

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**AVALIAÇÃO DO ESTADO QUIESCENTE DE CÉLULAS DE LEUCEMIA
PROMIELOCÍTICA AGUDA NA EXPOSIÇÃO AO LÍTIO**

Cristiane Ines Borré

Orientador(a): Profa. Dra. Patricia Pranke

Co-orientador (a): Dra. Virginia Wagatsuma

Porto Alegre, RS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**AVALIAÇÃO DO ESTADO QUIESCENTE DE CÉLULAS DE LEUCEMIA
PROMIELOCÍTICA AGUDA NA EXPOSIÇÃO AO LÍTIO**

Cristiane Ines Borré

Orientador(a): Prof. Dra. Patricia Pranke

Co-orientador(a): Dra. Virginia Wagatsuma

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia

**Porto Alegre, RS
2018**

Agradecimentos

À minha família pelo amor, apoio e torcida, mesmo de longe, pelo sucesso desta dissertação. Obrigada por ouvirem meus desabaços e acreditarem em mim, quando eu mesma duvidei.

Aos meus amigos que sempre me destinaram total apoio e orgulho durante o curso de mestrado,

Aos colegas do laboratório do Instituto de Pesquisa com Células Tronco, em especial àqueles que contribuíram tecnicamente, ou apenas cederam alguns minutos de conversa para que tudo ficasse mais fácil,

Aos meus colegas de pós-graduação Alan Bahr e Monica Wessner que compartilharam comigo dos mesmos anseios, desafios e triunfos que o curso de mestrado pode oferecer. Obrigada pelas conversas e amizade durante esta jornada!

À minha orientadora, Patricia Pranke, que além de orientar, me destinou total apoio e zelo quando eu precisei,

À minha co-orientadora Virginia, por fazer este trabalho possível,

À Mariane e Diego, da USP, que auxiliaram com alguns ensaios,

Aos demais professores do programa de pós-graduação, em especial à Ionara Rodrigues

Ao Programa de Pós graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e à UFRGS, pela oportunidade de desenvolver este trabalho,

À banca que avalia esta dissertação pelo tempo e interesse disponibilizado,

À Deus por me permitir chegar aqui e estar comigo sempre!

“Como não guardar gratidão a tudo aquilo que cooperou para tornar mais fácil e feliz o transcorrer dos dias? Deter por um instante, pois, o pensamento naqueles que nos proporcionaram um bem é render-lhes uma justa homenagem, da qual a alma jamais se arrepende.” González Pecotche

"Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante"

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

Introdução: A leucemia promielocítica aguda (LPA), um subtipo da leucemia mieloide aguda (LMA), caracterizada pela translocação t15;t17, é uma desordem hematológica que responde bem à terapia de diferenciação promovida pelo ácido all trans-retinóico (ATRA). Entretanto, seus casos ainda refletem um alto índice de recidiva após o tratamento. A quiescência celular é um enfoque interessante na análise de falhas terapêuticas a longo prazo, visto que os tratamentos não exaurem as células sem atividade cíclica. Nesse contexto, estudamos o papel do lítio na ativação do ciclo celular em uma linhagem de células de leucemia promielocítica aguda. **Objetivos:** Avaliar a atenuação de um estágio quiescente de células leucêmicas na exposição ao lítio, analisando o ciclo celular e metilação do DNA durante a exposição ao lítio, bem como, verificar a viabilidade de um tratamento das células com lítio, concomitante ao tratamento ATRA. **Método:** Células leucêmicas NB4 e NB4R2 foram submetidas ao tratamento com lítio e ATRA. As alterações da atividade metabólica das células, viabilidade, ciclo celular, *side population*, metilação do DNA total, bem como, análise da diferenciação granulocítica foram analisadas durante e após os tratamentos propostos. **Resultados:** Na dosagem de 10mM o lítio não causou alteração na atividade metabólica das células NB4, entretanto, nas células NB4R2 o lítio se mostrou citotóxico. O lítio causou o deslocamento de ciclo celular, redução de células imaturas quiescentes, bem como hipometilação gradual e progressiva no DNA de células NB4. A diferenciação granulocítica foi aumentada quando as células NB4 foram tratadas com lítio e ATRA, concomitantemente. **Conclusão:** O lítio promoveu um arraste no ciclo celular, atenuando o estágio não cíclico de células leucêmicas, possivelmente relacionado com a hipometilação do DNA promovida com o tratamento. O uso do lítio também se mostrou positivo na potencialização da terapia ATRA. Dessa forma, o lítio desponta como um interessante aliado no tratamento da leucemogênese, através da minimização de células quiescentes, maior suscetibilização à terapia e possível redução de casos recidivos na LPA.

ABSTRACT

Introduction: Acute promyelocytic leukemia (APL), a subtype of acute myeloid leukemia (AML), characterized by translocation t15;t17, is a hematological disorder that responds well to the differentiation therapy promoted by the ATRA. However, its cases still reflect a high rate of relapse after treatment. The cellular quiescence is an interesting approach in the analysis of long-term therapeutic failures because treatments does not destroy the cells without cyclical activity. In this context, studies were made of the role of lithium in the activation of the cell cycle in a population of acute promyelocytic leukemia cells. **Aims:** To evaluate the attenuation of a quiescent stage of leukemic cells in the exposure to the lithium, analyze the cellular cycle and methylation of the DNA during exposure to the lithium and verify the viability of a treatment of the cells, concomitant with the ATRA treatment. **Method:** NB4 and NB4R2 leukemic cells were submitted to treatment with ATRA action, and lithium. They were analyzed for their metabolic activity after treatment, cell viability, cell cycle and total DNA methylation, and granulocyte differentiation analysis was made. **Results:** At the 10mM dose, there was no alteration in the metabolic activity of the NB4 cells; however, in the NB4R2 cells, the lithium was cytotoxic. The lithium caused cell cycle dislocation, as well as a gradual and progressive DNA hypomethylation in the NB4 cells. Granulocytic differentiation was increased when the NB4 cells were treated concomitantly with lithium and ATRA. These effects were not visualized in the NB4R2 cells. **Conclusion:** The lithium provoked a slowing down of the cell cycle, attenuating a non-cyclical stage of the leukemia cells, which is probably related with the hypomethylation of the DNA, brought about with the treatment. The use of lithium was also shown to be positive in the potential use of ATRA therapy. Lithium can, therefore, be considered as na interesting ally for the treatment of leukemogenesis through the minimization of quiescent cells, greater susceptibility to therapy and a possible reduction in the number of cases of relapse in APL.

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1. Organização das Leucemias Mieloides Agudas</i>	<i>19</i>
<i>Tabela 2 Classificação das Leucemias Agudas de Linhagem Ambígua</i>	<i>20</i>

Lista de Figuras

- Figura 1.** Presença de blastos na M.O de paciente com LMA t(11;17) Punção de M.O >20% blastos. Imagem da esquerda, 200X. Imagem da direita, 1000X (PIÑÁN et al., 2015) 18
- Figura 2.** Promielócitos na M.O. (MASLAK, 2010) 22
- Figura 3.** Promielócitos no sangue periférico. Nucléolo proeminente, alta relação núcleo/citoplasma, grânulos violeta, presença de bastões de Auer (SCORDINO, 2016) 22
- Figura 4.** Representação esquemática do desenvolvimento da LPA a partir do transcrito PML-Rar α 24
- Figura 5.** Representação esquemática da requisição de histonas acetiltransferase, PCAF, para promoção da diferenciação resultante do tratamento ATRA.(SUNAMI et al., 2017)..... 26
- Figura 6.** Representação esquemática da ativação da via canônica Wnt/ β -catenina. (Adaptado de OLMEDA et al., 2003) 31
- Figura 7.** Representação esquemática dos quadrantes de contagem em câmara de Neubauer. 38
- Figura 8.** Avaliação da atividade metabólica das células NB4 expostas às doses de 2,5mM, 5mM, 7,5mM e 10mM nos tempos de 0h, 24h, 48h e 72h. O experimento foi repetido 3 vezes. $p < 0,05$ 46
- Figura 9.** Avaliação da atividade metabólica das células NB4R2 expostas às doses de 2,5mM, 5mM, 7,5mM e 10mM nos tempos de 0h, 24h, 48h e 72h. O experimento foi repetido 3 vezes. $*p < 0,05$ 47
- Figura 10.** Curva de crescimento das células NB4 durante o tratamento com lítio e ATRA nas doses de 10mM e 1uM, respectivamente. O crescimento das células foi observado durante o período de 120h. A curva ATRA (o) e Lítio/Atra (■) demonstrando a supressão da proliferação em células sensíveis ao ATRA. $*p < 0,05$ quando comparado ao controle 48
- Figura 11.** Curva de crescimento das células NB4R2 durante o tratamento com lítio e ATRA nas doses de 10mM e 1uM, respectivamente. O crescimento das células foi observado durante o período de 120h. Curva lítio (Δ) e lítio/ATRA (\diamond)

demonstrando declínio da viabilidade após o período de 72h. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle..... 49

Figura 12. Marcação com FDA e IP. Células NB4 tratadas com PBS por 120 horas (A); células NB4 tratadas com ATRA (1 μ M) por 120 horas (B); células tratadas com lítio (10mM) por 120 horas (C); células NB4 tratadas com lítio e ATRA por 120 horas (D). Marcação em verde, células vivas, marcação em vermelho, células mortas;..... 51

Figura 13. Contagem das células em azul de tripan em 120 horas de tratamento. A viabilidade encontrada foi PBS 97%; ATRA 75%; Lítio 97%; Lítio e ATRA 73%. * $p < 0,05$ quando comparado ao veículo PBS..... 51

Figura 14. Marcação com FDA e IP: Células NB4R2 tratadas com PBS por 120 horas (A); células tratadas com ATRA (1 μ M) por 120 horas (B); células tratadas com lítio (10mM) por 120 horas (C); células tratadas com lítio e ATRA por 120 horas (D). Marcação em verde: células vivas, marcação em vermelho: células mortas. 53

Figura 15. Contagem das células NB4-R2 em azul de tripan em 120 horas de tratamento. A viabilidade encontrada foi: PBS 98%; ATRA 94%; Lítio 74% e Lítio e ATRA 69%. * $p < 0,05$ quando comparado ao veículo PBS 54

Figura 16. Metilação do DNA total de células NB4 expostas ao tratamento com lítio na dose de 10mM. NB4-L1: 24h de tratamento; NB4-L3: 72h de tratamento; NB4-L5: 120h de tratamento. ** $p < 0,001$ quando comparado ao controle. 55

Figura 17. Metilação do DNA total das células NB4 quando expostas ao tratamento com lítio e ATRA. NB4-A: tratamento só com ATRA; NB4-LA1: 24h de tratamento com lítio e ATRA; NB4-LA3: 72h de tratamento com lítio e ATRA; NB4-LA5: 120h de tratamento com lítio e ATRA. * $p < 0,05$ quando comparado ao ATRA. ** $p < 0,001$ quando comparados ao controle..... 56

Figura 18. Metilação do DNA total de células NB4R2 expostas ao tratamento com lítio na dose de 10mM R2-L1: células NB4R2 tratadas por 24h; R2-L3: células NB4R2 tratadas por 72h; R2-L5: NB4R2 tratadas por 120h. Não houve diferença significativa entre os grupos. 57

Figura 19. Metilação no DNA total de células NB4R2 expostas ao tratamento com lítio e ATRA. R2-LA1: células NB4R2 tratadas por 24h; R2-LA3: células NB4R2 tratadas por 72h; R2-LA5: NB4R2 tratadas por 120h. 58

Figura 20. Histogramas obtidos a partir da análise de ciclo celular. Células NB4 (veículo) sincronizadas, entrando em estágios cíclicos a partir de ponto 0h.... 59

Figura 21. Histogramas obtidos a partir da análise de ciclo celular. Células NB4 tratadas com lítio, sincronizadas, entrando em estágios cíclicos a partir de ponto 0h. 59

Figura 22. Quantificação de células nos estágios do ciclo celular e comparação da população não tratada (veículo) com a população tratada com lítio.	60
Figura 23. Side Population de células NB4. Verapamil (controle nega PBS1x (veículo) e células NB4 tratadas com lítio, respectivamente.	
Figura 24. Gráfico representando a quantificação das chamadas stem cell-like. *p<0,05.....	61
Figura 25. Histogramas gerados na leitura da marcação das células NB4 com CD11b. PBS, Lítio, Lítio+ATRA e ATRA, respectivamente	63
Figura 26. Análise da expressão do CD11b em células NB4 tratadas com lítio e ATRA. *p<0,05.	63
Figura 27. Lâminas confeccionadas com coloração Leishman. (A) células NB4 tratadas com PBS. (B) células tratadas com Lítio. (C) células NB4 tratadas com ATRA. (D) células NB4 tratadas com Lítio e ATRA.....	64
Figura 28. Histogramas gerados na leitura da marcação das células NB4- R2 com CD11b. PBS, Lítio, Lítio+ATRA e ATRA, respectivamente	65
Figura 29. Análise de expressão de CD11b em células NB4-R2 tratadas com lítio e ATRA.	65
Figura 30. Lâminas confeccionadas com coloração Leishman. (A) células NB4R2 tratadas com PBS. (B) células NB4R2 tratadas com Lítio. (C) células NB4R2 tratadas com ATRA. (D) células NB4R2 tratadas com Lítio e ATRA. ...	66
Figura 31. Representação esquemática da hipótese de ativação de células quiescentes, com uso do lítio, para tratamento da LPA	73

LISTA DE ABREVIATURAS

5AzadC	5-aza-2'-deoxycytidine
5-mC%	5-metil citosina %
ATRA	Ácido all-trans retinóico
ChK1	Checkpoint 1
CILi	Cloreto de lítio
CT	Células-tronco
CTH	Células-tronco Hematopoética
CTL	Células-tronco Leucêmicas
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	Dimetiltransferases
FAB	Franco Americano Britânico
FDA	Diacetato de fluorosceína
GSK -3	Glicogênio sintase Quinase 3
HAT	Histonas Acetiltransferases
HDAC	Histonas desacetilases
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Iodeto de Propídeo
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica

LPA	Leucemia Promielocítica Aguda
M3	Subtipo da LMA
MO	Medula Óssea
MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
NB4	Células de leucemia promielocítica aguda sensíveis ao ATRA
NB4-R2	Células de leucemia promielocítica aguda resistentes ao ATRA
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate buffered saline
Rarα	Receptor do ácido retinóico
RC	Remissão completa
SFB	Soro Fetal Bovino
SP	<i>Side Population</i>
TA	Temperatura ambiente
WNT	<i>Wingless-related integration site</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Leucemia Mieloide Aguda.....	17
2.1.1 Classificação das Leucemias Mieloides Agudas	19
2.2 Leucemia Promielocítica Aguda.....	20
2.2.1 Epidemiologia	21
2.2.2 Histopatologia	21
2.2.3 Fisiopatologia.....	23
2.2.4 Etiologia	23
2.3 Acido all-Trans-Retinóico	25
2.4 Quiescência celular.....	27
2.5 O Lítio	30
3. HIPÓTESE	33
4. OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo geral.....	34
4.2 Objetivos específicos	34
5. MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1 Cultura celular	35
5.2 Tratamento.....	35
5.3 MTT.....	36
5.3.1 Avaliação do metabolismo celular das células NB4 e NB4R2 expostas ao lítio	36
5.3.2 Análise da curva de crescimento das células NB4 e NB4-R2 expost ao lítio e ATRA.....	37
5.4 Viabilidade celular.....	37
5.4.1 Marcação com Diacetato de Fluoresceína e Iodeto de Propídeo	37
5.4.2 Contagem das células	
5.5 Metilação do DNA	
5.5.1 Isolamento de DNA.....	39

5.5.2	Quantificação de DNA	39
5.5.3	Metilação do DNA	40
5.6	Ciclo celular.....	42
5.6.1	Análise de ciclo celular com Iodeto de Propídeo	42
5.6.2	Marcação com Hoechst 33342 – Side Population	43
5.7	Análise de diferenciação celular.....	44
5.7.1	Marcação com CD11b	44
5.7.2	Morfologia das células	45
6.	RESULTADOS	46
6.1	Efeito da exposição das células NB4 e NB4R2 ao lítio	46
6.2	Curva de crescimento das células em tratamento com Lítio e ATRA	47
6.3	Viabilidade das células durante tratamento com lítio e ATRA.....	49
6.4	Metilação do DNA	54
6.5	Análise do ciclo celular.....	58
6.5.1	Ciclo celular	58
6.5.2	Side population	60
6.6	Diferenciação granulocítica.....	62
6.6.1	Marcação com CD11b e morfologia.....	62
7.	DISCUSSÃO CONCLUSIVA	67
8.	PERSPECTIVAS.....	75
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1. INTRODUÇÃO

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma desordem hematológica que representa cerca de 80% dos casos de leucemias agudas que ocorrem entre adultos, compreendendo também cerca de 15-20% das leucemias da infância (ZAGO, 2004). A neoplasia se caracteriza pelo seu perfil heterogêneo, com diferentes graus de maturação mieloide, o que levou a necessidade de uma classificação da malignidade em diferentes subtipos, de acordo com características morfológicas e citoquímicas, objetivando, desta forma, a determinação da linhagem e grau de maturação das células blásticas.

Embora haja uma classificação através do perfil de maturação e aspectos citoquímicos, proposta pelo grupo Franco- Americano-Britânico (FAB) e revisada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o curso da doença varia significativamente entre pacientes pertencentes ao mesmo subgrupo de classificação e as terapias bem estabelecidas, ainda apresentam um índice significativo de recaída da doença, como nos casos de leucemia promielocítica aguda. (LANCET, 2014).

A leucemia promielocítica aguda (LPA), subtipo M3 (FAB), representa cerca de 8% das LMAs. Essa leucemia é caracterizada pela presença de promielócitos na medula e sangue periférico e é observada geralmente em adultos com idade média de 47 anos. O tratamento desse subgrupo das LMA responde bem ao Ácido all-Trans-Retinóico (ATRA), o qual induz a diferenciação granulocítica dos blastos. Outros tratamentos são estudados a fim da extinção, e não diferenciação, dos promielócitos, tais como o uso de etoposídeo, cisplatina e daunorrubicina. Entretanto, apesar dos tratamentos para LPA serem muito bem descritos, a doença ainda apresenta um índice de recidiva em torno de 25 a 50%, especialmente em pacientes de grupos de alto risco. (CINGAM e KOSHY, 2017; LANCET, 2014; ZAGO, 2004)

Um enfoque bastante atraente na tentativa de diminuição de casos recidivos é a análise da quiescência celular (células em estágio G0) observada

em subpopulações hematológicas. Assim como na hematopoese normal, o desenvolvimento da leucemia também é sustentado por células-tronco leucêmicas (CTL). Alguns pesquisadores já demonstraram que a presença de células em estado de quiescência, em casos de LMA, está ligada à quadros de recidivas e doença residual mínima (BORST, 2012; CHEN et al., 2016; CHEUNG; RANDO, 2013; ESSERS et al., 2009; SAITO et al., 2010). Neste contexto, a ativação das células dormentes durante o tratamento quimioterápico, desponta como uma alternativa para redução do notório índice de recaídas representadas na LPA.

A hipermetilação do DNA - evento epigenético envolvido com o silenciamento gênico – além de outras relações fisiológicas - é referido como uma característica de células quiescentes, seguido da hipometilação do DNA durante a ativação destas células. Outros dados demonstram o arraste do ciclo celular de G0/G1 para G2/M (estágio de divisão celular) quando as células da LPA são induzidas à hipometilação do DNA total. (DESJOBERT et al., 2015; GÖTZE et al., 2015). Esse deslocamento do ciclo celular, para um estágio proliferativo, tornam as células leucêmicas mais suscetíveis ao tratamento quimioterápico. Deste modo, o lítio, ativador da via WNT, do inglês “*Wingless-related integration site*”, envolvida com a proliferação celular através do aumento de β -Catenina intracelular, desponta como um elemento interessante na análise de ciclo celular e consequente sensibilização de células leucêmicas ao tratamento quimioterápico. Alguns estudos já demonstraram a capacidade do sal no arraste de ciclo celular em diversos tipos celulares. (DE GROOT et al., 2014; OLMEDA et al., 2003; WANG et al., 2008)

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leucemia Mieloide Aguda

Elencando os 10 cânceres mais comuns no Brasil, conforme o INCA (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016), as leucemias constituem 2,5% de todos os diagnósticos de câncer do mundo, sendo a LMA responsável pela maioria dos casos em adultos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2014). Com mais de 20.000 novos casos por ano, apenas nos Estados Unidos, a Leucemia Mieloide Aguda é a desordem maligna mais comum entre as leucemias agudas (DE KOUCHKOVSKY; ABDUL-HAY, 2016). No Brasil, a LMA é responsável pelo surgimento de 3 casos novos a cada 100.000 indivíduos, sendo responsável por 80% do total das leucemias agudas em adultos (média de idade ao diagnóstico: 47 anos), e 15 a 20% dos casos de leucemias agudas em crianças (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; ZAGO, 2004). Segundo Kouchkovsky e Abdul-Hay (2016), 70% dos pacientes com 65 anos ou mais morrerão em virtude da doença no prazo de 1 ano após o diagnóstico.

A LMA é uma neoplasia complexa que compreende um grupo de doenças clonais do tecido hematopoético, que apresenta considerável heterogeneidade, tanto citogenética como no comportamento biológico (SAULTZ; GARZON, 2016). A LMA não possui evidência de influência genética hereditária. A malignidade hematológica, em geral, surge em indivíduos previamente saudáveis, embora a exposição à terapias anteriores (agentes alquilantes ou radiação) pode despontar em quadros de desordem hematológica, como a LMA (DE KOUCHKOVSKY; ABDUL-HAY, 2016).

O transtorno hematopoético é caracterizado pela proliferação desordenada, inibição da apoptose, instabilidade genética e bloqueio da maturação celular, podendo a leucemogênese ocorrer em qualquer estágio da hematopoese, originando, desta forma, diferentes subtipos da LMA (LICHT; STERNBERG, 2005).

As células leucêmicas de origem mieloide, imaturas, além de serem inaptas à sua função fisiológica, acumulam-se na medula óssea (MO) comprometendo a produção eficiente de células sanguíneas normais. As células imaturas, acumuladas na MO, podem extravasar para o sangue periférico, sendo este um achado comum em diagnósticos prévios laboratoriais. A infiltração em outros tecidos também é observada, porém de forma menos frequente (DE KOUCHKOVSKY; ABDUL-HAY, 2016). Devido à infiltração de células imaturas na MO, os pacientes diagnosticados com LMA, apresentam anemia acompanhada de trombocitopenia e leucocitose, sendo a fadiga e a perda de peso, queixas habituais. O diagnóstico da LMA se dá pela presença de 20% ou mais de blastos na MO (LICHT; STERNBERG, 2005; SAULTZ; GARZON, 2016; ZAGO, 2004).

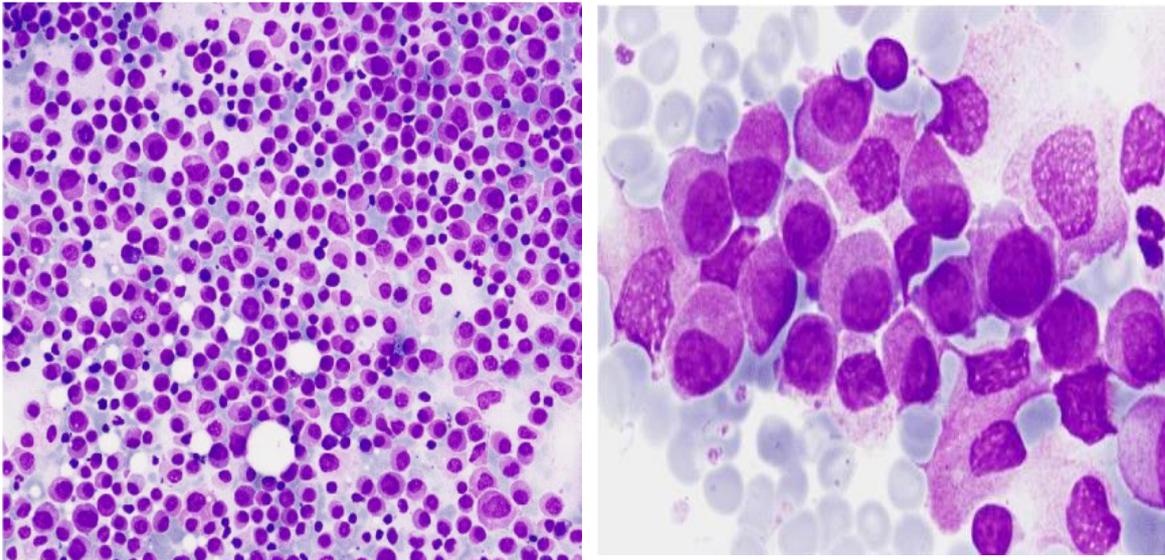


Figura 1. Presença de blastos na M.O de paciente com LMA t(11;17) Punção de M.O >20% blastos. Imagem da esquerda, 200X. Imagem da direita, 1000X (PIÑÁN et al., 2015)

A terapia para LMA, desde a década de 70 não sofre alteração. Conhecida como terapia de indução, a quimioterapia adota o regime intensivo de antraciclina e citarabina. O objetivo da terapia de indução é atingir a remissão completa (RC) definida como: <5% de blastos na MO; contagem absoluta de neutrófilos $\geq 1000/uL$ e plaquetas $> 100.000/uL$ no sangue periférico. Cerca de 30 a 40% dos pacientes não atingem a RC com a terapia de indução (SAULTZ; GARZON, 2016).

2.1.1 Classificação das Leucemias Mieloides Agudas

Devido à heterogeneidade da LMA, tanto citogenética como no comportamento biológico, fez-se a necessidade da classificação da neoplasia em subtipos que diferem entre si no grau de maturação, alteração genética e diagnóstico. O grupo Franco-Americano-Britânico (FAB), em 1976, lançou a primeira tentativa de classificação das LMAs. A classificação abrange oito subtipos da LMA (M0 a M7), com base na morfologia e características citoquímicas das células. Tal classificação foi amplamente utilizada até 2001, quando a Organização Mundial de Saúde (OMS) revisou e introduziu um novo sistema, atribuindo as translocações genéticas à cada subtipo da LMA. Em 2016 a classificação sofreu nova revisão, incorporando características relacionadas à imunofenotipagem, sendo esta a classificação mais atual e usada clinicamente (tabela 1 e 2). Entre os casos de LMA com anormalidades genéticas, 11 são os subtipos delineados na listagem.

Tabela 1. Organização das Leucemias Mieloides Agudas

LMA com anormalidades genéticas recorrentes
LMA com t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1
LMA com inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
LPA com PML-RARA t(15;17)
LMA com t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A
LMA com t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214
LMA com inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM
LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1
Entidade provisória: LMA com BCR-ABL1
LMA com mutação NPM1
LMA com mutação bialélica de CEBPA
Entidade provisória: LMA com mutação RUNX1
- LMA com alterações mielodisplásicas relacionadas
- Neoplasia Mieloides relacionadas com terapia
- LMA não classificáveis
LMA com mínima diferenciação

LMA sem maturação
LMA com maturação
Leucemia Mielomonocítica Aguda 6
Leucemia Monoblástica e Leucemia Monocítica Aguda
Leucemia Eritroide Pura
Leucemia Megacarioblástica Aguda
Leucemia Basofílica Aguda
Panmielose aguda com mielofibrose
- Sarcoma mieloide
- Proliferações mieloides relacionadas com síndrome de Down
Mielopoese anormal transitória (MAT)
Leucemia mieloide associada à síndrome de Down
- Neoplasias de células dendríticas plasmocitóides blásticas

Fonte: OMS, 2016

Tabela 2 Classificação das Leucemias Agudas de Linhagem Ambígua

Leucemias Agudas de Linhagens Ambíguas
- Leucemia Aguda Indiferenciada
- Leucemia Aguda de Fenótipo Misto com t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL 1
- Leucemia Aguda de Fenótipo Misto com t(v;11q23); rearranjo MLL
- Leucemia Aguda de Fenótipo Misto, T/mieloide, NOS
Leucemia Aguda de Fenótipo Misto, B/mieloide, NOS

Fonte: OMS, 2016

2.2 Leucemia Promielocítica Aguda

Relatada pela primeira vez em 1957, quando o hematologista Hillestad descreveu a Leucemia Promielocítica Aguda como uma variável hematológica cuja *“característica mais destacada foi seu curso de declínio muito rápido, em poucas semanas, imagem de glóbulos brancos dominada por promielócitos e hemorragia grave causada principalmente pela fibrinólise¹.”* (HILLESTAD, 1957, tradução nossa). A LPA, desde então, é foco de inúmeros estudos e considerada

¹ *“most outstanding feature was its very rapidly downhill course of few weeks’ duration, a white blood cell picture dominated by promyelocytes and severe bleeding caused mainly by fibrinolysis”* (HILLESTAD, 1957)

como um paradigma no campo da medicina, apesar dos atuais avanços nos campos de pesquisa biológica e clínica (LO-COCO; CICCIONI, 2011).

2.2.1 Epidemiologia

Classificada pela FAB como M3, a leucemia promielocítica aguda é um dos subtipos da LMA, e compreende cerca de 8% das LMAs. No Brasil, Rego e Jacomo (2011) descrevem a incidência de LPA em 28,2% de todos os casos de LMA. O relatório também descreve uma alta distribuição de casos de alto risco na América Latina, acompanhado com notório índice de mortalidade, causada, em geral, por hemorragia e infecção. Nos Estados Unidos a LPA representa uma incidência de 5 a 15% de todas as leucemias adultas.

De modo geral, a LPA atinge adultos com idade média de 47 anos, ocorrendo raramente em indivíduos com menos de 20 anos, sem distinção de distribuição entre sexos e raças. Essa incidência em indivíduos adultos jovens, representa o motivo pelo qual a doença desponta no Brasil com um índice elevado. Países com difícil acesso à saúde priorizam atendimento aos jovens, sendo os adultos jovens os principais atingidos pela LPA. Esse fato implica no registro aumentado dos casos de LPA, enquanto falsifica a ocorrência de outros tipos de LMA (REGO; JÁCOMO, 2011).

2.2.2 Histopatologia

A LPA caracteriza-se pela presença de promielócitos atípicos no sangue periférico e medula óssea hiperclular. O promielócito na LPA apresenta núcleo em forma de rim, ou vincos, cromatina fina, com uma alta relação núcleo/citoplasma, nucléolos proeminentes, além de hipergranulação violeta, com a presença de bastões de Auer (como mostrado nas imagens 2 e 3) e intensa atividade da enzima mieloperoxidase. A LPA também apresenta uma variante menos comum relacionada a granulação das células: a LPA hipogranular, que também apresenta boa sensibilidade à terapia de diferenciação. Ainda em relação à granulação dos promielócitos, Castoldi e colaboradores observaram que os promielócitos da MO podem granulações

mais evidentes que os promielócitos do sangue periférico (CASTOLDI et al., 1994; CINGAM; KOSHY, 2017; HILLESTAD, 1957).

A identificação morfológica é essencial, juntamente com os dados citoquímicos, para um diagnóstico rápido e determinante, visto que a LPA é associada com quadros de coagulopatias graves, responsáveis pelo alto índice de mortalidade pré tratamento.

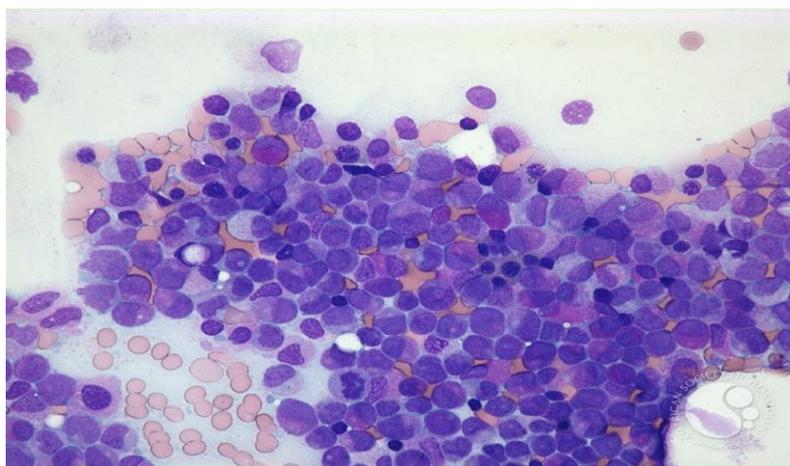


Figura 2 Promielócitos na M.O. (MASLAK, 2010)²

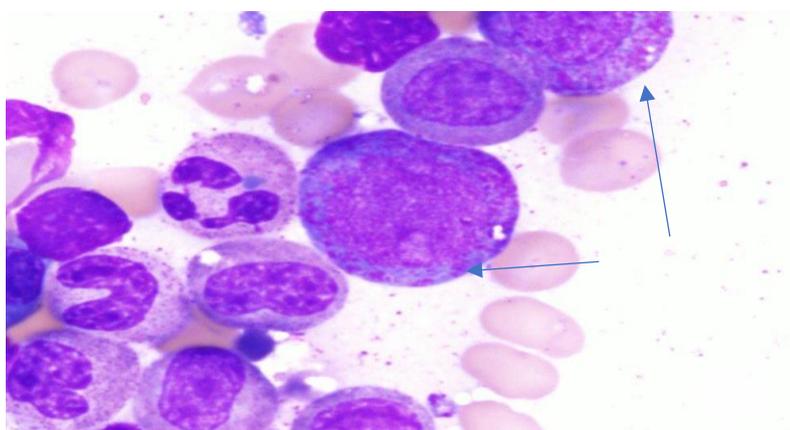


Figura 3 Promielócitos no sangue periférico. Nucléolo proeminente, alta relação núcleo/citoplasma, grânulos violeta, presença de bastões de Auer (SCORDINO, 2016)³

² Esta imagem foi originalmente publicada em ASH Image Bank. (Maslak, Peter). APL- biopsy - 2. ASH Image Bank. 2010, 00001142. © Sociedade Americana de Hematologia.

³ Esta imagem foi originalmente publicada em ASH Image Bank. (Scordino, Teresa. MD). Promyelocyte. ASH Image Bank. 2016, 00060399. © Sociedade Americana de Hematologia.

2.2.3 Fisiopatologia

Do ponto de vista genético, a LPA é caracterizada por alterações cromossômicas estruturais, envolvendo o locus para o receptor α do ácido retinóico, *Rara*. Em cerca de 90 a 95% dos casos, a LPA deriva da translocação recíproca entre os cromossomos 15 e 17 (t15, t17) (q22; q21), dando origem a proteína de fusão PML-*Rara*. A proteína PML-*Rara* não responde à níveis fisiológicos de ácido retinóico, desenvolvendo o bloqueio da maturação no estágio promielocítico. Os promielócitos não são fisiologicamente ativos, e portanto, não conseguem constituir uma barreira para infecções. Os grânulos das células expressam fator tecidual, induzindo uma ativação anormal da cascata de coagulação, resultando no quadro similar à coagulopatia intravascular disseminada (CIVD) (JACOMO; REGO, 2009; JONES; SALEEM, 1978; SAGRILLO et al., 2005; WINTROBE; GREER, 2009). A coagulação excessiva exaure as plaquetas necessárias para conter qualquer pequena hemorragia. Além disso, na LPA, é relevante a descrição de alta atividade de fibrinólise, o que contribui para os quadros hemorrágicos (JACOMO; REGO, 2009). Hemorragia e infecções são os principais causadores de óbito na LPA. (REGO; JÁCOMO, 2011). Em geral, pacientes com LPA apresentam fraqueza física e fadiga, sangramento gengival, petéquias, alterações visuais e infecções.

2.2.4 Etiologia

Em indivíduos saudáveis, o gene PML atua como um supressor tumoral. Estudos sugerem que ele controla a indução da apoptose através da p53 e supressão de crescimento em resposta à formação oncogênica. Já o gene *Rara*, codifica o receptor do ácido retinóico, o qual tem papel fundamental na diferenciação mieloide. Resumidamente, o gene *Rara* se liga aos elementos alvos do ácido retinóico – RAREs-. Essa ligação promove a heterodimerização do gene alvo, resultando no conjugado *Rara*/R α R (LEAL; KUMEDA; VELLOSO, 2009). Na presença de concentrações fisiológicas, o ácido retinóico se liga a esse complexo, recrutando enzimas Histonas Acetil Transferases (HATs). A

acetilação promovida, resulta na ativação da transcrição gênica e diferenciação mieloide. Quando ocorre a translocação recíproca PML-Rar α – t(15; 17), a oncoproteína mantém a capacidade de se ligar aos alvos retinóicos e de formar o heterodímero Rar α /R α R, contudo, o complexo PML-Rar α , recruta complexos repressores, como Histonas Desacetilases (HDACs) e DNA metiltransferases (Dnmt), que compactam a cromatina e resultam em repressão da transcrição gênica. Níveis fisiológicos de ácido retinóico não são capazes de desintegrar este complexo e a LPA se desenvolve (CINGAM; KOSHY, 2017; LEAL; KUMEDA; VELLOSO, 2009; MARTENS et al., 2010). Apesar da grande maioria dos casos de LPA (95%) apresentar a translocação t(15;17), outras alterações cromossômicas também são observadas em casos de LPA, porém em associação com o RARA, tais como: t (5; 17) (q35; q21), t (11; 17) (q23; q21), t (11; 17) (q13; q21) e t (17; 17) (q11; q21). (CINGAM; KOSHY, 2017; ROWLEY et al., 1977)

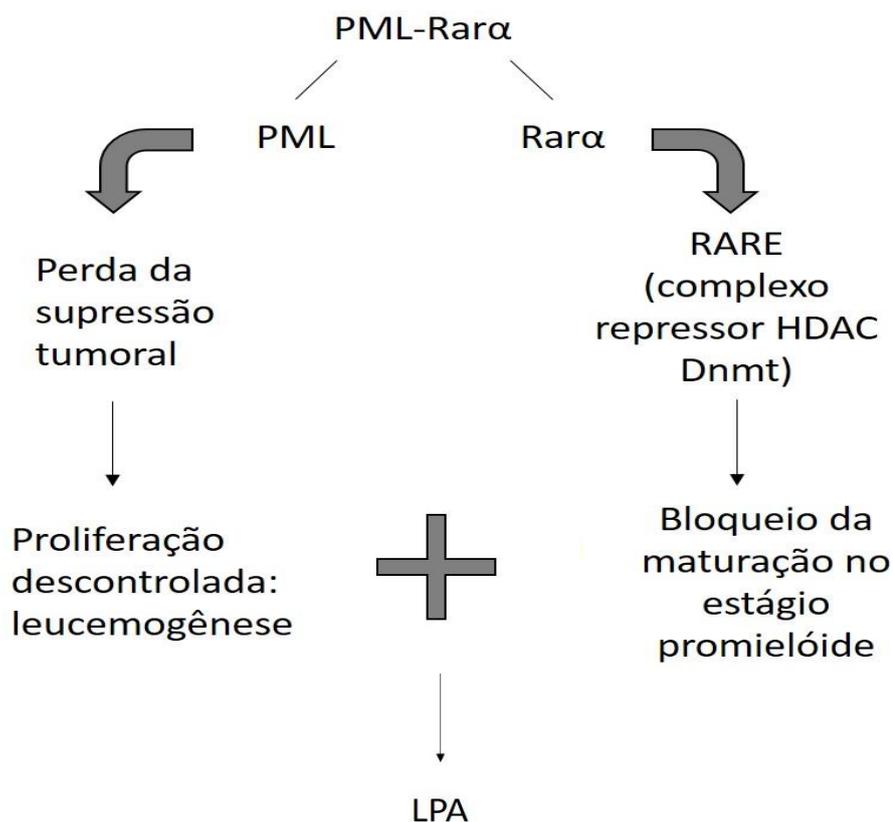


Figura 4 Representação esquemática do desenvolvimento da LPA a partir do transcrito PML-Rar α

A LPA é classificada de baixo risco quando a contagem de leucócitos é 10.000/uL ou menos, com plaquetas em 40.000/uL ou mais. A LPA de risco intermediário é considerada quando a contagem de leucócitos atinge 10.000/uL ou menos e plaquetas 40.000/uL ou menos. Já a LPA de alto risco é conferida quando a contagem de glóbulos brancos resulta acima de 10.000/uL (CINGAM; KOSHY, 2017).

2.3 Acido all-Trans-Retinóico

A LPA é o único subtipo das LMAs em que o tratamento deve ser iniciado imediatamente após a suspeita, devido à alta mortalidade pré-tratamento (TALLMAN; ALTMAN, 2009). O Ácido all-trans retinóico (ATRA) é a principal opção terapêutica para pacientes com LPA e promove bons resultados para a remissão da doença. Entretanto, antes da inserção do ATRA, na década de 80, a LPA apresentava um péssimo prognóstico, de evolução rápida e mortalidade alta. Mesmo com novas pesquisas e resultados promissores de outras drogas, o ATRA continua sendo a terapia de suporte para a LPA.

As primeiras experiências com ATRA no tratamento da LPA, ocorreram por volta do ano de 1988, cujo tratamento padrão era baseado apenas no uso de antraciclina, principalmente a daunorrubicina. Bernard e colaboradores 1973 demonstraram a sensibilidade das células ao tratamento com Daunorrubicina, chegando a um índice de remissão completa de 55% (BERNARD et al., 1973). A primeira experiência com ATRA ocorreu no hospital Shanghai Rui-Jin sob a orientação de ZY Wang, onde 24 pacientes com LPA foram tratados com ATRA e 23 deles atingiram a remissão completa da doença. A translocação cromossômica (t15, t17) já havia sido descrita por Rowley e colaboradores (1977), entretanto, curiosamente, ainda não era conhecido o envolvimento do receptor para o ácido retinóico na translocação. Mesmo com o advento do tratamento com o ATRA, os Estados Unidos manteve o tratamento de seus pacientes com LPA com a terapia usual para LMA, sem distinção para subtipos, até a década de 90. Nenhuma outra leucemia mieloide ou linfóide exibe um padrão semelhante de sensibilidade a um único agente quimioterápico. De fato, todas as outras leucemias, não promielocíticas, respondem apenas à

poliquimioterapia (CINGAM; KOSHY, 2017; DEGOS; WANG, 2001; LO-COCO; CICCONI, 2011).

A LPA se desenvolve através da formação do complexo PML-Rara α , que reprime a transcrição gênica. Níveis fisiológicos de ácido retinóico não são capazes de reverter a repressão dos genes envolvidos com a diferenciação. O ATRA, em níveis farmacológicos, consegue desintegrar o complexo PML-Rara α através de caspases do tipo 3 no resíduo Asp 522, na região PML da proteína de fusão. Esse feito foi demonstrado em células em cultura induzidas à diferenciação. De fato, a inibição da caspase do tipo 3 resultou em falha na desintegração do complexo PML-Rara α . O evento proteolítico promovido pelo ATRA, mantém intacto o componente Rara α , permitindo sua capacidade potencial em responder ao ácido retinóico. (NERVI et al., 1998; ZHOU et al., 2005).

Outro estudo demonstra dados consistentes com a acetilação de histonas como requisito da diferenciação promovida pelo ATRA. No estudo, o tratamento com ATRA eleva a expressão de PCAF, uma histona acetiltransferase (HAT). De fato, a diferenciação é bloqueada quando PCAF é silenciada. Nesse mesmo estudo, os autores demonstraram que a HAT acetila a histona H3 na região promotora dos genes alvos do ATRA.(SUNAMI et al., 2017)

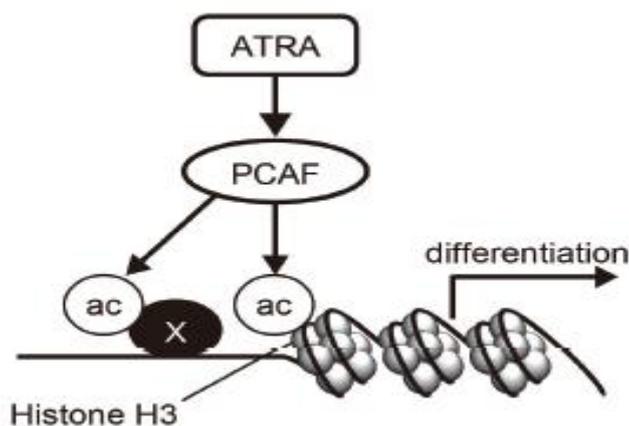


Figura 5 Representação esquemática da requisição de histonas acetiltransferase, PCAF, para promoção da diferenciação resultante do tratamento ATRA.(SUNAMI et al., 2017)⁴

⁴ Esta imagem foi originalmente publicada em The Journal of Biological Chemistry. (Sunami et al). Histone Acetyltransferase p300/CREB-binding Protein-associated Factor (PCAF) Is Required for All-trans-retinoic Acid-induced Granulocytic Differentiation in Leukemia Cells.. 2017

Após o advento do ATRA, o tratamento da LPA atingiu índices de remissão completa encorajadores, entretanto o feito não se manteve a longo prazo com a terapia baseada apenas em ATRA. Nesse contexto, uma combinação de ATRA e antracilcina passou a ser utilizada para a otimização da remissão da LPA. (LO-COCO; CICONI, 2011). Entretanto, apesar dos tratamentos para LPA serem muito bem descritos, a doença ainda apresenta um notável índice de recidiva (em torno de 25%) especialmente em pacientes de grupos de alto risco, permanecendo como um dos principais desafios – e foco de estudos- no tratamento da doença (CINGAM; KOSHY, 2017; LANCET, 2014; LI et al., 2018; ZAGO, 2004; ZHAO et al., 2018) .

2.4 Quiescência celular

A quiescência celular é definida como o estágio celular com ausência de proliferação e atividade basal mínima. Hoje é de conhecimento que as células adotam este estágio para preservação de suas características chaves, e não mais considera-se a ideia que as células entram em quiescência apenas em situações de privação de nutrientes. Ainda, é relevante salientar que a quiescência celular é um estágio reversível, dependente de sinalização. Nesse contexto, a quiescência difere da senescência celular, sendo esta última, uma característica irreversível, geralmente associada ao envelhecimento celular, e ainda na supressão do desenvolvimento de processos oncogênicos (BHATIA-DEY et al., 2016; CAMPISI, 2011; CHEUNG; RANDO, 2013).

Pardee, em 1974 descreveu um ponto de restrição (ponto R) no ciclo celular de células mamíferas. Segundo o estudo, o ponto R ocorre no estágio G1. As células podem entrar em quiescência antes do ponto de restrição, mas após o ponto R, são obrigadas a entrar em mitose. Os dados publicados demonstraram que a quiescência celular é decidida ainda no ponto G1 e não em qualquer fase do ciclo. (PARDEE, 1974). O então estabelecimento da quiescência permite às células se manterem dormentes, com atividade basal mínima, por longos períodos. Essa é uma característica, em geral, apresentada por células-tronco, que sustentam a capacidade de se manter nesse estágio não-

proliferativo por longos períodos a partir da existência de um nicho celular, que funciona como um microambiente com funções regulatórias. Dessa forma, também, as células-tronco cancerosas se aproveitam dos nichos de células tronco normais para sustentar um estágio quiescente (CHEUNG; RANDO, 2013; HSU; FUCHS, 2012).

A característica não proliferativa relacionada à quiescência, encorajou um enfoque para o estudo das células-tronco hematopoéticas e leucêmicas, durante o tratamento de neoplasias hematológicas. (ESSERS et al., 2009; ISHIKAWA et al., 2007; LI et al., 2018; SAITO et al., 2010). O índice notório de recidivas e falhas terapêuticas apresentado pela leucemia promielocítica aguda, pode ser justificado, nesse contexto, pela presença de populações de células-tronco quiescentes, com metabolismo basal mínimo e, portanto, resistentes ao tratamento quimioterápico.

De fato, Ishikawa e colaboradores, em 2007, demonstraram, em seu estudo, que as células CD34+ CD38- na LMA estão relativamente quiescentes em seu microambiente celular. Os autores evidenciaram ainda, que essas células CD34+ e CD38-, encontradas no nicho endosteal da medula óssea, eram resistentes à terapia quimioterápica. Esse achado, corrobora com a hipótese de que a quiescência celular pode estar envolvida com o índice de falha terapêutica e recidiva da doença (ISHIKAWA et al., 2007).

Dois anos mais tarde, um estudo publicado na revista *Nature*, descreveu os resultados de um ensaio que promovia a entrada das células-tronco hematopoéticas em um estágio cíclico a partir do tratamento com IFN α . O estudo converge com os dados de Rousselot e colaboradores, os quais demonstraram uma taxa surpreendente de remissão, a longo prazo, em pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC) tratados com IFN α , seguido de Imantinib – quimioterapia (ESSERS et al., 2009; ROUSSELOT et al., 2007). Os ensaios de Saito e colaboradores também demonstraram resultados promissores na tentativa de ativação das células-tronco leucêmicas através do tratamento com citocinas. A indução a um estágio cíclico promoveu a sensibilização dessas células-tronco à apoptose, requerida pelo tratamento quimioterápico (SAITO et al., 2010). Contudo, apesar dos resultados positivos, a ativação das células-tronco nos nichos hematopoéticos, seguida de um tratamento citotóxico, desponta no

exaurimento das CTH normais, levando à quadros graves de anemia seguido, em alguns casos, de morte dos animais (ESSERS et al., 2009).

Jedema e colaboradores também demonstraram em seu estudo, que células leucêmicas em estágios G0/G1 eram mais resistentes ao tratamento quimioterápico, enquanto que, células em estágio S, G2 e M eram mais suscetíveis ao mesmo tratamento. Esses achados demonstram a relevância do estágio de ciclo celular para uma melhor suscetibilização das células tumorais aos tratamentos (JEDEMA et al., 2004).

Cheung e Rando demonstraram, em seu estudo, as assinaturas de genes de diferentes células quiescentes e, conforme o esperado, para um perfil de célula não proliferativa, a relação exhibe o *downregulation* de genes envolvidos com regulação do ciclo celular, replicação de DNA e atividade mitocondrial. (CHEUNG; RANDO, 2013). Associada à repressão gênica no genoma de células animais, a metilação do DNA assume um importante papel no silenciamento gênico envolvido em diversas situações fisiológicas e patológicas.

A metilação do DNA nada mais é que a adição de um grupamento metil (CH₃) na posição 5 do nucleotídeo citosina. Essa metilação ocorre em regiões ricas nas sequências dos nucleotídeos citosina (C) e guanina (G), conhecidas como sequências CpG. A metilação do DNA que ocorre em regiões esparsas CpG, geralmente não resultam em algum significado clínico. Entretanto, a metilação do DNA em ilhas CpG, compostas por uma sequência de mais de 200 nucleotídeos (CpG), geralmente encontradas em regiões promotoras de genes, reflete em repressão da transcrição (FRANCIS et al., 2010; MOORE; LE; FAN, 2013; SZYF, 2007). Nesse contexto, Götze e colaboradores demonstraram, com dados consistentes, o padrão de mudança no perfil de metilação total no DNA de células hepáticas, durante a ativação de células quiescentes. Em seu estudo, as células hepáticas, quando quiescentes, apresentavam um padrão de metilação no DNA superior às células em estágio cíclico. Outros estudos também já convergiram sobre a mudança no perfil de metilação relacionado com a redistribuição do ciclo e diferenciação celular (DESJOBERT et al., 2015; HASSANI et al., 2017; MOMPARTLER; DORÉ; MOMPARTLER, 1990).

Além do envolvimento com ciclo celular, as alterações epigenéticas, embora ainda não muito claras, parecem estar intimamente ligadas à

leucemogênese e até mesmo relacionadas a um pior prognóstico da patologia. Alguns estudos confirmam o padrão de expressão aberrante da metilação do DNA no desenvolvimento da LMA (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al., 2013; FIGUEROA et al., 2010; LI et al., 2017). O estudo descrito em *Cancer Genome Atlas Research*, revela ainda a hipermetilação acentuada em DNAs de pacientes com Leucemia Promielocítica Aguda, quando comparada às células CD34+ de pacientes saudáveis. Adendo a isso, o estudo de Kroeger e colaboradores demonstraram que a hipermetilação do DNA em alguns genes está presente já no momento do diagnóstico, quando comparados à análise de metilação de células de medula óssea de pacientes saudáveis. A hipermetilação foi observada, ainda de forma mais acentuada, em cerca de 70% dos pacientes que sofreram recaída (KROEGER et al., 2008).

2.4 O Lítio

Conhecido na medicina pelo seu potencial terapêutico com desordens mentais agudas, o lítio despontou como um grande aliado para tratamento de transtornos bipolares, depressão e comportamentos suicidas. (MACHADO-VIEIRA et al., 2009) Ainda, o lítio tem sido promissor na investigação do seu papel indutor na proliferação e diferenciação de células neurais, bem como, no seu efeito neuroprotetor em casos de traumatismos cranianos (LEEDS et al., 2014; SU; CHU; WU, 2007). No campo da hematologia, o lítio teve seu papel reconhecido na atenuação da mielossupressão, quando utilizado em tratamento de pacientes submetidos à quimioterapia.

O lítio é conhecido como um ativador da via Wnt/ β -catenina, através da inibição da glicogênio sintase quinase -3 (GSK-3). A via Wnt desempenha papéis importantes no ciclo e crescimento celular e sua ativação depende de uma via canônica, representada pela proteína β -catenina. Quando as proteínas Wnt são estimuladas, a ligação com os receptores de membrana induzem a ativação da proteína *Disheveled* que impede a fosforilação de β -catenina pela GSK-3. Esse processo resulta em β -catenina estabilizada no citoplasma celular e sua translocação para o núcleo onde interage com as regiões gênicas TCF/Lef,

resultando na expressão da transcrição de genes, convergindo em proliferação e desenvolvimento celular. Quando GSK -3 é ativa, ela promove a degradação de β -catenina (Figura 6).

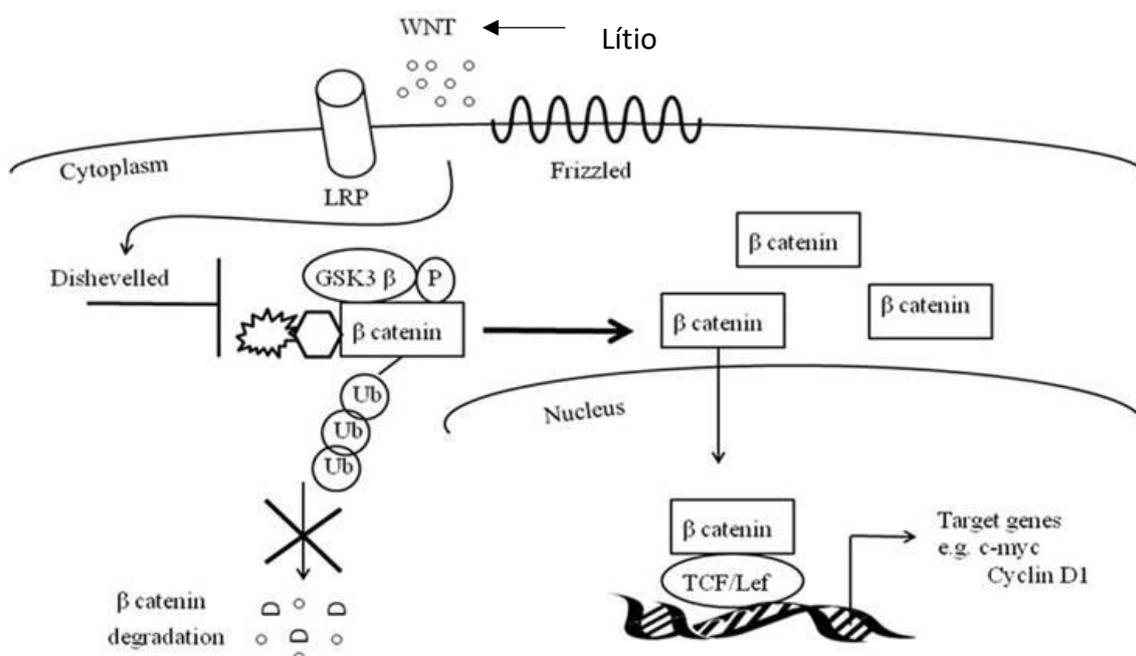


Figura 6. Representação esquemática da ativação da via canônica Wnt/ β -catenina. (Adaptado de OLMEDA et al., 2003)

Em doses consideradas baixas, até 10mM, o tratamento com lítio demonstra uma melhora na proliferação de células de leucemia promielocítica aguda, sem causar citotoxicidade. Em doses mais elevadas, o lítio é responsável pela queda da viabilidade de células leucêmicas (GAUWERKY; GOLDE, 1982; LI et al., 2015; SU; CHU; WU, 2007). Além disso, o tratamento com lítio, em diversos tipos celulares, demonstrou a capacidade de deslocamento e prisão de ciclo celular. O lítio foi descrito como responsável pela redução da população de células em G0/G1 e aumento do grupo celular em fase de síntese de DNA e mitose, fase S e fase G2/M respectivamente (DE GROOT et al., 2014; OLMEDA et al., 2003; WANG et al., 2008). Ainda, o estudo de Wang e colaboradores descreveu a modulação progressiva da prisão do ciclo celular, dependente da dose de lítio. O mecanismo pelo qual o lítio causa o deslocamento e prisão do ciclo celular ainda não é conhecido, contudo, o estudo supracitado mostrou que a prisão de ciclo celular depende da ativação da proteína quinase de *checkpoint* 1 (ChK1).

O lítio é, também, referenciado por indução à autofagia, processo de reciclagem de componentes do citosol, responsável pela manutenção da homeostase celular. (SARKAR et al., 2005). O estudo de Orfali e colaboradores, em 2015, demonstrou que a diferenciação efetiva promovida pelo tratamento com ATRA em células leucêmicas, tem como processo chave a autofagia celular. Demonstrou ainda, que quando as células resistentes à diferenciação foram tratadas com lítio e ATRA, a autofagia foi estimulada por ambos os tratamentos e uma diferenciação mieloide das células resistentes foi conseguida (ORFALI et al., 2015).

Os dados encontrados nas buscas literárias são animadores para estudos mais concisos com o uso do lítio em conjunto com terapias instituídas contra leucemogênese. Neste estudo, avaliamos o papel do lítio na modificação do ciclo celular de células de LPA para atenuação de estágios quiescentes e consequente maior sensibilização das células ao tratamento ATRA.

3. HIPÓTESE

O tratamento com lítio promove um arraste no ciclo celular de células de leucemia promielocítica aguda, atenuando o estágio quiescente e deixando as células suscetíveis ao tratamento ATRA.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a atenuação de um estágio quiescente de células leucêmicas na exposição ao lítio, bem como, verificar a viabilidade de um tratamento das células com lítio, juntamente ao tratamento ATRA

4.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito do tratamento com lítio em uma linhagem de células de leucemia promielocítica aguda, através das seguintes análises:

- Por meio de análise de metabolismo celular na exposição ao lítio
- Mediante a avaliação da curva de crescimento das células leucêmicas na presença de lítio e ATRA
- Mediante à avaliação da citotoxicidade do tratamento com lítio e ATRA através de contagem celular e marcação fluorescente com Diacetato de Fluoresceína e Iodeto de Propídeo
- Por meio da avaliação de metilação do DNA durante o tratamento com lítio e ATRA
- Por meio da avaliação do ciclo celular das células expostas ao tratamento com lítio
- Mediante à análise de *Side population* para observação de células imaturas quiescentes
- Mediante à análise de diferenciação celular após o tratamento com lítio e ATRA

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Cultura celular

As células NB4 e NB4-R2 foram cedidas gentilmente pelo laboratório de hematologia experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, sob a coordenação do Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego. O enfoque do estudo se deu, primordialmente, sobre as células NB4, sensíveis ao tratamento ATRA. Sendo as NB4-R2, resistentes, utilizadas para fins de parâmetros comparativos.

As células foram mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (estreptomicina e penicilina), em incubadora à 37°C, com 5% CO₂. As células foram mantidas a $0,5 \cdot 10^6$ células/mL. As trocas de meio ocorreram a cada dois dias, através de centrifugação à 500g, durante 5 minutos.

5.2 Tratamento

O cloreto de lítio, da marca Sigma-Aldrich, foi diluído em PBS1X de forma a obter uma solução mãe 10x mais concentrada que a solução de tratamento. A preparação do lítio foi efetuada sempre no momento do tratamento das células, de maneira a minimizar qualquer variação resultante do armazenamento da droga diluída. A dosagem do tratamento com lítio foi estabelecida em 10mM, de acordo com os ensaios de metabolismo celular (Ref). O Acido *all-trans* Retinóico, ATRA (Sigma-Aldrich), foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração de 1mM, e mantido congelado a -20°C, em alíquotas de 20uL. Foi estabelecida a dose de 1uM de ATRA para tratamento das células leucêmicas NB4 e NB4-R2.

5.3 MTT

O ensaio colorimétrico de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT), foi utilizado para avaliar o metabolismo das células em tratamento. Quando aplicado em cultura celular, o MTT é reduzido por células metabolicamente ativas, que convertem o reagente à cristais de formazan, de cor púrpura. A intensidade da cor púrpura é relacionada com a proporção de células metabolicamente ativas.

As células NB4 e NB4-R2 foram submetidas a avaliação do metabolismo celular na exposição às dosagens de lítio, bem como na avaliação da curva de crescimento das células com Lítio e ATRA. Ambos os ensaios foram realizados através do protocolo de MTT, a partir do plaqueamento de 1×10^5 células/mL, em placa de 96 poços. Após o tratamento das células, 10uL de MTT foram adicionados à cada poço da placa de ensaio e incubado ao abrigo da luz, por 2h30min. Os cristais de formazan foram dissolvidos com a adição de DMSO para, desta maneira, possibilitar a leitura de absorbância (570nm) pelo espectrofotômetro Spectramax. Esses parâmetros foram adotados em todas as repetições dos ensaios.

5.3.1 Avaliação do metabolismo celular das células NB4 e NB4R2 expostas ao lítio

Na concentração de 1×10^5 células/mL, cada grupo, constituído por triplicatas, foi tratado nas doses de 2,5mM, 5mM, 7,5mM e 10mM de lítio, bem como o controle com o veículo da droga (PBS1X), durante os tempos de 24, 48 e 72 horas. O resultado do metabolismo celular na exposição ao lítio, foi obtido pela análise de MTT, como descrito anteriormente. Os experimentos foram realizados de forma independente, em três momentos distintos.

5.3.2 Análise da curva de crescimento das células NB4 e NB4-R2 expostas ao lítio e ATRA

Para análise da curva de crescimento, as células foram plaqueadas em triplicatas para cada tratamento, na concentração de 1×10^5 células/mL. As células foram submetidas ao tratamento com 10mM de lítio, 1uM de ATRA, lítio e ATRA (10mM e 1uM, respectivamente), além do controle com PBS1X. Os tratamentos foram avaliados em 24, 72 e 120 horas através do ensaio com MTT. O experimento foi repetido três vezes.

5.4 Viabilidade celular

5.4.1 Marcação com Diacetato de Fluoresceína e Iodeto de Propídeo

Posterior ao ensaio da análise de metabolismo celular, as células foram, ao final do tratamento, marcadas com diacetato de fluoresceína (FDA) e iodeto de propídeo (PI). A marcação fluorescente distingue as células vivas de células mortas. O FDA é incorporado no citoplasma celular de células vivas e, então, clivado por lipases emitindo fluorescência verde. O PI é facilmente expelido por células vivas mas não pelas células apoptóticas, sendo, deste modo, marcador de células mortas, visualizado em fluorescência vermelha.

No tempo de 120 horas - final do tratamento das células com lítio e ATRA - as células foram cuidadosamente marcadas com FDA e PI, ao abrigo da luz. A marcação foi observada em microscópio de luz invertida, com fluorescência, e fotografadas com o software *Precision Image*.

5.4.2 Contagem das células

Ainda para estimar a viabilidade celular pós tratamento, em um mesmo momento da marcação com fluorescência, as células também foram submetidas à contagem através da técnica de coloração com azul de tripan (Sigma Aldrich). O azul de tripan é um corante que não atravessa a membrana de células viáveis, corando em azul, desta forma, as células não viáveis. A contagem de todos os tratamentos foi realizada em câmara de Neubauer, compreendendo os quatro quadrantes, demonstrado em círculos na figura abaixo, utilizando 10uL da suspensão celular, solubilizada em azul de tripan.

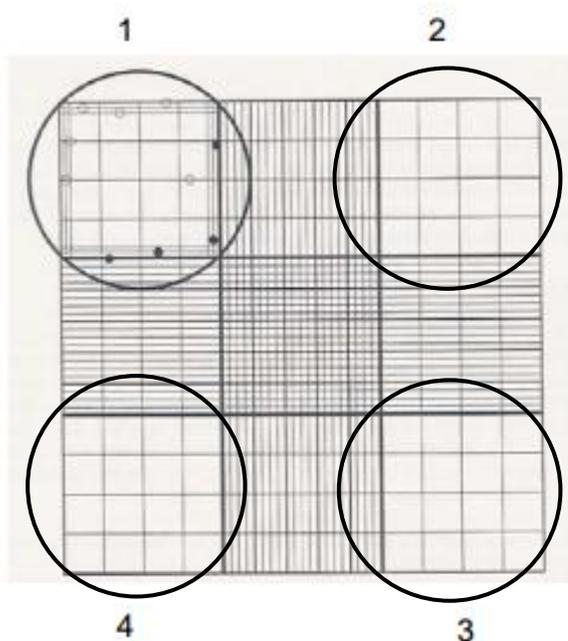


Figura 7. Representação esquemática dos quadrantes de contagem em câmara de Neubauer.

Cálculo para estimativa de viabilidade celular

Nº de células vivas + Nº de células mortas = total de células.

Total de células – 100%
Nº de células vivas – x

Total de células – 100%
Nº de células mortas - x

5.5 Metilação do DNA

5.5.1 *Isolamento de DNA*

Para avaliação de metilação do DNA as células NB4 e NB4-R2, após o tratamento com Lítio e ATRA, foram submetidas à lise celular pelo protocolo do reagente Trizol (Thermo Fischer), bem como, ao procedimento de separação de fases, após adição clorofórmio. Posterior a isso, a fase aquosa foi cuidadosamente removida. Etanol 100% foi adicionado à amostra e misturado por inversão. Após, as amostras foram submetidas à centrifugação à 2000g à 4°C, durante 5 minutos para sedimentação do DNA. O *pellet* foi ressuscitado com citrato de sódio, incubado por 30 minutos, seguido de centrifugação à 2000g à 4°, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o passo de ressuspensão com citrato de sódio foi repetido. O *pellet* formado a partir da centrifugação foi ressuscitado com etanol 75%, misturado por inversão e incubado por 20 minutos. Novamente, as amostras passaram por centrifugação à 2000g (4°C), durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e o DNA sedimentado foi submetido à secagem ao ar livre. O DNA foi solubilizado com NaOH a 8mM.

5.5.2 *Quantificação de DNA*

A análise de metilação do DNA sugere uma quantidade ótima de 100ng por de DNA por amostra, para um ensaio bem sucedido. Dessa forma, procedeu-se com a quantificação de DNA de cada amostra em teste, através do uso do espectrofotometro NanoDrop™ (Thermo Fischer). Transferiu-se 1uL da suspensão de DNA para o leitor. O registro da quantificação de DNA de todas as amostras foi realizado e desta forma prosseguiu-se com o ensaio de metilação.

5.5.3 Metilação do DNA

O ensaio de metilação foi realizado com o kit colorimétrico MethylFlash™ Methylated DNA Quantification, da Epigentek. Os controles e soluções de lavagem foram preparadas conforme informado na bula. Após os registros de quantificação do DNA, cada amostra foi adicionada em um respectivo poço da placa de metilação, de maneira que sua concentração final fosse 100ng de DNA. Solução de ligação também foi adicionada e a placa foi incubada a 37°C por 90 minutos. Posteriormente os poços foram lavados três vezes e, então, foi adicionado à solução com anticorpo de captura de DNA metilado. A placa foi incubada por 60 minutos, seguida de lavagem e adição da solução com anticorpo para detecção de DNA metilado. Novamente, a placa foi incubada por 30 min à 37°C e posteriormente lavada. Por último, a solução de trabalho foi adicionada e a placa foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Observou-se a mudança de cor em cada poço da análise. A cor azul foi observada em poços com presença suficiente de DNA metilado. Finalmente, adicionou-se a solução de parada, a fim de finalizar a reação enzimática, a cor, neste ponto, altera para amarelo e, deste modo, a placa foi submetida à leitura no espectrofotômetro Spectramax no comprimento de onda de 450 nm. O procedimento descrito está ilustrado na imagem que segue:

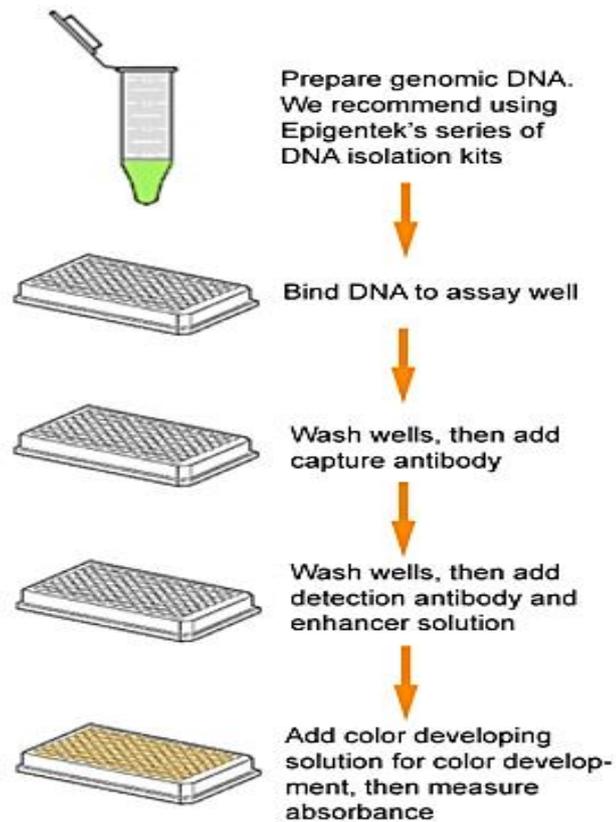


Figura 8: Representação esquemática do ensaio da placa de metilação. Fonte: Bula do kit MethylFlash™ Methylated DNA Quantification ,EPIGENTEK.

A metilação do DNA ocorre sempre no nucleotídeo citosina, dando origem à forma metilada 5-Metilcitosina (5-mC). Dessa forma, após a obtenção dos resultados de absorbâncias, os registros foram calculados de forma a obter a concentração de DNA em porcentagem de 5-Metilcitosina, como demonstra a fórmula abaixo:

$$5\text{-mC \%} = \frac{(\text{DO Amostra} - \text{DO ME3}) \div S}{(\text{DO ME4} - \text{DO ME3}) \times 2 \div P} \times 100\%$$

DO: Densidade óptica

ME3: Amostra controle negativo

ME4: Amostra controle positivo

S: Quantidade de DNA da amostra em ng

P: Quantidade de DNA da amostra controle positivo em ng.

5.6 Ciclo celular

O ciclo celular foi analisado ao final do tratamento com lítio, na dose de 10mM. A análise foi proposta para avaliação da quiescência celular, estabelecido aqui como estágio G0 do ciclo celular, bem como analisar as possíveis mudanças de ciclo celular nas células leucêmicas após o tratamento com lítio. Para análise de ciclo celular, utilizamos apenas a linhagem NB4, visto que a queda da viabilidade da linhagem NB4-R2 quando exposta ao lítio, descartou o interesse no delineamento de ciclo celular.

5.6.1 Análise de ciclo celular com Iodeto de Propídeo

Para a avaliação da influência do lítio nos estágios de ciclo celular, as células passaram por uma sincronização, de forma a promover uma progressão cíclica homogênea. A sincronização do ciclo celular foi realizada da seguinte forma: as células NB4 foram submetidas à sincronização do ciclo celular, por meio de um bloqueio duplo com Timidina (Calbiochem). As células NB4 foram incubadas em meio RPMI suplementado com 10% de SBF, adicionado de 2mM de timidina. O bloqueio das fases do ciclo celular foi mantido por 16 horas – primeiro bloqueio. A seguir, o meio contendo timidina foi removido, lavando-se as células com PBS 1X e mantidas em meio RPMI suplementado com 10% SBF por 8 horas. Após esse período, um segundo bloqueio foi realizado, por um período de 16 horas. Para promover a progressão concomitante do ciclo celular, uma nova alíquota de meio RPMI suplementado com 10% de SFB, foi adicionada à cultura de células NB4. Neste momento, 10mM de cloreto de lítio foram adicionados ao meio de cultivo celular, para avaliar seu efeito no ciclo celular das linhagens celulares de LPA (NB4).

As células sincronizadas e tratadas ou não com cloreto de lítio foram coletadas nos seguintes pontos de tempo: 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 14h e 16h. Após a coleta, as células foram submetidas à centrifugação para remoção do meio de cultura e submetidas à fixadas com etanol 70% em PBS 1X, gelado.

O material fixado foi mantido em freezer -20°C por pelo menos 12 horas, seguido de centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos. A seguir o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500uL de solução contendo 10ug/mL de RNase. Após, as células foram incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos, ao abrigo da luz e, marcados com iodeto de propídeo (50ug/mL). A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACS calibur, *BD Bioscience*, disponibilizado pelo laboratório da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

5.6.2 Marcação com Hoechst 33342 – Side Population

O *Hoechst 33342* é um marcador fluorescente ligante de DNA, capaz de identificar e purificar células hematopoéticas imaturas (*hematopoietic stem cells*) quiescentes, pelo método denominado “*side population*”. A purificação é baseada na diferença de efluxo do marcador *Hoechst 33342* entre os grupos de células analisadas. As células progenitoras quiescentes têm a capacidade de bombear o *Hoechst* para fora. Desse modo, as células-tronco em G0 são observadas com uma baixa fluorescência para o reagente. Esse é um excelente ensaio para a observação e a quantificação de células-tronco. Nosso estudo submeteu as células de linhagem de LPA a esse ensaio, na tentativa de observar qualquer população mais imatura, quiescente, antes e após ao tratamento com lítio.

As células NB4 tratadas com cloreto de lítio (10mM) e com o veículo (PBS1X) foram mantidas em cultivo com meio RPMI suplementado com 10% de SBF por 72 horas. Após esse período, 50uM de verapamil, droga inibidora do efluxo do corante *Hoechst 33342*, foram adicionados, por 10 minutos à 2×10^6 de células consideradas controle. Após o procedimento de bloqueio, 5ug/mL de *Hoechst 33342* foram adicionados às células tratadas e não tratadas com cloreto de lítio, e mantidas em incubadora de CO² à temperatura de 37°C, por 90 minutos. Ao término do período de incubação, as células foram transferidas para tubos de citometria, submetidas à centrifugação (2000rpm por 5 minutos), ressuspensas em 1mL de PBS gelado contendo 2ug/mL de iodeto de propídeo

e, mantidas em gelo até a leitura em citômetro de fluxo FACS Aria, BD (USP). A baixa temperatura inibe a bomba de efluxo do Hoechst 33342.

5.7 Análise de diferenciação celular

5.7.1 Marcação com CD11b

Somado ao estudo morfológico e citoquímico, a imunofenotipagem sustenta um papel igualmente importante na avaliação de maturação dos promielócitos na LPA. O CD11b (*ITGAM*) é uma glicoproteína transmembranar expressa em granulócitos, macrófagos, células dendríticas, células Natural Killer (NK) e alguns subconjuntos de células B e T. A ausência da expressão de CD11b é característica de células em estágio imaturo de diferenciação, sendo sua expressão, um indicador de diferenciação mieloide. Dessa forma, avaliamos a expressão de CD11b nas células NB4 e NB4-R2 ao final do tratamento com lítio e ATRA.

As células NB4 e NB4-R2 foram plaqueadas, em triplicatas, na concentração de 1×10^5 células/mL, em placas de 6 poços e tratadas com lítio na dose estabelecida de 10mM, por 120 horas. Da mesma maneira, procedeu-se o tratamento com ATRA na dose de 1uM, bem como o tratamento concomitante com Lítio e ATRA, durante o mesmo período. Experimento foi repetido 3 vezes, em momentos independentes. Ao final do tratamento, as células foram preparadas para análise em citometria de fluxo.

As células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em 1mL de PBS1X. Foram utilizadas 1×10^6 células para cada tubo de citometria. As células foram marcadas com o anticorpo primário CD11b e o controle isotópico PE anti-mouse IGg1 e então incubadas durante 15 minutos à TA (temperatura ambiente) As células foram centrifugadas e ressuspensas em PBS1X para leitura no citometro FACS Aria BD *Biosciences*, localizado no Instituto de Pesquisa com células Tronco (IPCT).

5.7.2 Morfologia das células

Adicional à avaliação da expressão imunofenotípica de CD11b, as células NB4 e NB4-R2, pós tratamento com lítio e ATRA, foram submetidas à confecção de lâminas para coloração. A suspensão de células foi acomodada à lâmina através de centrifugação pelo método de cito centrifugação (*Cytospin*). Após secagem ao ar livre, as lâminas foram cobertas pelo corante hematológico *Leishman*, seguido de diluição com água tamponada, pH 6,8. Finalizado o tempo de coloração, as lâminas foram lavadas em água corrente e acomodadas verticalmente para secagem, para posterior observação em microscopia óptica. As fotografias foram obtidas com a visualização das células em aumento de 1.000x, com a utilização de óleo de imersão.

5.8 Análise estatística

A comparação estatística foi feita através de uma ANOVA de uma via, complementada com o pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou $p < 0,05$ (*) ou $p < 0,001$ (**). O software SPSS foi utilizado como ferramenta para análise dos dados.

6. RESULTADOS

6.1 Efeito da exposição das células NB4 e NB4R2 ao lítio

Para avaliar a atividade metabólica das células NB4 e NB4-R2 em exposição ao lítio, realizo o ensaio colorimétrico de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT), depois de 0h, 24h, 48h e 72h de tratamento, nas doses 2,5mM, 5mM, 7,5mM e 10mM de Cloreto de lítio (CLi). As células usadas como controles foram tratadas com PBS1X nos mesmos tempos do tratamento com Lítio. Nas células NB4, a exposição às diversas doses e tempos do tratamento não demonstrou alteração significativa na atividade metabólica das células, conforme a figura 9, o que corrobora com os dados encontrados na literatura. Desse modo, adotamos a dose de 10mM como concentração padrão para tratamento das células, com base em resultados prévios da literatura, visto que o LiCl não foi capaz de modular a viabilidade celular.

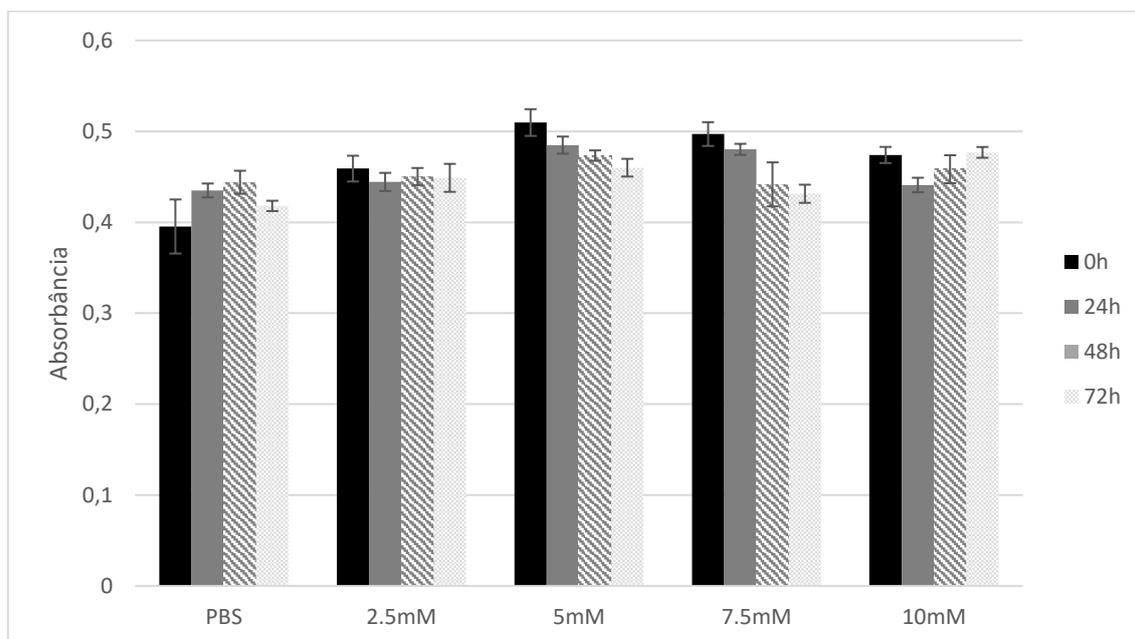


Figura 9. Avaliação da atividade metabólica das células NB4 expostas às doses de 2,5mM, 5mM, 7,5mM e 10mM nos tempos de 0h, 24h, 48h e 72h. O experimento foi repetido 3 vezes. $p < 0,05$

Nas células NB4-R2, a exposição ao lítio demonstrou alteração na atividade metabólica de forma tempo dependente em todas as concentrações. Conforme demonstrado na figura 10, a exposição ao lítio nos tempos de 72h, diminuiu significativamente a viabilidade das células.

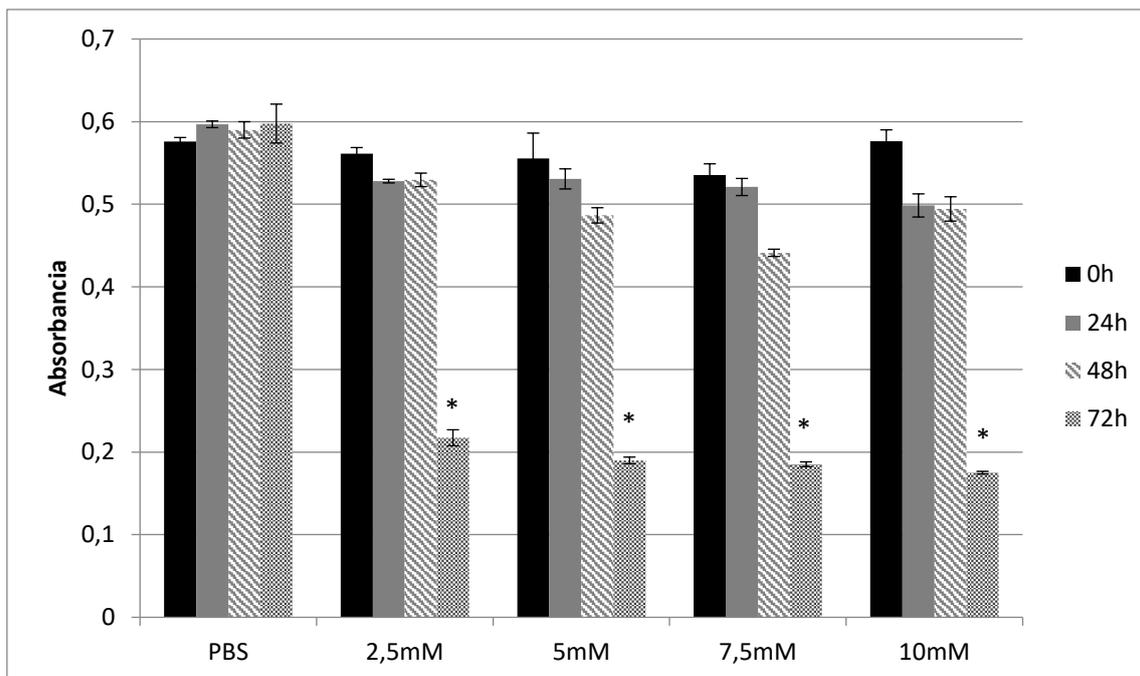


Figura 10. Avaliação da atividade metabólica das células NB4R2 expostas às doses de 2,5mM, 5mM, 7,5mM e 10mM nos tempos de 0h, 24h, 48h e 72h. O experimento foi repetido 3 vezes. * $p < 0,05$

6.2 Curva de crescimento das células em tratamento com Lítio e ATRA

Para avaliar a viabilidade do tratamento das células com lítio e ATRA, as células foram submetidas ao tratamento com lítio na dose 10mM e ATRA na dose de 1 μ M. O crescimento das células, durante o tratamento, foi avaliado no período de 24h, 72h e 120h pelo ensaio de MTT. O controle foi tratado com PBS1X e DMSO nos mesmos tempos de tratamento com lítio e ATRA. Novamente, o ensaio demonstra que as células NB4 não sofrem decréscimo na viabilidade quando expostas à dose de 10mM de lítio. Observa-se, ainda, um pequeno aumento da proliferação (não significativo) em relação ao controle, no tempo de 120h. As células NB4 reagem à exposição ao ATRA, conforme o esperado. O ATRA suprime a proliferação das células sensíveis, conforme demonstrado pela literatura. Quando usados de forma concomitante, conforme figura 11, os tratamentos ATRA e lítio demonstram uma ação dominante do efeito supressor do ATRA, reduzindo a atividade metabólica das células.

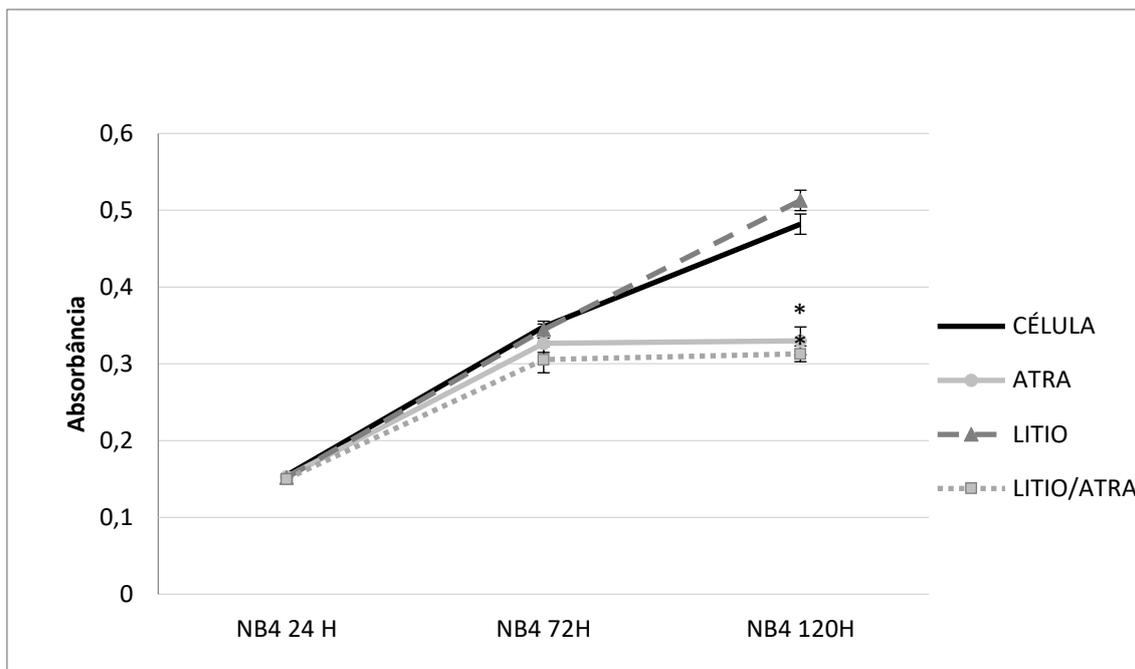


Figura 11. Curva de crescimento das células NB4 durante o tratamento com lítio e ATRA nas doses de 10mM e 1uM, respectivamente. O crescimento das células foi observado durante o período de 120h. A curva ATRA (o) e Lítio/Atra (■) demonstrando a supressão da proliferação em células sensíveis ao ATRA. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle (célula).

A curva de crescimento das células NB4-R2 em tratamento com lítio e ATRA demonstra, novamente, o decréscimo da viabilidade das células quando expostas ao lítio, na concentração de 10mM. Durante o período de 72h de tratamento com lítio, a curva de crescimento mostra-se inferior ao controle. No tempo de 120 horas, a curva sofre declínio, demonstrando uma taxa maior de apoptose em relação a proliferação. O tratamento ATRA não demonstra efeito significativo no metabolismo celular, cujo resultado corrobora com os dados da literatura. Entretanto, quando os tratamentos com Lítio e ATRA são aplicados concomitantemente, as células sofrem decréscimo na viabilidade, mostrando um efeito dominante da citotoxicidade causada pelo lítio, figura 12.

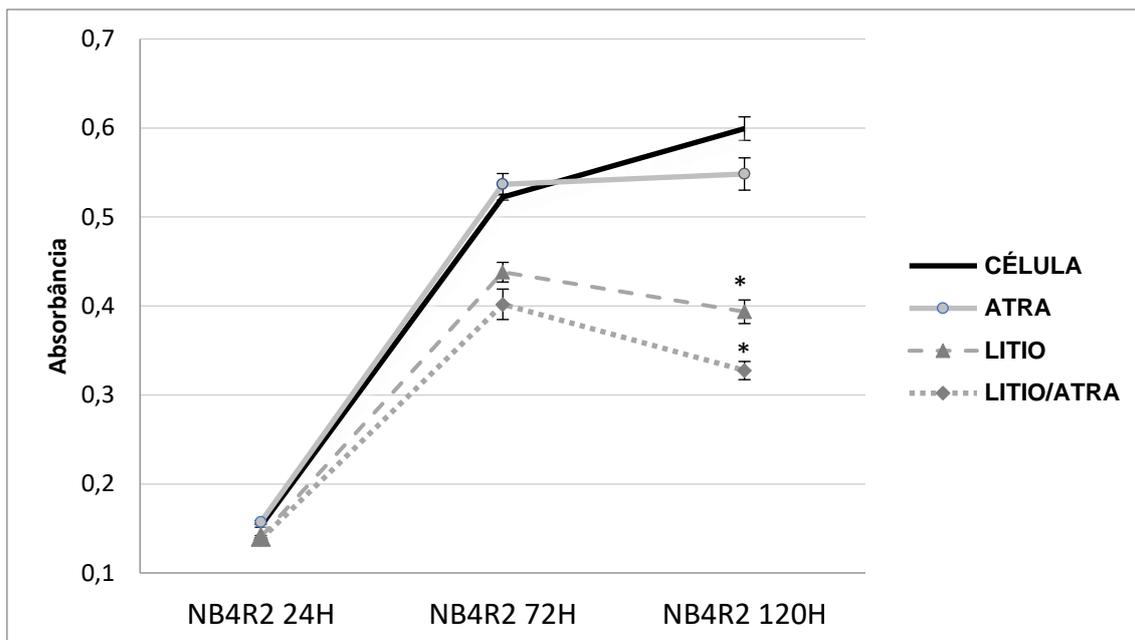


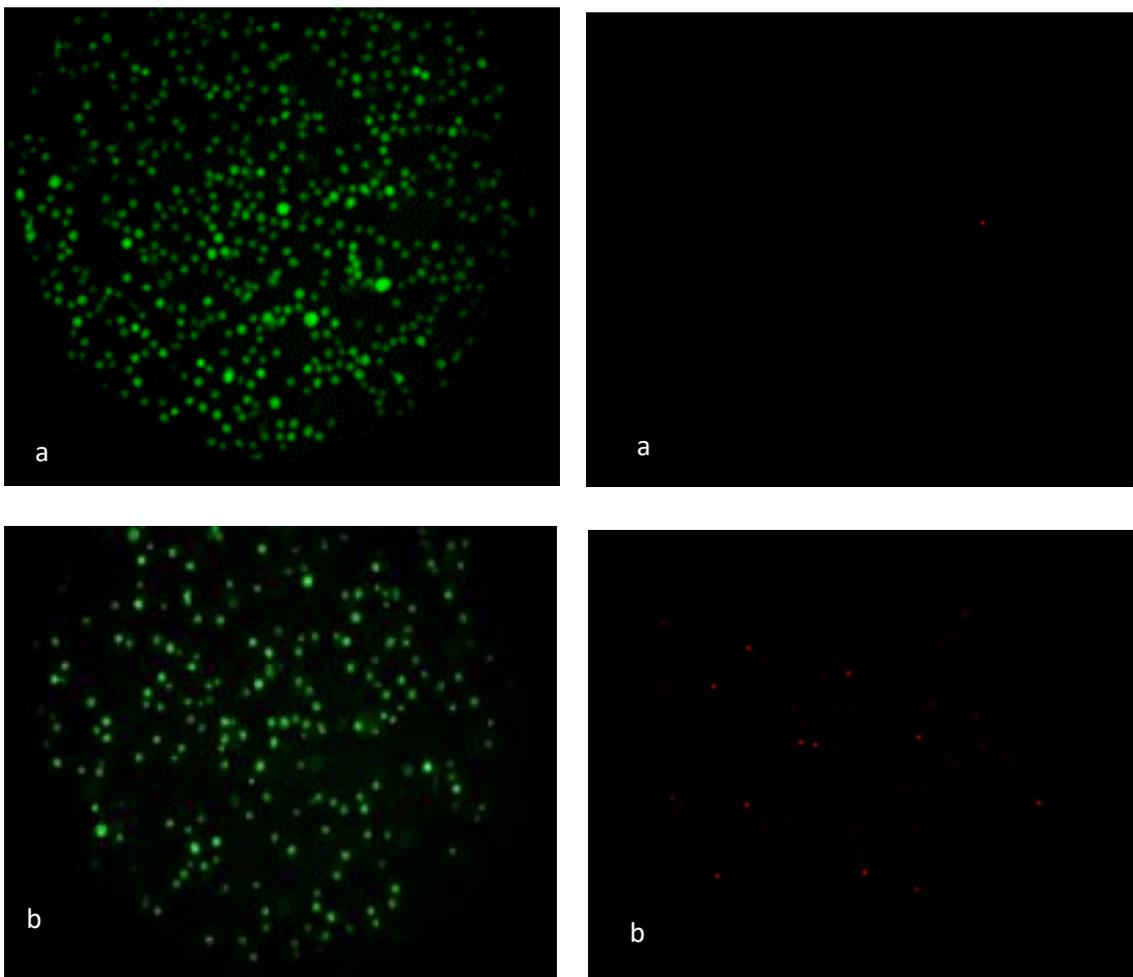
Figura 12. Curva de crescimento das células NB4R2 durante o tratamento com Lítio e ATRA nas doses de 10mM e 1uM, respectivamente. O crescimento das células foi observado durante o período de 120h. Curva lítio (Δ) e lítio/ATRA (\diamond) demonstrando declínio da viabilidade após o período de 72h. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle (célula).

6.3 Viabilidade das células durante tratamento com lítio e ATRA

Para avaliar a viabilidade das células no tratamento com lítio e ATRA a marcação das células foi realizada com iodeto de propídeo (IP) e diacetato de fluoresceína (FDA), no final do período do tratamento (120h), e observado, por microscópio de inversão, a emissão de fluorescência. O iodeto de propídeo é um composto facilmente expelido pelas células vivas, enquanto que as células mortas o mantêm presente em seu citoplasma. As células mortas, quando marcadas com IP, portanto, emitem uma fluorescência vermelha. O diacetato de fluoresceína é um componente que é clivado no citoplasma das células vivas. A clivagem dá origem à emissão de fluorescência verde, desta forma, células vivas, são visualizadas com marcação verde (figura 13).

Ainda, para avaliar a citotoxicidade do tratamento, as células foram submetidas à contagem celular através do protocolo com azul de tripan, no mesmo momento da marcação com IP e FDA, para fins de classificação da viabilidade celular no tempo de 120h.

A marcação das células NB4 com IP e FDA demonstrou visualmente o perfil não citotóxico do lítio na dose padronizada, demonstrando, inclusive, um aparente aumento na população celular viável (verde) (figura 13c). Observou-se também a clara supressão da proliferação celular quando tratadas com ATRA (figura 13b). O efeito da supressão e citotoxicidade observado no tratamento ATRA foi semelhante quando os dois tratamentos -lítio e ATRA- foram aplicados concomitantemente (figura 13d). As células passaram ainda por contagem com azul de tripan para a melhor concretização dos dados. O resultado da contagem celular concordou com os dados da marcação em fluorescência, demonstrando a queda na viabilidade quando as células são expostas ao ATRA (figura 14). A viabilidade obtida na contagem das células pós tratamento foi PBS1X: 97%; ATRA: 75%; Lítio: 97%; Lítio + ATRA: 73%. Esses dados corroboram os dados anteriores da curva de crescimento no tratamento com lítio e ATRA.



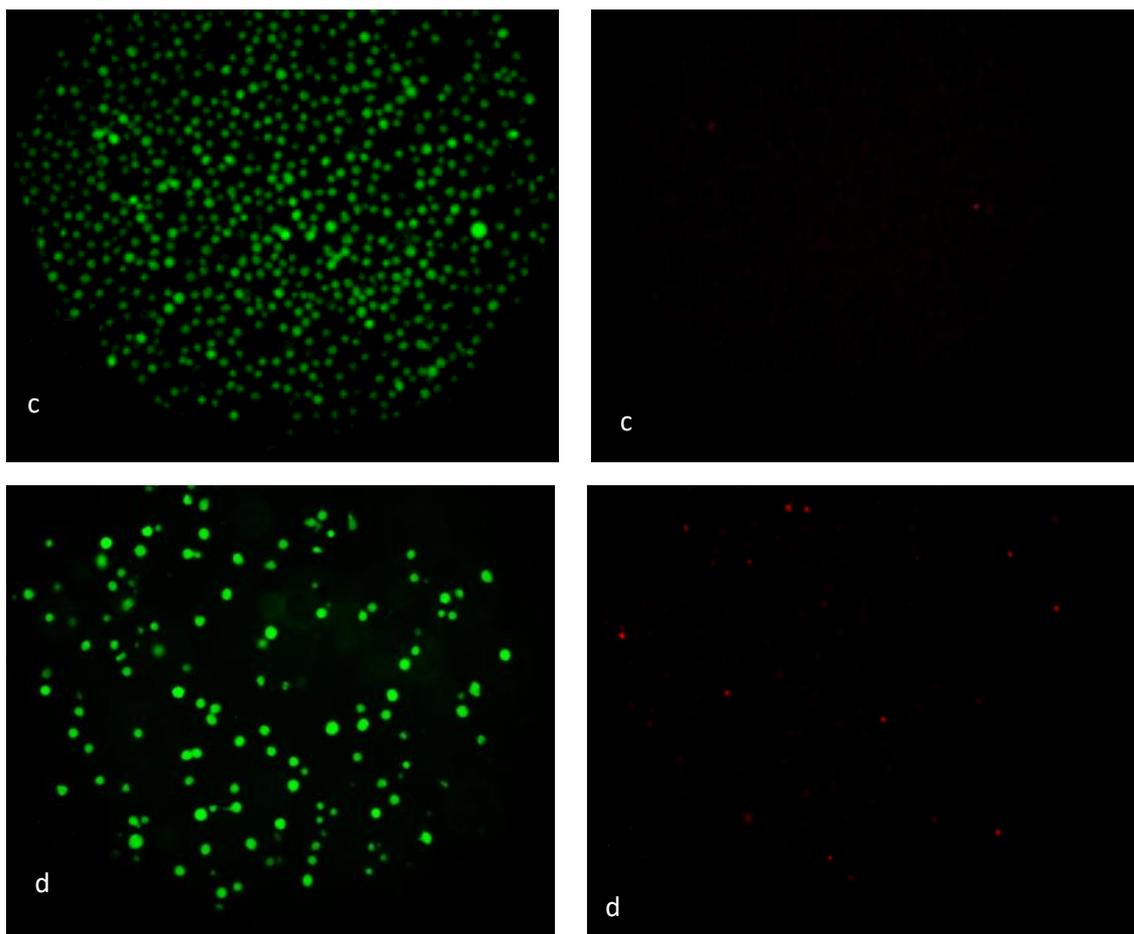


Figura 13. Marcação com FDA e IP. Células NB4 tratadas com PBS por 120 horas(A); células NB4 tratadas com ATRA (1uM) por 120 horas. (B); células tratadas com lítio (10mM) por 120 horas (C); células NB4 tratadas com lítio e ATRA por 120 horas (D). Marcação em verde (FDA, esquerda): células vivas, marcação em vermelho (IP, direita): células mortas;

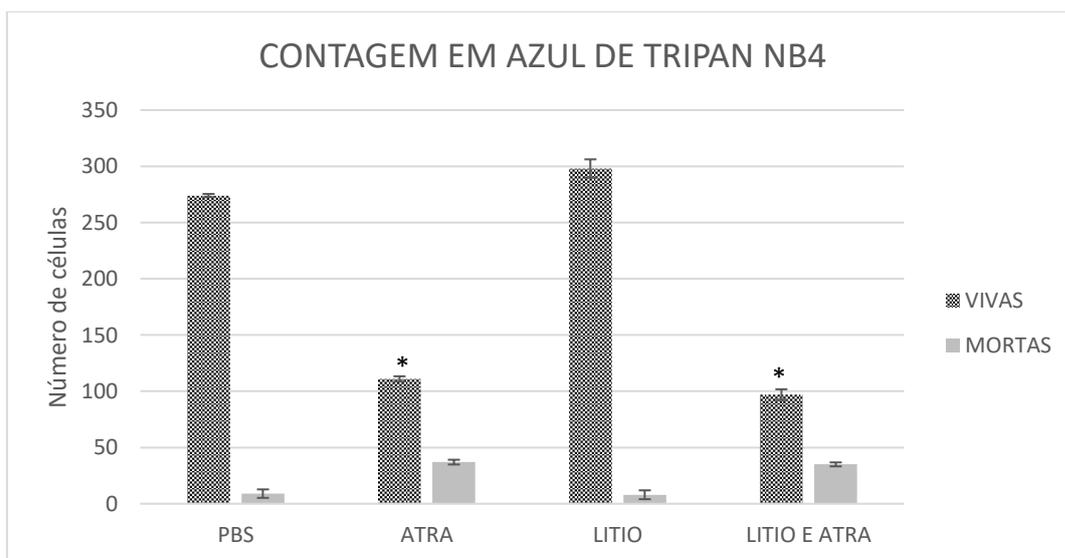
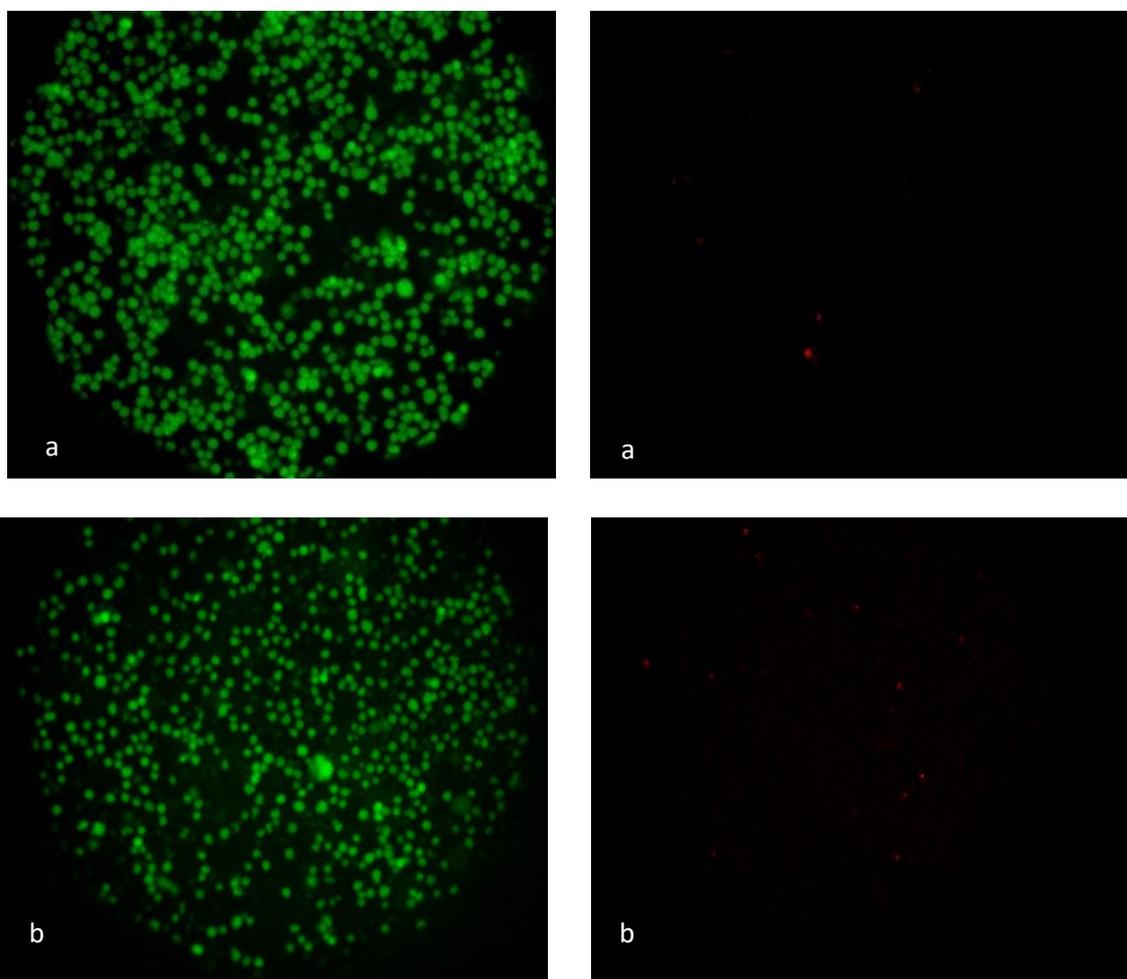


Figura 14 Contagem das células em azul de tripan em 120 horas de tratamento. A viabilidade encontrada foi PBS 97%; ATRA 75%; Lítio 97%; Lítio e ATRA 73%. * $p < 0,05$ quando comparado ao veículo PBS

Na marcação com IP e FDA, as células NB4-R2 emitiram fluorescência verde reduzida em comparação ao controle (PBS) quando tratadas com lítio à 10mM, por 120 horas (figura 15c). Compatível com o gráfico de avaliação do metabolismo das células NB4-R2 em exposição ao lítio (figura 10), a marcação com IP demonstrou um aumento de células não viáveis, evidenciando a citotoxicidade causada pelo tempo de exposição ao lítio. Não foi observada citotoxicidade significativa nas 120 horas de tratamento com ATRA (figura 15b). Quando os dois tratamentos foram aplicados simultaneamente, observou-se uma maior incidência de células apoptóticas, sugerindo o efeito citotóxico dominante do lítio no metabolismo celular (figura 15d).



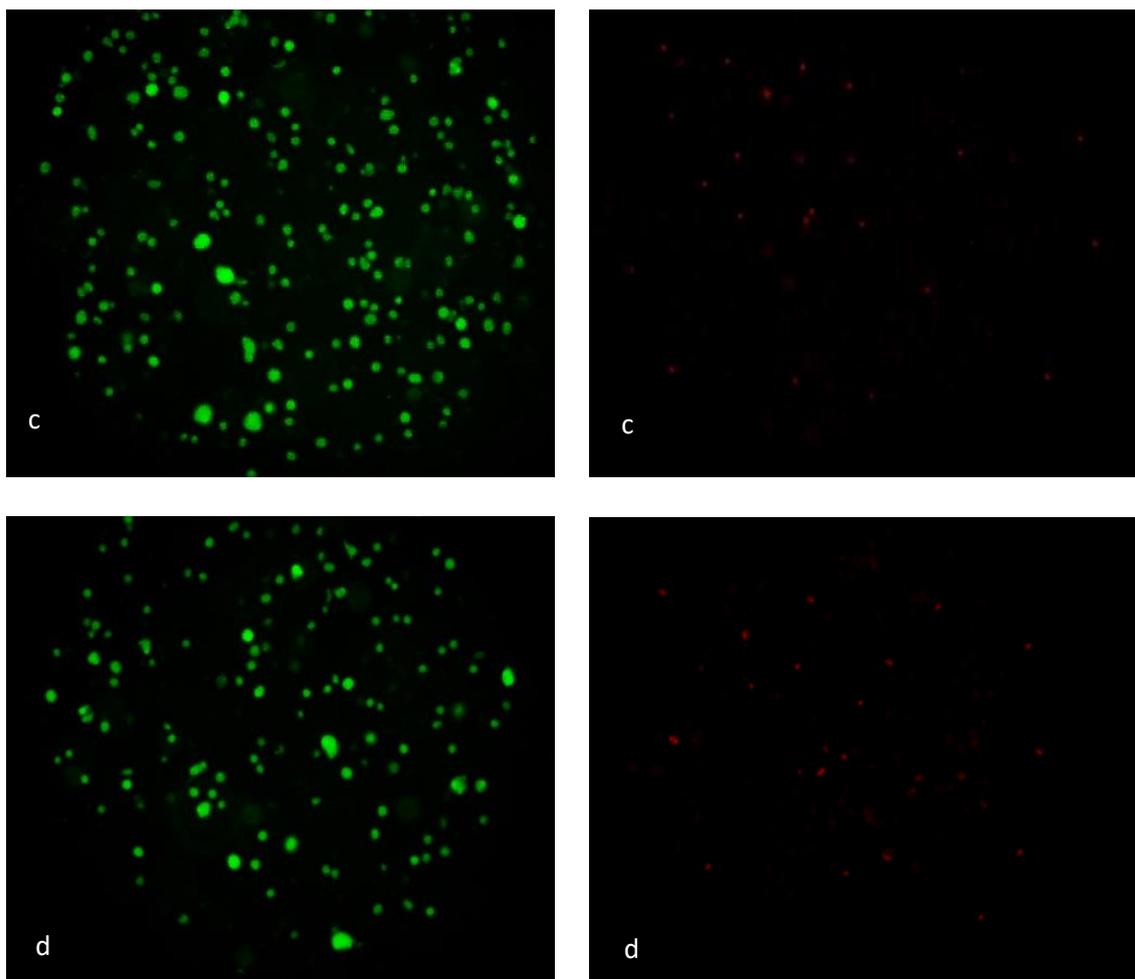


Figura 15. Marcação com FDA e IP: Células NB4R2 tratadas com PBS por 120 horas (A); células tratadas com ATRA (1 μ M) por 120 horas (B); células tratadas com lítio (10mM) por 120 horas (C); células tratadas com lítio e ATRA por 120 horas (D). Marcação em verde (FDA, esquerda): células vivas, marcação em vermelho (IP, direita): células mortas.

Posterior à marcação com FDA e IP, as células NB4-R2 foram, também, submetidas à contagem celular em azul de tripan para estimativa quantitativa da viabilidade celular durante os tratamentos. Na contagem, observamos que as células tratadas com lítio apresentaram uma viabilidade reduzida de 74%. Quando lítio e ATRA foram aplicados de forma simultânea, a contagem de células vivas observada foi de 69%. Notamos também que a população final de células reduziu em quase 50% se comparadas à população controle, entretanto, a taxa de redução de células vivas, não foi acompanhada proporcionalmente com o aumento de células mortas, o que indica que o lítio também, possivelmente, atenua a taxa de proliferação das células resistentes.

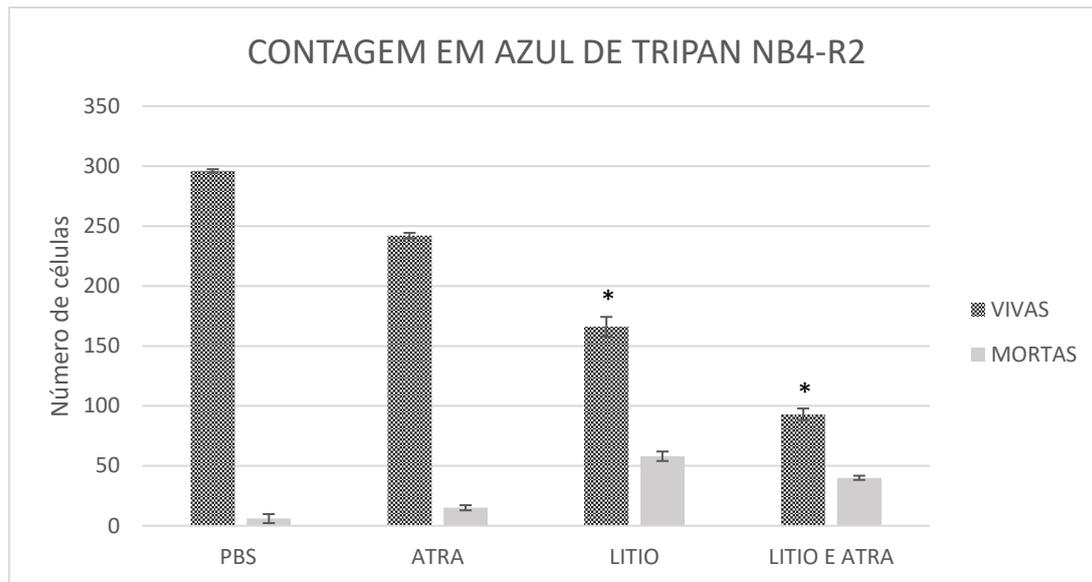


Figura 16. Contagem das células NB4-R2 em azul de tripan em 120 horas de tratamento. A viabilidade encontrada foi: PBS 98%; ATRA 94%; Lítio 74% e Lítio e ATRA 69%. * $p < 0,05$ quando comparado ao veículo PBS

6.4 Metilação do DNA

Para avaliar o potencial de hipometilação do lítio, as células foram plaqueadas e tratadas com PBS, lítio (10mM), ATRA (1uM) e lítio e ATRA pelo tempo de 24h, 72h e 120h. Após o tratamento, o DNA das células foi extraído pelo protocolo trizol, quantificado com o auxílio do Nanodrop e posteriormente submetido ao ensaio de metilação pelo método colorimétrico *MethylFlash™ Methylated DNA Quantification*, da Epigenetek.

No primeiro momento, foi analisado o perfil de metilação nas células NB4, durante o tratamento com lítio. Após a confecção da placa do kit de quantificação de metilação, as amostras foram submetidas à leitura no espectrofotômetro *Spectramax*, no comprimento de onda de 450nm. Após a leitura da absorbância das amostras, os resultados foram calculados de modo a obter a porcentagem de metilação em 5-mC%.

Nas células NB4, o lítio causou uma hipometilação significativa e gradual dependente do tempo de tratamento. Observou-se uma redução da metilação de mais de 50% do DNA total, já no primeiro dia de tratamento com lítio, quando

comparado com a amostra controle ($p < 0,001$). A hipometilação causada pelo tratamento com lítio continuou sendo observada nos tempos 72h e 120h, de forma menos intensa, chegando próximo a 15% de metilação global do DNA ao fim do tratamento, conforme mostra a figura 17.

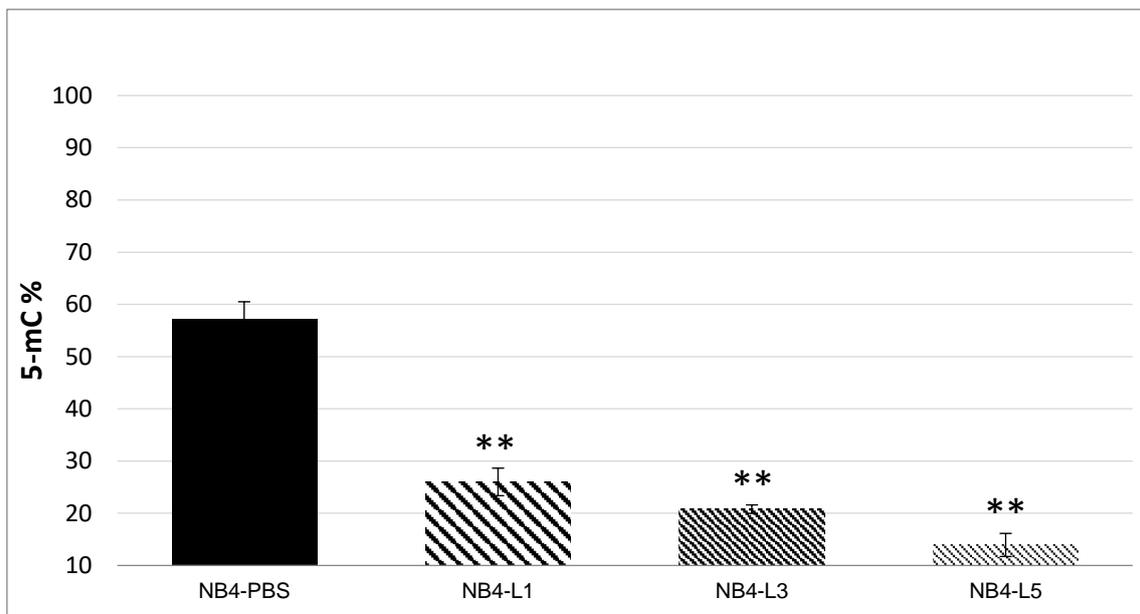


Figura 17. Metilação do DNA total de células NB4 expostas ao tratamento com lítio na dose de 10mM. NB4-L1: 24h de tratamento; NB4-L3: 72h de tratamento; NB4-L5: 120h de tratamento. ** $p < 0,001$ quando comparado ao controle.

Posterior a análise do efeito de hipometilação com tratamento lítio nos tempos de 24h, 72 e 120h, foi analisado o efeito da metilação do lítio, quando usado concomitantemente com o ATRA. O experimento de metilação foi desenvolvido da mesma forma como citado no ensaio anterior. Somado aos poços de tratamento com lítio e ATRA, as células NB4 ainda foram tratadas somente com ATRA a 1 μ M por 120h. O resultado demonstra um perfil de hipermetilação causado quando ATRA é utilizado sozinho, possivelmente relacionado com a supressão da proliferação. Quando aplicados de forma simultânea, o lítio hipometila o DNA total gradualmente, alcançando em torno de 17% de metilação, no tempo de 120h de tratamento.

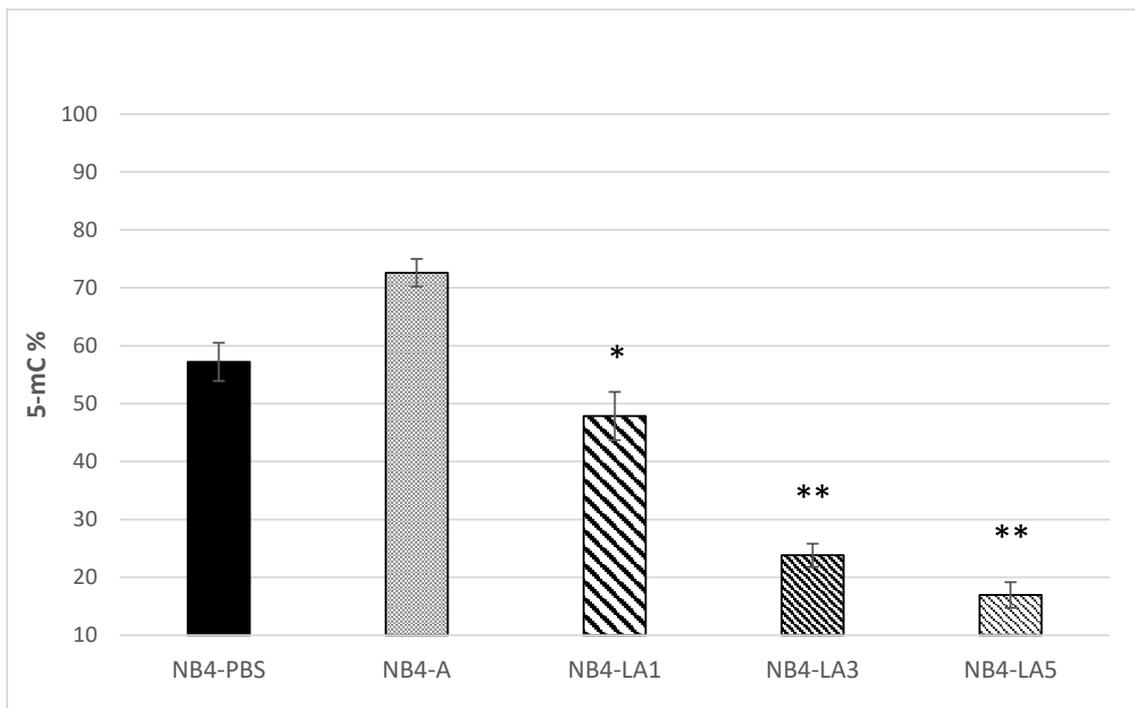


Figura 18 Metilação do DNA total das células NB4 quando expostas ao tratamento com lítio e ATRA. NB4-A: tratamento só com ATRA; NB4-LA1: 24h de tratamento com lítio e ATRA; NB4-LA3: 72h de tratamento com lítio e ATRA; NB4-LA5: 120h de tratamento com lítio e ATRA. * $p < 0,05$ quando comparado ao ATRA. ** $p < 0,001$ quando comparados ao controle.

O ensaio de metilação do DNA total também foi realizado com as células NB4-R2. Assim como as células NB4, foi analisado primeiramente a metilação do DNA das células quando expostas ao lítio na dose de 10mM por 24h, 72h e 120h. O DNA das células, após o tratamento, foi isolado, quantificado e analisado pelo kit *MethylFlash™ Methylated DNA Quantification*.

Os resultados do ensaio de metilação das células NB4-R2 demonstrou que as células resistentes ao ATRA já possuem o DNA hipometilado (controle) e que o tratamento com lítio, nos tempos de 72h e 120h, induz ainda mais a hipometilação a níveis críticos, inferiores à 10%.

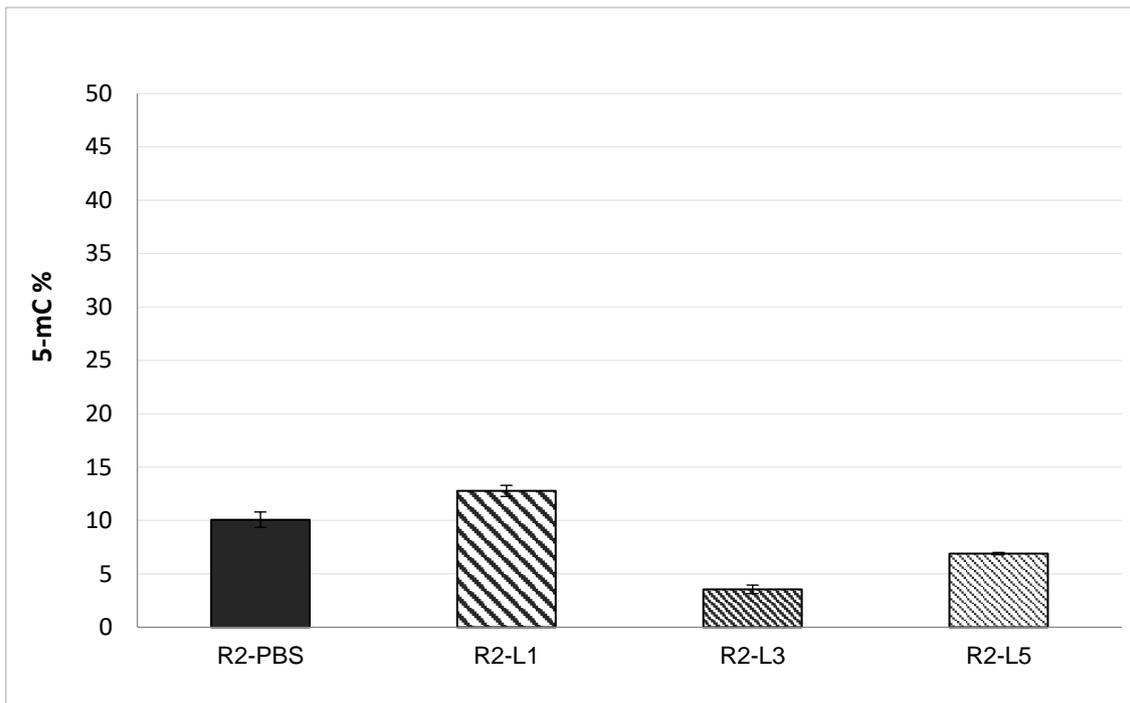


Figura 19 Metilação do DNA total de células NB4R2 expostas ao tratamento com lítio na dose de 10mM R2-L1: células NB4R2 tratadas por 24h; R2-L3: células NB4R2 tratadas por 72h; R2-L5: NB4R2 tratadas por 120h. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Foi analisado também o padrão de metilação no DNA das células NB4-R2, quando expostas ao tratamento concomitante com lítio a 10mM e ATRA a 1uM, pelo período de 24h, 72h e 120h. O experimento foi executado da mesma forma que o descrito para as células NB4. Como resultado, observamos um aumento da metilação do DNA quando as células são tratadas com ATRA, embora não significativo. As células tratadas com lítio e ATRA, sofrem uma hipermetilação acentuada nas primeiras 72 horas de tratamento, seguida de uma hipometilação crítica, próxima a 5%, no tempo de 120 horas.

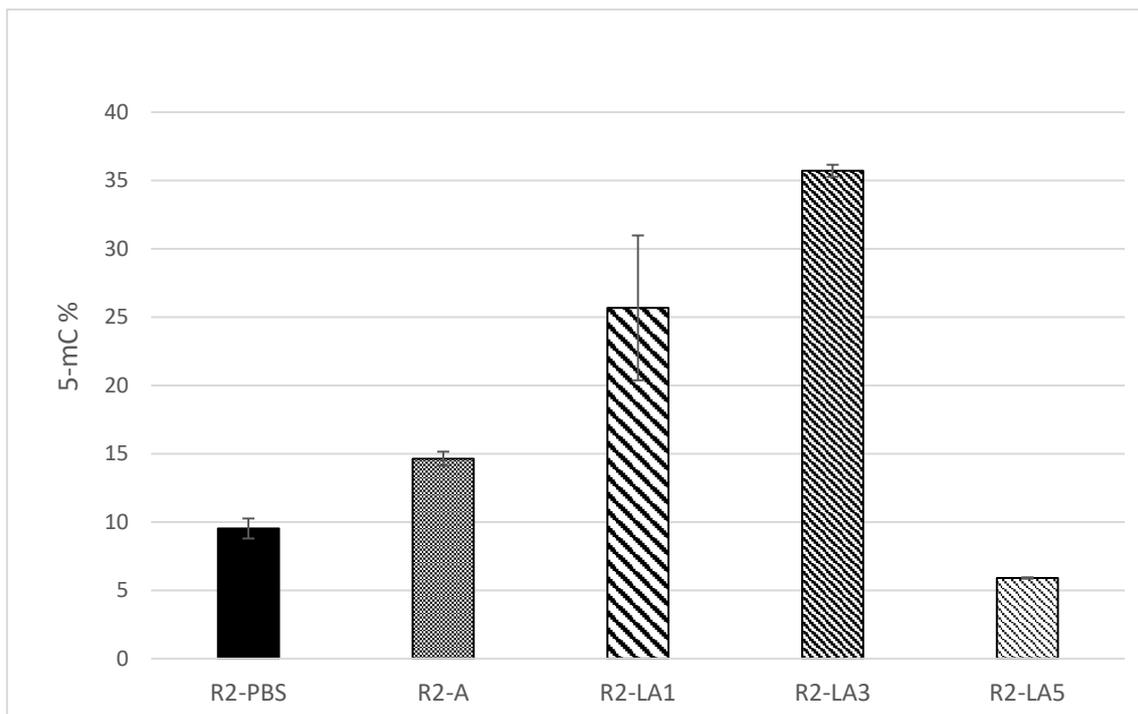


Figura 20 Metilação no DNA total de células NB4R2 expostas ao tratamento com lítio e ATRA. R2-LA1: células NB4R2 tratadas por 24h; R2-LA3: células NB4R2 tratadas por 72h; R2-LA5: NB4R2 tratadas por 120h.

6.5 Análise do ciclo celular

6.5.1 Ciclo celular

Após a sincronização e marcação das células NB4, a leitura do ciclo celular foi obtida por análise de citometria nos tempos de 0h à 16h, a cada 2h. O grupo tratado com lítio foi comparado com o grupo não tratado, sendo este tratado apenas com o veículo. A exposição das células leucêmicas ao tratamento com 10mM de lítio, promoveu um deslocamento de células do estágio G0/G1 para o estágio mitótico G2/M, sem diferença da população em fase de síntese de DNA, fase S. A população em estágio G0/G1 reduziu de 58% para 40% quando expostas ao lítio. Da mesma forma, a população em estágio G2/M aumentou de 27% para 46% quando submetidas ao tratamento com lítio por 16h (figura 23).

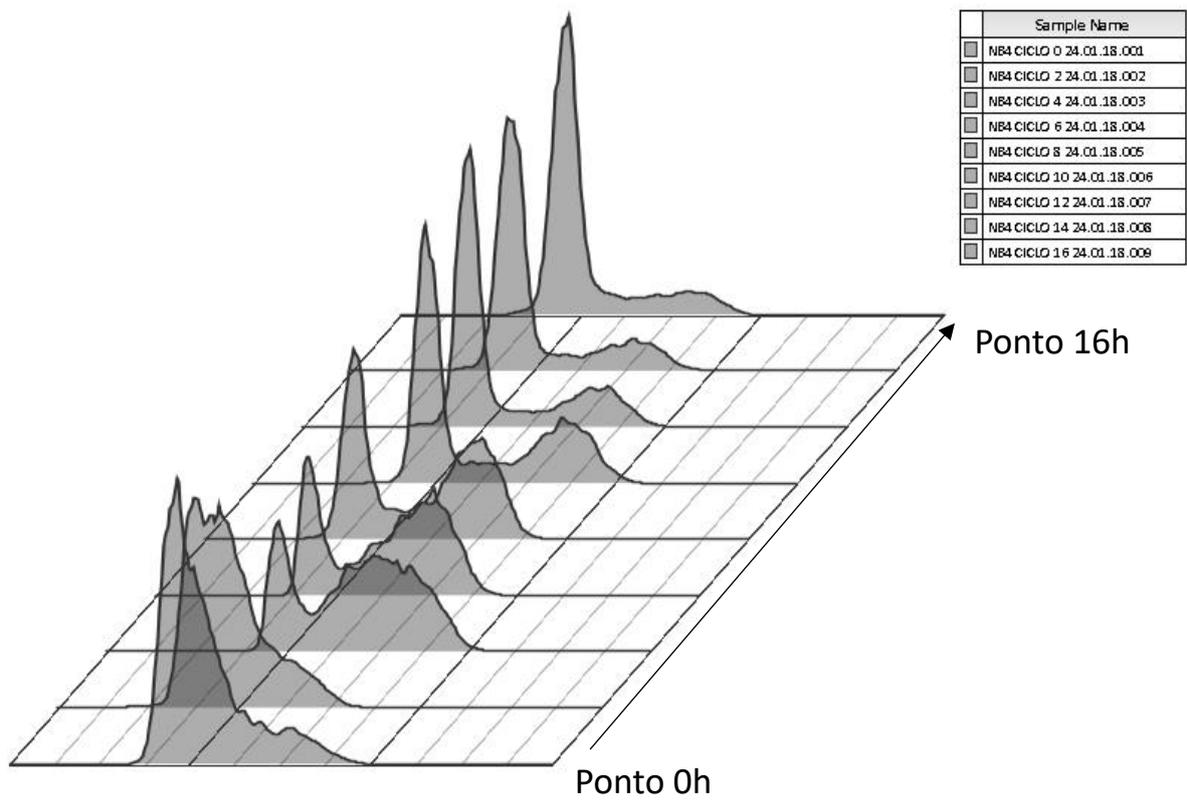


Figura 21. Histogramas obtidos a partir da análise de ciclo celular. Células NB4 (veículo) sincronizadas, entrando em estágios cíclicos a partir de ponto 0h.

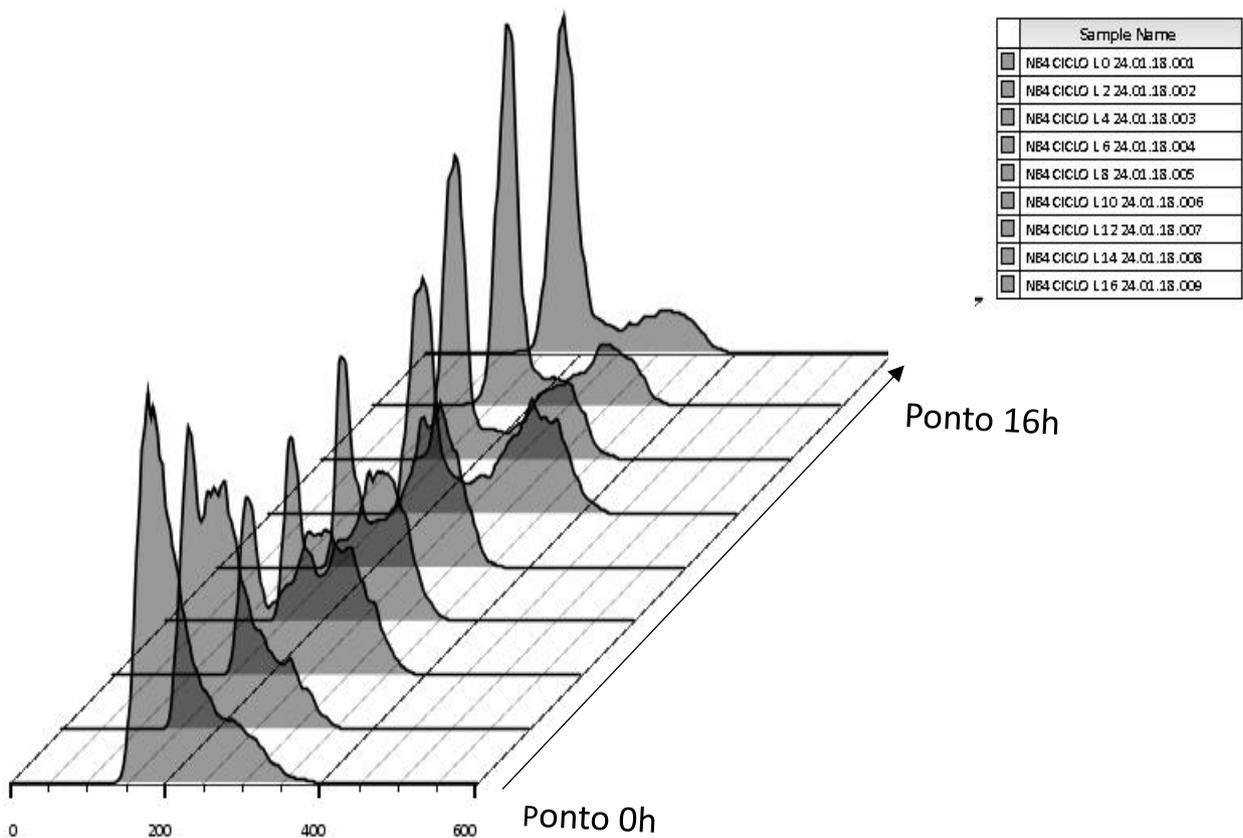


Figura 22 Histogramas obtidos a partir da análise de ciclo celular. Células NB4 tratadas com lítio, sincronizadas, entrando em estágios cíclicos a partir de ponto 0h.

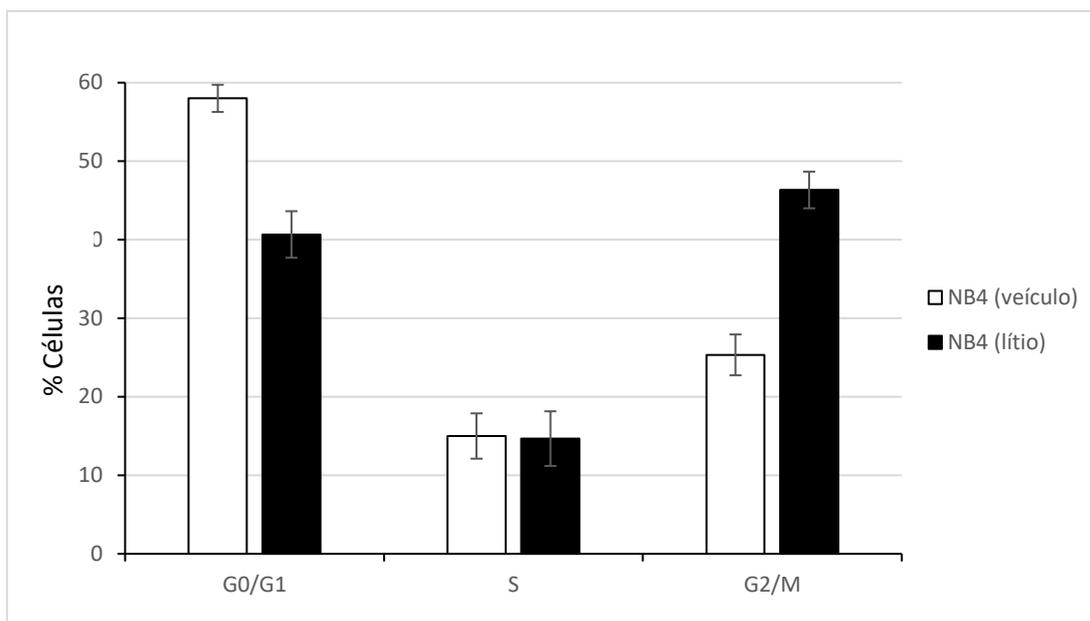


Figura 23. Quantificação de células nos estágios do ciclo celular e comparação da população não tratada (veículo) com a população tratada com lítio.

6.5.2 Side population

Após observar a mudança de ciclo celular promovida pelo tratamento com lítio nas células NB4, submetemos as células ao ensaio de *side population* no intuito de observar se o arraste no ciclo celular, promovido pelo tratamento com lítio, influencia na proporção de células imaturas quiescentes, *stem cell-like*.

O tratamento com lítio promoveu uma pequena redução na população *side population* (SP) quando comparado ao grupo de células tratadas apenas com o veículo, como demonstram as figuras 24 e 25. O dado reflete uma tendência do lítio em reduzir a população de células mais imatura quiescente, denominadas *stem cell-like*. O perfil do resultado do tratamento com lítio foi semelhante ao obtido quando analisamos o resultado do controle negativo (verapamil), sendo os dois grupos representados por menos de 1% de células progenitoras. Entretanto, o resultado não demonstrou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos veículo (PBS) e tratados com lítio.

Side population é um ensaio muito bem padronizado para observação de células-tronco e, portanto, células imaturas. A utilização de células de linhagem da LPA pode ter interferido no resultado, já que possuímos uma homogeneidade maior de células, do que em amostras biológicas, sendo mais difícil a observação de células que se assemelhem à células tronco.

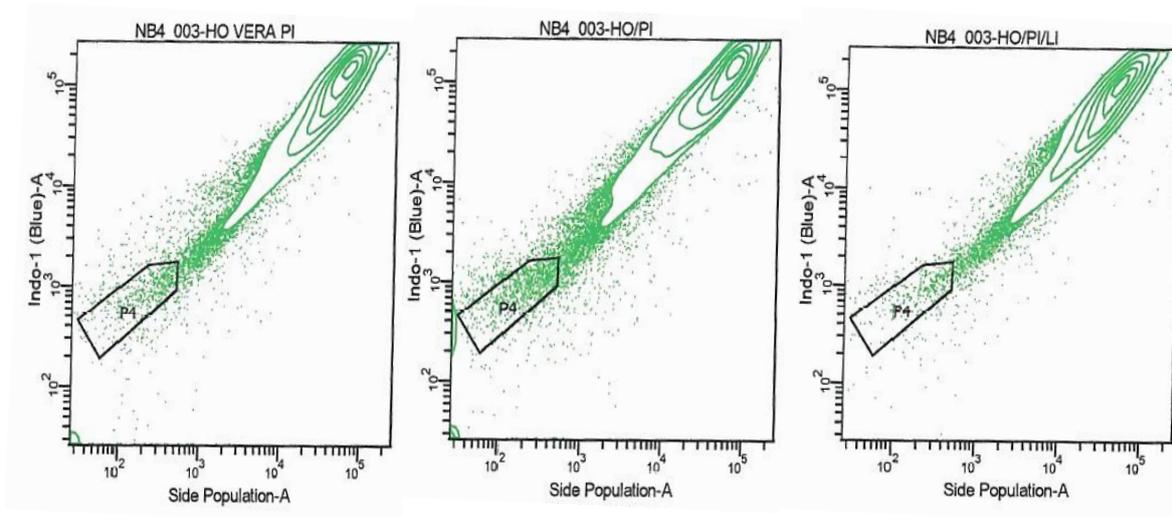


Figura 24 *Side Population* de células NB4. Verapamil (controle negativo), PBS1x (veículo) e células NB4 tratadas com lítio, respectivamente.

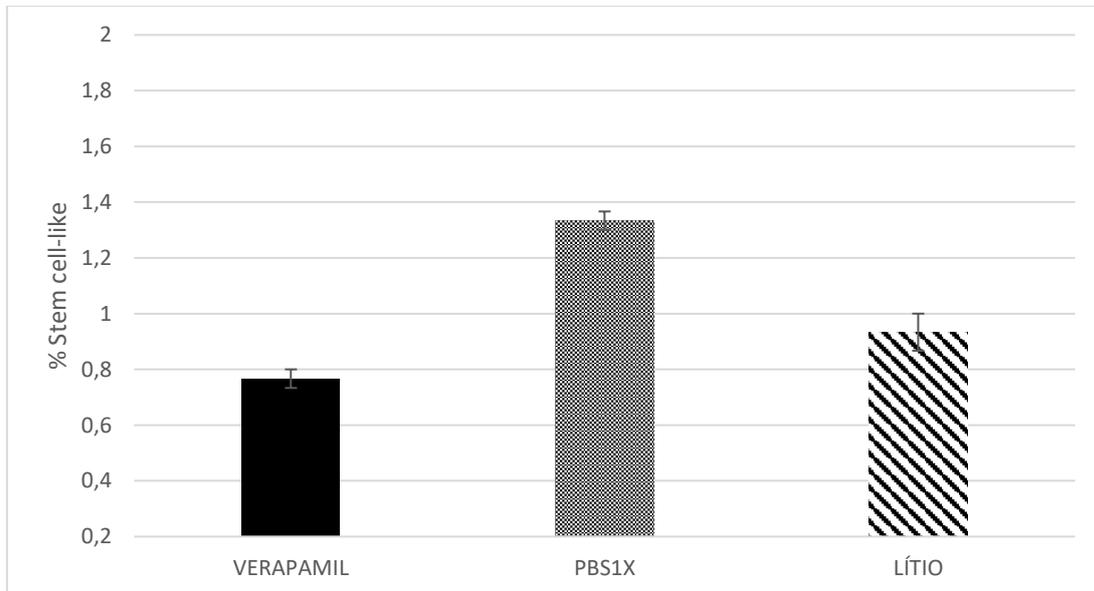


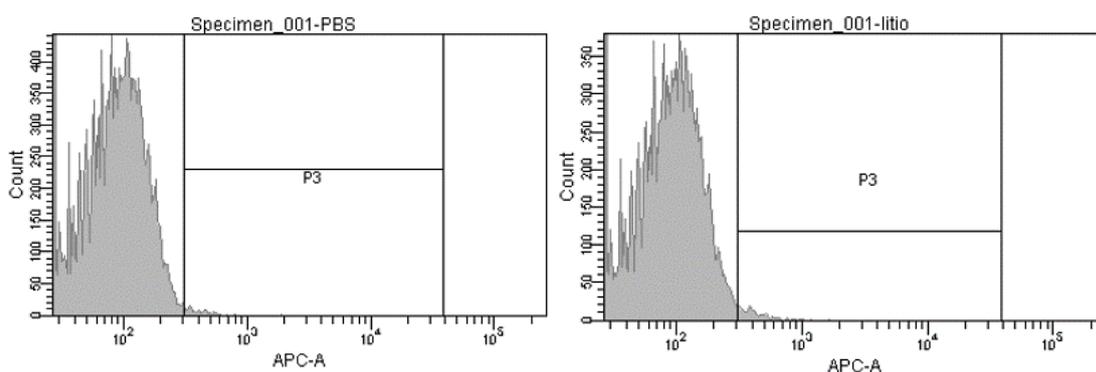
Figura 25. Gráfico representando a quantificação das chamadas *stem cell-like*. * $p < 0,05$

6.6 Diferenciação granulocítica

6.6.1 Marcação com CD11b e morfologia

Para avaliação da diferenciação granulocítica, as células, após o plaqueamento e tratamento por 120h com Lítio (10mM), ATRA (1uM) e Lítio e ATRA, foram submetidas ao ensaio de citometria de fluxo com marcação do anticorpo CD11b. O experimento foi executado conforme descrito em materiais e métodos. Após a marcação e incubação das células, o resultado foi obtido a partir da leitura de fluorescência com o citômetro FACS Aria da *BD Biosciences*. A marcação positiva com CD11b indica maturação da linhagem hematológica.

As células NB4, quando tratadas com ATRA, demonstraram um padrão de diferenciação esperado, com marcação positiva para CD11b em torno de 60%. Quando o lítio foi aplicado, juntamente com o tratamento de diferenciação – ATRA- observou-se um aumento na diferenciação final próximo à 80%. As células tratadas somente com lítio não demonstraram marcação positiva para diferenciação dos promielócitos, o que sugere, possivelmente, o efeito potencializador do lítio sobre o tratamento ATRA.



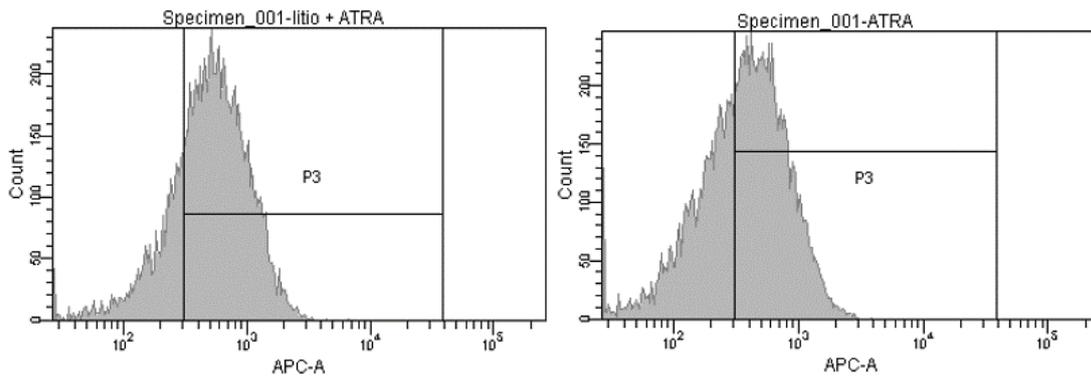


Figura 26 Histogramas gerados na leitura da marcação das células NB4 com CD11b. PBS, Lítio, Lítio+ATRA e ATRA, respectivamente

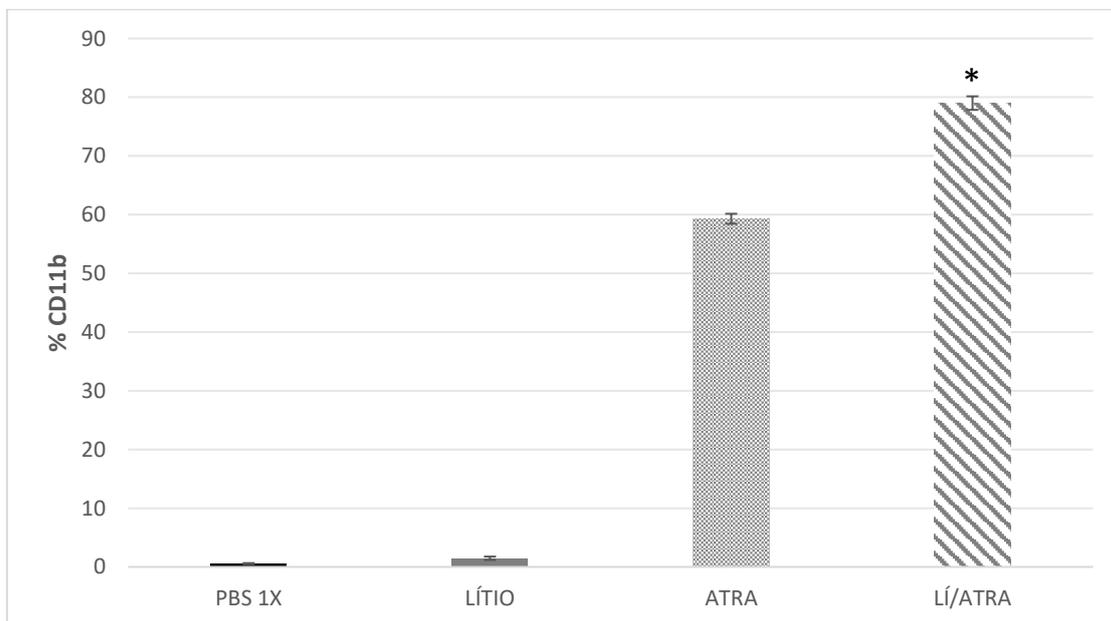


Figura 27. Análise da expressão do CD11b em células NB4 tratadas com lítio e ATRA. * $p < 0,05$.

Somado à marcação com CD11b para avaliação da diferenciação dos promielócitos, as células NB4 foram, também, submetidas à coloração em lâmina para observarmos a mudança de morfologia das células ao final do tratamento. A confecção das lâminas foi realizado com o corante hematológico *Leishmann*. O procedimento foi descrito em materiais e métodos.

O resultado da coloração é apresentado na figura 28. A maturação das células promielocíticas é visualizada através da presença de segmentação nuclear.

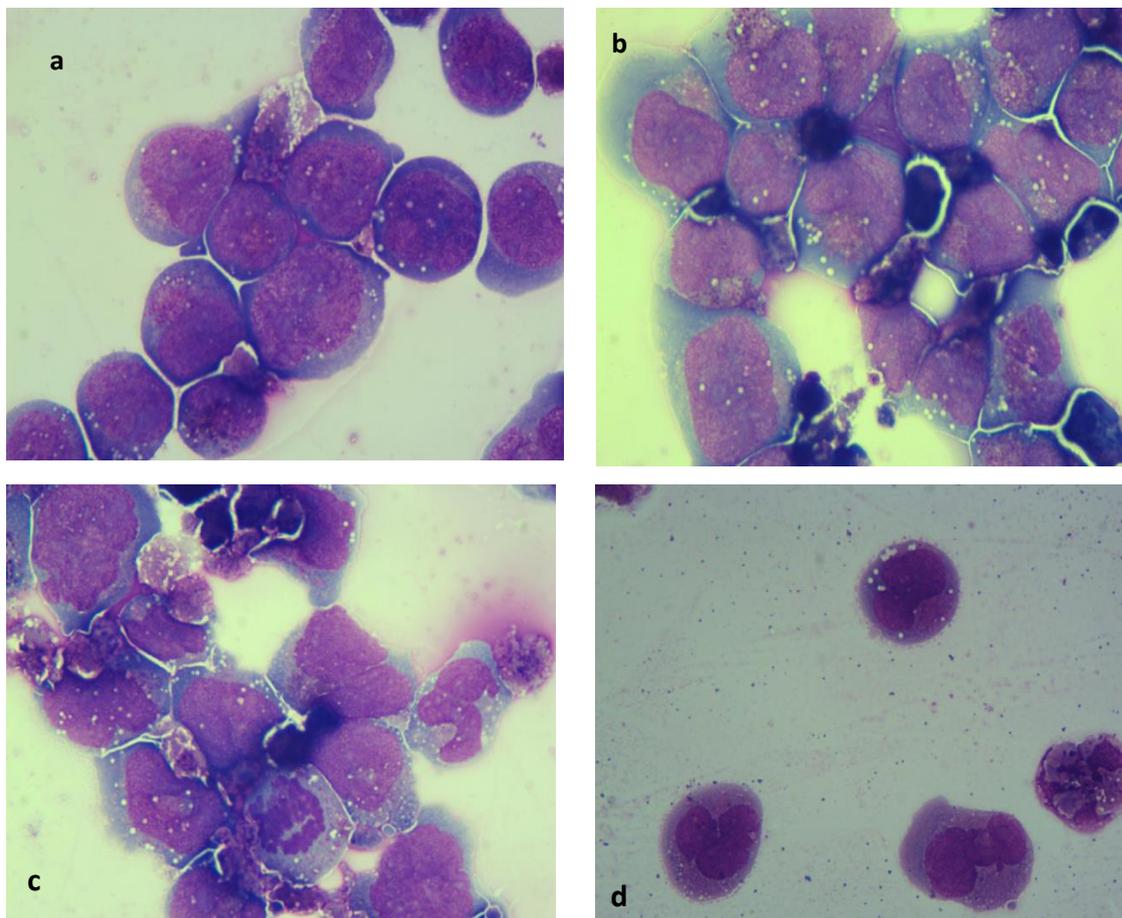


Figura 28. Lâminas confeccionadas com coloração Leishman. (A) células NB4 tratadas com PBS. (B) células tratadas com Lítio. (C) células NB4 tratadas com ATRA. (D) células NB4 tratadas com Lítio e ATRA.

Avaliamos também se o tratamento com lítio e ATRA influencia na resistência das células NB4-R2 à maturação. As células foram plaqueadas e tratadas de forma idêntica às células NB4. Após o fim do tratamento, as células foram marcadas com anticorpo CD11b e submetidas à leitura no citômetro FACS Aria, da *BD Biosciences*.

Conforme o esperado para células resistentes à terapia de diferenciação, as células NB4-R2 não maturam quando expostas ao tratamento de diferenciação ATRA. Quando aplicados de forma conjunta, lítio e ATRA, também não conseguiram promover a diferenciação dos promielócitos (Figuras 29 e 30), mostrando que o lítio, quando em contato com as células resistentes, está envolvido apenas com a citotoxicidade da população promielocítica resistente conforme demonstrado nos ensaios de metabolismo celular e viabilidade.

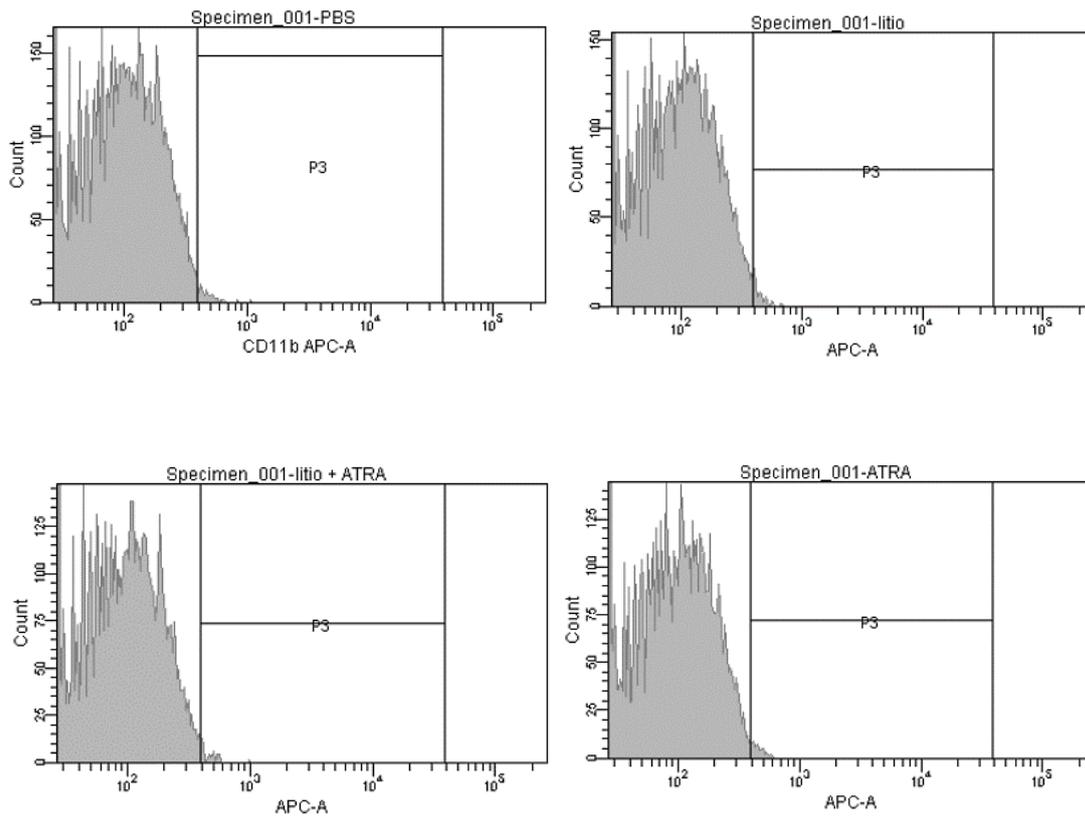


Figura 29. Histogramas gerados na leitura da marcação das células NB4- R2 com CD11b. PBS, Lítio, Lítio+ATRA e ATRA, respectivamente

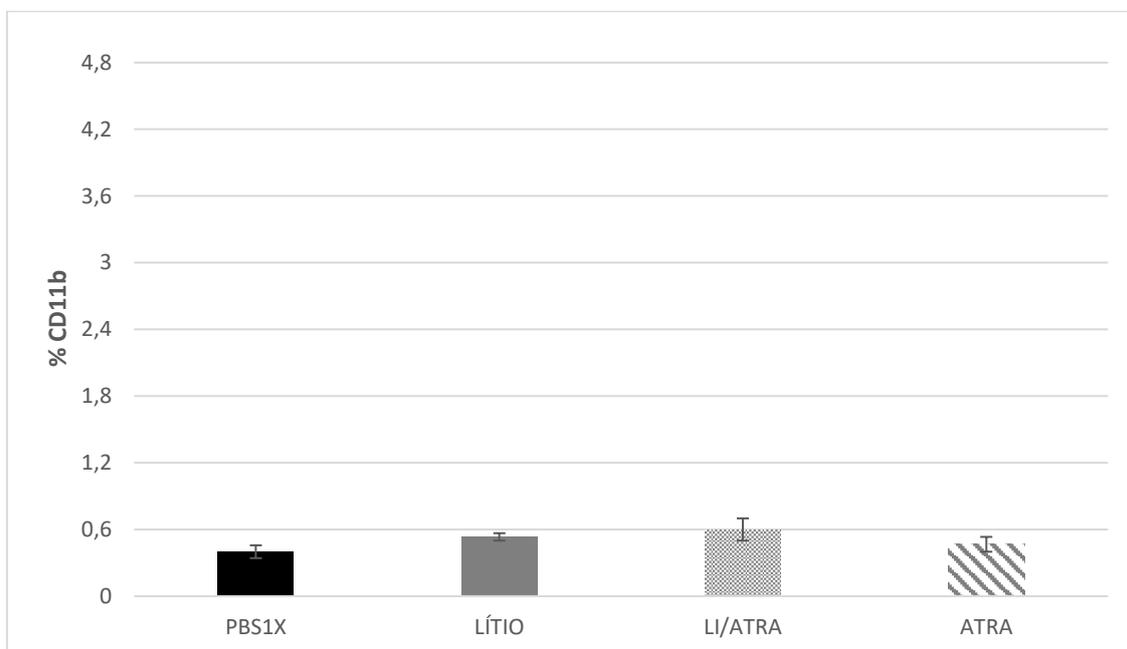


Figura 30. Análise de expressão de CD11b em células NB4-R2 tratadas com lítio e ATRA.

As células NB4R2 também foram submetidas à coloração com *Leishman*, para avaliação de morfologia, mostradas na figura 31.

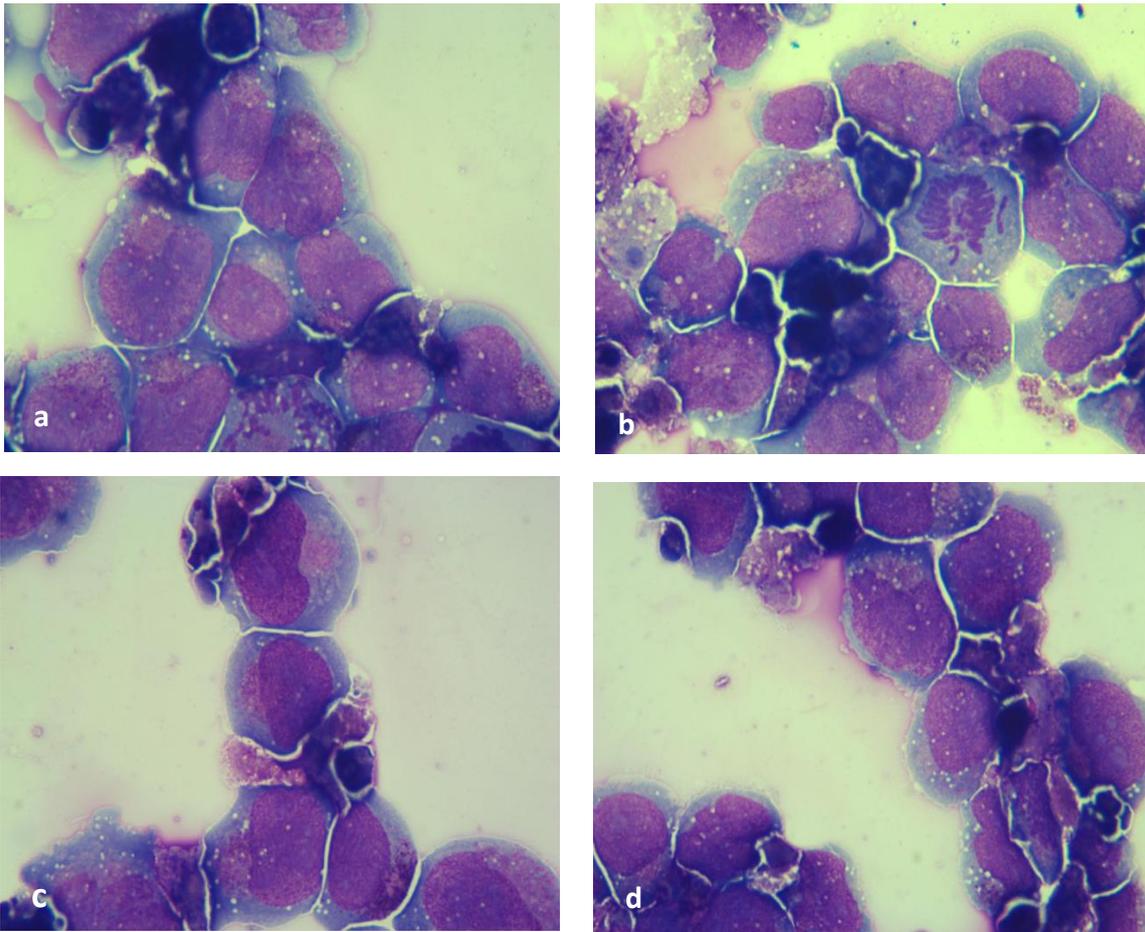


Figura 31. Lâminas confeccionadas com coloração Leishman. (A) células NB4R2 tratadas com PBS. (B) células NB4R2 tratadas com Lítio. (C) células NB4R2 tratadas com ATRA. (D) células NB4R2 tratadas com Lítio e ATRA.

7. DISCUSSÃO CONCLUSIVA

Descrito como ativador da via WNT, alguns estudos relatam o aumento da proliferação *in vitro* de células leucêmicas quando tratadas com dosagens baixas de lítio, até 10mM (BECKER; TYOBKA, 1990; GAUWERKY; GOLDE, 1982). Outros estudos também demonstraram que o tratamento com lítio promove a prisão de ciclo celular em G2/M, em diferentes tipos celulares. Envolvido com a proliferação e mudanças no ciclo celular, o lítio despontou, neste estudo, como um interessante elemento para análise da atenuação da quiescência celular, um dos focos de estudo para minimização de falhas terapêuticas e recidiva da LPA.

A nível de DNA, pesquisas também demonstram o *downregulation* de genes envolvidos em progressão do ciclo celular, replicação de DNA e genes responsáveis pela função mitocondrial em células tronco hematopoiéticas quiescentes (CHEUNG; RANDO, 2013). Neste enfoque, Götze et al., descreveu o decréscimo progressivo de metilação no DNA global, durante a ativação de células hepáticas previamente quiescentes, corroborando a associação da metilação do DNA, com o estado de dormência celular. Desta forma, neste estudo, avaliamos se o lítio, na dosagem de 10mM, promove um arraste de células, do ciclo quiescente G0 para um estágio cíclico, de maneira a suscetibilizar uma população maior de células ao tratamento ATRA. Avaliamos, também, o perfil de metilação das células expostas ao tratamento com lítio. Observamos, por fim, se o tratamento com lítio em células de leucemia promielocítica aguda, orientam a potencialização da diferenciação mieloide promovida pelo ATRA.

Inicialmente, avaliamos o perfil do metabolismo celular de células de leucemia promielocítica aguda, NB4, quando expostas à concentrações de até 10mM de lítio em diversos tempos. Como o esperado, não foi observada redução de metabolismo celular em nenhum período ou dose de tratamento, até 10mM de lítio. Contudo, quando submetemos as células NB4R2 ao mesmo ensaio,

observamos que, mesmo em concentrações baixas, o lítio causou uma redução significativa do metabolismo celular, dependente do tempo, em todas as concentrações. Esse comportamento repetiu-se no ensaio de MTT com tratamento concomitante de lítio e ATRA. O aumento de células não viáveis pôde ser visualizado na marcação com FDA e IP. Esta citotoxicidade observada pelo tratamento com lítio em células NB4-R2, está associado, provavelmente, ao estado de metilação do DNA destas células. O tratamento com lítio causou uma hipometilação acentuada no DNA das células - que já apresentavam um perfil de desmetilado- chegando próximo à 5% de 5-mC do DNA total, ao final do tratamento. Essa hipometilação do DNA, a qual é considerada crítica, está relacionada com a morte celular. Khan e colaboradores demonstraram em seu estudo que a hipometilação acentuada promovida pelo agente desmetilador 5-aza-2'-deoxycytidine (5AzadC), durante o tratamento de células mieloides, desmonta em diferentes vias apoptóticas (KHAN et al., 2008)

O estudo do metabolismo celular foi executado também para avaliação do tratamento do lítio, concomitante à terapia de diferenciação ATRA, nas células NB4. O resultado evidencia a não-citotoxicidade do lítio na dosagem de 10mM. O lítio também não potencializou a supressão proliferativa promovida pelo tratamento com ATRA. As células NB4 foram suscetíveis à terapia com ATRA, como o esperado, reduzindo a proliferação e aumentando a apoptose. Esses dados são confirmados na marcação com FDA e IP, bem como na contagem celular em azul de tripan. Os resultados evidenciam uma combinação viável no uso dos dois fármacos concomitantemente em células de leucemia promielocítica aguda.

O tratamento com lítio nas células NB4, em dose referida como não tóxica, não apresentou mudanças metabólicas significativas. Entretanto, a nível de ciclo celular, o tratamento com lítio promoveu um arraste de ciclo para o estágio G2/M. Concordante à isso, estudos evidenciam o deslocamento e prisão de ciclo celular no estágio G2/M em outros tipos celulares, quando tratados com lítio (DE GROOT et al., 2014; OLMEDA et al., 2003; WANG et al., 2008). Outros dados demonstram que o tratamento com lítio, em células hepáticas e renais, leva ao acúmulo da fosforilação da proteína cdc-2, *cycle division cell*, através do aumento da atividade da proteína CDK1, *cyclin dependent kinase 1*. A proteína

cdc-2 fosforilada, resulta no deslocamento do ciclo celular para o estágio G2/M (DE GROOT et al., 2014; WANG et al., 2008). Esse pode ser um dos fatores causadores do aumento da população em G2/M em células NB4.

Somado ao resultado do ciclo celular, a análise do *side population*, embora sem diferença estatisticamente significativa, demonstrou que o lítio tende a reduzir a população celular imatura quiescente, denominada *stem cell-like*. O resultado apresentado pelo ensaio demonstra uma redução celular da população quiescente do grupo tratado com lítio, quando comparada ao grupo tratado apenas com o veículo, PBS1X. O perfil do resultado do tratamento com lítio foi semelhante ao obtido quando analisamos o resultado do controle negativo (com bloqueador verapamil), sendo os dois grupos representados por menos de 1% de células progenitoras quiescentes. É interessante a realização dessa análise em células primárias, tratadas com lítio, visto que o ensaio é bem descrito para observação de grupos celulares *stem cell-like*, sendo as amostras biológicas, como a MO, mais ricas em células com este perfil.

O deslocamento do ciclo celular para um estágio mitótico, somado à esta tendência, mesmo que tênue, na redução de células progenitoras quiescentes, desponta no lítio, um interessante aliado no estudo da indução da ativação de células tronco leucêmicas. Esse é um dado relevante, visto que a presença de células-tronco leucêmicas, no seu estado quiescente, sem ciclo celular ativo e com baixo metabolismo celular, são inertes ao tratamento de diferenciação, sendo este, um dos focos de estudo em casos de recidiva da LPA.

A nível de DNA, nas células NB4, o lítio causou uma hipometilação gradual e progressiva, dependente do tempo, atingindo índices próximos à 15% de metilação no DNA total, ao fim do tratamento. Desjobert e colaboradores demonstraram em seu estudo que a hipometilação, induzida pelo agente desmetilador 5AzadC, promove um deslocamento de células do estágio G0/G1 para G2/M em células de leucemia promielocítica aguda (DESJOBERT et al., 2015). Corroborando esses dados, nossos resultados demonstram que a hipometilação causada pelo tratamento com lítio pode estar envolvida, também, na condução das células do estágio G0/G1, para o estágio cíclico G2/M, mostrado no ensaio de ciclo celular, muito provavelmente, por expressão de genes envolvidos com ciclo celular. Adendo à isso, o estudo proposto por *Cancer*

Genome Atlas Research Network. demonstra uma hipermetilação no DNA de pacientes com um pior prognóstico da LPA, e ainda, Kroeger e colaboradores evidencia índices de hipermetilação ainda mais altos em momentos de recidiva da doença. Dessa forma, além de possivelmente suscetibilizar uma população maior de células leucêmicas ao tratamento, através do deslocamento do ciclo celular, a hipometilação promovida pelo tratamento com lítio, pode contribuir nos casos de maus prognósticos da doença (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al., 2013; KROEGER et al., 2008)

Jedema e colaboradores demonstraram que células de leucemia mieloide aguda, quando em estágio G0/G1, são resistentes ao tratamento quimioterápico, entretanto, após a sincronização e tratamento, as células deslocadas para fase S, G2, e M foram mais suscetíveis à quimioterapia citotóxica, aumentando a proporção de células apoptóticas (JEDEMA et al., 2004). Dessa forma, a promoção do deslocamento de um estágio de menor metabolismo basal, como G0/G1, para um estágio de maior atividade cíclica, como S, G2 e M é, sem dúvidas, uma tentativa válida para o estudo da melhor suscetibilização das células leucêmicas ao tratamento da doença.

Alguns estudos já tentaram promover o despertar de células-tronco quiescentes *in vivo* (ESSERS et al., 2009; SAITO et al., 2010). O estudo de Essers e colaboradores fizeram uso de citocinas para ativação das células quiescentes, seguido de uma quimioterapia inibitória. O teste resultou em morte dos animais, pois o tratamento concomitante de citocina e 5-Fluorouracil, exauriram a maioria das células-tronco da medula óssea, desencadeando quadros graves de anemia, seguido de morte dos animais. Nesse contexto, o potencial de arraste de ciclo celular, observado em células tratadas com baixas dosagens de lítio, desponta em um resultado animador, visto que o lítio é um composto bem tolerado pelo organismo humano. A viabilidade do tratamento do lítio, concomitante à terapia de diferenciação, elimina a possibilidade do exaurimento das células-tronco hematopoéticas por um tratamento citotóxico.

Quando aplicado sozinha, a terapia de diferenciação promovida pelo ATRA, apresentou um pequeno deslocamento para cima da metilação total no DNA das células NB4 e NB4R2, embora não significativo. Alguns estudos (MARTENS et al., 2010; VAN GILS; VERHAGEN; SMIT, 2017) já demonstraram

alteração não significativa do tratamento com ATRA na metilação do DNA, sugerindo que a diferenciação promovida pelo tratamento é conseguida com outro evento epigenético. Um estudo recente, proposto por Sunami e colaboradores exibe seus dados consistentes com a acetilação de histonas como requisito para a diferenciação promovida pelo ATRA (SUNAMI et al., 2017).

O lítio foi aplicado de forma concomitante com ATRA durante 24, 72 e 120 horas, em ambas as linhagens NB4 e NB4-R2. O tratamento simultâneo foi submetido à análise de metilação do DNA com o propósito de observar o potencial hipometilador do lítio, mesmo na presença do ATRA. Os resultados do tratamento das células NB4 revelam que o lítio mantém seu potencial de hipometilação do DNA total, mesmo na presença de outro fármaco. O comportamento da redução de 5-mC foi semelhante ao tratamento com lítio sozinho. A hipometilação mostrou-se progressiva e gradual, dependente do tempo de exposição ao lítio, chegando à índices inferiores à 20% de DNA total metilado. Essa hipometilação causada pelo lítio, com consequente favorecimento da expressão gênica, pode também estar envolvida na potencialização da diferenciação granulocítica promovida quando o lítio e o ATRA são aplicados concomitantemente.

Quando o lítio foi aplicado juntamente ao tratamento ATRA, a diferenciação mieloide foi aumentada em quase 20% das células tratadas. Além do deslocamento de ciclo celular, como fator sensibilizador da diferenciação, pesquisadores também evidenciam uma melhora da diferenciação mieloide quando o agente desmetilador 5AzadC é utilizado juntamente com o ATRA, corroborando o efeito sinérgico da hipometilação do DNA na diferenciação promovida pela terapia usual para LPA. Esse fato se deve, possivelmente, à hipometilação e consequente melhor expressão de genes alvo do ATRA. (FUJIKI et al., 2012; MOMPALER; DORÉ; MOMPALER, 1990; NIITSU et al., 2001).

A hipometilação do DNA total causada pelo tratamento com lítio pode, também, estar influenciando a desmetilação do gene p16, frequentemente inativado por hipermetilação em células leucêmicas. Essa inativação do gene

p16 é bastante relacionada com a perda de diferenciação granulocítica em leucemias (GUO et al., 2000; NAKAMURA et al., 1999)

A hipometilação acentuada causada pelo tratamento com lítio nas células NB4-R2, se repetiu nas 120h de tratamento simultâneo com lítio e ATRA, atingindo índices próximos à 5% de DNA metilado (figura 19). Este dado concorda com a redução da viabilidade observada na curva de crescimento das células NB4-R2, também em 120h de tratamento com lítio e ATRA. A diferenciação granulocítica não foi conseguida em células resistentes, NB4-R2, quando o lítio foi incluído no tratamento, demonstrando que a hipometilação acentuada, causada pelo lítio, desponta apenas em vias apoptóticas. As células resistentes possuem mutação no receptor para o ácido retinóico. Com isso, níveis de hipometilação dos genes alvos do tratamento com ATRA não são suficientes para suscetibilizar esse grupo de células à terapia de diferenciação.

Os resultados de ciclo celular, *side population*, metilação do DNA e diferenciação granulocítica, após o tratamento com lítio, revelaram dados positivos na análise de atenuação de estágios não cíclicos e expressão gênica de células leucêmicas, afim de uma melhor sensibilização das células ao tratamento. Desta forma, o lítio pode ser um elemento interessante na perspectiva de ativação de células-tronco leucêmicas quiescentes, convergindo em um menor índice de recidivas após o tratamento de diferenciação. Esses dados, portanto, podem estar associados com a melhor diferenciação granulocítica quando lítio e ATRA são utilizados concomitantemente. O estudo recente de Peixoto e colaboradores também demonstrou dados positivos relacionados à potencialização do tratamento da LMC, quando lítio é incluído na terapia (PEIXOTO DA SILVA et al., 2018)

O lítio sozinho, na dose estabelecida no estudo, não causou citotoxicidade às células NB4, desta forma não potencializa o efeito supressor e apoptótico da terapia de diferenciação, o que, possivelmente, reflete num menor quadro de efeitos colaterais envolvidos com a alta citotoxicidade presente no uso combinatório de dois ou mais quimioterápicos. Dessa forma, neste estudo inicial o lítio se mostrou um bom aliado à terapia de diferenciação em células sensíveis ao tratamento.

Na figura 31, resumimos a hipótese que sustenta a presente análise, seguida de um breve resumo dos principais achados deste estudo.

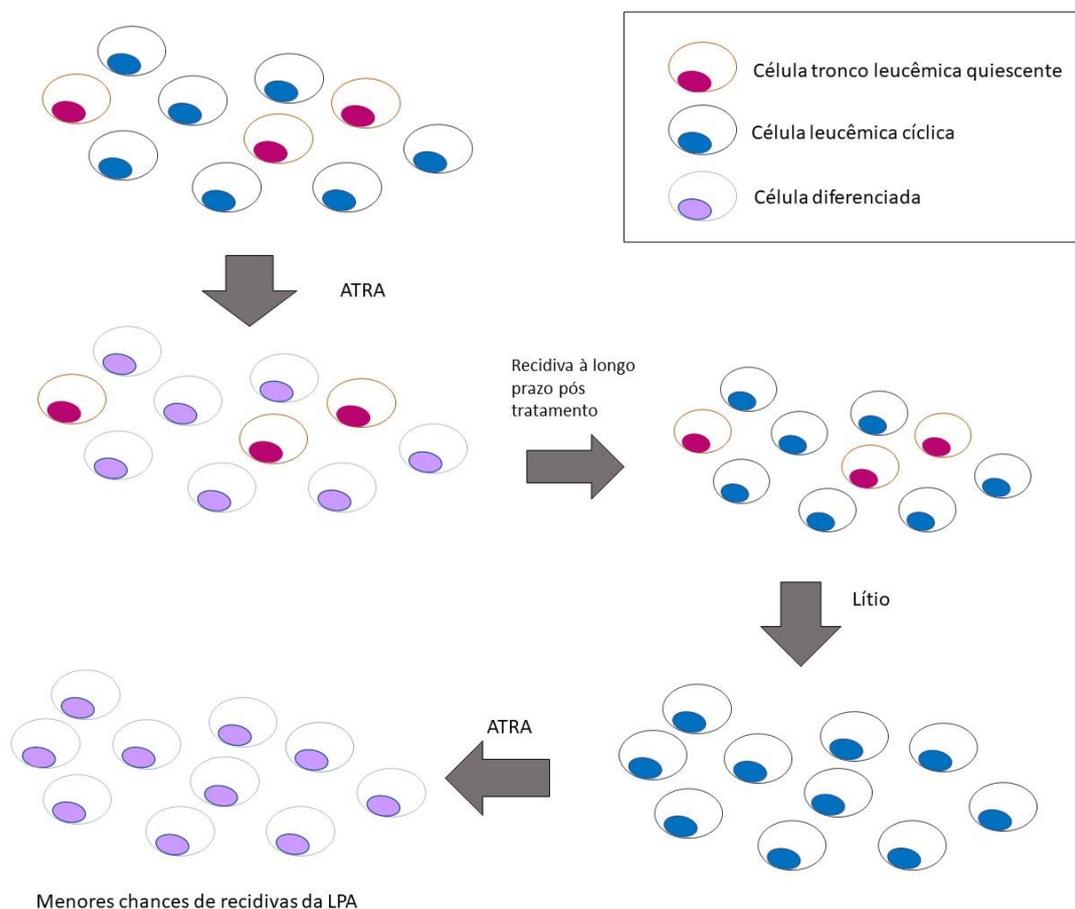


Figura 32. Representação esquemática da hipótese de ativação de células quiescentes, com uso do lítio, para tratamento da LPA

Com base na hipótese sugerida, resumimos os principais achados deste estudo:

- Lítio utilizado em dose baixa, não causou citotoxicidade nas células leucêmicas sensíveis ao ATRA, entretanto causou queda acentuada na viabilidade de células resistentes.
- Lítio promoveu um deslocamento de ciclo celular, aumentando a população mitótica G2/M e diminuindo a população com menor atividade cíclica G0/G1 de células NB4.

- O tratamento com lítio demonstrou uma tendência, não estatística, na diminuição da população de células progenitoras leucêmicas quiescentes, *stem cell-like* de células NB4.
- Lítio induziu a hipometilação gradual do DNA total de células NB4, atenuando o silenciamento gênico.
- Em células resistentes o lítio causou uma hipometilação severa, sendo este o possível fator da queda acentuada na viabilidade das células NB4-R2.
- O lítio, quando utilizado concomitantemente ao ATRA, potencializou o efeito da diferenciação granulocítica, quando comparado ao uso individual do ATRA nas células NB4.

8. PERSPECTIVAS

Neste estudo inicial avaliamos o efeito do tratamento com lítio em dose baixa (10mM), em células de leucemia promielocítica aguda, NB4. Observamos que o tratamento promove o deslocamento do ciclo celular, bem como hipometila o DNA total das células tumorais, refletindo na tendência tênue de ativação de células quiescentes, atribuídas como população G0. O lítio, em combinação com a terapia ATRA, promoveu a potencialização do efeito da diferenciação granulocítica. Esse dado pode ser resultado do deslocamento de ciclo celular para um estágio mais suscetível, bem como, da hipometilação do DNA total causada pelo tratamento com lítio, com conseqüente ativação de genes silenciados.

Seria interessante avaliar o efeito do uso do lítio *in vivo*, com observação clínica do uso deste elemento em um prazo maior. Notavelmente, seria também de boa relevância a análise destes fatores, como deslocamento de ciclo celular, *side population*, hipometilação do DNA e potencialização da terapia ATRA, em células-tronco leucêmicas para geração de dados mais concisos com o efeito na ativação da quiescência, já que esta é uma característica predominante de células progenitoras. Outro fator importante e concludente com o estudo seria a análise específica da metilação de genes associados ao ciclo celular antes e após o tratamento com lítio.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BECKER, R. W.; TYOBEKA, E. M. Lithium enhances the proliferation of HL-60 promyelocytic leukemia cells. **Leukemia Research**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 879–884, 1990. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014521269090177B>>.

Acesso em: 19 jan. 2018.

BERNARD, J. et al. Acute Promyelocytic Leukemia: Results of Treatment by Daunorubicin. **Blood**, [s. l.], v. 41, n. 4, 1973.

BHATIA-DEY, N. et al. Cellular Senescence as the Causal Nexus of Aging. **Frontiers in genetics**, [s. l.], v. 7, p. 13, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26904101>>. Acesso em: 5 jan. 2018.

BORST, P. Cancer drug pan-resistance: pumps, cancer stem cells, quiescence, epithelial to mesenchymal transition, blocked cell death pathways, persists or what? **Open biology**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 120066, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22724067>>. Acesso em: 2 dez. 2017.

CAMPISI, J. Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. **Current Opinion in Genetics & Development**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 107–112, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21093253>>. Acesso em: 5 jan. 2018.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, T. C. G. A. R. et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 368, n. 22, p. 2059–74, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23634996>>. Acesso em: 17 dez. 2017.

CASTOLDI, G. L. et al. Acute promyelocytic leukemia: morphological aspects. **Leukemia**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 1441–6, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8090023>>. Acesso em: 3 fev. 2018.

CHEN, W. et al. Cancer Stem Cell Quiescence and Plasticity as Major

Challenges in Cancer Therapy. **Stem cells international**, [s. l.], v. 2016, p. 1740936, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27418931>>. Acesso em: 2 dez. 2017.

CHEUNG, T. H.; RANDO, T. A. Molecular regulation of stem cell quiescence. **Nature reviews. Molecular cell biology**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 329–40, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23698583>>. Acesso em: 2 dez. 2017.

CINGAM, S. R.; KOSHY, N. V. **Cancer, Leukemia, Promyelocytic, Acute (APL, APML)**. [s.l.] : StatPearls Publishing, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29083825>>. Acesso em: 2 dez. 2017.

DE GROOT, T. et al. Lithium causes G2 arrest of renal principal cells. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 501–10, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24408872>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

DE KOUCHKOVSKY, I.; ABDUL-HAY, M. “Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update”. **Blood Cancer Journal**, [s. l.], v. 6, n. 7, p. e441, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/bcj.2016.50>>. Acesso em: 2 dez. 2017.

DEGOS, L.; WANG, Z. Y. All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. **Oncogene**, [s. l.], v. 20, n. 49, p. 7140–7145, 2001. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/1204763>>. Acesso em: 4 jan. 2018.

DESJOBERT, C. et al. Combined analysis of DNA methylation and cell cycle in cancer cells. **Epigenetics**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 82–91, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25531272>>. Acesso em: 16 dez. 2017.

ESSERS, M. A. G. et al. IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. [s. l.], 2009.

FIGUEROA, M. E. et al. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. **Cancer cell**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 13–27,

2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060365>>. Acesso em: 17 dez. 2017.

FRANCIS, N. et al. Metilação de DNA e Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 493–499, 2010. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/rbc/n_56/v04/pdf/11_revisao_metilacao_dna_cancer.pdf>. Acesso em: 5 jan. 2018.

FUJIKI, A. et al. All-trans retinoic acid combined with 5-Aza-2'-deoxycytidine induces C/EBP α expression and growth inhibition in MLL-AF9-positive leukemic cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 428, n. 2, p. 216–223, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23063977>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

GAUWERKY, C. E.; GOLDE, D. W. Lithium enhances growth of human leukaemia cells in vitro. **British Journal of Haematology**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 431–438, 1982. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.1982.tb02799.x>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

GÖTZE, S. et al. Epigenetic Changes during Hepatic Stellate Cell Activation. **PloS one**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. e0128745, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26065684>>. Acesso em: 16 dez. 2017.

GUO, S. X. et al. Hypermethylation of p16 and p15 genes and RB protein expression in acute leukemia. **Leukemia research**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 39–46, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10634644>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

HASSANI, S. et al. Redistribution of cell cycle by arsenic trioxide is associated with demethylation and expression changes of cell cycle related genes in acute promyelocytic leukemia cell line (NB4). **Annals of Hematology**, [s. l.], p. 1–11, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00277-017-3163-y>>. Acesso em: 2 dez. 2017.

HILLESTAD, L. K. Acute promyelocytic leukemia. **Acta medica Scandinavica**, [s. l.], v. 159, n. 3, p. 189–94, 1957. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13508085>>. Acesso em: 3 jan. 2018.

HSU, Y.-C.; FUCHS, E. A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 103–114, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22266760>>. Acesso em: 5 jan. 2018.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base**. 2014. Disponível em: <<http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/worldwide-data>>. Acesso em: 2 dez. 2017.

ISHIKAWA, F. et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 25, n. 11, p. 1315–1321, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17952057>>. Acesso em: 5 jan. 2018.

JACOMO, R. H.; REGO, E. M. Coagulation abnormalities in acute promyelocytic leukemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s. l.], v. 31, p. 48–50, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842009000800013&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 4 jan. 2018.

JEDEMA, I. et al. Acute myeloid leukemia cells in G0phase of the cell cycle that are unresponsive to conventional chemotherapy are sensitive to treatment with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/diphtheria toxin fusion proteins. **Experimental Hematology**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 188–194, 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301472X03003916>>. Acesso em: 29 jan. 2018.

JONES, M. E.; SALEEM, A. Acute promyelocytic leukemia. **The American Journal of Medicine**, [s. l.], v. 65, n. 4, p. 673–677, 1978. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0002934378908562>>. Acesso em: 4 jan. 2018.

KHAN, R. et al. Hypomethylation and apoptosis in 5-azacytidine-treated myeloid cells. **Experimental Hematology**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 149–157, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18206726>>. Acesso em: 17dez. 2017.

KROEGER, H. et al. Aberrant CpG island methylation in acute myeloid leukemia is accentuated at relapse. **Blood**, [s. l.], v. 112, n. 4, p. 1366–73, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18523155>>. Acesso em: 17 dez. 2017.

LANCET, J. E. Postremission therapy in acute promyelocytic leukemia: room for improvement? **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 32, n. 33, p. 3692–6, 2014. Disponível em: <<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2014.56.5549>>. Acesso em: 2 dez. 2017.

LEAL, A. M.; KUMEDA, C. A.; VELLOSO, E. D. R. P. Características genéticas da leucemia promielocítica aguda de novo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 454–462, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842009000600015&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 4 jan. 2018.

LEEDS, P. R. et al. A new avenue for lithium: intervention in traumatic brain injury. **ACS chemical neuroscience**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 422–33, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24697257>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

LI, L. et al. Lithium Chloride Promotes Apoptosis in Human Leukemia NB4 Cells by Inhibiting Glycogen Synthase Kinase-3 Beta. **International journal of medical sciences**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 805–10, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26516309>>. Acesso em: 8 jan. 2018.

LI, T. et al. Arsenic trioxide promoting ETosis in acute promyelocytic leukemia through mTOR-regulated autophagy. **Cell Death & Disease**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 75, 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41419-017-0018-3>>. Acesso em: 7 fev. 2018.

LI, Y. et al. Clinical implications of genome-wide DNA methylation studies in acute myeloid leukemia. **Journal of hematology & oncology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 41, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28153026>>. Acesso em: 17 dez. 2017.

LICHT, J. D.; STERNBERG, D. W. The molecular pathology of acute myeloid

leukemia. **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, [s. l.], v. 2005, n. 1, p. 137–42, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16304371>>. Acesso em: 2 dez. 2017.

LO-COCO, F.; CICCONE, L. History of acute promyelocytic leukemia: a tale of endless revolution. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. e2011067, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22220264>>. Acesso em: 3 jan. 2018.

MACHADO-VIEIRA, R. et al. The role of lithium in the treatment of bipolar disorder: convergent evidence for neurotrophic effects as a unifying hypothesis. **Bipolar disorders**, [s. l.], v. 11 Suppl 2, n. Suppl 2, p. 92–109, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19538689>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

MARTENS, J. H. A. et al. PML-RARalpha/RXR Alters the Epigenetic Landscape in Acute Promyelocytic Leukemia. **Cancer cell**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 173–85, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20159609>>. Acesso em: 17 dez. 2017.

MASLAK, P. APL - biopsy - 2. In: AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY (Ed.). **Image Bank ASH**. [s.l: s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Incidência de Câncer no Brasil**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>>. Acesso em: 2 dez. 2017.

MOMPARLER, R. L.; DORÉ, B. T.; MOMPALAR, L. F. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine and retinoic acid on differentiation and c-myc expression in HL-60 myeloid leukemic cells. **Cancer letters**, [s. l.], v. 54, n. 1–2, p. 21–8, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1698532>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. DNA methylation and its basic function. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 23–38, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22781841>>. Acesso em: 5 jan. 2018.

NAKAMURA, M. et al. p16/MTS1/INK4A gene is frequently inactivated by hypermethylation in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 translocation. **Leukemia**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 884–90, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10360377>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

NERVI, C. et al. Caspases Mediate Retinoic Acid–Induced Degradation of the Acute Promyelocytic Leukemia PML/RAR α Fusion Protein. **Blood**, [s. l.], v. 92, n. 7, 1998.

NIITSU, N. et al. Sensitization by 5-aza-2'-deoxycytidine of leukaemia cells with MLL abnormalities to induction of differentiation by all-trans retinoic acid and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3. **British journal of haematology**, [s. l.], v. 112, n. 2, p. 315–26, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11167824>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

OLMEDA, D. et al. Beta-catenin regulation during the cell cycle: implications in G2/M and apoptosis. **Molecular biology of the cell**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 2844–60, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12857869>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

ORFALI, N. et al. Induction of autophagy is a key component of all-trans-retinoic acid-induced differentiation in leukemia cells and a potential target for pharmacologic modulation. **Experimental hematology**, [s. l.], v. 43, n. 9, p. 781–93.e2, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25986473>>. Acesso em: 8 jan. 2018.

PARDEE, A. B. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 1286–90, 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4524638>>. Acesso em: 5 jan. 2018.

PEIXOTO-DA-SILVA, J. et al. Lithium, a classic drug in psychiatry, improves nilotinib-mediated antileukemic effects. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, [s. l.], v. 99, p. 237–244, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29334667>>. Acesso em: 2 fev. 2018.

PIÑÁN, M. et al. Acute Myeloid Leukemia with t(11;17)(q23;q21). [s. l.], 2015.

Disponível em:
<<http://austinpublishinggroup.com/hematology/fulltext/hematology-v2-id1050.php>>. Acesso em: 3 dez. 2017.

REGO, E. M.; JÁCOMO, R. H. Epidemiology and treatment of acute promyelocytic leukemia in latin america. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. e2011049, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22110899>>. Acesso em: 3 jan. 2018.

ROUSSELOT, P. et al. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. **Blood**, [s. l.], v. 109, n. 1, p. 58–60, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16973963>>. Acesso em: 5 jan. 2018.

ROWLEY, J. D. et al. Further evidence for a non-random chromosomal abnormality in acute promyelocytic leukemia. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 869–872, 1977. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.2910200608>>. Acesso em: 4 jan. 2018.

SAGRILLO, M. R. et al. Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH) Acute promyelocytic leukemia: characterization of chromosome abnormalities by classical cytogenetics and FISH. **Rev. bras. hematol. hemoter**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 94–101, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v27n2/v27n2a08>>. Acesso em: 4 jan. 2018.

SAITO, Y. et al. Induction of cell cycle entry eliminates human leukemia stem cells in a mouse model of AML. **Nature biotechnology**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 275–80, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20160717>>. Acesso em: 2 dez. 2017.

SARKAR, S. et al. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. **The Journal of cell biology**, [s. l.], v. 170, n. 7, p. 1101–11, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16186256>>. Acesso em: 8 jan. 2018.

SAULTZ, J. N.; GARZON, R. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review.

Journal of clinical medicine, [s. l.], v. 5, n. 3, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26959069>>. Acesso em: 2 dez. 2017.

SCORDINO, T. Promyelocyte. In: AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY (Ed.). **Image Bank ASH**. [s.l: s.n.].

SU, H.; CHU, T.-H.; WU, W. Lithium enhances proliferation and neuronal differentiation of neural progenitor cells in vitro and after transplantation into the adult rat spinal cord. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 206, n. 2, p. 296–307, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488607002038>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

SUNAMI, Y. et al. Histone Acetyltransferase p300/CREB-binding Protein-associated Factor (PCAF) Is Required for All-trans-retinoic Acid-induced Granulocytic Differentiation in Leukemia Cells. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 292, n. 7, p. 2815–2829, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28053092>>. Acesso em: 17 dez. 2017.

SZYF, M. **DNA methylation and cancer therapy**. [s.l.] : Landes Bioscience/Eurekah.com, 2007.

TALLMAN, M. S.; ALTMAN, J. K. How I treat acute promyelocytic leukemia. **Blood**, [s. l.], v. 114, n. 25, p. 5126–35, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10233871>>. Acesso em: 4 jan. 2018.

VAN GILS, N.; VERHAGEN, H. J. M. P.; SMIT, L. Reprogramming acute myeloid leukemia into sensitivity for retinoic-acid-driven differentiation. **Experimental Hematology**, [s. l.], v. 52, p. 12–23, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301472X1730139X>>. Acesso em: 17 dez. 2017.

WANG, X. et al. Involvement of the role of Chk1 in lithium-induced G2/M phase cell cycle arrest in hepatocellular carcinoma cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 104, n. 4, p. 1181–1191, 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.21693>>. Acesso em: 4 dez. 2017.

WINTROBE, M. M. (Maxwell M.; GREER, J. P. **Wintrobe's clinical hematology**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=NYCeAgAAQBAJ&pg=PA1193&lpg=PA1193&dq=granules+promyelocyte+express+tissue+factor&source=bl&ots=RE-Gc0otO5&sig=QkP70-2nkr_jNFmfH7YBYD2xuM8&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwiajLL3w77YAhWEQpAKHTxgCtIQ6AEIOzAC#v=onepage&q=granules>. Acesso em: 4 jan. 2018.

ZAGO, M. A. et al. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. [s.l: s.n.].

ZHAO, H. et al. Difference in causes and prognostic factors of early death between cohorts with de novo and relapsed acute promyelocytic leukemia. **Annals of Hematology**, [s. l.], v. 97, n. 3, p. 409–416, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29289982>>. Acesso em: 7 fev. 2018.

ZHOU, G.-B. et al. Retinoic acid and arsenic for treating acute promyelocytic leukemia. **PLoS medicine**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. e12, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15696202>>. Acesso em: 4 jan. 2018.