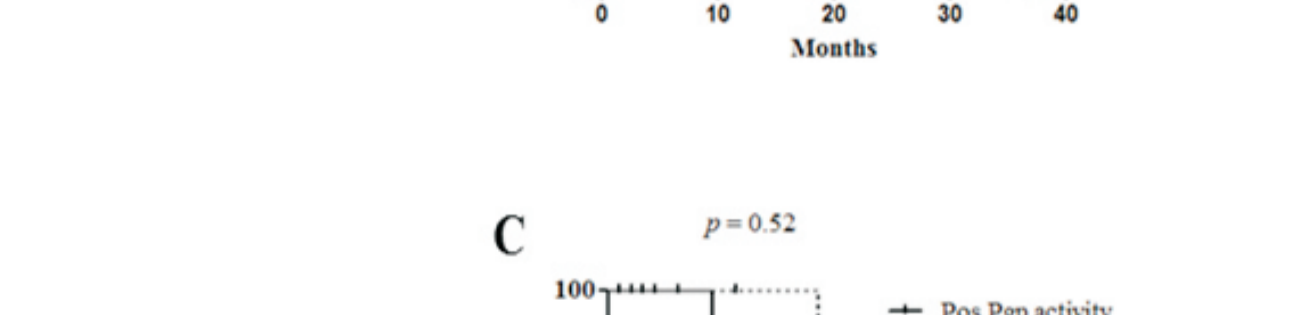


Figura 17: Curvas de sobrevida global (OS) e sobrevida livre de doença (DFS) dos pacientes com LMA de novo. A) OS em relação aos níveis de miR-27a. B) DFS em relação aos níveis de miR-27a. C) OS em relação à atividade da Pgp. D) OS em relação à expressão da Pgp.