



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Instituto de Biologia**

**LEONARDO LUIS ARTICO**

***IGFBP7* COMO UM NOVO ALVO TERAPÊUTICO NA LEUCEMIA  
LINFOIDE AGUDA**

***IGFBP7* AS A NEW THERAPEUTIC TARGET IN ACUTE  
LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA**

**CAMPINAS**

**2019**

**LEONARDO LUIS ARTICO**

***IGFBP7* COMO UM NOVO ALVO TERAPÊUTICO NA LEUCEMIA  
LINFOIDE AGUDA**

***IGFBP7* AS A NEW THERAPEUTIC TARGET IN ACUTE  
LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR, na Área de GENÉTICA ANIMAL E EVOLUÇÃO.

Dissertation presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY, in the concentration area of ANIMAL GENETICS AND EVOLUTION.

Orientador: Dr. José Andrés Yunes

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELO ALUNO LEONARDO  
LUIS ARTICO E ORIENTADA PELO PROF.  
DR. JOSÉ ANDRÉS YUNES.

CAMPINAS

2019

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2017/03239-5

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Ar78i Artico, Leonardo Luis, 1994-  
IGFBP7 como um novo alvo terapêutico na leucemia linfóide aguda /  
Leonardo Luis Artico. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: José Andrés Yunes.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de  
Biologia.

1. Câncer. 2. Leucemia linfóide aguda. 3. Gene IGFBP7. 4. Resistência a  
quimioterápicos. 5. Glicocorticóides. I. Yunes, José Andrés. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** IGFBP7 as a new therapeutic target in acute lymphoblastic leukemia

**Palavras-chave em inglês:**

Cancer  
Acute lymphoblastic leukemia  
IGFBP7 gene  
Chemotherapeutics resistance  
Glucocorticoids

**Área de concentração:** Genética Animal e Evolução

**Títuloção:** Mestre em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

José Andrés Yunes [Orientador]  
Carmen Veríssima Ferreira Halder  
Priscila Pini Zenatti

**Data de defesa:** 20-02-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular

Campinas-SP, 20 de fevereiro de 2019

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Dr. José Andrés Yunes

Dra. Carmen Veríssima Ferreira Halder

Dra. Priscila Pini Zenatti

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho aos pacientes do Hospital Boldrini, na esperança de que o conhecimento descrito nesta dissertação contribua de alguma forma para melhorar a qualidade de vida dos mesmos, trazendo conforto e esperança para seus familiares...*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à minha família: meus pais, Luizete e Enio, por terem sido minha fonte de inspiração e meu suporte até o presente momento; minha irmã Maila por ser meu maior exemplo de superação e humildade e meu irmão Eduardo, por me encher de orgulho com suas conquistas diárias.

Agradeço à família que nós escolhemos ao longo da vida, meus amigos Cássio, Édila, Tanara e Jacinta, os quais sempre acreditaram em mim e me deram todo o apoio necessário para que eu pudesse correr atrás dos meus sonhos.

Agradeço aos meus pais de pesquisa Dra. Ana Cristina, Dr. Juliano, Dra. Ana Paula e Dr. Wellington, graças a vocês hoje eu realizo pesquisa ética, científica e de qualidade. Vocês são, sem dúvidas, minhas fontes inspiradoras!

Agradeço ao meu atual orientador, Dr. Andrés Yunes por ter acreditado em mim, pelos aprendizados e pelo desenvolvimento profissional e pessoal que está me proporcionado.

Agradeço a todos os amigos do Centro de Pesquisa Boldrini que foram tão importantes para mim e para o trabalho. Aninha, Mônica, Jotta, Ana Mosca, Bruna, Seleny, Lílian, Carol Lopes, Mariana, Priscila, Lívia, Natacha, Nathália Cury, Juliana, Mayara, Natália Paiva, Leonardo, Carol Dias, Zeni, Juan, Diego e Zé. Agradeço imensamente por toda a companhia, pelos cafés, congressos, pelos desabafos, pelo carinho e claro, pelos momentos científicos. Agradeço também a todos os demais colegas do Hospital Boldrini que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado. Agradeço à Direção do Centro Infantil Boldrini, principalmente à Dra. Silvia, por consentir a realização deste estudo e por me proporcionar tamanha oportunidade de aprendizado.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) a qual proporcionou o financiamento deste projeto (processo 2017/03239-5) através do convenio com a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## RESUMO

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é o tipo de câncer mais comum na infância, representando cerca de 30% de todos os casos de cânceres e 80% de todas as leucemias que ocorrem até a faixa etária de 15 anos. Apesar da melhora da terapia para LLA, essa doença ainda é a causa mais comum de morte relacionada a câncer em crianças em todo o mundo. Na última década, alguns trabalhos demonstraram que a maior expressão de *IGFBP7* estaria relacionada a um pior prognóstico dos pacientes com LLA. Mostramos anteriormente que as células de LLA são a principal fonte de *IGFBP7* no microambiente da leucemia, a qual exerce um efeito parácrino sobre as células estromais da medula óssea, refletindo na resistência a terapia primária pelos pacientes. Aqui, demonstramos que *IGFBP7* exerce também um efeito autócrino sobre as células de LLA (linhas celulares e células primárias). Observamos que os efeitos positivos de proliferação mediados por Insulina/IGFs nas linhagens celulares de LLA são significativamente aumentados pela adição de *IGFBP7* recombinante, promovendo a maior ativação da via PI3k/Akt/mTOR. Todavia, o silenciamento de *IGFBP7* prejudica este efeito, impulsionando a ativação da via p53 nas células silenciadas. Ainda, ilustramos que o *knockdown* de *IGFBP7* sensibiliza as células de LLA diante das ações citostáticas mediadas pelo fármaco Dexametasona e confirmamos que *IGFBP7* promove resistência quimioterápica aos glicocorticoides na LLA. Nossos dados demonstram ainda que a neutralização de *IGFBP7* com anticorpo monoclonal é prejudicial para a viabilidade *in vitro* e *in vivo* da leucemia. Por fim, relatamos também que a associação do anticorpo anti-*IGFBP7* com Dexametasona reduz drasticamente a viabilidade celular da LLA, confirmando a importância da *IGFBP7* na progressão desta neoplasia.

## ABSTRACT

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the most common pediatric cancer, corresponding to about 30% of all cases of cancer and 80% of all leukemia in patients of less than 15 years old. Despite the improvement on the therapy of ALL, this disease is still the most common cause of cancer-related death in young people around the world. In the last decade, some studies have shown that high expression of *IGFBP7* would be related to a worse prognosis in ALL patients. We have previously shown that ALL cells are the main source of IGFBP7 in the leukemia microenvironment, where it exerts a paracrine effect on bone marrow stromal cells, reflecting resistance to primary therapy by patients. Here we show that IGFBP7 exerts also an autocrine effect on ALL cells (cell lines and primary cells). We observed that the positive effects of INS/IGF on ALL cell lines viability were significantly enhanced by recombinant IGFBP7, promoting PI3k/Akt/mTOR pathway activation. However, IGFBP7 silencing impairs this effect, boosting the p53 pathway activation in the silenced cells. Furthermore, we illustrate that IGFBP7 knockdown sensitizes ALL cells to cytostatic actions mediated by Dexamethasone and confirmed that IGFBP7 promotes chemo-therapeutic resistance to glucocorticoids in ALL. Our data further demonstrates that IGFBP7 neutralization with monoclonal antibody is detrimental to the in vitro and in vivo leukemia viability. Finally, we have shown that association of anti-IGFBP7 antibody plus Dexamethasone dramatically reduces the ALL cellular viability, revealing the importance of IGFBP7 in leukemia progression.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Vias de sinalização da insulina, IGF1 e IGF2 e seus receptores	16
<b>Figura 2.</b> Nível de expressão dos diferentes éxons do gene do receptor de insulina em amostras de LLA pediátrica	17
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de ação de IGFBP7 na LLA	21

## CAPÍTULO I

<b>Figure 1.</b> <i>IGFBP7</i> downregulation results in decreased proliferation, survival, viability and migration of ALL cell lines	31
<b>Figure 2.</b> <i>IGFBP7</i> enhances INS/IGF signaling and viability in ALL	32
<b>Figure 3.</b> Relevance of <i>IGFBP7</i> <i>in vivo</i> and efficacy of anti- <i>IGFBP7</i> monoclonal antibody therapy	33
<b>Supplementary Figure 1.</b> Validation of <i>IGFBP7</i> downregulation by ELISA and Western blot	35
<b>Supplementary Figure 2.</b> Effect of <i>IGFBP7</i> downregulation on ALL proliferation and <i>in vivo</i> progression	36
<b>Supplementary Figure 3.</b> Western blot analysis validating our mouse anti-human <i>IGFBP7</i> antibody	37

## CAPÍTULO II

<b>Figura 1.</b> O silenciamento de <i>IGFBP7</i> promove a ativação da via p53 nas linhagens de LLA-B	47
<b>Figura 2.</b> Nutlin-3 reduz a viabilidade de linhagens celulares de LLA com <i>IGFBP7</i> silenciado	49
<b>Figura 3.</b> <i>IGFBP7</i> protege a LLA da supressão tumoral mediada por p53	51

<b>Figura 4.</b> IGFBP7 protege as células de LLA diante das ações citostáticas mediadas por Dexametasona	52
<b>Figura 5.</b> A neutralização de IGFBP7 com uso de anticorpo monoclonal reduz a viabilidade celular e sensibiliza LLA à ação da Dexametasona	54
<b>Figura 6.</b> O silenciamento de <i>IGFBP7</i> promove ativação e translocação nuclear de GR nas linhagens celulares de LLA tratadas com Dexametasona	56
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática da sinalização de INS/IGFs/IGFBP7 promovendo ativação da via PI3K/Akt/mTOR	63
<b>Figura 8.</b> <i>Crosstalk</i> negativo entre p53 e a via PI3K/Akt/mTOR mediado por IGFBP7	66

## SUMÁRIO

1.0. INTRODUÇÃO GERAL .....	13
2.0. REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1. O Sistema IGFs .....	17
2.2. IGFBP7 (Proteína 7 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina) ....	21
2.3. IGFBP7 e a resistência quimioterápica.....	22
3.0. OBJETIVO GERAL.....	25
3.1. Objetivos específicos .....	25
CAPÍTULO I.....	26
IGFBP7 COMO UM NOVO ALVO TERAPÊUTICO NA LLA.....	26
1.0. MANUSCRITO.....	27
2.0. MATERIAL SUPLEMENTAR .....	37
CAPÍTULO II.....	49
DESVENDANDO OS MECANISMOS DE AÇÃO DE IGFBP7 .....	49
1.0. RESULTADOS .....	50
1.1. O silenciamento de IGFBP7 ativa a sinalização da via p53 em células de LLA-B .	50
1.2. Nutlin-3 reduz a viabilidade das linhagens celulares de LLA knockdown para IGFBP7.....	51
1.3. IGFBP7 parece proteger a LLA diante da supressão tumoral mediada por p53.....	52
1.4. IGFBP7 promove resistência à Dexametasona em linhagens celulares de LLA ....	54
1.5. A neutralização de IGFBP7 com uso de anticorpo monoclonal reduz a viabilidade celular e sensibiliza LLA à ação da Dexametasona .....	56
1.6. O silenciamento de IGFBP7 potencializa a translocação nuclear do receptor de glicocorticoide (GR) na presença de Dexametasona.....	57
2.0. MATERIAIS E MÉTODOS COMPLEMENTARES .....	60
2.1. RNA-seq e análises de GSEA .....	60
2.2. Viabilidade celular pelo ensaio de MTT.....	60
2.3. Sinalização celular e migração de GR por Western blot.....	60
3.0. DISCUSSÃO GERAL.....	63
4.0. CONCLUSÕES .....	72
5.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73

6.0. ANEXOS .....	81
6.1. Anexo I: Parecer do comitê de ética 1 .....	81
6.1. Anexo I: Parecer do comitê de ética 1 (continuação) .....	82
6.2. Anexo II: Parecer do comitê de ética 2 .....	83
6.2. Anexo II: Parecer do comitê de ética 2 (continuação) .....	84
6.2. Anexo II: Parecer do comitê de ética 2 (continuação) .....	85
6.3. Anexo III: Parecer do comitê de ética animal .....	86
6.4. Anexo VI: Declaração de direitos autorais .....	87

## 1.0. INTRODUÇÃO GERAL

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e estima-se que foi responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018 (WHO, 2019). O nome câncer é imposto a um conjunto de patologias relacionadas à disfunção dos processos de diferenciação, proliferação e morte celular programada (apoptose), sendo a homeostase de um organismo dependente destes processos. Um complexo sistema coordenado por diferentes vias metabólicas assegura o controle adequado da homeostase (Bissell e Radisky, 2001; Davidoff et al., 2010). Fortuitamente, as vias moleculares que garantem o contexto fisiológico normal são interrompidas. A progressão deste processo resulta em uma desordem funcional que, isoladamente, pode atribuir vantagens proliferativas a uma determinada célula (ou um conjunto delas) gerando um clone neoplásico. Desse modo, qualquer alteração e/ou inativação dos componentes das vias de regulação, podem contribuir para o desenvolvimento de câncer (Duarte, Hawkins e Lo Celso, 2018).

A tumorigenicidade de uma célula geralmente é acompanhada de alterações genéticas, as quais são, em grande parte, responsáveis pela “quebra” das vias de sinalização que garantem o bom funcionamento do microambiente celular. Dentre estas alterações estão: alterações nas vias apoptóticas e no conteúdo de DNA, ativação de proto-oncogenes, mutações pontuais, deleções, inserções virais, translocações cromossômicas, alterações epigenéticas (modificação de histonas ou metilação do DNA), inativação de genes supressores tumorais, expressão de micro-RNAs, entre outras (Hanahan e Weinberg, 2011).

A modificação genética de uma célula normal e, conseqüentemente, produção de uma célula maligna é antecedida por consecutivos erros de sinalização molecular, uma vez erros metabólicos iniciais (não reparados) potencializam erros progressivamente mais graves, gerando um efeito cascata. Diversas conseqüências são geradas pelo acúmulo de distúrbios metabólicos nas células como, por exemplo, a evasão de apoptose, autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais de anti crescimento, sustentada angiogênese, potencial replicativo ilimitado, reprogramação do metabolismo energético e evasão da destruição imune. Juntas, essas características contribuem para a formação de uma célula neoplásica. Fisiologicamente, o clone neoplásico é impulsionado a multiplicar e se desenvolver, sendo este processo denominado “evolução clonal.” Neste estágio, o clone neoplásico progride para estágios mais invasivos, promovendo metástase. Vale ressaltar que, de maneira geral, mais de uma célula pode sofrer alterações genético-metabólicas simultaneamente, resultando em

neoplasias policlonais, o que naturalmente aumenta a patogenicidade da doença (Alberts et al., 2002; Pawelec, Derhovanessian e Larbi, 2010; Lozano et al., 2012).

Dentre as principais neoplasias existentes atualmente estão: o câncer de pulmão, mama, colorretal, próstata, pele (não melanoma), estômago e sangue (leucemias) (WHO, 2019). As leucemias são um conjunto de neoplasias hematológicas as quais se caracterizam por apresentar proliferação desordenada de células hematopoiéticas prematuras (sem função biológica estabelecida) em processo de divisão. Devido à rápida multiplicação destes clones leucêmicos, os mesmos acabam substituindo os precursores hematopoiéticos saudáveis presentes na medula óssea (Reya et al., 2001).

De uma maneira geral, a hematopoese ocorre a partir de uma célula tronco hematopoiética (CTH) pluripotente, a qual se diferencia em duas células distintas, uma mantém a identidade de CTH e a outra dá origem a um progenitor (mieloide ou linfoide) com características diferenciadas. Um precursor linfoide é responsável por originar os linfócitos T e B, além das células *natural killer* (NK). Já um precursor mieloide tem função de originar progenitores de maior complexidade, como as células maduras da série eritrocítica, granulocítica e megacariocítica (Reya et al., 2001; Kaushansky, 2006).

A ocorrência de alterações genético-moleculares na CTH pode promover a diferenciação e a proliferação de progenitores anormais, corroborando para a formação de neoplasias mieloides (ex.: síndromes mielodisplásicas, neoplasias mieloproliferativas e leucemias mieloides agudas) e linfoides, tais como a leucemia linfoide aguda (LLA). As leucemias agudas constituem um grupo heterogêneo de doenças malignas caracterizadas por defeitos na diferenciação e proliferação elevada de progenitores hematopoiéticos, resultando na expansão e acúmulo de blastos na medula óssea (Testa e Riccioni, 2007). Estas são subdivididas em leucemia mieloide aguda (LMA) e LLA dependendo da presença de mieloblastos ou linfoblastos, respectivamente.

A LLA é o tipo de neoplasia mais comum na infância (<15 anos), representando 80% das leucemias e 25% dos diferentes casos de câncer nesta faixa etária. Tradicionalmente, a LLA tem sido classificada em dois fenótipos: (1) LLA-T, quando a linhagem celular afetada se refere à de linfócitos T (representando 15% dos casos); (2) LLA-B derivada, representada pela linhagem celular referente aos linfócitos B, a qual engloba a maioria dos casos (aproximadamente 85%). Ambos os fenótipos podem ser subdivididos de acordo com as anormalidades cromossômicas representadas na cariotipagem, incluindo aneuploidias e translocações cromossômicas. A ocorrência de distintas desordens genéticas como

translocações, inversões, deleções e duplicação de cromossomos ou parte destes, garante a grande heterogeneidade da LLA (Inaba, Greaves, e Mullighan, 2013).

Apesar do grande avanço no tratamento da LLA, o qual fez com que as chances de cura chegassem a 90% com uso combinado de fármacos (Pillozzi et al., 2011; Pui, Robison e Look, 2011), aproximadamente 20% dos pacientes ainda apresentam células leucêmicas resistentes ao tratamento quimioterápico, resultando na recaída da doença (Pui et al., 2004; Pui, Robison e Look, 2011). Todavia, nas últimas duas décadas, grandes progressos ocorreram a respeito do entendimento da fisiopatologia molecular da LLA. Como prova, a identificação e a caracterização das translocações cromossômicas permitiram a identificação de genes críticos para a sobrevivência desta neoplasia. Ainda, a ocorrência de translocações particulares apresenta importância ímpar na estratificação dos pacientes, o que possibilita a classificação dos mesmos em terapias mais ou menos intensivas (Laranjeira, 2012).

Além das translocações cromossômicas, outros mecanismos moleculares contribuem para o surgimento da LLA, tais como a inibição da expressão de genes supressores tumorais, a expressão de proto-oncogenes, as interações com o microambiente tumoral e, mais recentemente, as interações autócrinas ocorridas entre as células leucêmicas (Pui, Robison e Look, 2011; Hjort et al., 2017). Diversos trabalhos têm demonstrado que as interações dos blastos de LLA com células estromais da medula óssea (BMSCs) têm impacto positivo na sobrevivência das células leucêmicas (Bissell e Radisky, 2001; Bièche et al., 2004; Burger et al., 2009; Chen et al., 2011; Carroll e Raetz, 2012; Laranjeira et al. 2012) e no aumento da resistência ao tratamento quimioterápico (Cheung e Van Ness, 2001; Clutter, Fortney, e Gibson, 2005; Cobaleda e Sánchez-García, 2009; Coustan-Smith et al., 2009; Chen et al., 2011). Conhecidamente, as BMSCs atuam protegendo as células de LLA diante do efeito pró-apoptótico mediado pela quimioterapia, induzindo (principalmente) a ativação de vias moleculares que impulsionam a sobrevivência e proliferação, como a PI3K/Akt/mTOR (Cobaleda e Sánchez-García, 2009; Chen et al., 2011).

Visando a identificação de novas vias moleculares que interferissem na resistência quimioterápica da LLA, o estudo de Holleman et al., (2004) demonstrou, através da técnica de *microarray* (em combinação com ensaios de sensibilidade a drogas *in vitro*), um conjunto de genes com padrões de expressão ligados à sensibilidade ou à resistência dos fármacos prednisona, vincristina, asparaginase e daunorrubicina, os quais são amplamente utilizados no tratamento da LLA (Dai et al., 2006). Dentre os genes encontrados, os autores identificaram que o aumento da expressão de *IGFBP7* (*insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 7*) estaria relacionado a um pior prognóstico dos pacientes e uma menor sensibilidade da LLA a

ação da asparaginase. Posteriormente, outros trabalhos também associaram o aumento da expressão de *IGFBP7* com a resistência à terapia primária e a um pior prognóstico de pacientes com leucemia (Heesch et al., 2010; Hu et al., 2012; Laranjeira et al., 2012).

Em conjunto, esses achados nos levam a acreditar que *IGFBP7* poderia desempenhar um importante papel na sobrevivência da LLA e, até mesmo, na resistência farmacológica desta neoplasia. Para prova de conceito, nesta dissertação apresentaremos os principais resultados obtidos referentes ao papel de *IGFBP7* na progressão *in vitro* e *in vivo* da LLA. Além disso, descrevemos em primeira mão que o silenciamento deste gene ativa a via p53, refletindo na maior sensibilização *in vitro* da LLA diante das ações citostáticas mediadas pelos glicocorticoides.

## 2.0. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. O Sistema IGFs

O sistema IGF (*insulin-like growth factor*) é basicamente constituído por dois polipeptídeos (IGF1 e IGF2), uma bem caracterizada família de seis proteínas ligadoras de IGFs (*IGF binding protein*) de alta afinidade (IGFBP-1 a -6), uma dezena de proteínas ligadoras de IGFs de baixa afinidade relacionadas (IGFBP-rP-1 a -10), enzimas proteases que degradam as IGFBPs/IGFBP-rPs aumentando a biodisponibilidade dos ligantes, e três receptores de superfície celular (receptor de insulina - IR, IGF1R e IGF2R) (Pollak et al., 2004; Mazerbourg e Monget, 2018).

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF1 e IGF2) e insulina (INS) são fatores mitogênicos bem caracterizados, os quais atuam aumentando a sobrevivência de diferentes tipos celulares, incluindo a LLA (Gibson, 2002). IGF1, IGF2 e INS possuem receptores de tirosina quinase transmembranares específicos (IGF1R, IGF2R e IR, respectivamente). Todavia, estes fatores de crescimento podem compartilhar e/ou competir pelo mesmo receptor, dependendo da função metabólica pretendida.

A via de sinalização do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1) tem papel importante na regulação da proliferação celular e da apoptose. Os resultados convergentes da pesquisa epidemiológica e modelos de carcinogênese *in vivo* indicam que altos níveis de IGF1 circulante estão associados ao aumento do risco de vários cânceres comuns (Pollak et al., 2004). IGF1, anteriormente conhecido como somatomedina C (por causa de sua homologia com a INS) é um peptídeo de 70 aminoácidos que é codificado por um gene atribuído ao cromossomo 12q22-24.1 (Blatt, 2000). Já é conhecido que o crescimento fetal é determinado de forma direta pelas IGFs produzidas indistintamente por estes tecidos, enquanto que nas crianças, os níveis de IGFs são regulados pelo hormônio do crescimento, que controla a produção de IGF1 pelo fígado (El-Shewy e Luttrell, 2009). Altos níveis séricos de IGF1 associado ao elevado peso dos recém-nascidos estão correlacionados com a ocorrência de LLA pediátrica, hipótese conhecida com “Big Babies” (Ross et al., 1996). Trabalhos pioneiros já demonstraram que INS e IGF1, via IR e IGF1R, atuam de forma autócrina e parácrina em células de LLA promovendo o crescimento e proliferação destes tipos celulares (Estrov et al., 1991; Baier et al., 1992; Neely et al., 1992; Leverrier et al., 1999; Ogawa et al., 2000; Tu, Cheung e Lau, 2000; Medyouf et al., 2011).

Tanto IGF1 como INS são ligantes de IGF1R. Após a interação de IGF1R com estes fatores, as vias de sinalização intracelular que favorecem a proliferação, bem como a

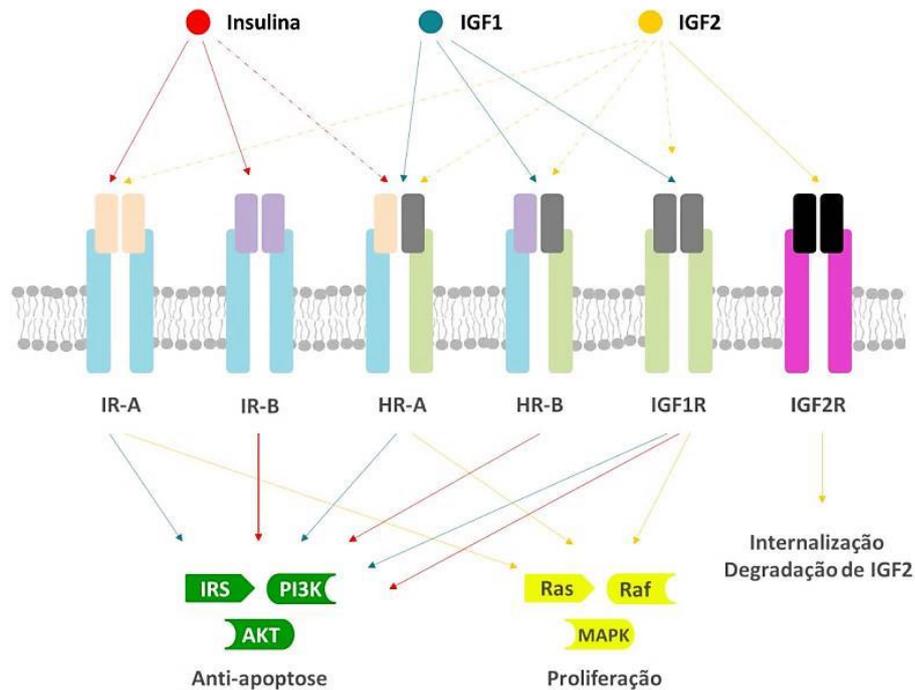
sobrevivência celular, são ativadas. A ativação de IGF1R resulta na fosforilação de proteínas do substrato do receptor de insulina (IRS1-4). A fosforilação dos IRSs mediada por IGF1R promove, principalmente, a sinalização a jusante das vias PI3K/Akt/mTOR e Ras/Raf/MAPK, as quais conhecidamente são responsáveis pela manutenção dos sinais mitogênicos de células neoplásicas (Khandwala et al., 2000).

IGF1R é um receptor de tirosina quinase com 70% de homologia ao IR. O primeiro foi originalmente considerado um receptor redundante usado pelas células apenas quando a sinalização do IR estava ausente ou defeituosa. Todavia, nos últimos anos, IGF1R tem emergido como uma proteína com características únicas que as diferenciam acentuadamente da IR (Mauro et al., 2003; Rosenfeld, 2005). Especialmente na biologia do câncer, IGF1R passou a assumir um papel importante, uma vez que este receptor desencadeia ações positivas para a mitogênese, transformação e proteção contra apoptose celular. Todas essas características se somam à proliferação celular sustentada que é, naturalmente, uma característica das células cancerígenas. Além disso, IGF1R também desempenha um importante papel na adesão celular e na longevidade (Baserga et al., 2003).

Os receptores IR e IGF1R derivam de um gene ancestral comum altamente preservado em vertebrados e invertebrados (Hernández-Sánchez et al., 2008), mostrando 45-65% de homologia no local de ligação do ligante e 60-85% de homologia nos domínios de tirosina quinase e recrutamento de substrato (Whittaker et al., 2001). Ambos os receptores são ligantes de INS, IGF1 e IGF2 (embora IGF2 ligue com menor afinidade). O IR é codificado pelo gene *INSR*, localizado no cromossomo 19p13.2; a região codificadora inclui 22 éxons que geram uma proteína de 1370 aminoácidos, com uma massa molecular de ~154 KDa (Belfiore et al., 2009). O processamento alternativo do éxon 11 gera duas isoformas estruturalmente diferentes: IR-A e IR-B. Os 12 aminoácidos derivados do éxon 11 estão incluídos na isoforma IR-B (isoforma madura), mas não na isoforma IR-A (isoforma fetal) (Westermeier et al., 2016; Belfiore et al., 2017). As duas isoformas são expressas de forma diferente, a IR-A é predominantemente expressa em tecidos embrionários e fetais, sistema nervoso central (SNC), células hematopoiéticas e células cancerígenas, enquanto IR-B é expressa nos principais tecidos alvo da INS (ex.: fígado, gordura e músculo) (Denley et al., 2003; Belfiore et al., 2009; Belfiore et al., 2017; Vella et al., 2018).

O IR-B liga INS com alta afinidade e IGF1 e IGF2, com baixa afinidade. Já a isoforma IR-A apresenta alta afinidade com INS e IGF2, sendo a interação com IGF1 aproximadamente dez vezes menor (Belfiore et al., 2009; Sciacca et al., 2010; Morcavallo et al., 2011; Vella et al., 2018) (Figura 1). Quando ativado pela INS, o IR-B medeia

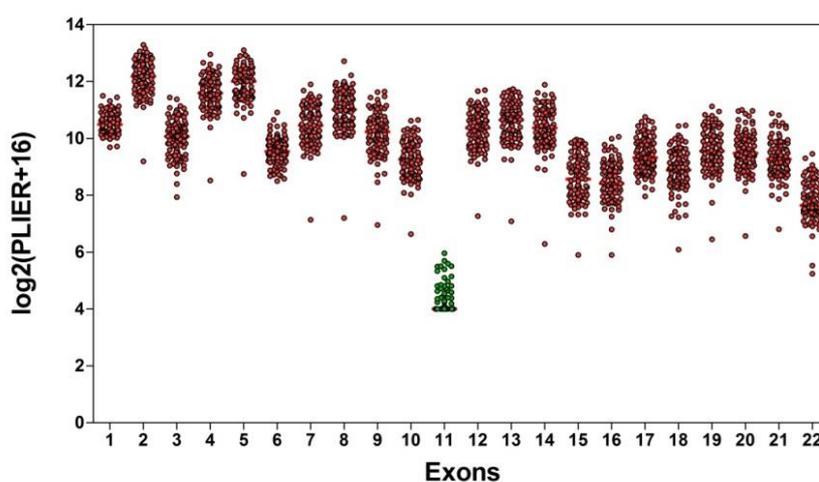
principalmente os efeitos metabólicos, enquanto o IR-A, ativado pela INS ou IGF2, medeia efeitos mitogênicos (Belfiore et al., 2017). Tanto as células cancerosas estromais como as epiteliais podem produzir IGF2. A partir disto, uma vez que IR-A é um receptor de elevada afinidade para o IGF2, este processo pode estar diretamente relacionado com a acentuada proliferação de células cancerígenas (Genua et al., 2009).



**Figura 1. Esquema simplificado das vias de sinalização da insulina, IGF1 e IGF2 e seus receptores.** Modificado de Genua et al., (2009).

Além das tradicionais isoformas de IR, este receptor também pode apresentar formação de heterodímeros com IGF1R, formando receptores híbridos (HR) (HR-IR-A:IGF1R e HR-IR-B:IGF1R) (Figura 1) (Benyoucef et al., 2007; Blanquart, Achi e Issad, 2008). O HR-A tem maior afinidade por IGF1, IGF2 e INS, respectivamente (Figura 1). O HR-B liga principalmente IGF1, mas também o IGF2 (com menor afinidade). A afinidade de ligação das IGFs pelo receptor HR-B é menor do que pelos receptores IGF1R e HR-A. Ou seja, a formação do híbrido com o IR-B “atenua” o potencial mitogênico do IGF1R. Dito de outra forma, a expressão de HR-B torna a célula menos sensível aos efeitos mitogênicos de INS e IGFs. Já a expressão de HR-A sensibiliza as células diante dos efeitos mitogênicos desses fatores (Pandini et al., 2003).

De um modo geral, IR está superexpresso em várias neoplasias malignas que respondem de maneira anormal a INS, pró-INS e IGFs, apresentando geralmente efeitos mitogênicos (Pandini et al., 2003; Blanquart, Achi e Issad, 2008; Malaguarnera e Belfiore, 2014; Vella et al., 2018). O papel biológico do IR superexpresso em cânceres ainda não é bem compreendido. Todavia, vários estudos destacaram a relevante expressão da isoforma IR-A na proliferação celular e no câncer (Belfiore e Malaguarnera, 2011; Belfiore et al., 2017; Vella et al., 2018). Nossos dados gerados por análises de *microarray* corroboram com estes estudos, visto que na LLA o éxon 11 do *INSR* é bem menos expresso que os demais éxons, indicando a prevalência de IR-A nestes tipos celulares (Figura 2) (Laranjeira, 2012).



**Figura 2. Níveis de expressão dos diferentes éxons do gene do receptor de insulina em amostras de LLA pediátrica.** A expressão gênica foi avaliada com *microarrays* Gene1.0 ST (Affymetrix) e analisada com o programa Bioconductor usando algoritmo Plier16. Cada ponto corresponde ao valor de expressão por paciente (n: 93). Notar que a expressão do éxon 11 é desproporcionalmente inferior (cerca de 6 vezes na escala log2, que corresponde a 100 vezes em escala linear) aos demais éxons. Fonte: Laranjeira, 2012.

Já a expressão e regulação de *IGF2* são complexas. Brevemente, a expressão deste gene envolve um mRNA não traduzido conhecido como H19 e o silenciamento de um alelo pelo mecanismo de *imprinting* gênico (Westermeyer et al., 2016). A perda de *imprinting* ou outras falhas reguladoras que levam ao aumento da expressão de H19 seriam os principais fatores que conferem vantagem ao crescimento celular dependente de IGF2. Fisiologicamente, IGF2 liga com alta afinidade a IGF2R e com menor afinidade a IGF1R e IR, respectivamente. A maioria dos estudos indica que IGF2R não produz um sinal metabólico quando ligado a IGF2. A principal função deste receptor estaria vinculada ao

sequestro de IGF2, uma vez que seus efeitos biológicos (mitogênicos e anti apoptóticos) ocorrem através de interações com IGF1R. Neste modelo, a redução de expressão de *IGF2R* estaria relacionada ao aumento de ativação de *IGF1R* mediado por IGF2 (Pollak et al., 2004).

De um modo geral, as IGFs distinguem-se da INS devido as suas interações com proteínas de ligação a IGFs de alta (IGFBP-1 a -6) e baixa afinidade relacionadas (IGFBP-rP1 a -rP10). Ao modular a distribuição tecidual das IGFs e seu acesso aos receptores celulares, as IGFBPs adicionam complexidade considerável à regulação da biodisponibilidade e sinalização das IGFs. Alguns estudos pré-clínicos indicam que as IGFBPs podem funcionar como oncogenes, dependendo do contexto celular. Além disso, há evidências de que estas proteínas podem ser úteis como biomarcadores teciduais para avaliar a progressão tumoral e/ou a resistência terapêutica (Baxter, 2014).

## **2.2. IGFBP7 (*Proteína 7 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina*)**

Conhecidamente, as IGFBPs e IGFBP-rPs são responsáveis por ligar às IGFs circulantes e carregá-las aos seus sítios de ação. Todavia, as ações destas proteínas não são restritas somente ao transporte das IGFs. Outras inúmeras funções são atribuídas as IGFBPs/IGFBP-rPs, sendo as principais: (1) aumento da meia vida das IGFs; (2) modulação do acesso das IGFs aos seus receptores e, por consequência, a regulação de suas atividades; e (3) capacidade de regular o crescimento, migração ou metabolismo celular de uma maneira independente das IGFs (Rosenfeld et al., 1999).

IGFBP7 (*insulin-like growth factor binding protein 7*), também denominada TAF (*Tumor-derived adhesion factor*), mac25 (*Meningioma-associated cDNA 25*), PSF (*Prostacyclin-stimulating factor*) e AGM (*Angiomodulin*), é classificada como IGFBP-rP1 (*Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1*) pela baixa afinidade de ligação às IGFs ou INS. Por este fato, IGFBP7 parece não competir com INS e IGFs por seus receptores, porém, atua aumentando o tempo de meia vida destes fatores através de interações diretas com os mesmos, podendo promover ações mitogênicas dependendo do tecido alvo (Akaogi et al., 1996).

Além do seu importante papel na proliferação celular, alguns estudos têm classificado IGFBP7 como uma molécula chave para a adesão e migração de diferentes tipos tumorais (Jiang et al., 2008; Georges et al., 2011; Hu et al., 2012; Laranjeira et al., 2012). Embora as funções biológicas da IGFBP7 ainda não estejam totalmente esclarecidas, uma gama de atribuições é dada a esta proteína. Além da atividade dependente das IGFs já mencionadas, sabe-se que a IGFBP7 se liga a diferentes componentes da matriz extracelular

como o colágeno (tipos II, IV e V), a heparina-sulfato e glicosaminoglicanas, contribuindo para a adesão de célula/célula ou célula/matriz extracelular (Sato et al., 1999). A proteína IGFBP7 também pode ser acumulada nos vasos sanguíneos tumorais e tecidos linfoides secundários, não estando presente em vasos sanguíneos e tecidos não linfoides normais (Girard et al., 1999; Tu et al., 2000). Ensaios de imunolocalização ultraestrutural mostraram IGFBP7 associada com microvilosidades próximas às junções das células endoteliais (Girard et al., 1999), sugerindo um papel positivo na regulação do tráfego de linfócitos, tendo em vista a constatação de que IGFBP7 também interage com diversas quimiocinas, tais como: SLC, CCL21, IP-10, CXCL10 e RANTES (Nagakubo et al., 2003).

Mais relacionado ao câncer, foi demonstrado que *IGFBP7* pode regular a proliferação, adesão e senescência celular em vários tecidos neoplásicos (Emdad et al., 2008; Pollak, 2008; Subramanian, Sharma e Mokbel, 2008; Chen et al., 2011). Além disso, esta proteína tem sido associada a um mau prognóstico no câncer de mama inflamatório (Biéche et al. 2004), mesotelioma (Sun et al., 2005), câncer de próstata (Osman et al., 2006) e câncer colorretal (Rupp et al., 2015). Nas leucemias, *IGFBP7* é relatado como um fator prognóstico negativo. Heesch et al., (2010) mostraram que a alta expressão do mRNA codificante da proteína IGFBP7 está associado com a resistência à terapia primária e a um pior prognóstico em pacientes com LLA-T. A mesma relação foi encontrada para amostras primárias de leucemia mieloide aguda (LMA) e LLA-B Ph(-) (Hu et al., 2012). Nesta perspectiva, *IGFBP7* vem sendo caracterizado como um fator prognóstico negativo nas leucemias e, atualmente, tem se tornado objeto de estudo com grande valor biológico para estas neoplasias, sendo enquadrado como um novo alvo terapêutico (Niu, Wu e Hu, 2018).

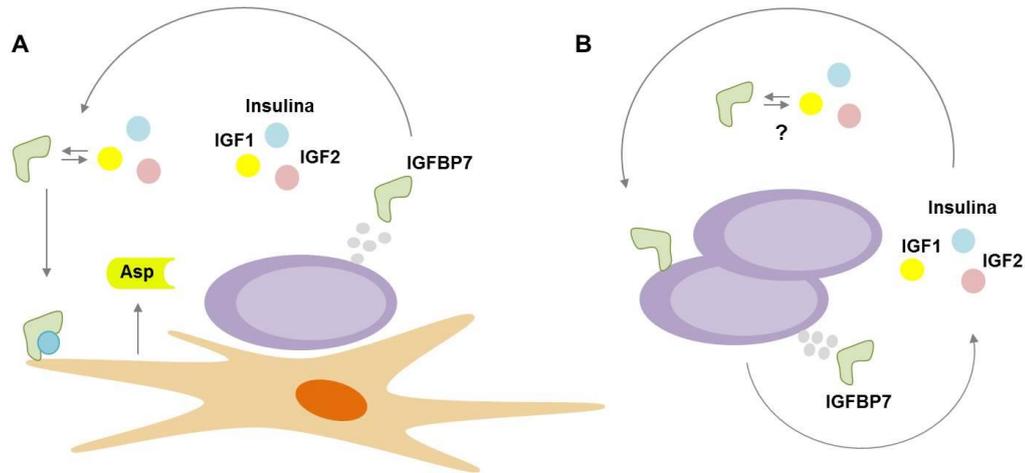
### ***2.3. IGFBP7 e a resistência quimioterápica na leucemia***

Diversos processos biológicos, principalmente genéticos, contribuem para o aumento da resistência a antineoplásicos pelas leucemias. Estudos pioneiros já demonstraram que os rearranjos cromossômicos TEL-AML1 (Ramakers-van Woerden et al., 2000), BCR-ABL (Hongo et al., 2002) e MLL (Stam et al., 2003) são classicamente envolvidos na resistência quimioterápica da LLA. Além disso, as interações entre as células leucêmicas e BMSCs também contribuem para a quimioresistência, visto que as BMSCs podem ativar e/ou modular vias metabólicas alternativas, as quais são direcionadas a promover inibição farmacológica ou proteção das células leucêmicas contra os agentes quimioterápicos (Hall et al., 2004; Wang et al., 2004; Iwamoto et al., 2007; Laranjeira et al., 2012). Desse modo, vale a pena ressaltar a importância dos estudos emergentes que visam à identificação de novos

proto-oncogenes relacionados à resistência quimioterápica na LLA. Dentre estes estudos, se faz necessário citar o trabalho de Holleman et al., (2004).

Neste artigo, os autores estudaram o perfil de resistência de células de LLA a diferentes compostos quimioterápicos, dentre eles a prednisona, vincristina, asparaginase e daunorrubicina. Através deste, os autores puderam associar que a maior expressão de *IGFBP7* estaria intimamente relacionada com a resistência ao fármaco asparaginase. A partir disso, outros trabalhos surgiram associando a expressão de *IGFBP7* com a resistência a uma gama de agentes antineoplásicos empregados no tratamento das leucemias. Dai e colaboradores (2006) associaram *IGFBP7* com a resistência quimioterápica *in vitro* da tetraplatina, metotrexato, fluororacil e acivicina. Esses efeitos também foram observados para fármacos inibidores da topoisomerase (topotecan e etoposideo) e intercalantes de DNA (mitoxantrona e doxorubicina) (Györff et al., 2006). Selga e seus parceiros (2009) relataram que o aumento da expressão de *IGFBP7* estaria diretamente relacionado à resistência ao metotrexato nas leucemias. De fato, o trabalho pioneiro de Holleman e colaboradores (2004) serviu como um *insight* para estudos posteriores, os quais associaram a expressão de *IGFBP7* com a resistência quimioterápica de diferentes fármacos nas leucemias.

Contribuindo para um melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência farmacológica da asparaginase mediada por *IGFBP7* na LLA, nosso grupo de pesquisa demonstrou que *IGFBP7* participa de interações recíprocas entre células leucêmicas e BMSCs, caracterizando um mecanismo de resistência dependente do estroma medular (Laranjeira et al., 2012). Neste trabalho, comprovamos que a adição da proteína *IGFBP7* recombinante (r*IGFBP7*) + INS e/ou rIGF1, e/ou rIGF2, estimula a produção de asparagina sintetase (*ASNS*) e a secreção de asparagina pelas BMSCs, indicando que em um sistema de co-cultura, *IGFBP7* protege as células de LLA contra a ação da asparaginase (Figura 3A) (Laranjeira et al., 2012). Entretanto, atualmente acreditamos que *IGFBP7* pode também desempenhar funções de maneira independente das BMSCs, através de um mecanismo autócrino entre as células leucêmicas (Figura 3B). Para prova de conceito, a seguir apresentaremos uma série de experimentos *in vitro* e *in vivo* utilizando modelos celulares e xenográficos de LLA com o intuito de confirmarmos os efeitos autócrinos mediados por *IGFBP7* na leucemia. Ainda, apresentaremos os prováveis mecanismos moleculares e vias de sinalização, as quais *IGFBP7* parece atuar, além do papel desempenhado por esta proteína na via dos glicocorticoides, amplamente utilizados no tratamento da LLA.



**Figura 3. Mecanismos de ação de IGFBP7 na LLA.** (A) Mecanismo de ação dependente do estroma: As células leucêmicas ao interagirem com as células do estroma aumentam a expressão e secreção de IGFBP7. IGFBP7 extracelular atua ligando-se aos fatores de crescimento INS e IGFs incrementando a disponibilidade dos mesmos para as células do estroma, que assim estimuladas, aumentam a biossíntese (além da expressão de asparagina sintetase - *ASNS*) e secreção de asparagina. O aumento nos níveis de asparagina favorece as células leucêmicas diante da ação da L-asparaginase. (B) Mecanismo de ação independente do estroma: IGFBP7, produzida pelas células leucêmicas pode, de alguma forma, interagir e aumentar a meia vida e/ou a disponibilidade de INS e IGFs; além disso, IGFBP7 também pode estar desencadeando funções desconhecidas, independentes dos fatores de crescimento, atuando através de um mecanismo anti-apoptótico sobre a leucemia. Fonte: adaptado de Laranjeira, 2012.

### **3.0. OBJETIVO GERAL**

Nesta dissertação, nosso objetivo central foi investigar o papel de *IGFBP7* na progressão tumoral da Leucemia Linfóide Aguda (LLA). No entanto, optamos por dividi-lo em dois capítulos, os quais fazem referência aos objetivos específicos que visam responder de maneira mais clara o objetivo central.

#### **3.1. Objetivos específicos**

**CAPÍTULO I** - estudar a importância de *IGFBP7* e dos fatores de crescimento Insulina/IGFs na progressão *in vitro* e *in vivo* da Leucemia Linfóide Aguda.

**CAPÍTULO II** - identificar o mecanismo de ação desempenhado por *IGFBP7* na Leucemia Linfóide Aguda.

## CAPÍTULO I

### IGFBP7 COMO UM NOVO ALVO TERAPÊUTICO NA LLA

Neste capítulo relataremos o papel pró-oncogênico de *IGFBP7* (e também da proteína) na LLA, através do mecanismo autócrino ocorrido entre as células leucêmicas. Demonstraremos este efeito tanto em experimentos *in vitro* como *in vivo* utilizando diferentes linhagens celulares de LLA-B e T. Além disso, apresentaremos em primeira mão os efeitos terapêuticos gerados pela utilização de um anticorpo monoclonal contra a proteína IGFBP7, o qual apresentou impacto significativo na proliferação e sobrevivência da LLA *in vitro* e na progressão da ALL *in vivo*. Mecanicamente, ilustraremos que IGFBP7 parece atuar, pelo menos em parte, através do eixo INS/IGFs promovendo o aumento da viabilidade de linhagens celulares e células primárias de LLA. Estes achados serão apresentados a seguir em formato de manuscrito, o qual foi recentemente submetido à publicação.

## 1.0. MANUSCRITO

### **IGFBP7 as a therapeutic target in acute lymphoblastic leukemia**

Angelo Brunelli Albertoni Laranjeira,<sup>1,2,a</sup> Leonardo Luís Artico,<sup>1,2,a</sup> Lívia Weijenborg Campos,<sup>1,2</sup> José Barreto Campello Carvalheira,<sup>3</sup> Sandra Regina Brambilla,<sup>3</sup> Izilda Aparecida Cardinalli,<sup>1</sup> Maria Alessandra Silva Salgado,<sup>1</sup> Alexandre Eduardo Nowill,<sup>4</sup> Sílvia Regina Brandalise,<sup>1</sup> and José Andrés Yunes,<sup>1,5,\*</sup>

<sup>1</sup>Centro Infantil Boldrini, Campinas, SP 13083-210, Brazil.

<sup>2</sup>Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, State University of Campinas, Campinas, SP 13083-210, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Clínica Médica, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, SP 13083-894, Brazil.

<sup>4</sup>Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas na Infância, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, SP 13083-894, Brazil.

<sup>5</sup>Medical Genetics Department, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, SP 13083-894, Brazil.

**<sup>a</sup> ABAL and LLA contributed equally to this work**

**Contact information for correspondence:** José Andrés Yunes, Laboratório de Biologia Molecular, Centro Infantil Boldrini, ZIP: 13083-210, Campinas – SP, Brazil; Phone: +55 (19) 981653511; e-mail: andres@boldrini.org.br

**Acknowledgments:** The authors would like to thank Maria Carolina Spago and Marcia Cristina Fornazim, from the State University of Campinas, for the excellent technical help with cell culture experiments. ABAL, LLA and LWC received scholarship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). JAY received a Productivity fellowship from the Brazilian National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq, process 305896/2013-0 and 301596/2017-4). This work was supported by grants to JAY from CNPq (471003/2013-1) and FAPESP (12/12802-1 and 14/20015-5).

**Conflict of interest:** The authors declare they have no conflicting financial interests.

## LETTER TO THE EDITOR

Insulin (INS) and insulin-like growth factors (IGF1 and IGF2) are well known mitogenic and pro-survival factors to many different cell types, including both B- and T-cell acute lymphoblastic leukemias (ALL).<sup>1</sup> INS/IGFs act by binding to homo or heterodimeric INSR and IGF1R cell surface receptors tyrosine kinase, that recruit and phosphorylate insulin receptor substrate proteins (IRS1-4) thus initiating the downstream activation of the PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MAPK signaling pathways. Another component of the system are IGF binding proteins (IGFBPs) that play opposite physiologic roles by competing with INSR/IGF1R while prolonging the half-life of ligands.<sup>2</sup> Different drugs and antibodies targeting the IGF1R have been developed.<sup>3</sup> One of these, the SCH 717454 monoclonal antibody against IGF1R have shown promising *in vivo* results against 2 out of 8 ALL tested.<sup>4</sup> This work points to IGFBP7 as a novel therapeutic target of the INS/IGF system in ALL. We have previously shown that ALL cells are the main source of IGFBP7 in the leukemia microenvironment, where it exerts a paracrine effect on bone marrow stromal cells.<sup>5</sup> Here we show that IGFBP7 exerts also an autocrine effect on ALL cells (cell lines and primary cells). The positive effects of INS/IGF on ALL viability were significantly enhanced by IGFBP7, while knockdown or antibody neutralization of IGFBP7 was highly detrimental to ALL *in vitro* and *in vivo*.

High affinity IGF binding proteins were shown to have either no influence (IGFBP3, -5, and -6) or to inhibit (IGFBP1, -2, and -4) the proliferation of the B-cell precursor ALL (BCP-ALL) cell lines NALM6 and RS4;11 by blocking the IGF1 signaling through the MAPK and Akt pathways.<sup>6</sup> IGFBP7 belongs to a subfamily of IGFBP-related proteins (IGFBP-RP) that have relatively low affinity for INS/IGFs and was first described as an enhancer of the mitogenic activities of INS and IGFs.<sup>7</sup> Accordingly, we have previously shown that knockdown of *IGFBP7* reduced the proliferation of the BCP-ALL cell lines REH and 697.<sup>5</sup> Similar results are shown here with respect to three different T-ALL cell lines (Online Supplementary Figure S1 and S2A). Thus, although there are indications that very high IGFBP7 concentrations (>5 mg/ml) may induce T-ALL senescence,<sup>8</sup> in our experience and considering serum levels of this protein to be below 50 ng/ml,<sup>5,9</sup> IGFBP7 seems to be a mitogenic factor for both BCP- and T-ALL. We confirmed this finding by BrdU incorporation (Figure 1A) and clonogenic (Figure 1B) assays. Additionally, *IGFBP7* downregulation resulted in increased apoptosis (Figure 1C), viability (Figure 1D) and migration (Figure 1E)

of ALL cell lines. A detailed description of methods is presented in the Online Supplementary Methods.

IGFBPs may have both IGF-dependent and IGF-independent actions.<sup>10</sup> We have previously shown that the paracrine effect of IGFBP7 on bone marrow stromal cell was largely IGF-dependent.<sup>5</sup> Others have shown that IGFBP7 increases vascular permeability by binding to integrin  $\alpha\beta 3$ <sup>11</sup> and exerts a tumor suppressor role on breast cancer cells by binding to IGF1R and blocking its activation by IGFs.<sup>12</sup> In case of ALL, the autocrine effects of IGFBP7 seemed to be IGF-dependent, as INS stimulation of ALL cells was significantly enhanced by IGFBP7, as evaluated by both IRS-1 (Ser302) and IRS-1 (pan-Tyrosine) phosphorylation levels (Figure 2A). Besides that, IGFBP7 knockdown has been shown to block Akt activation in ALL cell lines (Figure 2B), which don't respond to INS. However, addition of recombinant IGFBP7 undoes this effect, promoting the Akt phosphorylation (Ser473). Addition of insulin seems to potentiate this effect (Figure 2B and C).

Very few studies have investigated the dependence of ALL on INS/IGF stimulation. The pharmacologic inhibition or deletion of IGF1R was shown to be sufficient to prevent the establishment/progression of T-ALL disease.<sup>13</sup> Here we confirmed this finding and extended it to BCP-ALL. Silencing of INSR and IGF1R receptors significantly reduced the proliferation of REH and Jurkat cell lines (Figure 2D), leading to apoptosis (Figure 2E).

The relevance of the INS/IGF axis and IGFBP7 on ALL viability was confirmed using primary ALL cells. Primary ALL cells tend to die when cultured *in vitro*.<sup>14</sup> As shown in Figure 2F, supplementation of the culture medium with INS, IGF1, IGF2 or IGFBP7 alone was not sufficient to restrain cell death. But when INS/IGFs were added in conjunction with IGFBP7, cell viability consistently increased in 6 out of the 8 cases analyzed.

Considering the complexity of the INS/IGF system, *in vitro* experiments are just a poor approximation to the real situation. For instance, several proteases are known to cleave IGFBPs/IGFBP-RPs, liberating INS/IGF for INSR/IGF1 binding. In addition, interaction of IGFBPs/IGFBP-RPs with extracellular matrix components can modulate their affinity for INS/IGFs. To address the leukemogenic potential of autocrine IGFBP7 secreted by ALL cells, under physiological paracrine/endocrine IGFBP7 levels and the interaction/competition with other cells and molecules, we transplanted the IGFBP7-silenced cell lines into immunocompromised NOD/SCID mice. Silencing of *IGFBP7* resulted in significant attenuation of leukemia progression, as evaluated by the percentage of leukemia cells in the peripheral blood, bone marrow, liver and spleen (Figure 3A and Online Supplementary Figure

S2B). Of note, *IGFBP7* knockdown resulted in complete abrogation of central nervous system (CNS) infiltration by leukemia cells (Figure 3B).

These results encouraged us to produce and test the antileukemia effect of an antibody against IGFBP7 (Online Supplementary Figure S3). As shown in Figure 3C, adding 20 µg/mL of the anti-IGFBP7 antibody to the culture medium resulted in significant inhibition of ALL cell viability. Similar results were obtained in mice transplanted with the RS4;11 cell line (Figure 3D) or with a patient-derived xenograft (Figure 3E). Mice treated with the anti-IGFBP7 antibody (20 mg/Kg intraperitoneally, 3 days a week during 4 weeks) showed decreased leukemic progression in comparison to mice treated with an anti-PSA antibody, as evaluated by the percentage of human CD45+ cells in peripheral blood at different time points.

In conclusion, we confirmed the notion that INS/IGFs are important mitogenic and pro-survival factors in ALL and revealed IGFBP7 as a relevant player in this context and as a valid target for therapeutic intervention.

## References

1. Gibson LF. Survival of B lineage leukemic cells: signals from the bone marrow microenvironment. *Leuk Lymphoma*. 2002;43(1):19-27.
2. Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev*. 2000;21(3):215-44.
3. Pollak M. The insulin receptor/insulin-like growth factor receptor family as a therapeutic target in oncology. *Clin Cancer Res*. 2012;18(1):40-50.
4. Wang Y, Lipari P, Wang X, Chen T, Liu J, Marrinan C, et al. SCH 717454, a fully human monoclonal antibody against human IGF-1R, inhibits tumor growth in xenograft models. *Cancer Res*. 2007;67(1):659.
5. Laranjeira ABA, de Vasconcelos JF, Sodek L, Spago MC, Fornazim MC, Tone LG, et al. IGFBP7 participates in the reciprocal interaction between acute lymphoblastic leukemia and BM stromal cells and in leukemia resistance to aspraginase. *Leukemia*. 2012;26(1):1001-1011.

6. Yamada H, Iijima K, Tomita O, Taguchi T, Miharu M, Kobayashi K, et al. Effects of insulin-like growth factor-1 on B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol.* 2013;97(1):73-82.
7. Akaogi K, Sato J, Okabe Y, Sakamoto Y, Yasumitsu H, Miyazaki K. Synergistic growth stimulation of mouse fibroblasts by tumor-derived adhesion factor with insulin-like growth factors and insulin. *Cell Growth Differ.* 1996;7(1):1671-1677.
8. Heesch S, Schlee C, Neumann M, Stroux A, Kuhn A, Schwartz S, et al. BAALC-associated gene expression profiles define IGFBP7 as a novel molecular marker in acute leukemia. *Leukemia.* 2010;24(1):1429-1436.
9. Lopez-Bermejo A, Khosravi J, Corless CL, Krishna RG, Diamandi A, Bodani U, et al. Generation of anti-insulin-like growth factor-binding protein-related protein 1(IGFBP-rP1/MAC25) monoclonal antibodies and immunoassay: quantification of IGFBP-rP1 in human serum and distribution in human fluids and tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(1):3401-3408.
10. Allard JB, Duan C. IGF-Binding Proteins: Why Do They Exist and Why Are There So Many? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9(9):117.
11. Komiya E, Sato H, Watanabe N, Ise M, Higashi S, Miyagi Y, et al. Angiomodulin, a marker of cancer vasculature, is upregulated by vascular endothelial growth factor and increases vascular permeability as a ligand of integrin  $\alpha\beta 3$ . *Cancer Med.* 2014;3(3):537-49.
12. Evdokimova V, Tognon CE, Benatar T, Yang W, Krutikov K, Pollak M, et al. IGFBP7 binds to the IGF-1 receptor and blocks its activation by insulin-like growth factors. *Sci Signal.* 2012;18;5(255):ra92.
13. Medyouf H, Gusscott S, Wang H, Tseng JC, Wai C, Nemirovsky O, et al. High-level IGFBP7 expression is required for leukemia-initiating cell activity in T-ALL and is supported by Notch signaling. *J Exp Med.* 2011;29;208(9):1809-22.
14. 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(1):2370-2377.

## Figure legends

**Figure 1: IGFBP7 downregulation results in decreased the proliferation, survival, viability and migration of ALL cell lines.** (A) Proliferation of REH, RS4;11 (BCP-ALL), TALL-1 and Jurkat (T-ALL) cell lines stably transduced with lentivirus expressing shRNA against IGFBP7 (-) or scramble control (Scr). Cells were synchronized under serum-free conditions for 4 h, cultured 24 h in complete medium and then labelled during 4 h with BrdU. Cell cycle was evaluated by flow cytometry. The percentage of cells in G0/1, S-phase, G2/M and in apoptosis is shown. (B) RS4;11 and Jurkat cells (sh.IGFBP7 or sh.Scramble) were grown in semi-solid medium for 14 days and colonies were counted at the microscope. Bars represent means  $\pm$  SE for triplicate wells. (C) Survival of cells after 24 h culture in serum-free medium. Apoptosis was measure by flow cytometry after labeling with annexin-V and propidium iodide. Bars represent the means of the triplicates presented in percentage (viable cells are represented in dark blue and apoptotic cells in orange). (D) Viability of REH, RS4;11, TALL-1 and Jurkat cell lines stably transduced with lentivirus expressing shRNA against IGFBP7 (-) or scramble control (Scr). Cell were cultured in RPMI-10% FBS or serum-free medium for 72 h. Viability was measured by the MTT assay and absorbance was measured at 570 nm. (E) Migration of cells across a transwell membrane. The chemokine SDF-1 (100 ng/ml) or PBS were added to the lower chamber. After 4 h, cells in the lower chamber were counted by flow cytometry. Bars represent means  $\pm$  SE for triplicate wells. Statistical analysis was done by two-way ANOVA and Bonferroni post-tests for comparisons between (-) vs Scr (\* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$  and \*\*\* =  $p > 0.001$ ).

**Figure 2: IGFBP7 enhances INS/IGF signaling and viability in ALL.** (A) ELISA results for phospho-IRS-1 (Ser302) and phospho-IRS-1 (pan-Tyrosine) on the different ALL cell lines after 15 min or 4 h stimulation with insulin (500 ng/mL) and/or rIGFBP7 (100 ng/mL). Bars represent means  $\pm$  SE for triplicates. (B) Western blot results for phospho-Akt (Ser473) on the different ALL IGFBP7 knockdown (-) or Scramble (Scr) cell lines after 15 min stimulation with INS (500 ng/mL) and/or rIGFBP7 (100 ng/mL). (C) Flow cytometry results for phospho-Akt (Ser473) on RS4;11 and REH (IGFBP7 knockdown (-) or Scramble (Scr)) cell lines after 15 min stimulation with INS (500 ng/mL) and/or rIGFBP7 (100 ng/mL). (D) ALL cell lines were stably transduced with ITPG-inducible shRNA vectors against INSR, IGF1R or scramble control (Scr). Cell proliferation was measured 24 h and 48 h after IPTG (1  $\mu$ g/mL) stimulation. (E) Survival of cells sh.IGF1R, sh.INSR or sh.Scramble. Cell survival was measured 24 h and 48 h after IPTG (1  $\mu$ g/mL) stimulation. Apoptosis was

measure by flow cytometry after labeling with Annexin-V and Propidium iodide (PI). Bars represent the means of the triplicates presented in percentage (viable cells are represented in dark blue and apoptotic cells in orange). **(F)** Primary BCP-ALL cells (see Online Supplementary Table S1) were cultured in serum-free AIM-V medium supplemented with different combinations of INS (500 ng/mL), rIGF1 (200 ng/mL), rIGF2 (200 ng/mL) and rIGFBP7 (100 ng/mL). After 48 h, cell viability was measured by the MTT assay. Bars represent means  $\pm$  SE for duplicate wells. Statistical analysis was done by two-way ANOVA and Bonferroni post-tests for comparisons of each treatment with control (\* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$  and \*\*\* =  $p > 0.001$ ).

**Figure 3: Relevance of IGFBP7 *in vivo* and efficacy of anti-IGFBP7 monoclonal antibody therapy.** **(A)** NOD/SCID mice were transplanted with ALL cell lines stably transduced with lentivirus expressing shRNA against IGFBP7 (-) or scramble control (Scr). After 4 (REH, RS4;11, and 697) to 6 (TALL-1) weeks, animals were sacrificed and evaluated for the percentage of leukemia cells in the peripheral blood, bone marrow, liver and spleen by flow cytometry. Bars represent means  $\pm$  SE for 3 animals. **(B)** Percentage of leukemia cells in the central nervous systems of animals, 6 weeks after transplantation, as determined immunohistochemistry. Bars represent data from two animals. **(C)** Effect of an anti-IGFBP7 antibody (20  $\mu$ g/mL) or anti-PSA control (20  $\mu$ g/mL) on the viability of ALL cell lines after 72 h of culture in RPMI-10% FBS medium. Cell viability was measured by the MTT assay. Bars represent means  $\pm$  SE for triplicates. **(D)** Progression of RS4;11 cells into NOD/SCID mice treated with 20 mg/kg of the anti-IGFBP7 or anti-PSA antibody given intraperitoneally, 3 times per week. The percentage of leukemia cells (hCD45+ cells) in peripheral blood mononuclear cells was evaluated by flow cytometry. Curves are for individual animals. **(E)** Kaplan-Meier survival curves of NOD/SCID mice transplanted with a BCP-ALL primary cells (patient P2 of Supplementary Table 1) and treated with the anti-IGFBP7 or anti-PSA antibody, as before, during 4 weeks. Treatment of mice started when half of the animals had  $\geq 0.5\%$  of leukemia cells (hCD45+) in the peripheral blood. Curves were compared to control untreated animals by the log-rank test.

Figure 1

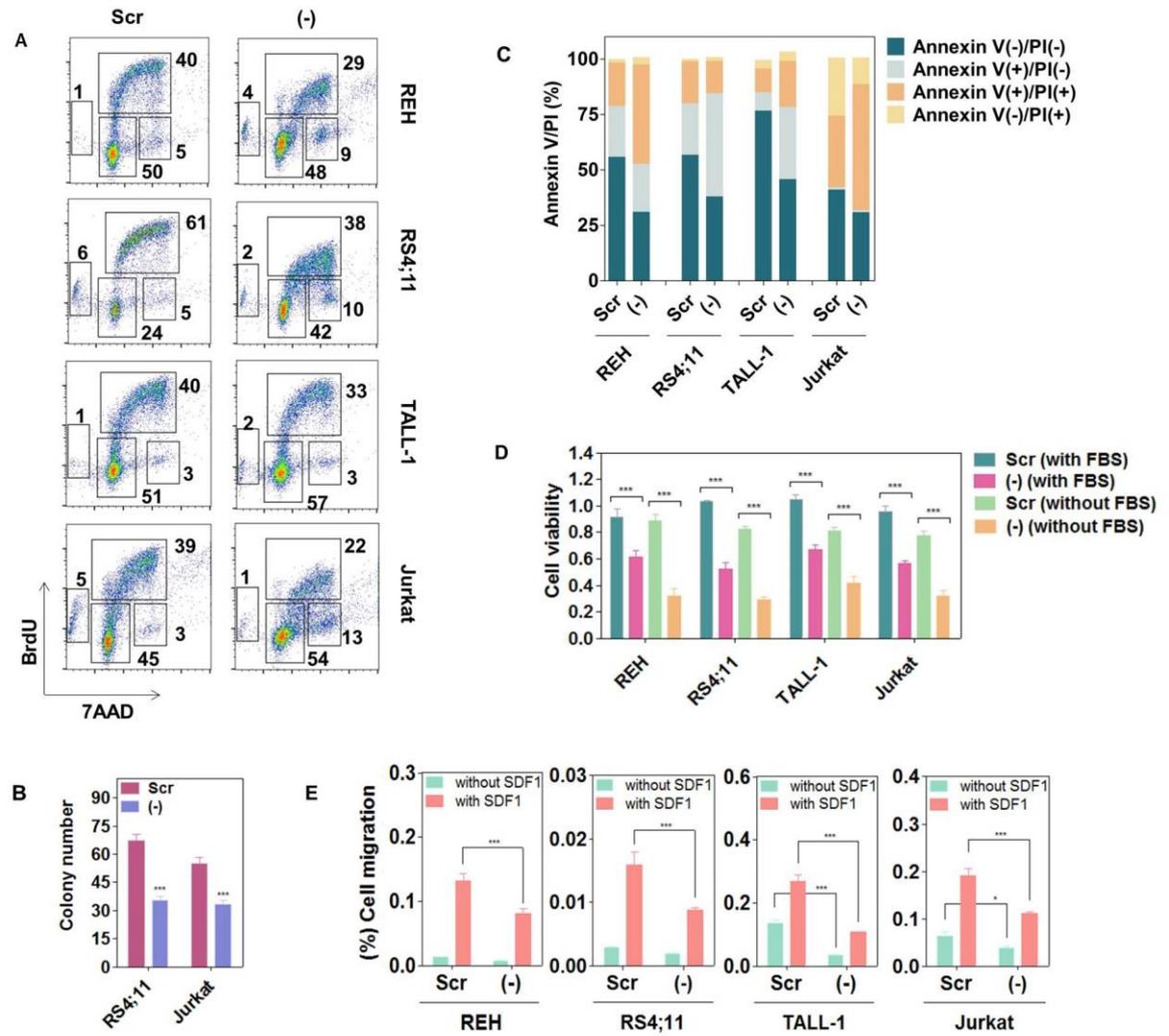


Figure 2

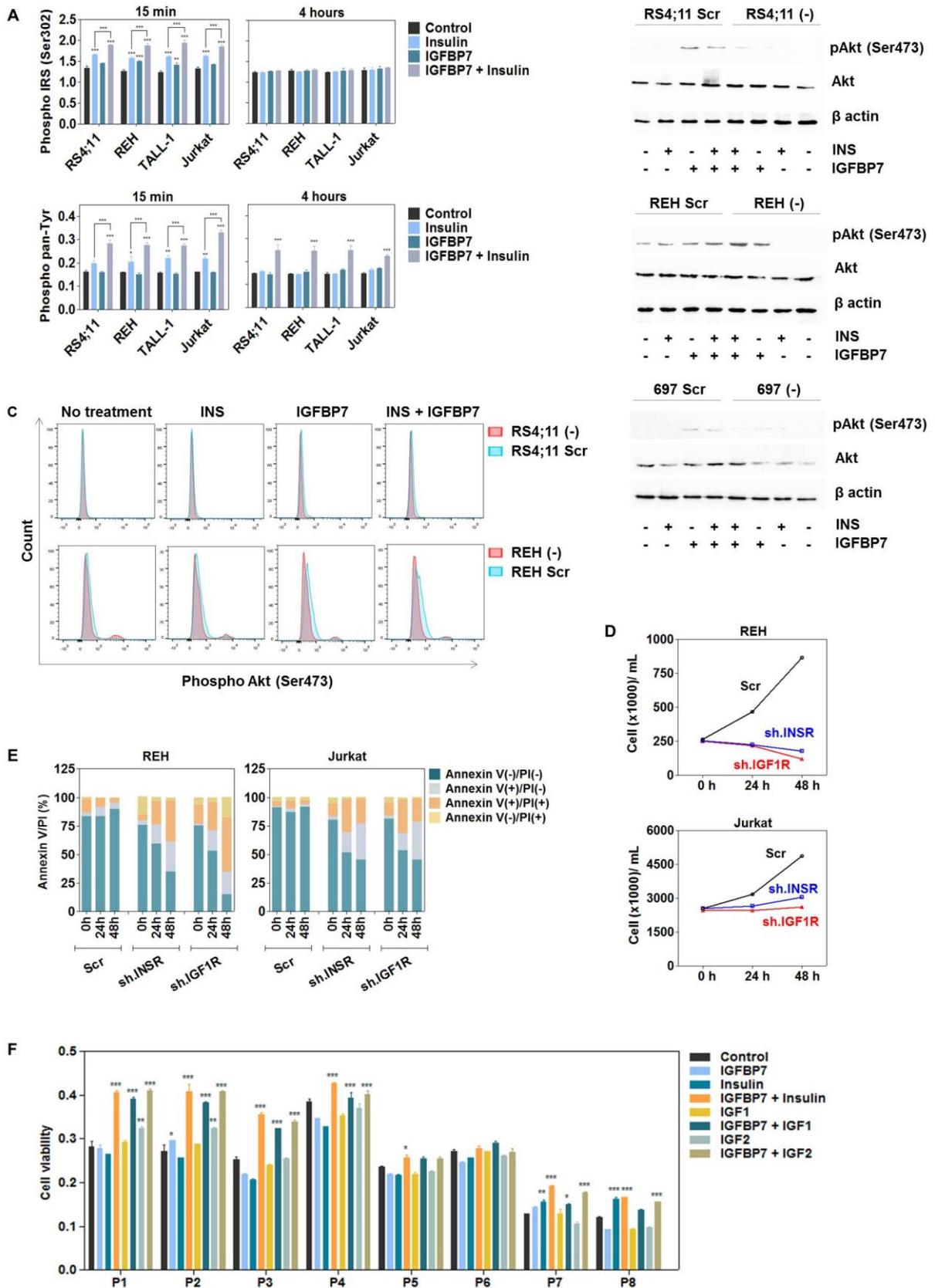
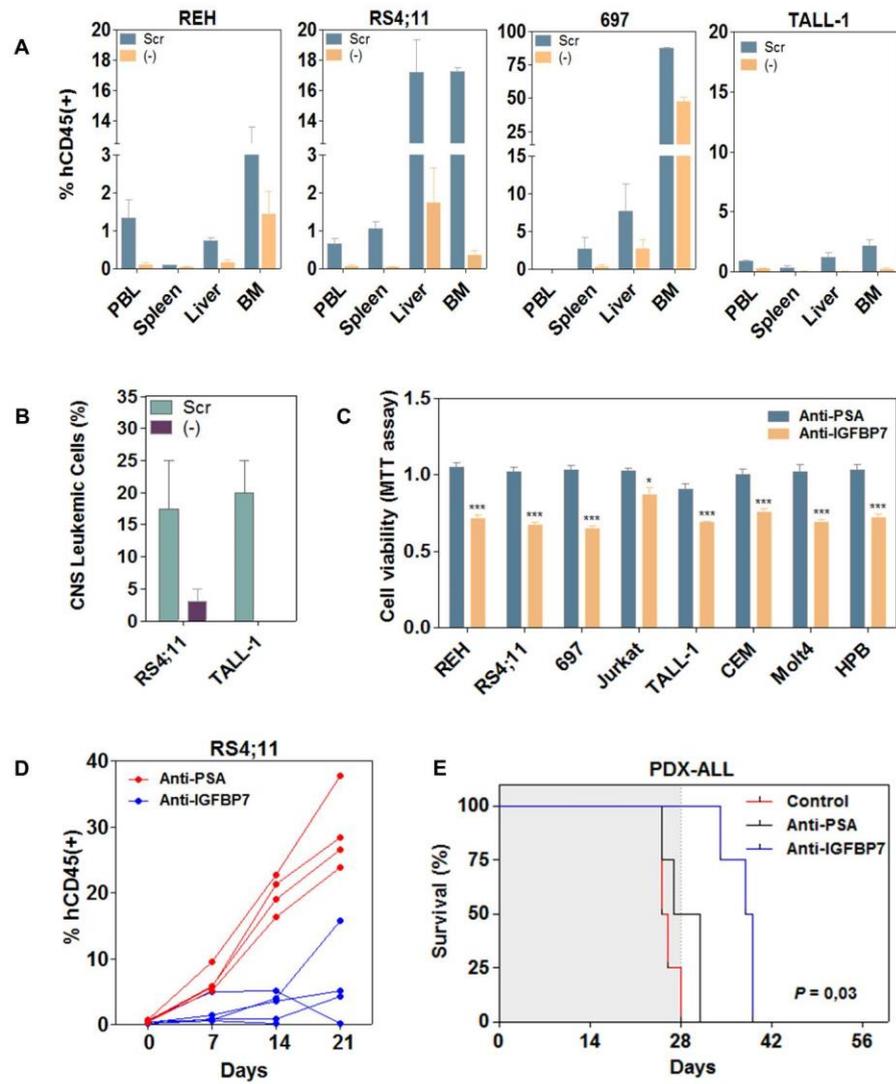


Figure 3



## **2.0. MATERIAL SUPLEMETAR**

### **ONLINE SUPPLEMENTARY MATERIALS**

**Supplementary Figure 1.** Validation of IGFBP7 downregulation by ELISA and Western blot.

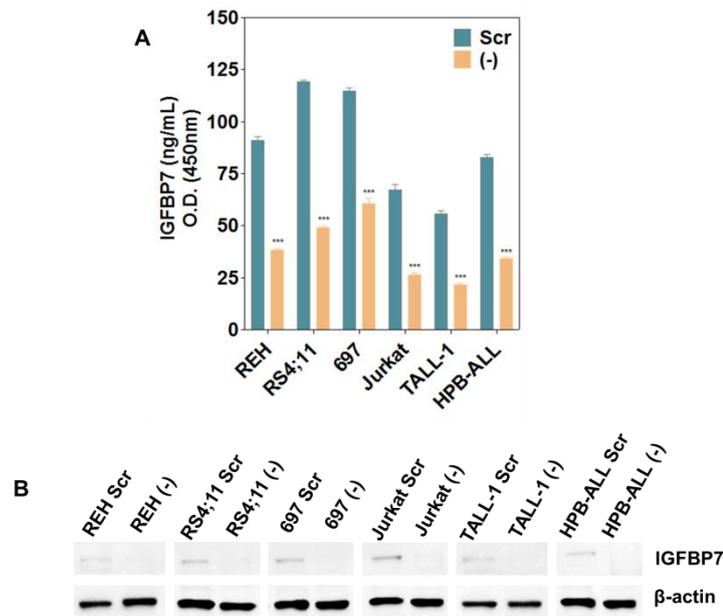
**Supplementary Figure 2.** Effect of *IGFBP7* downregulation on ALL proliferation and *in vivo* progression.

**Supplementary Figure 3.** Western blot analysis validating our mouse anti-human IGFBP7 antibody.

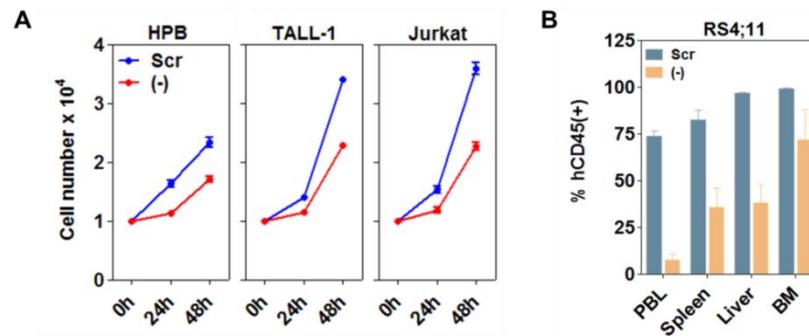
**Supplementary Table 1.** Clinical and biological features of precursor B-ALL samples used in functional studies.

### **Supplementary Materials and Methods**

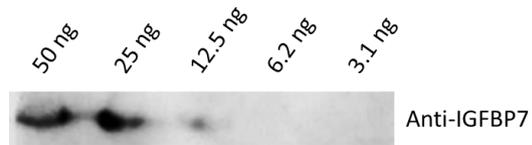
### **References**



**Supplementary Figure 1. Validation of IGFBP7 downregulation by ELISA and Western blot.** (A) Downregulation of IGFBP7 expression in the conditioned culture media of B-ALL (REH, RS4;11, 697) and T-ALL (HPB-ALL, Jurkat and TALL-1) cell lines stably transduced with lentiviral shRNA constructs against IGFBP7 (-) or a non-coding random sequence (Scr). Conditioned media were collected after 24 h of culture in RPMI-10%FBS. IGFBP7 levels were measured by ELISA. Bars represent means  $\pm$  SE for triplicates. Statistical analysis was done by two-way ANOVA and Bonferroni post-tests for comparisons between (-) vs. Scr cells (\*\*\*) =  $p > 0.001$ ). (B) Western blot analysis of intracellular IGFBP7 levels on sh.IGFBP7 (-) or sh.Scramble (Scr) cell lines. Cells were grown in serum-free RPMI medium for 4 h. Proteins were extracted, quantified and analyzed by Western blot using commercial antibodies against IGFBP7 (clone AF1334, R&D Systems) and  $\beta$ -actin (clone 4967, Cell Signaling) as loading control.



**Supplementary Figure 2. Effect of IGFBP7 downregulation on ALL proliferation and *in vivo* progression.** (A) T-ALL cell lines (HPB-ALL, TALL-1 and Jurkat) stably transduced shRNA vectors against IGFBP7 (-) or scramble control (Scr) were cultured in RPMI-10%FBS. Cell proliferation was measured at the indicated time points by flow cytometry counting of all viable cells. Points represent means  $\pm$  SE for triplicate wells. (B) NOD/SCID mice were transplanted with RS4;11 cells stably transduced with shRNA vectors against IGFBP7 (-) or scramble (Scr). After 6 weeks, animals were sacrificed and evaluated for the percentage of leukemia (hCD45+) cells in the peripheral blood, bone marrow, liver and spleen by flow cytometry. Bars represent means  $\pm$  SE for triplicates.



**Supplementary Figure 3. Western blot analysis validating our mouse anti-human IGFBP7 antibody.** Increasing amounts of the recombinant human IGFBP7 protein were denatured, electrophoresed and blotted onto a nitrocellulose membrane. The membrane was probed with 10  $\mu\text{g/ml}$  of our anti-IGFBP7 antibody obtained by protein G purification from hybridoma culture supernatant.

**Supplementary Table 1.** Clinical and biological features of precursor B-ALL samples used in the functional studies.

<b>ID</b>	<b>Gender</b>	<b>Age</b>	<b>WBC per <math>\mu</math>L</b>	<b>CALLA</b>	<b>Chromosome translocation</b>	<b>Follow up (years)</b>	<b>Status at last follow up</b>
<b>P1</b>	F	5.39	34,900	pos	na	19.5	in remission
<b>P2</b>	M	9.25	134,000	pos	t(9;22) p190	2.5	Died
<b>P3</b>	M	2.44	48,700	pos	na	1.7	lost to follow up
<b>P4</b>	F	6.40	52,000	neg	na	20.8	in remission
<b>P5</b>	F	2.59	77,500	na	na	23.5	in remission
<b>P6</b>	M	10.57	149,600	1	na	0.7	Died
<b>P7</b>	F	10.25	45,000	1	negative	1.3	Died
<b>P8</b>	M	3.92	34,500	1	na	23.2	in remission

ID: patient's identification; F: female; M: male; Age: age in years; na: not available; pos: positive; neg: negative;

## Supplementary Materials and Methods

### Cell culture

B-cell precursor ALL cell lines REH, 697, and RS4;11 were kindly provided by Dr. Sheila A. Shurtleff, St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, TN); the T-ALL cell lines TALL-1 and HPB-ALL were kindly provided by Dr. João Barata, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa (Lisbon, Portugal), and cell lines Jurkat and Molt-4 were kindly provided by Dr. Angelo Cardoso, Indiana University School of Medicine, I.U. Simon Cancer Center (Indianapolis, IN). All ALL cell lines were cultured in RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) with 10% Fetal Bovine Serum (FBS - Gibco/Thermo-Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), 50 U/mL penicillin and 50 µg/mL of streptomycin (Gibco/Thermo-Scientific). Cell cultures were incubated in a humidified environment at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Primary ALL cells correspond to retrospective samples obtained from bone marrow aspirates of newly diagnosed patients. Mononuclear cells were isolated by Ficoll-gradient centrifugation, resuspended in FBS with 10% DMSO (Sigma-Aldrich), and kept frozen in liquid nitrogen. Samples were thawed and depleted of dead and apoptotic cells by immunomagnetic beads (Dead Cell Removal Kit, Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany). Primary cells were cultured in AIMV medium (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). The study was approved by the Research Ethics Committee from the State University of Campinas (CAAE: 0014.0.144.146-08 and 0018.0.144.146-08).

### shRNA knockdown of *IGFBP7*, *IGF1R* and *INSR*

Retroviral production and transduction were done as described by Laranjeira et al. (2012)<sup>1</sup>. *IGFBP7* expression was downregulated by stable transfection of ALL cell lines with the pLKO.1 MISSION shRNA lentiviral vector NM\_001553.1-959s1c1 (Sigma-Aldrich). As negative control, cells were transduced with the MISSION Non-Target shRNA Control Vector (Sigma-Aldrich). Knockdown of *IGFBP7* was confirmed at the cellular RNA and supernatant protein levels, by qRT-PCR and ELISA assays, respectively, as described before,<sup>1,2</sup> and by Western blot analysis (see below). *IGF1R* and *INSR* expression was downregulated by inducible transfection of REH and Jurkat cell lines with pLKO.1 MISSION LacO shRNA lentiviral vector NM\_000208 and NM\_000875, respectively (Sigma-Aldrich). As negative control, cells were transduced with the MISSION LacO Non-Target shRNA

Control Vector (Sigma-Aldrich). After 10 days selection with puromycin (Sigma-Aldrich), the cells were treated with IPTG (Sigma-Aldrich) at 1  $\mu$ M for shRNA induction.

#### Cell proliferation assay based on BrdU incorporation

The different cell lines (sh.IGFBP7 and sh.Scramble) were cultured in 96 well-plates at 50,000 cells/well for a period of 4 h in serum-free RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich) for synchronization, and then in RPMI-10% FBS for 24 h. Cells were labelled during 4 h with BrdU and then with 7AAD using the FITC BrdU Flow Kit (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA), following the manufacturer's recommendations. Analyzes were done by flow cytometry in a FACSCanto II (Becton Dickinson) using the Flow Jo Software (Becton Dickinson).

#### Cell survival/apoptosis assay

Cells were cultured in 96 well-plates at 50,000 cells/well for 24 h in serum-free RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich), washed once with Phosphate-buffered saline (PBS), resuspended in the appropriate binding buffer, labeled with Annexin-V Alexa Fluor 488 conjugated (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) and propidium iodide (5  $\mu$ g/mL) for 15 min at room temperature and immediately analyzed by flow cytometry in a FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson). Data were expressed as mean geometric intensity of fluorescence obtained from triplicates, which were presented in percentage. The cell lines transduced with the conditional shRNA expression vectors against INSR, IGF1R or scramble, were grown in RPMI-10% FBS medium (Sigma-Aldrich and Gibco/Thermo-Scientific, respectively) supplemented with 1  $\mu$ g/mL IPTG (Sigma-Aldrich) for shRNA induction, and apoptosis was measured after 24 and 48 h, as described above.

#### Cell proliferation assays for cell lines and primary ALL cells

The proliferation of the T-ALL cell lines (HPB-ALL, Jurkat, and TALL-1) stably transduced with shRNA vectors against IGFBP7 or scramble were cultured in 96 well-plates at 25,000 cells/well in RPMI-10% FBS (Sigma-Aldrich and Gibco/Thermo-Scientific, respectively). Cell numbers were measured at the indicated time points by flow cytometry, after forward versus side scatter (FSC vs SSC) gating of viable cells. In the case of REH and Jurkat cells transduced with conditional shRNA vectors against INSR, IGF1 or scramble, cell

numbers were counted by trypan blue exclusion using a hemocytometer 24 h and 48 h after addition of IPTG (Sigma-Aldrich).

Proliferation assays with primary ALL cells were performed in 96-well plates at 200,000 cells/well in AIM-V serum-free medium (Invitrogen) supplemented with different combinations of insulin (500 ng/mL; Novo Nordisk, Novo Allé, Bagsværd, Denmark), IGF1 (200 ng/mL; R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA), IGF2 (200 ng/mL; R&D Systems), IGFBP7 (100 ng/mL; R&D Systems) for 48 h. Viable cells were quantified by the MTT assay. The formazan dye formed by viable cells was quantified by measuring the absorbance at 570 nm.

To evaluate the effect of IGFBP7 neutralization, the ALL cell lines were cultured in 96 well-plates at 50,000 cells/well in RPMI-10% FBS (Sigma-Aldrich and Gibco/Thermo-Scientific, respectively) supplemented with our anti-IGFBP7 monoclonal antibody (20 µg/mL) or an anti-PSA control (20 µg/mL; Rheabiotech, Campinas, São Paulo, Brazil) for 72 h. Viable cells were quantified by the MTT assay, as above.

#### Production of a monoclonal antibody against IGFBP7

Balb/c mice were immunized with a IGFBP7-derived peptide antigen by standard methods.<sup>3</sup> Hybridomas were selected by ELISA against the native IGFBP7 (R&D Systems). The generated antibody is predicted to recognize both the human and mouse IGFBP7 proteins. Of note, the peptide antigen has no relevant similarity against any other protein as evaluated by BLASTP. The detection limit reached by this monoclonal antibody in a dot-blot ELISA assay against the BSA-conjugated antigen peptide was 0.05 ng (data not shown). In Western blot assay the antibody was able to detect 12.5 ng of recombinant IGFBP7 (Supplementary Figure 3).

#### Clonogenic assay

Cells were washed with PBS and 10,000 cells per well in a 6-well plate were grown in semi-solid HSC-CFU (Mileyni Biotec). The cells were incubated for 14 days and after that period the total number of colonies were counted with the aid of an optical microscope. Experiments were carried out in triplicates.

### Cell migration assay

Migration was evaluated using transwell culture-plate inserts with 5 micron pores (Corning Life Sciences, Corning, New York, USA). Briefly, 30,000 cells were cultured in the upper chamber in RPMI-10% FBS (Sigma-Aldrich and Gibco/Thermo-Scientific, respectively). In some cases, SDF-1 (100 ng/mL, Sigma-Aldrich) was added in the lower chamber to stimulate migration. Treatments were done in triplicates. The plates were incubated for 4 h. Cells that migrated to the lower chamber were then counted by flow cytometry and the results were expressed as the ratio of cells that migrated by total cultured cells.

### Confirmation of IGFBP7 knockdown by Western blot

Cells were cultured in RPMI-10% FBS (Sigma-Aldrich and Gibco/Thermo-Scientific, respectively) for 48 h, pelleted by centrifugation and lysed in RIPA-like Buffer (50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% Sodium deoxycholate; 0,1% SDS) supplemented with 1% Phosphatase inhibitor cocktail I (Sigma-Aldrich), 1% Phosphatase inhibitor cocktail II (Sigma-Aldrich), 1% Protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich), and 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma-Aldrich). Thirty  $\mu$ g of protein were electrophoresed in a 10% SDS-polyacrylamide gel. Proteins were electro-blotted onto a nitrocellulose membrane in transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, and 20% methanol). Membranes were immunoblotted overnight at 4°C with antibodies against IGFBP7 (clone AF1334, R&D Systems) and  $\beta$ -actin (clone 4967, Cell Signaling Technology) in TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) with 2% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich). Immunodetection was performed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1:5,000 – clone 7076, Cell Signaling Technology) in 5% non-fat dry milk in TBST, for 1 h at room temperature, and developed by using the Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate detection reagent (Thermo-Scientific) and visualized by autoradiography.

### Cell signaling assay: ELISA

Cells were cultured in 96 well-plates at 25,000 cells/well in serum-free RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich) for 4 h. Triplicate wells were left untreated or treated with insulin (500 ng/mL, Novo Nordisk) and/or IGFBP7 (100 ng/mL, R&D Systems) for 15 min. Phospho-IRS-1 (Ser302) and Phospho-IRS-1 (panTyr) levels were quantified by using the

PathScan Phospho-IRS-1 (Ser302) and PathScan Phospho-IRS-1 (panTyr) Sandwich ELISA kits (Cell Signaling Technology), respectively, according to the manufacturer's recommendations.

#### Cell signaling assay: Western blot

Cells were cultured in RPMI (Sigma-Aldrich) without FBS for overnight and treated with INS (500 ng/mL) and/or rIGFBP7 (100 ng/mL) for 15 min. After, the cells were pelleted by centrifugation and lysed in RIPA-like Buffer (50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% Sodium deoxycholate; 0,1% SDS) supplemented with 1% Phosphatase inhibitor cocktail I (Sigma-Aldrich), 1% Phosphatase inhibitor cocktail II (Sigma-Aldrich), 1% Protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich), and 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma-Aldrich). Thirty  $\mu$ g of protein were electrophoresed in a 10% SDS-polyacrylamide gel. Proteins were electro-blotted onto a nitrocellulose membrane in transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, and 20% methanol). Membranes were immunoblotted overnight at 4°C with antibodies against phospho-Akt (Ser473) (clone 9271, Cell Signaling Technology), Akt (clone 9272, Cell Signaling Technology) and  $\beta$ -actin (clone 4967, Cell Signaling Technology) in TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) with 2% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich). Immunodetection was performed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1:5,000 – clone 7074, Cell Signaling Technology) in 5% non-fat dry milk in TBST, for 1 h at room temperature, and developed by using the Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate detection reagent (Thermo-Scientific) and visualized by autoradiography.

#### Cell signaling assay: Flow cytometry

Cells were cultured in RPMI (Sigma-Aldrich) without FBS for overnight and treated with INS (500 ng/mL) and/or rIGFBP7 (100 ng/mL) for 15 min. After, the cells were fixed and permeabilized for intracellular staining using the phospho-Akt antibody (Ser473) conjugated with Alexa-Fluor 647 (Becton Dickinson). Cells were permeabilized following a Intracellular Flow Cytometry Staining Protocol by BioLegend.

#### *In vivo* experiments

Ten millions IGFBP7 knockdown or Scramble ALL cell lines were injected via the tail vein into non-irradiated NOD/SCID (NOD.CB17-Prkdc<sup>scid</sup>/J) mice (The Jackson

Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA). Animals were provided by CEMIB, the animal facility at the State University of Campinas (Campinas, São Paulo, Brazil) and maintained with food and drink *ad libitum* in ventilated racks. Blood sampling from the retro-orbital plexus was obtained weekly to monitor the percentage of human CD45 positive cells (hCD45+). After 4 or 6 weeks, mice were sacrificed and blood, spleen, liver and bone marrow were collected to evaluate the percentage leukemia cells (hCD45+) in total CD45+ mononuclear cells (sum of hCD45+ and mouse CD45+) by flow cytometry using a FACSCanto II (Becton Dickinson) equipment. Antibodies used were anti-hCD45-FITC (clone HI30, BD Pharmingen, San Diego, California, USA or EXBIO, Prague, Czech Republic) and anti-mCD45-PE (clone 30F-11, BD Pharmingen). In some cases, we also analyzed leukemia-cell entry into the CNS of animals by immunohistochemistry evaluation of meningeal infiltration. To test the therapeutical efficacy of our anti-IGFBP7 monoclonal antibody, one million RS4;11 or 10 million patient-derived xenograft BCP-ALL cells (patient P2 of Supplementary Table 1) were injected into non-irradiated NOD/SCID mice as before. When hCD45+ reached  $\geq 0.5\%$  of peripheral blood cells in half of the animals, mice were randomly distributed into the different treatment groups (3 or 4 animals/group). Animals were treated with 20 mg/kg of our anti-IGFBP7 or anti-PSA (Rheabiotech) antibody intraperitoneally 3 days per week during 3 (RS4;11) to 4 weeks (primary ALL). Animals were monitored every week to measure the percentage of ALL cells in the peripheral blood mononuclear cells. Kaplan-Meier survival curves were compared using the Log-rank test. Institutional Review Board approval for the animal study was obtained from the Animal Experimentation Ethics Committee of the Biology Institute, State University of Campinas (CEUA/UNICAMP, protocol 1133/2008).

## References

1. Laranjeira ABA, de Vasconcelos JF, Sodek L, Spago MC, Fornazim MC, Tone LG, et al. IGFBP7 participates in the reciprocal interaction between acute lymphoblastic leukemia and BM stromal cells and in leukemia resistance to aspraginase. *Leukemia*. 2012;26(1):1001-1011.
2. Kutsukake M, Ishihara R, Momose K, Isaka K, Itokazu O, Higuma C et al. Circulating IGF-binding protein 7 (IGFBP7) levels are elevated in patients with endometriosis or undergoing diabetic hemodialysis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2008;6(54).

3. Grant GA. Synthetic Peptides for Production of Antibodies that Recognize Intact Proteins. *Curr Protoc Mol Biol.* 2002;11.16

## CAPÍTULO II

### DESVENDANDO OS MECANISMOS DE AÇÃO DE IGFBP7

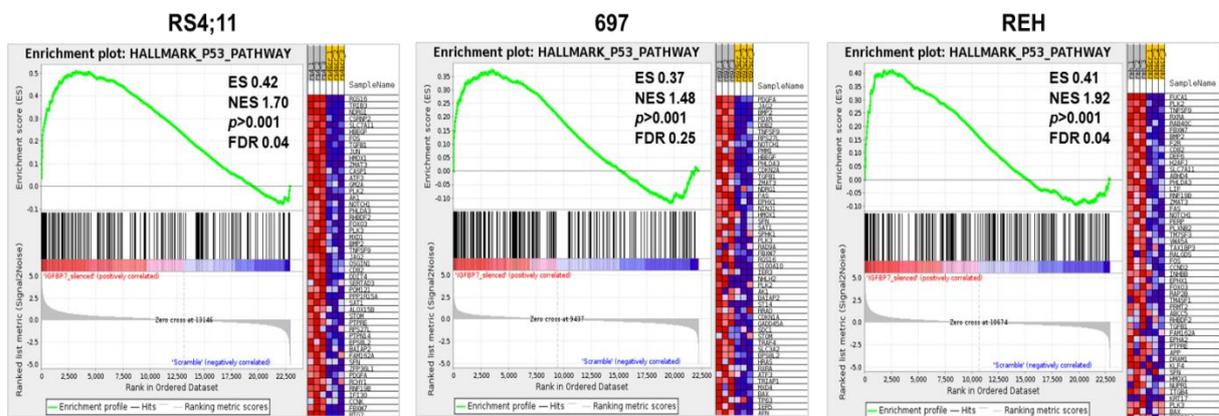
Até o momento, muito pouco se sabe sobre as vias de sinalização e os mecanismos moleculares que interagem com IGFBP7, embora já existam relatos nas leucemias de que esta proteína contribui para um pior prognóstico dos pacientes e também para o aumento da resistência a terapia primária (Gibson, 2002; Laranjeira et al., 2012). Sendo assim, tendo em vista os achados apresentados no Capítulo I, os quais demonstram o papel crucial de IGFBP7 e dos fatores de crescimento Insulina/IGFs para a progressão da LLA, aqui apresentaremos evidências experimentais às quais demonstram que IGFBP7 pode estar protegendo as células leucêmicas contra os efeitos apoptóticos mediados pela via p53. Além disso, demonstramos que *IGFBP7* (e proteína) pode atribuir resistência à LLA diante da ação dos glicocorticoides.

## 1.0. RESULTADOS

### 1.1. O silenciamento de *IGFBP7* ativa a sinalização da via *p53* em células de LLA-B

Buscando entender melhor o mecanismo molecular envolvido na viabilidade celular induzida por *IGFBP7*, realizamos um estudo de larga escala através da análise de expressão gênica utilizando o sequenciamento de RNA (RNA-seq) das linhagens celulares RS4;11, 697 e REH (LLA-B) *knockdown* para *IGFBP7* (sh.*IGFBP7*) e seus respectivos controles (sh.Scramble) (Figura 1).

A análise de enriquecimento do conjunto de genes (GSEA) indicou que o silenciamento de *IGFBP7* nas linhagens celulares de LLA-B induziu a expressão de genes alvo da via *p53*, a qual foi significativamente enriquecida ( $p < 0.001$ ) com relação às células controle (sh.Scramble). Esses resultados sugerem que o silenciamento de *IGFBP7* desencadeie a ativação da via *p53*, a qual desempenha papel central na indução de parada do ciclo celular, senescência e, conseqüentemente, apoptose; por desempenhar estas ações, *p53* é o mais importante supressor tumoral existente (Joerger e Fersht, 2016; Crunkhorn, 2018).



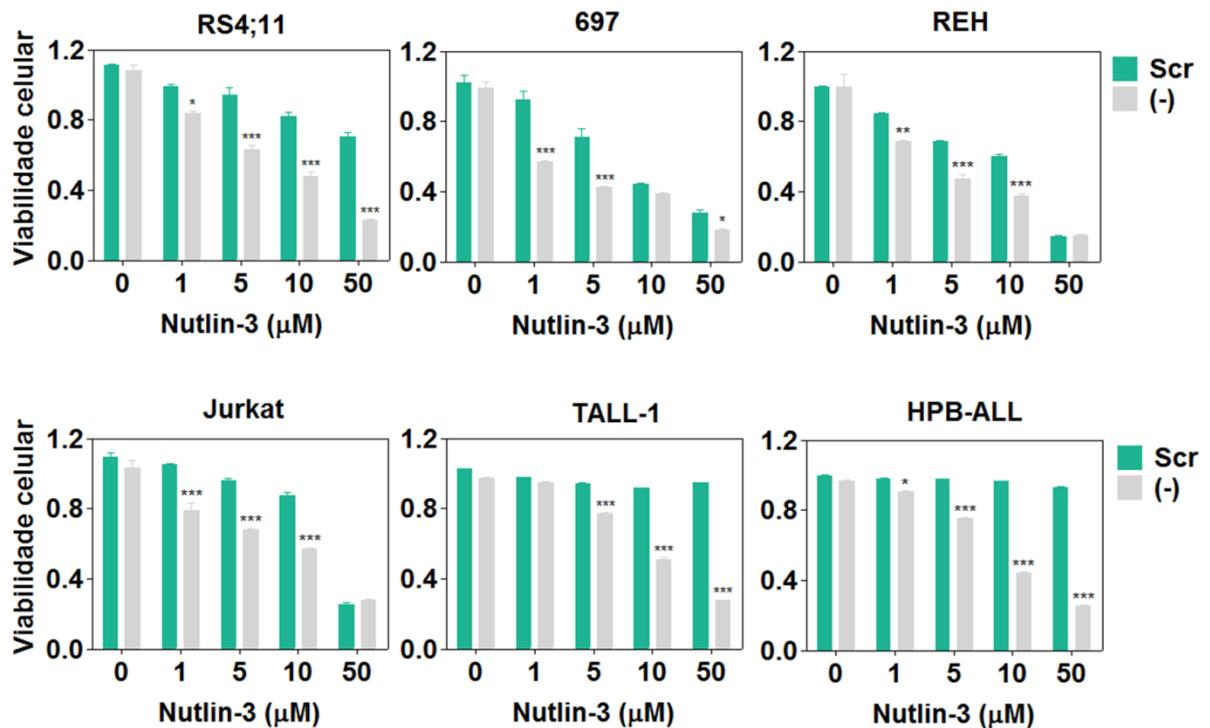
**Figura 1. O silenciamento de *IGFBP7* promove a ativação da via *p53* nas linhagens de LLA-B.** A análise de GSEA das linhagens RS4;11, 697 e REH com *IGFBP7* silenciado (em triplicadas biológicas) apresentaram em comum o enriquecimento de genes correlatos à via *p53* (representado em vermelho) em comparação às células controle (representado em azul). ES: *enrichment score*; NES: *normalized enrichment score*; FDR: *false discovery ratio*.

## ***1.2. Nutlin-3 reduz a viabilidade das linhagens celulares de LLA knockdown para IGFBP7***

A partir dos resultados gerados pela análise de GSEA apresentados na seção anterior, acreditamos que o silenciamento de *IGFBP7* promova a ativação da via p53 em linhagens celulares de LLA-B. Buscamos confirmar esta hipótese, realizamos um estudo funcional utilizando um ativador sintético de p53, Nutlin-3. Suspeitamos que a ativação farmacológica de p53 teria um impacto maior nas células sh.IGFBP7 quando comparadas as células controle (sh.Scramble).

O fator de transcrição p53 é regulado negativamente pela proteína MDM2 através de diferentes mecanismos em coordenação com MDMX (MDM4). A proteína MDM2 se liga ao domínio de transativação de p53 e bloqueia sua capacidade de ativar a transcrição de genes pro-apoptóticos, mantendo-o no citoplasma celular. MDM2 também funciona como uma E3 ubiquitina ligase, mediando degradação de p53. A inativação de p53 não só promove a tumorigênese, mas também confere às células cancerosas a capacidade de resistência a morte induzida por agentes terapêuticos. Na ausência de MDM2, p53 é constantemente ativado e isso potencializa sua ação antitumoral em um cenário oncogênico (Joerger e Fersht, 2016; Crunkhorn, 2018). Levando em consideração este conhecimento prévio, optamos por tratar nas linhagens RS4;11, 697, REH (LLA-B), Jurkat, TALL-1 e HPB-ALL (LLA-T) (células sh.IGFBP7 e sh.Scramble) com Nutlin-3, um fármaco antagonista de MDM2. Para isso, as células foram cultivadas em meio RPMI-1640 enriquecido com 10% FBS e doses crescentes de Nutlin-3 (0, 1, 5, 10 e 50  $\mu$ M) durante 48 h. No final deste período, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT.

Os resultados apresentados na Figura 2 ilustram que, tanto as linhagens de LLA-B (RS4;11, 697 e REH) como as linhagens de LLA-T (Jurkat, TALL-1 e HPB-ALL) *knockdown* para *IGFBP7* foram, de um modo geral, mais sensíveis a Nutlin-3 quando comparadas as células controle (sh.Scramble). Esses achados nos permitem indicar que o silenciamento de *IGFBP7* pode também estar modulando os efeitos da via p53 nas linhagens de LLA-T, visto que o tratamento com Nutlin-3 reduziu a viabilidade das células sh.IGFBP7 de modo comparável as linhagens de LLA-B. Ainda, mesmo diante a uma superdose de Nutlin-3 (50  $\mu$ M) podemos observar que as células sh.Scramble referentes as linhagens RS4;11, TALL-1 e HPB-ALL foram estatisticamente resistentes ao fármaco (embora a viabilidade tenha sido sutilmente reduzida). Em conclusão, nossos achados demonstram que a ativação de p53 mediada por Nutlin-3 associada ao silenciamento de *IGFBP7* pode resultar em um efeito sinérgico, inviabilizando as linhagens de LLA in vitro (Figura 2).



**Figura 2. Nutlin-3 reduz a viabilidade de linhagens celulares de LLA com *IGFBP7* silenciado.** As linhagens celulares sh.IGFBP7 ou sh.Scramble de LLA-B (RS4;11, 697 e REH) e LLA-T (Jurkat, TALL-1 e HPB-ALL) foram simultaneamente tratadas com diferentes doses (0, 1, 5, 10 e 50  $\mu\text{M}$ ) do fármaco antagonista de MDM2, Nutlin-3, durante 48 h em meio RPMI-1640 enriquecido com 10% FBS. Após o período, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT, através da leitura da absorbância (comprimento de onda: 570nm) realizada em um espectrofotômetro. Barras representam a média das triplicatas  $\pm$  SEM. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 7.0 através dos testes two-way ANOVA e Bonferroni post-tests (\* =  $p > 0.05$ ; \*\* =  $p > 0.01$ ; \*\*\* =  $p > 0.001$ ). (-) = células sh.IGFBP7. Scr = células sh.Scramble.

### 1.3. *IGFBP7* parece proteger a LLA diante da supressão tumoral mediada por p53

Conhecidamente, a via p53 é ativada após sinais de estresse celular, como danos ao DNA ou sinalização oncogênica. A ativação deste fator de transcrição ocorre através de uma cascata de eventos de fosforilação e outras modificações pós-traducionais, as quais resultam na expressão de genes alvo correlatos a p53. Esses genes atuam principalmente na parada do ciclo celular (Ex.: p21, Btg2, 14-3-3 $\sigma$  e Reprimo), reparo de DNA (Ex.: Gadd45 $\alpha$ , P53r2, Dbp2 e Mgmt) ou apoptose (Ex.: Puma, Noxa, Bax e Pig3), caso o dano seja irreparável (Vousden e Prives, 2009). Os genes alvo de p53 também têm papéis importantes

na senescência (Ex.: *Pai1*, *Pml* e *Cdkn1a*), angiogênese (Ex.: *Tsp1*, *Bai1*, *Epha2* e *Col4a1*) e autofagia (Ex.: *Atg10*, *Tsc2*, *Tpp1* e *Foxo3*) (Bieging, Mello e Attardi, 2014). Ao longo dos anos, inúmeros estudos sobre p53 revelam cada vez mais a complexidade e a conectividade desta via molecular, a qual desempenha papéis distintos na regulação metabólica e desenvolvimento (Joerger e Fersht, 2016).

A fim de identificarmos mecanismos moleculares adjacentes ao fator de transcrição p53, realizamos um estudo de sinalização celular utilizando as células sh.IGFBP7 e sh.Scramble referentes as linhagens RS4;11 e Jurkat, através da técnica de Western blot. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 na ausência de FBS durante *overnight*. Como controle interno, optamos por tratar as mesmas linhagens com 1  $\mu$ M do quimioterápico Dexametasona (um glicocorticoide amplamente utilizado no tratamento da LLA pediátrica) durante 5 h. Ao término do tratamento, as células foram lavadas em PBS 1x, lisadas e as proteínas totais foram extraídas, quantificadas e analisadas.

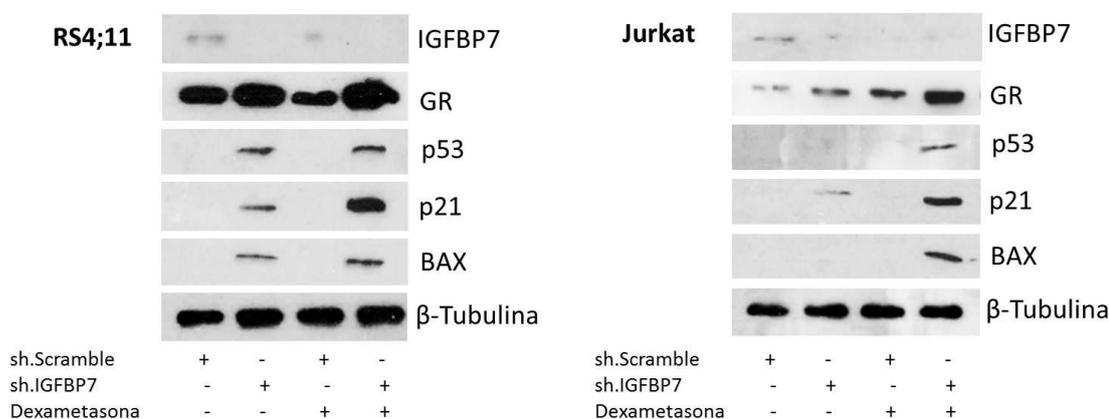
De um modo geral, é possível verificar na Figura 3 que tanto para a linhagem RS4;11 quanto para Jurkat, as células sh.Scramble apresentam níveis basais da proteína IGFBP7, a qual não foi identificada nas células sh.IGFBP7, confirmando assim o silenciamento deste gene pela redução dos níveis de proteína. Curiosamente, é possível observar que as células sh.IGFBP7 apresentaram uma maior expressão do receptor de glicocorticoide (GR) independente do estímulo com Dexametasona; todavia, a adição deste fármaco potencializou ainda mais a expressão do receptor.

Corroborando os dados da análise de GSEA, a qual apresentou o enriquecimento da via p53 nos clones sh.IGFBP7, aqui confirmamos este achado pelo aumento dos níveis da proteína p53 na linhagem RS4;11 com *IGFBP7* silenciado. Todavia, para a linhagem Jurkat, o tratamento com Dexametasona foi fundamental para a ativação de p53 nas células sh.IGFBP7. De forma oposta, as células sh.Scramble (RS4;11 e Jurkat) não apresentaram ativação de p53, mesmo diante do tratamento com o glicocorticoide.

Como consequência da ativação de p53, também é possível observar que as células sh.IGFBP7 apresentam o aumento dos níveis proteicos de p21 e Bax. O fator de transcrição p53 desempenha papéis importantes na parada do ciclo celular (mediada por p21) e direcionamento para apoptose (mediada por Bax), diante de sinais oncogênicos (Joerger e Fersht, 2016). Nossos dados apresentados na Figura 3 apontam que as células sh.Scramble, as quais apresentam níveis basais de IGFBP7, podem estar atenuando a supressão tumoral mediada por p53 na LLA, refletindo em níveis reduzidos/inesistentes das proteínas p21 e Bax,

mesmo diante dos efeitos citostáticos mediados por Dexametasona. De modo contrário, o silenciamento *IGFBP7* mostrou ativar p53 e, conseqüentemente, p21 e Bax.

É digno de nota que a adição de Dexametasona parece potencializar a ativação de p53 nas células sh.IGFBP7, o que fica evidente pelo aumento nos níveis de p21 e Bax. Além disso, de uma maneira curiosa, o silenciamento de *IGFBP7* pareceu aumentar os níveis de GR mesmo na ausência de estímulo por Dexametasona, demonstrando uma provável interação de *IGFBP7* com a via dos glicocorticoides.



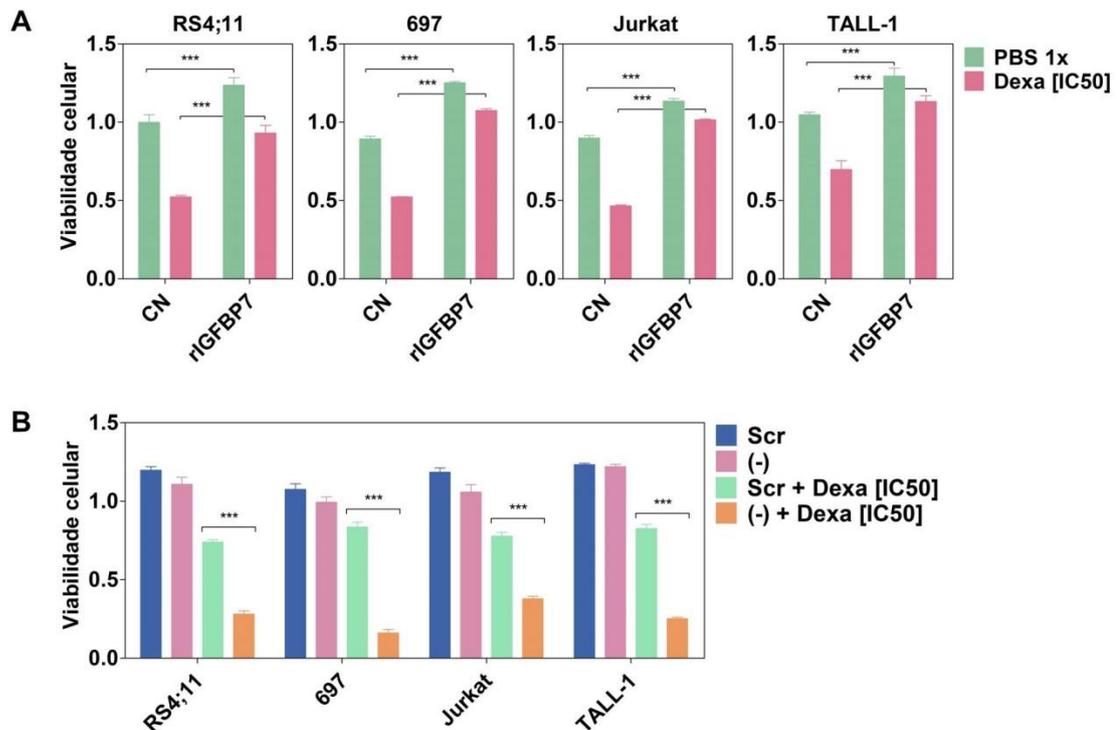
**Figura 3. *IGFBP7* protege a LLA da supressão tumoral mediada por p53, inibindo p21 e Bax.** Os clones sh.IGFBP7 ou sh.Scramble referentes as linhagens RS4;11 e Jurkat foram tratados com 1  $\mu$ M de Dexametasona durante 5 h. Após, proteínas totais foram extraídas, quantificadas e analisadas por WB. Trinta microgramas de proteína foram desnaturadas, sujeitas a eletroforese e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas em soluções com os anticorpos anti-IGFBP7 (clone AF1334, R&D Systems, diluição de 1:1000), anti-GR (clone 3660, Cell Signaling Technology, diluição de 1:1000), anti-p53 (clone 9282, Cell Signaling Technology, diluição de 1:1000), anti-p21 (clone 2946, Cell Signaling Technology, diluição de 1:1000) e anti-BAX (clone 2772, Cell Signaling Technology, diluição de 1:1000). Como controle endógeno foi utilizado o anticorpo anti- $\beta$ -tubulina (clone 2146, Cell Signaling Technology, 1:10,000).

#### 1.4. *IGFBP7* promove resistência à Dexametasona em linhagens celulares de LLA

Os dados apresentados na Figura 3 sugerem que *IGFBP7* pode proteger as células de LLA contra as ações citostáticas mediadas por Dexametasona, além dos já conhecidos efeitos protetores aos fármacos asparaginase e metotrexato (Selga et al., 2009; Laranjeira et al., 2012). Se essa hipótese estiver correta, a adição da proteína IGFBP7 recombinante

(rIGFBP7) deveria proteger as células diante da ação do corticoide. Para testar a hipótese, diferentes linhagens celulares de LLA foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de FBS durante 48 h, na presença ou ausência de rIGFBP7 (100 ng/mL) e/ou Dexametasona (doses de IC50: RS4;11 – 2,88 ng/mL; 697 – 0,1 ng/mL; Jurkat – 30 ug/mL; e TALL-1 – 12,5 ng/mL). Após o período de incubação, a viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de MTT.

Corroborando com nossa hipótese, os gráficos apresentados na Figura 4A ilustram que a adição de rIGFBP7 em associação com Dexametasona protege as linhagens celulares diante da ação deste fármaco. Além disso, é possível evidenciar que na ausência de Dexametasona, a adição de rIGFBP7 impulsiona significativamente a viabilidade celular da LLA (Figura 4A).



**Figura 4. IGFBP7 protege as células de LLA diante das ações citostáticas mediadas por Dexametasona.** (A) As linhagens de LLA-B (RS4;11 e 697) e LLA-T (Jurkat e TALL-1) foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de FBS, na presença ou ausência rIGFBP7 (100 ng/mL) e/ou Dexametasona (doses de IC50: RS4;11 – 2,88 ng/mL; 697 – 0,1 ng/mL; Jurkat – 30 ug/mL; e TALL-1 – 12,5 ng/mL) durante 48 h. Após esse período a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT, através da leitura da absorbância (comprimento de onda: 570nm) realizada em um espectrofotômetro. As barras representam a média das triplicatas  $\pm$  SEM. (B) Os clones sh.IGFBP7 e sh.Scramble

referentes as linhagens RS4;11, 697, Jurkat e TALL-1 foram cultivadas em meio RPMI-1640 (isento de FBS) suplementado com Dexametasona (doses de IC50) durante 24 h. Após esse período a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. As barras representam a média das triplicatas  $\pm$  SEM. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 7.0, através dos testes two-way ANOVA e Bonferroni post-tests (\*\*\* =  $p > 0.001$ ). (-) = células sh.IGFBP7. Scr = células sh.Scramble. PBS 1x: tampão fosfato-salino.

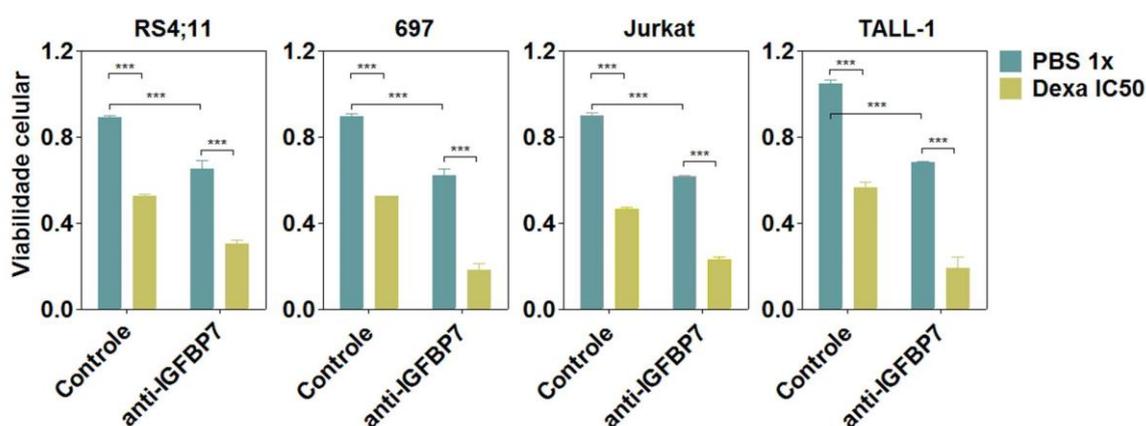
Para confirmar estes achados, perfizemos um segundo estudo funcional utilizando as células sh.IGFBP7 e sh.Scramble referentes as linhagens celulares RS4;11, 697, Jurkat e TALL-1. Para isso, cultivamos as células em meio RPMI-1640 acrescido de 10% de FBS durante 48 h. Posteriormente, as células foram lavadas em PBS 1x e ressuspensas em meio RPMI-1640 isento de FBS e suplementado com Dexametasona (doses de IC50). Após 24 h de cultivo, a viabilidade celular foi mensurada pelo ensaio de MTT. Em concordância com os resultados anteriores, é possível observar que o silenciamento de *IGFBP7* reduziu drasticamente a viabilidade das células tratadas com Dexametasona (Figura 4B). Em conjunto, esses achados refletem o importante papel desta proteína na modulação de resposta a glicocorticoides, sustentando nossa hipótese de que *IGFBP7* pode promover resistência à LLA diante das ações citostáticas mediadas por Dexametasona.

### ***1.5. A neutralização de IGFBP7 com uso de anticorpo monoclonal reduz a viabilidade celular e sensibiliza LLA à ação da Dexametasona***

Após verificarmos uma estreita relação entre IGFBP7 e GR, buscamos explorar o potencial uso terapêutico deste achado. Dispondo de um anticorpo neutralizante de IGFBP7 (Ver manuscrito apresentado no Capítulo I), buscamos verificar o comportamento das linhagens celulares de LLA tratadas com Dexametasona em associação com o anticorpo monoclonal anti-IGFBP7 produzido em nosso laboratório (Figura Suplementar S3 do manuscrito, Capítulo I). Como IGFBP7 é uma proteína extracelular secretada, a neutralização da mesma com anticorpos poderia tornar-se uma ferramenta útil, a qual aumentaria a sensibilidade destas células à ação da Dexametasona e, talvez, contribuir para a sensibilização da leucemia diante da ação de outros quimioterápicos. Para prova de conceito, arquitetamos um experimento funcional utilizando as linhagens RS4;11, 697, Jurkat e TALL-1. Inicialmente as diferentes linhagens celulares foram cultivadas em meio RPMI-1640 acrescido de 10% de FBS suplementado ou não com Dexametasona (doses de IC50

previamente estipuladas) e/ou anticorpo anti-IGFBP7 (20  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 48 h. A viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de MTT.

Como é possível observar na Figura 5, o tratamento das células com anticorpo monoclonal anti-IGFBP7 reduz a viabilidade celular da LLA de maneira significativa, quando comparadas as células controle. A associação de Dexametasona com anticorpo anti-IGFBP7 reduziu drasticamente a viabilidade de todas as linhagens celulares de LLA aqui testadas. De um modo geral, esses resultados demonstram que a neutralização de IGFBP7 promove a potencialização das ações citostáticas mediadas por Dexametasona, sugerindo que esta proteína pode ser um novo alvo terapêutico na LLA.



**Figura 5. A neutralização de IGFBP7 com uso de anticorpo monoclonal reduz a viabilidade celular e sensibiliza LLA à ação da Dexametasona.** As linhagens celulares RS4;11, 697, Jurkat e TALL-1 foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de FBS e/ou anticorpo anti-IGFBP7 (20  $\mu\text{g/mL}$ ) e/ou Dexametasona (doses de IC50: RS4;11 – 2,88 ng/mL; 697 – 0,1 ng/mL; Jurkat – 30  $\mu\text{g/mL}$ ; e TALL-1 – 12,5 ng/mL). Após 48 h, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT através da leitura da absorbância (comprimento de onda: 570nm) realizada em um espectrofotômetro de placas, sendo que as barras representam a média das triplicatas  $\pm$  SEM. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 7.0 através dos testes two-way ANOVA e Bonferroni post-tests (\*\*\*) =  $p < 0.001$ ).

### ***1.6. O silenciamento de IGFBP7 potencializa a translocação nuclear do receptor de glicocorticoide (GR) na presença de Dexametasona***

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular, os quais refletem o importante papel de *IGFBP7* na promoção da resistência à Dexametasona pela LLA, nesta seção procuramos desvendar como *IGFBP7* poderia atuar neste mecanismo. A

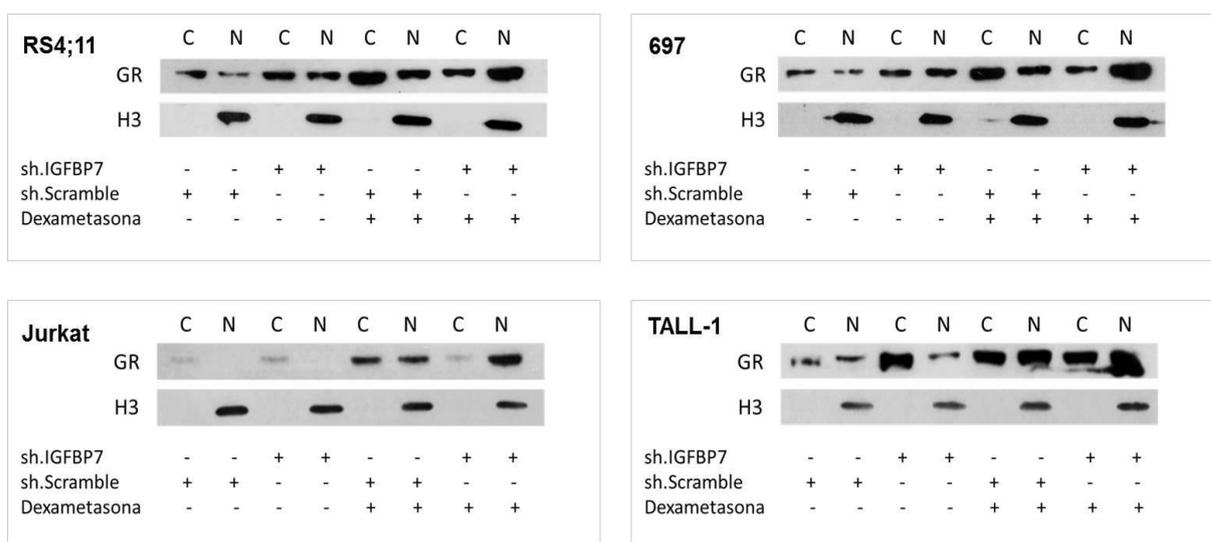
sinalização molecular desencadeada pelos glicocorticoides é complexa, sendo os receptores de glicocorticoides (GRs) os principais alvos destes fármacos. Fisiologicamente, GR é retido no citoplasma celular onde permanece inativo. A partir de uma ativação hormonal ou farmacológica, GR sofre uma conformação estrutural e é deslocado para o núcleo junto com um complexo multiproteico que garante o bom desempenho desta ação; no núcleo, GR ligado por ligante desempenha sua função ativando ou reprimindo a transcrição genica (Vandevyver, Dejager e Libert, 2012).

Uma vez que o silenciamento de *IGFBP7* reduziu drasticamente a viabilidade celular da LLA diante da ação da Dexametasona, ao mesmo tempo em que a adição de rIGFBP7 protegeu as linhagens, é passível de acreditar que *IGFBP7* poderia estar atuando na sinalização molecular de GR. Para prova de conceito, as linhagens celulares RS4;11, 697, Jurkat e TALL-1 (células sh.IGFBP7 e sh.Scramble) foram expandidas em meio RPMI-1640 enriquecido com 10% de FBS durante 48 h. O tratamento das células com Dexametasona (concentração final de 1  $\mu$ M) foi realizado em 5 *time points* distintos (zero, 1, 2, 3 e 4 h), com o objetivo de manter GR constantemente ativado. Após a expansão das linhagens, 0,2  $\mu$ M do fármaco foi adicionado a cada 1 h decorrida a partir do tempo zero do início do tratamento, totalizando 5 h de exposição. Tendo em vista a rápida ativação e exportação nuclear de GR, esta metodologia nos permitiria visualizar este receptor no núcleo das células, caso estivesse sendo ativado. Desse modo, após cinco horas de tratamento, as linhagens celulares foram lavadas em PBS 1x e as frações proteicas do citoplasma e núcleo foram extraídas, quantificadas por Bradford e a presença da proteína GR foi analisada.

Os resultados apresentados na Figura 6 ilustram que o silenciamento de *IGFBP7* promove um sutil aumento nos níveis de GR tanto no citoplasma quanto no núcleo das linhagens RS4;11 e 697. Todavia, para a linhagem TALL-1, o silenciamento aumentou consideravelmente os níveis de GR citoplasmático nas células sh.IGFBP7, quando comparadas as células sh.Scramble. A adição de Dexametasona promoveu o equilíbrio de GR citoplasmático e nuclear das células sh.Scramble referentes as linhagens de LLA-T, aumentando também os níveis deste receptor na fração citoplasmática das linhagens de LLA-B. Curiosamente, as células silenciadas para *IGFBP7* apresentaram um aumento significativo nos níveis de GR na fração nuclear (Figura 6). Além disso, é digno de nota que o tratamento das células sh.IGFBP7 referentes a linhagem Jurkat promoveu a completa translocação nuclear de GR.

De um modo geral, os resultados apresentados nesta seção demonstram que a regulação negativa de *IGFBP7* promove a potencialização dos efeitos citostáticos mediadas

por Dexametasona sugerindo que, além do importante papel da proteína IGFBP7 para a progressão *in vitro* e *in vivo* da LLA (Ver Capítulo I), a mesma também poderia estar vinculada com a resistência quimioterápica dos glicocorticoides pelas leucemias. Atualmente, nosso grupo de pesquisa está empenhado na busca por outras comprovações que sustentam estes achados.



**Figura 6. O silenciamento de IGFBP7 promove ativação e translocação nuclear de GR nas linhagens celulares de LLA tratadas com Dexametasona.** As células sh.IGFBP7 ou sh.Scramble referentes as linhagens RS4;11, 697, Jurkat e TALL-1 foram cultivadas em RPMI-1640 isento de FBS durante *overnight*. Após este período, as células foram tratadas com 1  $\mu$ M de Dexametasona durante 5 h. Em seguida, as proteínas citoplasmáticas e nucleares foram extraídas, quantificadas e analisadas por Western blot. Trinta microgramas de proteína citoplasmática e nuclear foram desnaturadas, sujeitas a eletroforese e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas em uma solução com anticorpo anti-GR (clone D8H2, Cell Signaling Technology, 1:1000). Como controle endógeno nuclear foi utilizado o anticorpo anti-Histona H3 (clone AB1791, Abcam, 1:10,000). A membrana foi revelada usando o reagente para detecção de substrato Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo-Scientific) e visualização das proteínas foi feita por autorradiografia.

## **2.0. MATERIAIS E MÉTODOS COMPLEMENTARES**

### ***2.1. RNA-seq e análises de GSEA***

O sequenciamento foi realizado na empresa NOVAGEN Genética Ltda (São Paulo, Brasil) e os dados foram analisados na plataforma GSEA (Subramanian et al. 2005) através da colaboração com a Dra. Xinghua Shi, líder do laboratório de bioinformática e genômica da University of North Carolina at Charlotte (USA).

### ***2.2. Viabilidade celular pelo ensaio de MTT***

Para os ensaios de viabilidade celular, as linhagens celulares RS4;11, REH, 697 (LLA-B), Jurkat e TALL-1 e HBP-ALL (LLA-T) e/ou seus respectivos clones sh.IGFBP7 e sh.Scramble foram cultivadas em placas de 96 wells (confluência de 25,000 células/well) contendo meio RPMI-1640 enriquecido ou não com 10% de soro fetal bovino (FBS) durante 24 h ou 48 h. Durante os determinados períodos de incubação, o meio de cultura foi suplementado (ou não) com os diferentes fatores a serem testados, como Dexametasona (doses de IC50: RS4;11 – 2,88 ng/mL; 697 – 0,1 ng/mL; Jurkat – 30 µg/mL; e TALL-1 – 12,5 ng/mL), IGFBP7 recombinante (rIGFBP7 – 100 ng/mL), Nutlin-3 (concentrações de zero, 1, 5, 10 e 50 µM) ou anticorpo monoclonal anti-IGFBP7 (20 µg/mL). Ao término da exposição, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. O corante MTT (0,5 mg/mL) foi adicionado em todos os wells contendo os diferentes tratamentos, sendo a placa incubada a 37°C por 4,5 horas. Decorrido o tempo de incubação foi adicionado 100 µL de uma solução de SDS 10% - HCL0,01M para solubilizar os cristais de formazan gerados pela redução do MTT pela células viáveis. A solubilização ocorreu por aproximadamente 18 h (*overnight*). A leitura da absorbância (comprimento de onda de 570 nm) foi realizada em um espectrofotômetro de placas.

### ***2.3. Sinalização celular e migração de GR por Western blot***

Para a análise de ativação da via p53, as células sh.IGFBP7 e sh.Scramble referentes as linhagens RS4;11 e Jurkat foram cultivados em meio RPMI-1640 acrescido de 10% FBS durante 48 h. Após este período, as células foram lavadas em PBS 1x e ressuspendidas em meio RPMI-1640 isento de FBS suplementado ou não com 1 µM de Dexametasona (tratamento realizado conforme descrito no parágrafo anterior), durante 5 h. Após este período, as células foram novamente lavadas em PBS 1x, peletadas por

centrifugação e as proteínas totais foram extraídas utilizando o Tampão RIPA-like (50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% de deoxicolato de sódio; 0,1% de SDS) suplementado com 1% do inibidor de fosfatase I, 1% do inibidor de fosfatase II, 1% do inibidor de protease e 1 mM de PMSF (todos da Sigma-Aldrich) durante 5 min. As proteínas foram quantificadas por Bradford e armazenadas em freezer -80°C até a utilização.

Com intuito de observarmos a translocação nuclear do receptor de glicocorticoide (GR) ativado por Dexametasona, as células sh.IGFBP7 e sh.Scramble referentes as linhagens RS4;11, 697, Jurkat e TALL-1 foram cultivados em meio RPMI-1640 acrescido de 10% FBS por 48 h. Buscando manter GR constantemente ativado, tratamos as linhagens em cinco diferentes tempos com 0,2 µM de Dexametasona (tempos: zero, 1, 2, 3, e 4 h) até chegarmos a um montante acumulativo de 1 µM do fármaco no meio de cultura. Na quinta hora após o início do tratamento, as células foram lavadas em PBS 1x (tampão fosfato-salino) e peletadas por centrifugação. As proteínas citoplasmáticas foram obtidas através da lise do citoplasma celular com uma solução tampão de baixa agressividade, denominada Tampão I (10 mM HEPES; 60 mM KCl; 1 mM EDTA; 0.075% (v/v) NP40; 1 mM DTT) suplementado com 1% do inibidor de fosfatase I, 1% do inibidor de fosfatase II, 1% do inibidor de protease e 1 mM de PMSF (todos da Sigma-Aldrich). Após este processo, o produto da lise foi centrifugado e o sobrenadante contendo as proteínas citoplasmáticas foi coletado. O *pellet* gerado pela primeira centrifugação foi lavado 3x com o Tampão I visando à completa remoção de proteínas citoplasmáticas. Em seguida, realizamos uma segunda lise no *pellet* (contendo a fração nuclear) utilizando o Tampão RIPA-like suplementado com 1% do inibidor de fosfatase I, 1% do inibidor de fosfatase II, 1% do inibidor de protease e 1 mM de PMSF (todos da Sigma-Aldrich) durante 5 min. Ambas as frações proteicas foram quantificadas por Bradford e armazenadas em freezer -80°C até a utilização.

Para todas as análises, 30 µg de proteínas (citoplasmáticas, nucleares ou totais) foram submetidas à eletroforese em um gel de SDS-poliacrilamida (concentração de 10%). As proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM de glicina, 0.1% de SDS e 20% de metanol). Posteriormente, as membranas foram incubadas durante *overnight* a 4°C com os anticorpos primários anti-GR (clone 3660, Cell Signaling Technology, diluição de 1:1000), anti-IGFBP7 (clone AF1334, R&D Systems, diluição de 1:1000), anti-p53 (clone 9282, Cell Signaling Technology, diluição de 1:1000), anti-p21 (clone 2946, Cell Signaling Technology, diluição de 1:1000) e anti-BAX (clone 2772, Cell Signaling Technology, diluição de 1:1000). Como controles endógenos foram utilizados os anticorpos anti-Histona H3 (clone AB1791, Abcam,

1:10,000) e anti- $\beta$ -tubulina (clone 2146, Cell Signaling Technology, 1:10,000). Todos os anticorpos primários foram diluídos em solução tampão TBS-T (20 mM Tris, 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween-20) com 2% de albumina de soro bovino (BSA). A imunodeteção foi realizada por incubação da membrana com anticorpo secundário anti-IgG de coelho (clone 7074, Cell Signaling Technology, diluição de 1:10,000) ou murino (clone 7076, Cell Signaling Technology, diluição de 1:10,000) conjugado com enzima HRP em uma solução de 5% de leite em pó desnatado diluído com TBS-T. Após 1 h de incubação, a membrana foi revelada usando o reagente para detecção de substrato Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo-Scientific) e visualizado por autorradiografia.

### 3.0. DISCUSSÃO GERAL

Apesar do grande avanço no tratamento da LLA, o qual fez com que as chances de cura chegassem à margem de 90% em alguns protocolos de tratamento (Pui, Robison e Look, 2011; Pillozi et al., 2011), aproximadamente 20% dos casos ainda são enquadrados na categoria de alto risco, merecendo atenção individualizada. A maioria destes pacientes apresenta recaída da doença, fato atribuído a grande heterogeneidade da LLA aliada à resistência quimioterápica desenvolvida pelas células leucêmicas, o que reflete na necessidade de otimização do tratamento (Pui et al., 2004; Pui, Robison e Look, 2011). Diferentes trabalhos tem mostrado que a alta expressão de *IGFBP7* estaria relacionada ao pior prognóstico e a um perfil de resistência a terapia primária de pacientes com leucemia (Heesch et al., 2010; Hu et al., 2011; Laranjeira et al., 2012), inferindo que este gene e proteína poderiam ser candidatos alvos no tratamento desta doença.

Anteriormente, comprovamos que a *IGFBP7* secretada pelas BMSCs desempenha um importante papel na sobrevivência de linhagens celulares e células primárias de LLA. Corroborando o estudo de Holleman e colaboradores (2004), mostramos que a adição *rIGFBP7* associada aos fatores de crescimento INS, *rIGF1* e/ou *rIGF2*, estimula a produção de asparagina sintetase (*ASNS*) e a secreção de asparagina pelas BMSCs, resultando na proteção das células leucêmicas diante da ação do fármaco L-asparaginase (Laranjeira et al., 2012). Esta ação foi caracterizada por nós como um mecanismo de resistência dependente de BMSCs, o qual é esquematizado na Figura 3A.

Tendo em vista que *IGFBP7* é também uma proteína secretada pelas próprias células de LLA (Laranjeira et al., 2012), hipotizamos que estas poderiam se beneficiar desta proteína de uma maneira autócrina, interagindo ou não com os fatores de crescimento mencionados anteriormente, caracterizando um mecanismo independente das BMSCs (Figura 3B). Sendo assim, neste trabalho buscamos estudar o papel autócrino de *IGFBP7* e dos fatores INS/IGFs, na progressão da LLA e os mecanismos moleculares envolvidos neste processo.

*IGFBP7* pertence à subfamília de proteínas relacionadas à *IGFBPs* (*IGFBP-rPs*) apresentando baixa afinidade de ligação a INS e IGFs, sendo descrita pela primeira vez como uma molécula estimuladora da atividade mitogênica destes fatores de crescimento (Akaogi et al., 1996). Previamente, mostramos que o silenciamento de *IGFBP7* com uso da técnica de RNAi (RNA de interferência) reduziu significativamente a proliferação e viabilidade celular de linhagens celulares de LLA-B, tais como REH e 697 (Laranjeira et al., 2012). Aqui, diversos experimentos *in vitro* foram realizados para confirmar com mais clareza os achados

observados por Laranjeira et al., (2012). A partir disso, confirmamos que o silenciamento de *IGFBP7* é responsável pela redução da viabilidade e proliferação celular não apenas para as linhagens REH e 697, mas também para RS4;11 (LLA-B). Além disso, nossos achados nos permitem extrapolar esta evidência para as linhagens de LLA-T (Jurkat e TALL-1), as quais apresentaram grande sensibilidade ao *knockdown* de *IGFBP7*. Em resumo, as análises *in vitro* apresentadas na Figura 1 do manuscrito ilustram que *IGFBP7* pode atuar como um fator mitogênico tanto para a LLA-B quanto para a LLA-T, sendo esta hipótese sustentada pelos dados apresentados nos ensaios de incorporação de BrdU, capacidade clonogênica, sobrevivência e viabilidade celular (Figura 1A, B, C e D, respectivamente).

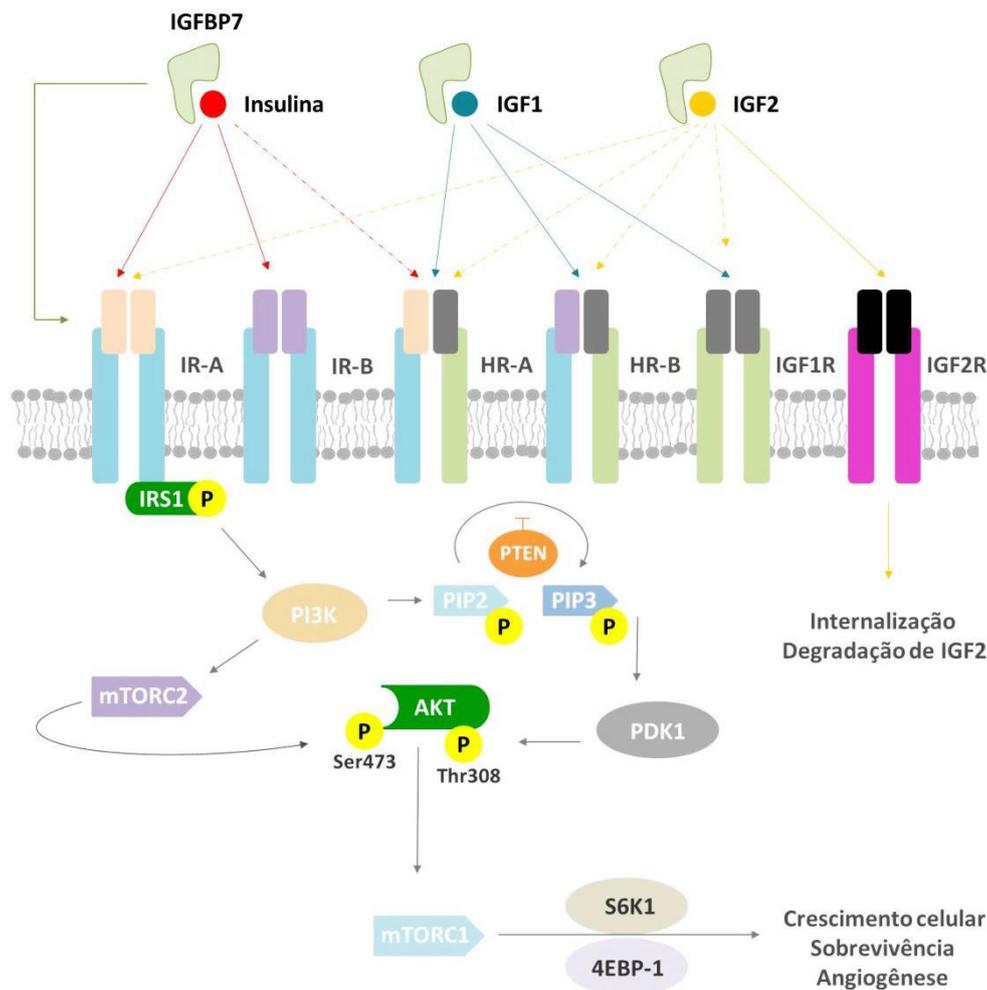
Corroborando com nossas evidências, outros estudos também tem demonstrado à estreita relação de *IGFBP7* com a proliferação celular de linhagens leucêmicas. Bartram e colaboradores (2015) comprovaram que a super expressão de *IGFBP7* em LLA-T é responsável pelo aumento da proliferação celular das linhagens Jurkat e Molt-4, sendo que em um ambiente com deficiência nutricional estas células apresentaram alta resistência a apoptose. Hu et al., (2011) verificaram que o silenciamento de *IGFBP7* em linhagens de leucemia mieloide aguda (LMA) reduz a viabilidade e multiplicação celular; de modo contrário, a superexpressão de *IGFBP7* promoveu o efeito inverso nas células analisadas. Mais recentemente, Niu, Wu e Hu, (2018) também comprovaram que a superexpressão de *IGFBP7* na linhagem K562 de AML potencializa significativamente a adesão, proliferação e migração celular, o que está de acordo com nossos resultados, visto que a regulação negativa de *IGFBP7* reduziu de maneira significativa a migração das linhagens celulares aqui analisadas (Figura 1E).

Conhecidamente, as IGFBPs podem ter ações dependentes ou independentes das IGFs (Allard e Duan, 2018). Mostramos anteriormente que o efeito parácrino da *IGFBP7* nas BMSCs foi amplamente dependente das IGFs (Laranjeira et al., 2012). De modo contrário, outros trabalhos tem demonstrado que *IGFBP7* pode desempenhar ações independentes destes fatores de crescimento. A exemplo disso, Evdokimova et al., (2012) demonstraram que *IGFBP7* aumenta a permeabilidade vascular pela ligação à integrina  $\alpha\beta3$  e exerce um papel supressor tumoral nas células do câncer de mama ao se ligar ao IGF1R e bloquear sua ativação por IGFs.

Todavia, se tratando do papel de *IGFBP7* na LLA, os efeitos autócrinos desta proteína parecem ser potencializados por INS/IGFs. Os dados apresentados na Figura 2A do manuscrito ilustram que a estimulação das linhagens celulares de LLA com INS aumenta a fosforilação (Ser302 e pan-Tirosina) do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), sendo que

a adição de rIGFBP7 potencializa de maneira significativa esta sinalização, a qual pode ser observada até 4 h após o estímulo (resíduos de pan-Tirosina). Condizendo com esses achados, percebemos que o silenciamento de *IGFBP7* atua de maneira oposta, promovendo a redução dos níveis de fosforilação de Akt (Ser473) (Figura 2B e C do manuscrito) mesmo diante do estímulo com INS, o que demonstra que a ativação de Akt não é totalmente dependente deste fator de crescimento. Ainda, quando as células sh.IGFBP7 receberam a adição de rIGFBP7 exógeno, a fosforilação de Akt (Ser473) foi reestabelecida e este efeito foi potencializado pela adição de INS (Figura 2B e C do manuscrito).

Mecanicamente, a proteína IGFBP7 está diretamente envolvida no aumento da meia vida dos fatores de crescimento INS e IGFs (Akaogi et al., 1996). A ligação de INS ao seu receptor (IR) promove a ativação dos substratos do receptor de insulina (INS1-4), principalmente IRS-1. A fosforilação de IRS-1 (Ser302) ocorre rapidamente durante estímulo com INS ou IGFs e é fundamental para o processo de fosforilação dos resíduos de tirosina desta proteína (Giraud et al. 2004). Esta ação é, em parte, responsável pelo recrutamento de PI3K e a ativação a jusante de diversas proteínas tais como Akt e mTOR, as quais atuam promovendo o crescimento e inibição da apoptose celular (Eck et al., 1996; Yenush e White, 2005). A ativação de PI3K por IRS-1 faz com que esta proteína fosforile PIP2 para gerar PIP3. PIP3 promove o recrutamento de Akt para a membrana citoplasmática, onde é fosforilada e ativada por PDK1 (resíduo Thr308). A ativação de PI3K por IRS-1 também pode ativar Akt através de interações moleculares com o complexo mTOR, denominado mTORC2. A fosforilação de mTORC2 (Ser2481) por PI3K promove a fosforilação de Akt (Ser473) que, quando ativada, desempenha ações mediando ativação de outro complexo de mTOR, agora chamado de mTORC1. Uma vez ativada, mTORC1 atua fosforilando os fatores reguladores da tradução ribossômica S6 quinase-1 (S6K-1) e a proteína de ligação do fator de iniciação da tradução eucariota-4E-1 (4EBP-1). A ativação de S6K-1 conduz à tradução de um mRNA que codifica proteínas ribossômicas, fatores de alongamento e outras proteínas necessárias para a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular. A fosforilação de 4EBP-1 promove também a ativação de ciclina D1, c-Myc e o fator indutor de hipóxia-1 $\alpha$ , contribuindo para a progressão do ciclo celular (Lapante e Sabatini, 2012; Mabuchi et al., 2015). Um esquema simplificado da ativação destas vias é ilustrado na Figura 7.



**Figura 7. Representação esquemática da sinalização de INS/IGFs/IGFBP7 promovendo ativação da via PI3K/Akt/mTOR.** Adaptado de Mabuchi et al., (2015).

A ativação da via PI3K/Akt/mTOR na LLA é descrita como um “gatilho” de proliferação e viabilidade celular *in vitro* (Xu et al., 2003; Schade et al., 2006; Tazzari et al., 2007; Silveira et al., 2015). Levando em consideração os achados apresentados na Figura 2A, B e C do manuscrito, observamos que *IGFBP7* esteja, de alguma maneira, relacionado com a manutenção e ativação da via PI3K/Akt/mTOR nas leucemias, visto que o silenciamento deste gene refletiu diretamente na menor fosforilação de Akt (Ser473) e, fisiologicamente, na redução dos sinais de sobrevivência celular (Figura 1 do manuscrito). Corroborando nossos achados, o recente estudo publicado por de Wu et al., (2019) descreve em primeira mão que a ativação da via PI3K/Akt/mTOR, a qual é constantemente ativada na maioria das neoplasias pulmonares, é estreitamente dependente de *IGFBP7*. Neste trabalho, os autores identificaram que a supressão de *IGFBP7* reflete na redução abrupta da fosforilação de Akt (Ser473) e,

consequentemente, bloqueio da via PI3K/Akt/mTOR, ocasionando a parada do ciclo celular e apoptose nas células silenciadas. Como também observado em nosso estudo, a adição de rIGFBP7 exógena reestabeleceu os níveis de Akt fosforilado e a maior ativação da via PI3K/Akt/mTOR (Wu et al., 2019). Todavia, o mecanismo de ação que promove a redução da fosforilação de Akt mediada pelo silenciamento de *IGFBP7* não foi desvendado por Wu e colaboradores.

Nas leucemias, 70% dos casos de ativação constitutiva da via PI3K/Akt/mTOR é resultante da sinalização desencadeada por INS/IGFs sobre o receptor IGF1R (Park et al., 2010). Todavia, poucos estudos investigaram a real dependência da LLA diante dos estímulos mediados pela ativação de IGF1R por ligantes. Medyouf et al., (2011) relataram que a inibição ou deleção farmacológica do IGF1R é primordial para prevenir a progressão da LLA-T. Nossos dados corroboram os achados de Medyouf e colaboradores; além disso, também verificamos que as linhagens celulares de LLA-B apresentam o mesmo perfil de dependência pelo receptor IGF1R apresentado pelas células de LLA-T, visto que o silenciamento de *IGF1R* e *INSR* reduz de maneira significativa a proliferação celular das linhagens REH (LLA-B) e Jurkat (LLA-T) (Figura 2D do manuscrito). Ainda, percebemos que 48 h após a ativação do silenciamento, a sobrevivência *in vitro* destas linhagens é drasticamente afetada, ficando evidente pelas marcações de Anexina-V/IP (Figura 2E do manuscrito).

A importância do eixo INS/IGFs e da proteína IGFBP7 para a viabilidade da LLA foi também confirmada por um estudo funcional utilizando células primárias de LLA-B. As células LLA primárias tendem a não resistir ao cultivo *in vitro* sem suplementação adequada (Menabe et al., 1992). Como ilustrado na Figura 2F do manuscrito, a suplementação do meio de cultura com INS, rIGF1, rIGF2 ou rIGFBP7 sozinhos não foi suficiente para manter a viabilidade destas células. No entanto, quando os fatores de crescimento INS, rIGF1 ou rIGF2 foram adicionados em conjunto com rIGFBP7, a viabilidade aumentou consideravelmente em 6 dos 8 casos de BCP-LLA analisados, demonstrando o papel relevante destes fatores de crescimento para a LLA. Todavia, considerando a complexidade do sistema INS/IGFs, é necessário ressaltar que os experimentos *in vitro* aqui apresentados indicam apenas uma aproximação sobre a situação real ocorrida em um sistema biológico completo. Por exemplo, sabe-se que fisiologicamente várias proteases são responsáveis por clivar as diferentes IGFBPs e IGFBP-rPs, contribuindo para uma maior ativação de IGF1R e INSR por INS/IGFs (Gibson, 2002). Desse modo, para melhor entendermos o potencial leucemogênico autócrino de IGFBP7 na LLA e avaliarmos o papel fisiológico desta proteína secretada por diferentes tecidos, transplantamos as linhagens sh.IGFBP7 e sh.Scramble em camundongos NOD/SCID

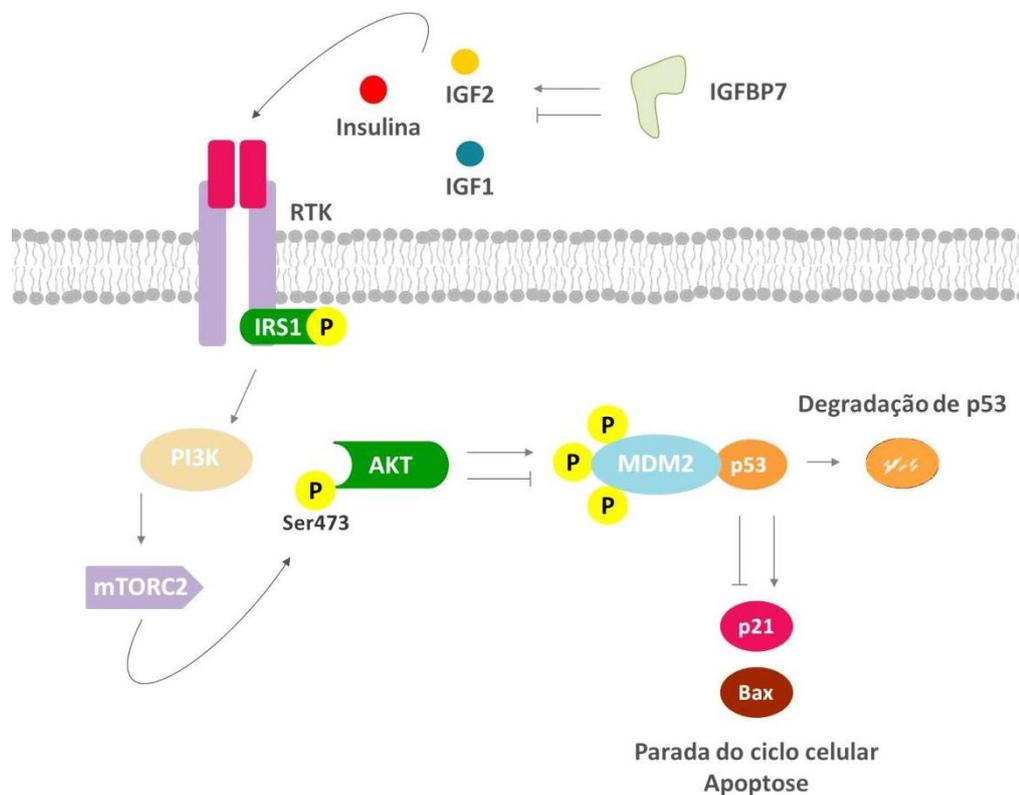
imunossuprimidos. Os dados apresentados na Figura 3 do manuscrito apontam que o silenciamento de *IGFBP7* nas linhagens de LLA atenua de modo significativo a progressão da leucemia *in vivo*, conforme avaliado pela porcentagem de células CD45+ presentes no sangue periférico, baço, fígado e medula óssea dos camundongos (Figura 3A e Figura Suplementar 2B do manuscrito). É digno de nota que o *knockdown* de *IGFBP7* parece anular completamente a infiltração da LLA no sistema nervoso central (SNC) dos camundongos após seis semanas decorridas do transplante (Figura 3B do manuscrito). Entretanto, outros estudos precisam ser realizados a fim de confirmar este efeito, tendo em vista que o silenciamento de *IGFBP7* pode estar apenas retardando a capacidade de migração das células leucêmicas. Como alternativa, o tempo de acompanhamento dos animais transplantados poderia ser aumentado para um *range* superior a seis semanas.

Os efeitos observados nas análises *in vivo*, ligados aos dados de sinalização celular mediados por *IGFBP7* sobre a via PI3K/Akt/mTOR observados neste estudo e no trabalho de Wu et al., (2019), nos encorajaram a produzir e testar o efeito antileucêmico de um anticorpo contra *IGFBP7*. Como mostrado na Figura 3C do manuscrito, a adição de 10 µg/mL do anticorpo anti-*IGFBP7* ao meio de cultura resultou na inibição significativa da viabilidade celular das linhagens de LLA. Resultados semelhantes foram obtidos em camundongos transplantados com a linhagem celular RS4;11 (Figura 3D do manuscrito) ou com o xenoinxerto derivado de paciente (Figura 3E do manuscrito). Camundongos que receberam intraperitonealmente o anticorpo anti-*IGFBP7* apresentaram redução significativa da progressão leucêmica em comparação com camundongos tratados com anticorpo anti-PSA (tratamento controle), refletindo mais uma vez o papel importante da proteína *IGFBP7* na manutenção da viabilidade e proliferação da LLA.

Contribuindo com os achados apresentados no Capítulo I desta dissertação, no Capítulo II apresentamos as primeiras evidências de que o silenciamento de *IGFBP7* promove a ativação da via p53 nas linhagens de LLA-B. Já é conhecida a existência de um *crosstalk* negativo entre p53 e a via PI3K/Akt /mTOR (Duan e Maki, 2016). A via PI3K/Akt/mTOR, como já descrita, pode promover a proliferação, sobrevivência e o crescimento celular (Mabuchi et al., 2015). Em contraste, p53 pode inibir a proliferação e sobrevivência de células neoplásicas, além de desempenhar esses efeitos diante de danos irreparáveis no DNA (Joerger e Fersht, 2016; Crunkhorn, 2018). Sendo assim, talvez não seja surpreendente que a menor ativação da via PI3K/Akt /mTOR reflita na maior ativação da via p53. De fato, Mayo e Donner (2001) já demonstraram em seu estudo que a ativação de Akt por INS e IGFs promove o aumento de fosforilação de MDM2 e, conseqüentemente, potencializa a capacidade desta

proteína em degradar p53. De forma contrária, a inibição de Akt reduz a fosforilação de MDM2, resultando na maior ativação de p53 diante de sinalizações oncogênicas (Duan e Maki, 2016).

Frente a esses achados, acreditamos que a menor ativação de Akt mediada pelo silenciamento de *IGFBP7* (Ver Figura 2 do manuscrito) possa estar contribuindo para a maior ativação de p53 (e das proteínas p21 e Bax) via MDM2, uma vez que as células sh.*IGFBP7* tratadas com Nutlin-3 (um antagonista de MDM2) apresentaram uma drástica redução da viabilidade celular (Capítulo II, Figura 2). Na Figura 8 apresentamos um esquema simplificando do *crossstalk* negativo ocorrido entre p53 e a via PI3K/Akt/mTOR, junto a nossa hipótese de que a proteína *IGFBP7* poderia atuar em parte, como uma protagonista desta via.



**Figura 8. Crosstalk negativo entre p53 e a via PI3K/Akt/mTOR mediado por IGFBP7.** A proteína *IGFBP7* promove aumento da meia vida da Insulina/IGFs contribuindo para a maior afinidade de ligação destes fatores de crescimento em seus respectivos receptores (RTK – receptor de tirosina quinase). A ativação de RTK promove a fosforilação de IRS-1, o qual recruta PI3K. O recrutamento de PI3K ativa mTORC2 que por sua vez, fosforila Akt. Akt ativado atua intensificando a fosforilação de MDM2 que, consequentemente, priva p53 e inibe sua atividade supressora tumoral inibindo a transcrição de p21 e Bax. De forma oposta, o silenciamento de *IGFBP7* pode reduzir a ativação de RTK por ligantes, resultando na menor

ativação de Akt. A atividade reduzida de Akt reflete na menor fosforilação de MDM2, o que contribui para a maior ativação de p53 e proteínas a jusante desta via, resultando na parada do ciclo celular e apoptose. Adaptado de Duan e Maki (2016).

Além de verificarmos que o silenciamento de *IGFBP7* pode promover a ativação de p53, nossos resultados também demonstram que o tratamento das células sh.IGFBP7 com Dexametasona potencializa esta ativação, aumentando os níveis proteicos de p53, p21 e Bax, respectivamente. Ainda, mostramos que a suplementação do meio de cultura com rIGFBP7 protege as linhagens celulares de LLA-B e LLA-T diante da ação citostática mediada pelo quimioterápico Dexametasona (Figura 4A, Capítulo II). Em conjunto, esses achados nos levaram a acreditar que o silenciamento de *IGFBP7* poderia sensibilizar as células de LLA perante a ação dos glicocorticoides e, de fato, este efeito pode ser observado na Figura 4B do Capítulo II.

A resposta precoce aos glicocorticoides é um fator prognóstico informativo na LLA infantil (Dördelmann et al., 1999) e a resistência aos glicocorticoides é uma característica bem documentada na recidiva (Kaspers et al., 2005). A resistência aos glicocorticoides é associada a um fenótipo proliferativo (apresentado pelas células neoplásicas) envolvendo o aumento da glicólise, biossíntese do colesterol e, principalmente, ativação das vias de sinalização PI3K/Akt/mTOR e Myc (Beesley et al., 2009; Hulleman et al., 2009; Silveira et al., 2015). Evangelisti et al., 2017 já demonstraram visualmente a importância da via PI3K/Akt/mTOR na resposta a glicocorticoides pela LLA. Neste estudo, os autores mostraram que a inibição desta via utilizando os inibidores sintéticos IPI-145 e ZSTK-474 refletem diretamente na maior sensibilização de linhagens de LLA-B diante das ações citostáticas da Dexametasona. Os autores atribuíram este efeito a maior translocação nuclear de GR, a qual ocorreu quando as linhagens celulares KOPN8, Nalm6 e REH foram tratadas com os inibidores IPI-145 e ZSTK-474 em associação com Dexametasona (Evangelisti et al., 2017). Acreditamos que a maior translocação de GR observada nas linhagens com *IGFBP7* silenciado (Figura 6, Capítulo II) esteja relacionada com a redução dos níveis de fosforilação de Akt, como pode ser observada na Figura 2B do manuscrito. Evidências acumuladas por alguns trabalhos têm demonstrado que a inibição de Akt potencializa a translocação nuclear de GR ativado por ligante, restaurando na sensibilização das células leucêmicas diante da ação dos glicocorticoides (Piovan et al., 2013; Silveira et al., 2015; Hall, Reynolds e Kang, 2016; Evangelisti et al., 2017). Todavia, os mecanismos moleculares que entrelaçam as vias PI3K/Akt/mTOR e GR ainda não são compreendidos.

Piovan e colaboradores (2013) mostraram que a ativação de Akt contribui para o aumento da resistência aos glicocorticoides. Isso ocorre devido a intensa fosforilação dos resíduos Ser134 de GR, mediada por Akt, o que prejudica a translocação nuclear deste receptor, bloqueando a regulação transcricional de genes alvo dos glicocorticoides. Além disso, já fora demonstrado também que a inibição dupla de PI3K/mTOR utilizando o inibidor sintético BEZ235 estimulou a atividade antileucêmica induzida pela Dexametasona *in vitro* e *in vivo* em modelos de LLA-T. BEZ235 também foi capaz de aliviar a supressão mediada Akt das vias apoptóticas induzidas pelos glicocorticoides, tais como as proteínas pró-apoptóticas BCL-2 e BIM (Hall, Reynolds e Kang, 2016).

De fato, embora Piovan e parceiros (2013) já tenham demonstrado de maneira bastante elegante a importância da via PI3K/Akt/mTOR na resistência aos corticoides, estudos adicionais tendem a contribuir para o melhor entendimento deste processo. Acreditamos que a proteína IGFBP7 seja essencial neste mecanismo de sinalização, visto que a neutralização da mesma com anticorpo monoclonal anti-IGFBP7 sensibiliza as linhagens celulares de LLA a ação de Dexametasona (Figura 5, Capítulo II). Todavia, vale ressaltar que a ativação de p53 nas células com *IGFBP7* silenciado pode estar acontecendo por um mecanismo independente da via PI3K/Akt/mTOR. Atualmente, nosso grupo de pesquisa está empenhado em estudar os mecanismos de ação modulados por *IGFBP7*, os quais parecem interligar as vias PI3K/Akt/mTOR, p53 e GR, visando preencher as lacunas que ainda permanecem incompreendidas neste cenário.

#### 4.0. CONCLUSÕES

- O silenciamento de *IGFBP7* promove a redução da proliferação, capacidade clonogênica, sobrevivência, viabilidade e migração celular *in vitro* das linhagens celulares de LLA;
- A sinalização molecular mediada por INS via IGF1R e/ou IR é potencializada pela adição de rIGFBP7 nas linhagens celulares de LLA, resultando na maior fosforilação de IRS-1 (Ser302 e pan-Tyr) e Akt (Ser473), responsáveis pela ativação a jusante da via PI3K/Akt/mTOR, a qual atua promovendo a proliferação e sobrevivência celular;
- O silenciamento de *IGFBP7* reduz a fosforilação de Akt (Ser473) mediada por INS em células de LLA. A adição de rIGFBP7 exógena restaurou e potencializou este efeito;
- O silenciamento de *IGFBP7* nas linhagens celulares de LLA atenuou a progressão da leucemia e aumentou a sobrevida dos camundongos NOD/SCID transplantados com estas células;
- A neutralização de *IGFBP7* com uso de anticorpo monoclonal anti-IGFBP7 reduz a viabilidade *in vitro* da LLA e promove o aumento da sobrevida de camundongos NOD/SCID transplantados com linhagem celular e xenoinxerto derivado de paciente;
- O silenciamento de *IGFBP7* ativa a via p53 em linhagens celulares de LLA;
- O silenciamento de *IGFBP7* sensibiliza as células de LLA diante à ação do fármaco Dexametasona, promovendo a maior translocação nuclear do receptor de glicocorticoide.

Por fim, é nosso dever enfatizar a necessidade de comprovações mais detalhadas sobre os fatos aqui observados, tendo em vista o amplo mecanismo molecular que engloba as vias INS/IGFs, PI3K/Akt/mTOR, p53, e GR.

## 5.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAOGI, K. et al. Synergistic growth stimulation of mouse fibroblasts by tumor-derived adhesion factor with insulin-like growth factors and insulin. **Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research**, v. 7, n. 12, p. 1671–1677, 1996.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4<sup>th</sup> edition. New York: Garland Science; 2002. The Preventable Causes of Cancer. Available from: file:///C:/Users/Leonardo/Zotero/storage/K875BL6Q/NBK26897.html

ALLARD, J. B.; DUAN, C. IGF-binding proteins: why do they exist and why are there so many? **Frontiers in endocrinology**, v. 9, p. 117, 2018.

BAIER, T. G. et al. Characterisation of insulin-like growth factor I receptors of human acute lymphoblastic leukaemia (ALL) cell lines and primary ALL cells. **European Journal of Cancer**, v. 28, n. 6, p. 1105–1110, 1992.

BARTRAM, I. et al. Inhibition of IGF1-R overcomes IGFBP7-induced chemotherapy resistance in T-ALL. **BMC cancer**, v. 15, n. 1, p. 663, 2015.

BASERGA, R.; PERUZZI, F.; REISS, K. The IGF-1 receptor in cancer biology. **International journal of cancer**, v. 107, n. 6, p. 873–877, 2003.

BAXTER, R. C. IGF binding proteins in cancer: mechanistic and clinical insights. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 5, p. 329, 2014.

BEESELEY, A. H. et al. Glucocorticoid resistance in T-lineage acute lymphoblastic leukaemia is associated with a proliferative metabolism. **British Journal of Cancer**, v. 100, n. 12, p. 1926–1936, 16 jun. 2009.

BELFIORE, A. et al. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. **Endocrine reviews**, v. 30, n. 6, p. 586–623, 2009.

BELFIORE, A. et al. Insulin receptor isoforms in physiology and disease: an updated view. **Endocrine reviews**, v. 38, n. 5, p. 379–431, 2017.

BELFIORE, A.; MALAGUARNERA, R. The insulin receptor and cancer. **Endocrine-related cancer**, p. ERC–11, 2011.

BENYOUCEF, S. et al. Characterization of insulin/IGF hybrid receptors: contributions of the insulin receptor L2 and Fn1 domains and the alternatively spliced exon 11 sequence to ligand binding and receptor activation. **Biochemical Journal**, v. 403, n. 3, p. 603–613, 2007.

BIÈCHE, I. et al. Molecular profiling of inflammatory breast cancer: identification of a poor-prognosis gene expression signature. **Clinical cancer research**, v. 10, n. 20, p. 6789–6795, 2004.

BIEGING, K. T.; MELLO, S. S.; ATTARDI, L. D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. **Nature reviews. Cancer**, v. 14, n. 5, p. 359–370, maio 2014.

BISSELL, M. J.; RADISKY, D. Putting tumours in context. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, n. 1, p. 46, 2001a.

BISSELL, M. J.; RADISKY, D. Putting tumours in context. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, n. 1, p. 46, 2001b.

BLANQUART, C.; ACHI, J.; ISSAD, T. Characterization of IRA/IRB hybrid insulin receptors using bioluminescence resonance energy transfer. **Biochemical pharmacology**, v. 76, n. 7, p. 873–883, 2008.

BLATT, J. IGF1 and leukemia. **Pediatric hematology and oncology**, v. 17, n. 3, p. 199–201, 2000.

BURGER, J. A. et al. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. **Blood**, v. 114, n. 16, p. 3367–3375, 2009.

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

CHEN, D. et al. Insulin-like growth factor binding protein-7 (IGFBP7) functions as a potential tumor suppressor in hepatocellular carcinoma (HCC). **Clinical Cancer Research**, p. clincanres–2774, 2011.

CHEUNG, W. C.; VAN NESS, B. The bone marrow stromal microenvironment influences myeloma therapeutic response in vitro. **Leukemia**, v. 15, n. 2, p. 264, 2001.

CLUTTER, S. D.; FORTNEY, J.; GIBSON, L. F. MMP-2 is required for bone marrow stromal cell support of pro-B-cell chemotaxis. **Experimental hematology**, v. 33, n. 10, p. 1192–1200, 2005.

COBALEDA, C.; SÁNCHEZ-GARCÍA, I. B-cell acute lymphoblastic leukaemia: towards understanding its cellular origin. **Bioessays**, v. 31, n. 6, p. 600–609, 2009.

COUSTAN-SMITH, E. et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. **The lancet oncology**, v. 10, n. 2, p. 147–156, 2009.

CRUNKHORN, S. Cancer: Restoring P53 Activity. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, p. 394, 30 maio 2018.

DAI, Z. et al. Prediction of anticancer drug potency from expression of genes involved in growth factor signaling. **Pharmaceutical research**, v. 23, n. 2, p. 336–349, 2006.

DAVIDOFF, A. J. et al. Chemotherapy and survival benefit in elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 13, p. 2191–2197, 2010.

DENLEY, A. et al. The insulin receptor isoform exon 11-(IR-A) in cancer and other diseases: a review. **Hormone and Metabolic Research**, v. 35, n. 11/12, p. 778–785, 2003.

DÖRDELMANN, M. et al. Prednisone Response Is the Strongest Predictor of Treatment Outcome in Infant Acute Lymphoblastic Leukemia. **Blood**, v. 94, n. 4, p. 1209–1217, 15 ago. 1999.

DUAN, L.; MAKI, C. G. The IGF-1R/AKT Pathway Determines Cell Fate in Response to P53. **Translational Cancer Research**, v. 5, n. 6, p. 664-675–675, 22 set. 2016.

DUARTE, D.; HAWKINS, E. D.; CELSO, C. L. The interplay of leukemia cells and the bone marrow microenvironment. **Blood**, v. 131, n. 14, p. 1507–1511, 2018.

ECK, M. J. et al. Structure of the IRS-1 PTB Domain Bound to the Juxtamembrane Region of the Insulin Receptor. **Cell**, v. 85, n. 5, p. 695–705, 31 maio 1996.

EL-SHEWY, H. M.; LUTTRELL, L. M. Insulin-like growth factor-2/mannose-6 phosphate receptors. **Vitamins & hormones**, v. 80, p. 667–697, 2009.

EMDAD, L. et al. Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) functions as an oncogene and regulates angiogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 50, p. 21300–21305, 2009.

ESTROV, Z. et al. Human growth hormone and insulin-like growth factor-1 enhance the proliferation of human leukemic blasts. **Journal of clinical oncology**, v. 9, n. 3, p. 394–399, 1991.

EVANGELISTI, C. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition potentiates glucocorticoid response in B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 3, p. 1796–1811, 1 mar. 2018.

EVDOKIMOVA, V. et al. IGF1BP7 Binds to the IGF-1 Receptor and Blocks Its Activation by Insulin-Like Growth Factors. **Sci. Signal.**, v. 5, n. 255, p. ra92–ra92, 18 dez. 2012.

GENUA, M. et al. c-Abl and Insulin Receptor Signalling. **Vitamins & Hormones**, v. 80, p. 77–105, 2009.

GEORGES, R. B. et al. The insulin-like growth factor binding proteins 3 and 7 are associated with colorectal cancer and liver metastasis. **Cancer biology & therapy**, v. 12, n. 1, p. 69–79, 2011.

GIBSON, L. F. Survival of B lineage leukemic cells: signals from the bone marrow microenvironment. **Leukemia & lymphoma**, v. 43, n. 1, p. 19–27, 2002.

GIRARD, J.-P. et al. Heterogeneity of endothelial cells: the specialized phenotype of human high endothelial venules characterized by suppression subtractive hybridization. **The American journal of pathology**, v. 155, n. 6, p. 2043–2055, 1999.

GIRAUD, J. et al. Nutrient-Dependent and Insulin-Stimulated Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 on Serine 302 Correlates with Increased Insulin Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 5, p. 3447–3454, 30 jan. 2004.

GYÖRFFY, B. et al. Gene expression profiling of 30 cancer cell lines predicts resistance towards 11 anticancer drugs at clinically achieved concentrations. **International journal of cancer**, v. 118, n. 7, p. 1699–1712, 2006.

HALL, B. M. et al. Stromal cells expressing elevated VCAM-1 enhance survival of B lineage tumor cells. **Cancer letters**, v. 207, n. 2, p. 229–239, 2004.

HALL, C. P.; REYNOLDS, C. P.; KANG, M. H. Modulation of Glucocorticoid Resistance in Pediatric T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia by Increasing BIM Expression with the PI3K/MTOR Inhibitor BEZ235. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 22, n. 3, p. 621–632, 1 fev. 2016.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HEESCH, S. et al. BAALC-associated gene expression profiles define IGFBP7 as a novel molecular marker in acute leukemia. **Leukemia**, v. 24, n. 8, p. 1429, 2010.

HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, C. et al. Evolution of the insulin receptor family and receptor isoform expression in vertebrates. **Molecular biology and evolution**, v. 25, n. 6, p. 1043–1053, 2008.

HJORT, M. A. et al. Phosphatase of regenerating liver-3 is expressed in acute lymphoblastic leukemia and mediates leukemic cell adhesion, migration and drug resistance. **Oncotarget**, v. 9, n. 3, p. 3549, 2018.

HOLLEMAN, A. et al. Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 6, p. 533–542, 2004.

HONGO, T. et al. Two Groups of Philadelphia Chromosome—Positive Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Classified by Pretreatment Multidrug Sensitivity or Resistance in In Vitro Testing. **International journal of hematology**, v. 76, n. 3, p. 251, 2002.

HU, S. et al. Function and Expression of Insulin-Like Growth Factor–Binding Protein 7 (IGFBP7) Gene in Childhood Acute Myeloid Leukemia. **Pediatric hematology and oncology**, v. 28, n. 4, p. 279–287, 2011.

HULLEMAN, E. et al. Inhibition of Glycolysis Modulates Prednisolone Resistance in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. **Blood**, v. 113, n. 9, p. 2014–2021, 26 fev. 2009.

INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, v. 381, n. 9881, p. 1943–1955, 2013.

IWAMOTO, S. et al. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 4, p. 1049–1057, 2007.

JIANG, W. et al. Insulin-like growth factor binding protein 7 mediates glioma cell growth and migration. **Neoplasia**, v. 10, n. 12, p. 1335–1342, 2008.

JOERGER, A. C.; FERSHT, A. R. The p53 pathway: origins, inactivation in cancer, and emerging therapeutic approaches. **Annual Review of Biochemistry**, v. 85, p. 375–404, 2016.

KASPERS, G. J. L. et al. Immunophenotypic Cell Lineage and in Vitro Cellular Drug Resistance in Childhood Relapsed Acute Lymphoblastic Leukaemia. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 41, n. 9, p. 1300–1303, jun. 2005.

KAUSHANSKY, K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 19, p. 2034–2045, 2006.

KHANDWALA, H. M. et al. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. **Endocrine reviews**, v. 21, n. 3, p. 215–244, 2000.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274–293, 13 abr. 2012.

LARANJEIRA, A. B. A. et al. IGFBP7 participates in the reciprocal interaction between acute lymphoblastic leukemia and BM stromal cells and in leukemia resistance to asparaginase. **Leukemia**, v. 26, n. 5, p. 1001, 2012.

LARANJEIRA, A. B. **Participação do IGFBP7 na interação leucemia-estroma e na resistência a quimioterapia**. 2012. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/316896>>. Acesso em: 20 ago. 2018.

LEVERRIER, Y. et al. Role of PI3-kinase in Bcl-X induction and apoptosis inhibition mediated by IL-3 or IGF-1 in Baf-3 cells. **Cell death and differentiation**, v. 6, n. 3, p. 290, 1999.

LOZANO, R. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095–2128, 2012.

MABUCHI, S. et al. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 137, n. 1, p. 173–179, 1 abr. 2015.

MALAGUARNERA, R.; BELFIORE, A. The emerging role of insulin and insulin-like growth factor signaling in cancer stem cells. **Frontiers in endocrinology**, v. 5, p. 10, 2014.

MANABE, A. et al. Bone Marrow-Derived Stromal Cells Prevent Apoptotic Cell Death in B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia. **Blood**, v. 79, n. 9, p. 2370–2377, 1 maio 1992.

MAURO, L. et al. Role of the IGF-I receptor in the regulation of cell–cell adhesion: Implications in cancer development and progression. **Journal of cellular physiology**, v. 194, n. 2, p. 108–116, 2003.

MAYO, L. D.; DONNER, D. B. A Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway Promotes Translocation of Mdm2 from the Cytoplasm to the Nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 20, p. 11598–11603, 25 set. 2001.

MEDYOUNG, H. et al. High-level IGF1R expression is required for leukemia-initiating cell activity in T-ALL and is supported by Notch signaling. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 9, p. 1809–1822, 2011.

MORCAVALLO, A. et al. Research resource: new and diverse substrates for the insulin receptor isoform A revealed by quantitative proteomics after stimulation with IGF-II or insulin. **Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 8, p. 1456–1468, 2011.

NAGAKUBO, D. et al. A high endothelial venule secretory protein, mac25/angiomodulin, interacts with multiple high endothelial venule-associated molecules including chemokines. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 2, p. 553–561, 2003.

NEELY, E. K. et al. Mitogenic effects of human recombinant insulin on B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. **Leukemia**, v. 6, n. 11, p. 1134–1142, 1992.

NIU, Y.; WU, S.; HU, S. IGFBP7 As a Potential Therapeutic Target for AML. **Blood**, v. 132, n. Suppl 1, p. 5134, 21 nov. 2018.

OGAWA, M. et al. Cytokines prevent dexamethasone-induced apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in a new multiple myeloma cell line. **Cancer Research**, v. 60, n. 15, p. 4262–4269, 2000.

OSMAN, I. et al. Novel blood biomarkers of human urinary bladder cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 11, p. 3374–3380, 2006.

PANDINI, G. et al. Differential gene expression induced by insulin and insulin-like growth factor-II through the insulin receptor isoform A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 43, p. 42178–42189, 2003.

PARK, S. et al. Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 95, n. 5, p. 819–828, maio 2010.

PAWELEC, G.; LARBI, A.; DERHOVANESSIAN, E. Senescence of the human immune system. **Journal of comparative pathology**, v. 142, p. S39–S44, 2010.

PILLOZZI, S. et al. Chemotherapy resistance in acute lymphoblastic leukemia requires hERG1 channels and is overcome by hERG1 blockers. **Blood**, v. 117, n. 3, p. 902–914, 2011.

PIOVAN, E. et al. Direct Reversal of Glucocorticoid Resistance by AKT Inhibition in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancer Cell**, v. 24, n. 6, p. 766–776, 9 dez. 2013.

POLLAK, M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 12, p. 915, 2008.

POLLAK, M. N.; SCHERNHAMMER, E. S.; HANKINSON, S. E. Insulin-like growth factors and neoplasia. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 7, p. 505, 2004.

PUI, C.-H. et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIIIIB at St Jude Children's Research Hospital. **Blood**, v. 104, n. 9, p. 2690–2696, 2004.

PUI, C.-H.; ROBISON, L. L.; LOOK, A. T. Acute Lymphoblastic Leukaemia. **Lancet (London, England)**, v. 371, n. 9617, p. 1030–1043, 22 mar. 2008.

REYA, T. et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **nature**, v. 414, n. 6859, p. 105, 2001.

ROSENFELD, R. G. et al. The insulin-like growth factor binding protein superfamily: new perspectives. **Pediatrics**, v. 104, n. Supplement 5, p. 1018–1021, 1999.

ROSENFELD, R. G. The IGF system: new developments relevant to pediatric practice. In: **IGF-I and IGF Binding Proteins**. [s.l.] Karger Publishers, 2005. 9p. 1–10.

ROSS, J. A. et al. Big babies and infant leukemia: a role for insulin-like growth factor-1? **Cancer Causes & Control**, v. 7, n. 5, p. 553–559, 1996.

RUPP, C. et al. IGFBP7, a novel tumor stroma marker, with growth-promoting effects in colon cancer through a paracrine tumor–stroma interaction. **Oncogene**, v. 34, n. 7, p. 815, 2015.

SATO, J. et al. Identification of cell-binding site of angiomodulin (AGM/TAF/Mac25) that interacts with heparan sulfates on cell surface. **Journal of cellular biochemistry**, v. 75, n. 2, p. 187–195, 1999.

SCHADE, A. E. et al. Phosphatidylinositol-3-Phosphate Kinase Pathway Activation Protects Leukemic Large Granular Lymphocytes from Undergoing Homeostatic Apoptosis. **Blood**, v. 107, n. 12, p. 4834–4840, 15 jun. 2006.

SCIACCA, L. et al. Insulin analogues differently activate insulin receptor isoforms and post-receptor signalling. **Diabetologia**, v. 53, n. 8, p. 1743–1753, 2010.

SELGA, E. et al. Networking of differentially expressed genes in human cancer cells resistant to methotrexate. **Genome medicine**, v. 1, n. 9, p. 83, 2009.

SILVEIRA, A. B. et al. PI3K inhibition synergizes with glucocorticoids but antagonizes with methotrexate in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Oncotarget**, v. 6, n. 15, p. 13105–13118, 1 abr. 2015.

STAM, R. W. et al. Differential mRNA expression of Ara-C–metabolizing enzymes explains Ara-C sensitivity in MLL gene–rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 101, n. 4, p. 1270–1276, 2003.

SUBRAMANIAN, A. et al. Gene Set Enrichment Analysis: A Knowledge-Based Approach for Interpreting Genome-Wide Expression Profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 43, p. 15545–15550, 25 out. 2005.

SUBRAMANIAN, A.; SHARMA, A.; MOKBEL, K. Insulin-like growth factor binding proteins and breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 107, n. 2, p. 181–194, 2008.

SUN, X. et al. Molecular characterization of tumour heterogeneity and malignant mesothelioma cell differentiation by gene profiling. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v. 207, n. 1, p. 91–101, 2005.

TAZZARI, P. L. et al. Multidrug Resistance-Associated Protein 1 Expression Is under the Control of the Phosphoinositide 3 Kinase/Akt Signal Transduction Network in Human Acute Myelogenous Leukemia Blasts. **Leukemia**, v. 21, n. 3, p. 427–438, mar. 2007.

TESTA, U.; RICCIONI, R. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 92, n. 1, p. 81–94, 2007.

TU, W.; CHEUNG, P.-T.; LAU, Y.-L. Insulin-like growth factor 1 promotes cord blood T cell maturation and inhibits its spontaneous and phytohemagglutinin-induced apoptosis through different mechanisms. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 3, p. 1331–1336, 2000.

VANDEVYVER, S.; DEJAGER, L.; LIBERT, C. On the Trail of the Glucocorticoid Receptor: Into the Nucleus and Back. **Traffic**, v. 13, n. 3, p. 364–374, 1 mar. 2012.

VELLA, V. et al. Insulin Receptor Isoforms in Cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 11, p. 3615, 2018.

VOUSDEN, K. H.; PRIVES, C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. **Cell**, v. 137, n. 3, p. 413–431, 1 maio 2009.

WANG, L.; FORTNEY, J. E.; GIBSON, L. F. Stromal cell protection of B-lineage acute lymphoblastic leukemic cells during chemotherapy requires active Akt. **Leukemia research**, v. 28, n. 7, p. 733–742, 2004.

WESTERMEIER, F. et al. Insulin receptor isoforms: an integrated view focused on gestational diabetes mellitus. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 32, n. 4, p. 350–365, 2016.

WHO - World Health Organization. **Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 3 fev. 2019.

WOERDEN, N. L. R. et al. TEL/AML1 Gene Fusion Is Related to in Vitro Drug Sensitivity for L-Asparaginase in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Blood**, v. 96, n. 3, p. 6, 2000.

WU, S.-G. et al. IGFBP7 Drives Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibition in Lung Cancer. **Cancers**, v. 11, n. 1, p. 36, jan. 2019.

XU, Q. et al. Survival of Acute Myeloid Leukemia Cells Requires PI3 Kinase Activation. **Blood**, v. 102, n. 3, p. 972–980, 1 ago. 2003.

YENUSH, L.; WHITE, M. F. The IRS-signalling system during insulin and cytokine action. **BioEssays**, v. 19, n. 6, p. 491–500, 1 jun. 1997.

## 6.0. ANEXOS

### 6.1. Anexo I: Parecer do comitê de ética I



UNICAMP

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 16/12/08.  
(Grupo III)

**PARECER CEP:** Nº 1133/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0018.0.144.146-08

**I - IDENTIFICAÇÃO:**

**PROJETO:** "IGFBP7 E A QUIMIORESISTÊNCIA DA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA PEDIÁTRICA".  
**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Ângelo Brunelli Albertoni Laranjeira  
**INSTITUIÇÃO:** Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Domingos A. Boldrini.  
**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 12/12/2008  
**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 16/12/09 (O formulário encontra-se no site acima)

**II - OBJETIVOS**

Averiguar se o IGFBP7 exerce um efeito direto sobre as células de LLA, bem como caracterizar outros de seus ligantes além da insulina. Estudar o efeito do IGFBP7 sobre a expressão de genes implicados na biossíntese de asparagina e transportadores de aminoácidos, bem como moléculas implicadas na resistência a apoptose. Pretende-se também a quantificação da expressão de IGFBP7 e ligantes em amostras diagnósticas de LLA e estabelecer uma relação com fatores clínico-biológicos dos pacientes.

**III - SUMÁRIO**

Serão avaliadas amostras de medula óssea de 200 pacientes com LLA, cujo material encontra-se no Banco de células do I. Boldrini. Para os testes com células estromais será utilizado uma linhagem de células imortalizadas, obtidas em centro de pesquisa. Será realizada análise da viabilidade celular (ensaio MTT), PCR em tempo real, análise de aminoácidos por RMN, citometria de fluxo e Western Blot.

**IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES**

O estudo está bem estruturado. Todos os documentos estão corretamente anexados. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pode ser dispensado por utilizar material biológico de banco.

**V - PARECER DO CEP**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado a dispensa do Termo do

---

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13084-971 Campinas - SP

PHONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -

## 6.1. Anexo I: Parecer do comitê de ética I (continuação)



UNICAMP

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

**VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES**

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

**VII - DATA DA REUNIÃO**

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 16 de dezembro de 2008.



**Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

---

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br

- 2 -

## 6.2. Anexo II: Parecer do comitê de ética 2



UNICAMP

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÊDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 12/02/09.  
(Grupo II)

**PARECER CEP:** Nº 1105/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0014.0.144.146-08

**I - IDENTIFICAÇÃO:**

**PROJETO:** "MICROAMBIENTE DA MEDULA ÓSSEA E PI3K NA RESISTÊNCIA A DROGAS DA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA PEDIÁTRICA".  
**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** José Andrés Yunes.  
**INSTITUIÇÃO:** Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Domingos A. Boldrini  
**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 11/12/2008  
**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 12/02/10 (O formulário encontra-se no site acima)

**II - OBJETIVOS**

1- Quantificar aminoácidos no meio de cultura de células de estroma da medula óssea tratadas com IGFBP7 + ligantes (insulina, IGF-1, IGF-2); 2- Avaliar efeito de IGFBP7+ligantes (insulina, IGF-1, IGF-2) na sobrevivência de células primárias de LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA (LLA) frente à asparaginase, quando em cultura de curta duração, sem estroma; 3- Avaliar efeito de IGFBP7+ligantes (insulina, IGF-1, IGF-2) na expressão de mRNA de ASNS, glutamina sintetase (GS) e de transportadores de aminoácidos nas células de LLA e do estroma; 4- Tratar células de LLA com diferentes doses de EBIO e verificar viabilidade celular frente a diferentes doses de daunorubicina, quantificando a incorporação intracelular da droga através de citometria de fluxo; 5- Desvendar o mecanismo de fluxo intracelular ligado ao KCNN4, usando substratos e inibidores específicos para os diferentes transportadores; 6- Analisar distribuição intracelular da daunorubicina em células de LLA tratadas ou não com EBIO, por microscopia de fluorescência e co-marcação de lisossomos com LysoTracker blue, do Golgi com NBD-C6-Ceramíde e do retículo endoplasmático com DiOC6; 7- avaliar uso do clotrimazol (ou TRAM-34) na sensibilização das células de LLA aos agentes quimioterápicos, in vitro e in vivo (em camundongos); 8- Quantificar níveis de mRNA de GPR56 em amostras de 150 pacientes com LLA e buscar associações com características biológico-clínicas dos pacientes; 9- Confirmar a expressão da proteína GPR56 na superfície das células de LLA, por imunocitoquímica; 10- Sequenciar os exons 3,5,8 e 9 de GPR56 em 30 amostras de DNA ou cDNA de blastos de pacientes e de linhagens de LLA. Serão analisados 3 grupos de pacientes: (i) com doença extramedular ao diagnóstico, (ii) com baixa expressão de GPR56 (<0,05 moléculas de GPR56/ABL), (iii) grupo de pacientes com expressão de GPR56 na mediana; 11- silenciar o GPR56 por iRNA em uma linhagem de LLA e analisar resistência das células a asparaginase quando em cultura com ou sem estroma de medula óssea.

**III - SUMÁRIO**

O autor relata que 20% a 30% das crianças com leucemia linfóide aguda (LLA) sofrem recaídas da doença e apresentam maior resistência aos quimioterápicos. Métodos modernos de

---

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8136  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -

## 6.2. Anexo II: Parecer do comitê de ética 2 (continuação)



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

análise de expressão gênica possibilitam a identificação de genes relacionados ao processo de resistência à drogas. Segundo referências apresentadas pelo autor, as células da recaída são altamente proliferativas e mesmo assim mais resistente à quimioterapia, esse processo pode estar relacionado com a maior expressão de genes de reparo do DNA e de anti-apoptose, que compensariam os efeitos da quimioterapia. A interação de blastos leucêmicos com as células estromais da medula óssea (obs: o estroma é o tecido conjuntivo de sustentação de um órgão) aumenta a resistência da LLA à leucemia.

Dois sub-projetos fazem parte do projeto maior. No primeiro a proposta é estudar a função dos genes IGFBP7, KCNN4 e GPR56 na resistência à drogas para o tratamento de LLA, no contexto da interação leucemia-estroma. Para realização desses sub-projetos serão incluídas amostras de sangue/medula óssea de crianças portadoras de leucemia linfóide aguda, sem tratamento prévio, atendidas integralmente no Centro Infantil Boldrini, a pesquisa será feita com o restante do material colhido para diagnóstico e não acarretará em nenhum procedimento ao paciente. É prevista a utilização de 150 amostras retrospectivas. São descritos os procedimentos para obtenção de amostras com, pelo menos, 85% de blastos leucêmicos, basicamente centrifugação diferencial e filtração. As amostras são preservadas em nitrogênio líquido. O controle será feito com amostras provenientes de doadores normais e de pacientes com resultado negativo após exame. O DNA de indivíduos normais será obtido de cartões de triagem neonatal (CIPOL-UNICAMP). Os testes laboratoriais serão realizados com amostras não identificadas e descartadas após seu uso. Segundo o autor a pesquisa com o DNA de tecido estocado não precisa de autorização, desde que seja mantido o anonimato do depositante. O teste de viabilidade e apoptose celular será realizado em cultura em placa, sendo adicionados os produtos de estudo (IGFBP7, insulina, IGF-1, IGF-2, EBIO, clotrimazol, AS605240, daunorubicina, vincristina, asparaginase, corticóide) e avaliação final será colorimétrica.

A quantificação da expressão gênica será por extração total de RNA e síntese de DNA e os mesmos primers utilizados para o PCR também serão usados no sequenciamento.

No segundo sub-projeto existe a proposta de seqüenciar o cDNA de IL-7R, e o domínio JH2 de Jak1 e Jak3, dos blastos leucêmicos de 50 casos de LLA-T (linhagem linfocitária - T). Os dados de polimorfismos do IL-7R serão comparados com frequências publicadas da população caucasiana. Além disso, pretende-se analisar a frequência dos mesmos polimorfismos em amostras de 40 indivíduos saudáveis da nossa população. Caso seja encontrada alguma mutação no IL-7R ou Jak, o cDNA mutante será clonado, assim como o receptor IL-2R, e ambos serão transfectados em células HEK293 e uma série de testes será realizada.

#### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

#### V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13081-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br

## 6.2. Anexo II: Parecer do comitê de ética 2 (continuação)



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

### VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

### VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na 1 Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 20 de janeiro de 2009.

  
**Prof. Dra. Carmem Sílvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM/UNICAMP

### 6.3. Anexo III: Parecer do comitê de ética animal



CEEA/Unicamp

#### Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

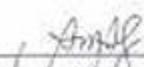
#### CERTIFICADO

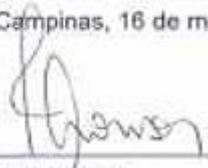
Certificamos que o Protocolo nº 1766-1, sobre "Estudo da via PI3K/AKT/mTOR na Leucemia Linfóide Aguda Pediátrica", sob a responsabilidade de Prof. Dr. José Andrés Yunes / Gilberto C. Franchi Jr., está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 16 de março de 2009.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1766-1, entitled "Studies of PI3K/AKT/mTOR pathway in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on March 16, 2009.

Campinas, 16 de março de 2009.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp  
Caixa Postal 6106  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6369  
E-mail: [comisa@unicamp.br](mailto:comisa@unicamp.br)  
<http://www.ibi.unicamp.br/ceea/>

#### 6.4. Anexo VI: Declaração de direitos autorais

##### Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **IGFBP7 como um novo alvo terapêutico na leucemia linfóide aguda**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 11 de abril de 2019

Assinatura : \_\_\_\_\_

Nome do(a) autor(a): **Leonardo Luís Artico**

RG n.º 6090474633

Assinatura : \_\_\_\_\_

Nome do(a) orientador(a): **José Andrés Yunes**

RG n.º 541346374