

Agradecimentos

Mais uma etapa termina e não posso deixá-la passar em branco sem agradecer a todos os que me ajudaram a alcançá-la:

À Prof. Dra. Ana Bela Sarmiento Ribeiro, um grande obrigada por me ter orientado no decorrer deste projecto, pela paciência, pelo esforço e disponibilidade.

À Dra. Ana Cristina Pereira Gonçalves, pelo apoio, pela disponibilidade, pela motivação, pela paciência e também pela orientação que me deu durante o decorrer de todo este projecto. Muito obrigada!

Ao Dr. Paulo Pereira e Dr. Henrique Girão, pelos ensinamentos, motivação e apoio.

Ao laboratório de Biologia Molecular Aplicada da Faculdade de Medicina da UC e a todos os seus investigadores e colaboradores.

À Raquel, que sempre se mostrou disposta a ajudar em tudo o que fosse necessário.

À Joana, à Cátia e à Patrícia, um grande obrigada pelo companheirismo e pelos momentos de malagueira que faziam sempre com que os dias se passassem melhor!

Aos MIBs pelos óptimos momentos que passamos e pelo companheirismo.

À Sara, Célia, Andreia e Mimi, que fizeram com que estes anos passados em Coimbra se tornassem inesquecíveis.

Aos meus amigos de sempre, James, Jota, Raquel, que em todos os momentos que tive até hoje, em que achava que não ia conseguir, estiveram sempre lá para me provar o contrário.

À Lili, Jennifer, Marlene, Daniela, um grande obrigado por estarem sempre do meu lado, tanto nos dias não como nos dias menos não.

Ao Didas, Yann, Rui, um enorme obrigada por me aturarem em momentos de crise e por tentarem fazer com que as situações ficassem menos escuras, colocando-me sempre um sorriso no rosto.

A todos os que de algum modo contribuíram para esta dissertação e que não foram especificamente designados, mas que, nem por isso foram esquecidos.

Embora já não estejam presentes, não posso deixar de agradecer aos meus avós, pois eu sei que estão a torcer por mim e que com certeza o fim desta etapa deixá-los-ia muito orgulhosos.

E finalmente, um enorme obrigada aos meus pais. Sem eles o meu percurso académico nunca teria sido possível. Obrigada pelo grande esforço, pelo amor, pelas críticas, pelos conselhos, pelo apoio, por tudo o que fizeram por mim e que me tornou a pessoa que sou hoje.

A todos, um muito obrigada!

Índice

Agradecimentos.....	I
Índice	IV
Abreviaturas	VII
Abstract	X
Resumo	XIII
1.Introdução	1
1.2.Hematopoiese.....	3
1.3.Neoplasias hematológicas	4
1.4.Sinalização celular.....	7
1.4.1.Vias de diferenciação	9
1.5.As vias de diferenciação WNT, NOTCH, HEDGEHOG como alvos terapêuticos na Leucemia Linfoblástica Aguda	18
2.Materiais e Métodos	23
2.1.Listagem do material e equipamento.....	24
2.2.Caracterização da linha celular	24
2.3.Análise da proliferação e morte celular através da determinação da densidade e viabilidade celulares	25
2.4.Avaliação da morte celular	26
2.5.Avaliação intracelular do potencial de membrana mitocondrial	29
2.6.Avaliação do ciclo celular.....	30
2.7.Análise estatística	30
3.Resultados	32
3.1.Caracterização da linha celular CEM	33
4.Discussão	48
4.1.Efeito dos moduladores das vias WNT, NOTCH e Hedgehog na viabilidade celular	49
4.2.Análise dos efeitos dos moduladores na expressão de proteínas envolvidas nos mecanismos de morte celular	54
4.3.Avaliação do efeito dos moduladores no potencial da membrana mitocondrial.....	55
4.4.Avaliação do efeito dos moduladores da via Hedgehog no ciclo celular	55

5.Conclusão	57
6.Bibliografia.....	60

Abreviaturas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

APC – *Adenomatous Polyposis Coli*

ARN – Ácido Ribonucleico

BAX – *Bcl-2 associated X protein*

BCL-2 – *B-cell leucemia/Lymphoma*

CCD1 – Ciclina D1

CDC – *Cell Division Control*

Cdk – *Cyclin-dependent kinase*

CK 1 – Caseína Cinase 1

CEH – Célula Estaminal Hematopoiética

CLP – Células Linfóides Progenitoras

CMP – Células Mielóides Progenitoras

CPM – Células progenitoras multipotentes

CEL – Célula Estaminal Leucémica

CSL – *CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1*

FAS – *Tumor Necrosis Factor Receptor*

FGF – *Fibroblast Growth Factor*

FITC – Isiotiocianato de fluoresceína

FZD – *Frizzled Receptor*

G₀ – Gap 0

G₁ – Gap 1

G₂ – Gap 2

GDC – Vismodegib (GDC 0449)

GSI – *Gamma-Secretase Inhibitor XXII*

GSK3 β – *Glycogen Synthase Kinase 3 β*

IAP – *Inhibitor of Apoptosis Protein*

IP – Iodeto de propídeo

LLA – *Leucemia Linfoblástica Aguda*

LEF – *Lymphoid Enhancer-Binding Factor*

LRP5/6 – *Lipoprotein Receptor-Related Protein 5/6*

JC 1 – *5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide*

M/A – Razão monómeros/agregados de JC1

MIF – Média de intensidade de fluorescência

NICD – *Notch Intracellular Domain*

PBS – Tampão fosfato

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*

SKIP – *Ski-Related Protein*

TCF – *T-Cell Factor*

TGF β – *Transforming Growth Factor β*

TNF-R – *Tumor Necrose Factor Receptor*

TRAIL – *TNF related Apoptosis Inducing Ligand*

Abstract

Conserved embryonic signaling pathways such as Hedgehog (Hh), Wingless (WNT) and NOTCH, critical for stem cell self-renewal and differentiation in hematopoiesis, have been implicated in the pathogenesis of several hematological malignancies.

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is characterized by the abnormal proliferation and accumulation of immature lymphoid cells within the bone marrow and lymphoid tissues, which can develop from the aberrant activation of the WNT/ β -catenin, NOTCH and Hedgehog signaling pathways. On account of that, these pathways may constitute new potential candidate targets for ALL therapy.

The main goal of this study was to evaluate the therapeutic potential of WNT/ β -catenin, NOTCH and Hedgehog inhibitors, respectively IWR-1, Gamma-Secretase inhibitor XXII (GSI) and Vismodegib (GDC 0449), alone and in combination in an ALL cell line.

To evaluate the effect of these developmental signaling pathways inhibitors on cell viability, we use an ALL cell line, the CEM cells, submitted to different concentrations of the inhibitors. The IC_{50} (half maximal inhibitory concentration), was determined using the blue trypan assay. Cell death was assessed by optical microscopy (after May-Grunwald staining) and by flow cytometry (using Propidium Iodide/Annexin V staining and measuring the levels of BAX and BCL-2, proteins). We also tested by flow cytometry, some proteins related with cell cycle regulation, as p53 and Cyclin D1, and we measure the mitochondrial membrane potential, using the fluorescent probe JC1.

The results observed showed that GSI, IWR-1 and GDC-0449 induced cytostatic and cytotoxic effects in CEM cells. These compounds suppressed cell growth/proliferation and induced a decrease in cell viability in a time- and dose-dependent manner, when they administered alone or in combination with each other. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of GSI, IWR-1 and GDC 0449 in CEM cells was 25-50 μ M, 30-40 μ M and 75 μ M, respectively, after 24h of treatment. These compounds induce cell death mainly by apoptosis, which may be caspase-dependent and mediated eventually through the mitochondrial apoptotic pathway, as we observe an increase in caspase levels and a decrease in mitochondrial membrane potential. We could also observe that p53/cyclin D1 and BAX/BCL-2 levels were diminished in presence of these cell signalling pathways inhibitors, but that they didn't show a notable influence in cell cycle arrest.

In conclusion, our results suggest that GSI, IWR-1 and GDC 0449 are potential new targeted therapies that could be efficient in ALL treatment in the future.

Keywords:

- Acute Lymphoblastic Leukemia
- WNT/ β -catenin, NOTCH and Hedgehog signalling pathways
- IWR-1, Gamma Secretase Inhibitor XXII and Vismodegib (GDC 0449)

Resumo

As vias de sinalização embrionárias como a Hedgehog (Hh), Wingless (WNT) e NOTCH são essenciais na auto-renovação e diferenciação das células estaminais e têm sido implicadas na patogénese de várias neoplasias hematológicas.

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é caracterizada pela proliferação anormal e acumulação de células linfóides imaturas na medula óssea e nos tecidos linfóides, a qual pode ser desenvolvida pela activação anómala das vias de sinalização WNT/ β -catenina, NOTCH e Hedgehog. Tendo isto em conta, estas vias podem ser eventuais candidatas a potenciais alvos terapêuticos da LLA.

O principal objectivo deste estudo foi avaliar o potencial terapêutico dos inibidores das vias WNT/ β -catenina, NOTCH e Hedgehog, respectivamente, IWR-1, Gamma-Secretase Inhibitor XXII (GSI) and Vismodegib (GDC 0449), administrados isoladamente e em combinação terapêutica numa linha celular de LLA, a linha CEM.

Para avaliar o efeito destes inibidores na viabilidade celular, as células CEM foram incubadas na ausência e na presença de diferentes concentrações destes inibidores. O seu efeito na viabilidade e proliferação celular foi avaliado pelo ensaio de exclusão com Azul Tripano, enquanto que a morte celular foi analisada por microscopia óptica (com a coloração May-Grunwald) e por citometria de fluxo (utilizando a coloração Anexina V e Iodeto de Propídeo e medindo os níveis das proteínas BCL2 e BAX). Também foram medidos os níveis de expressão de algumas proteínas relacionadas com a regulação do ciclo celular, como a p53 e CCD1 e também se utilizou a sonda JC 1 para medir o potencial da membrana mitocondrial.

Os resultados obtidos indicam que GSI, IWR-1 e GDC 0449 induzem efeitos citotóxicos e citostáticos. Estes inibidores suprimem o crescimento celular e induzem a diminuição da viabilidade celular de forma dependente do tempo e concentração utilizada, quando administrados isoladamente ou em associações. O IC_{50} do GSI, IWR-1 e GDC-0449 nas células CEM foi 25-50 μ M, 30-40 μ M e 75 μ M, respectivamente, após 24 horas de tratamento. Estes compostos induzem morte, maioritariamente, por apoptose, a qual pode ser dependente das caspases e derivar, possivelmente, da via de apoptose mitocôndria, visto se verificar aumento nos níveis de caspases e diminuição do potencial da membrana mitocondrial. Pudemos também observar que os níveis de p53/ciclina D1 e BAX/BCL-2 se encontravam

diminuídos na presença dos inibidores destas vias, não havendo, no entanto, alterações notáveis no ciclo celular.

Em conclusão, os nossos resultados sugerem que GSI, IWR-1 e GDC-0449 são potenciais novos alvos terapêuticos que poderão ser eficientes no tratamento de LLA.

Palavras-Chave:

- Leucemia Linfoblástica Aguda
- Vias de sinalização WNT/ β -catenina, NOTCH e Hedgehog
- IWR-1, Gamma-Secretase Inhibitor XXII e Vismodegib (GDC 0449)

1. Introdução

1.1. O cancro

A maioria dos cancros humanos não é simplesmente uma doença geneticamente determinada, mas sim uma manifestação do comportamento cultural e pessoal imposto a uma susceptibilidade genética hereditária individual. (Pinto, A.M., 2007) Assim, o cancro é uma doença multifatorial resultante da participação de fatores como o ambiente, a predisposição genética, o estilo de vida, a exposição a agentes biológicos (ex.: vírus), químicos e/ou radiação, entre outros.

Os milhões de células que constituem o organismo humano formam uma complexa comunidade celular que se auto-regula, e é regulada por células vizinhas, de forma que cada tecido mantenha dimensão e forma adequada e adaptada às necessidades do corpo humano. Neste sentido, o número de células existentes num tecido normal é, vigorosamente controlado, através do equilíbrio entre a proliferação e a morte das células. Neste mecanismo de controlo celular, as células envelhecidas, ou seja, as que perderam a sua função fisiológica ou que já não são necessárias, sofrem um processo de morte programada, sendo este denominado por apoptose. Estas células serão, por isso, substituídas por células novas, as quais se dividem e diferenciam em células maduras funcionantes(Pinto, A.M., 2007).

Assim, o cancro pode resultar da proliferação celular descontrolada e/ou do bloqueio da diferenciação celular, podendo ainda estar associado à resistência à morte celular por apoptose. As células neoplásicas, por norma, apresentam alterações nos mecanismos de controlo celular, seguindo o seu próprio programa de replicação, ignorando os sinais inibitórios, tornando-se assim autónomas e “imortais”. Assim sendo, a carcinogénese, ou transformação neoplásica, resulta da acumulação de mutações não letais (fase de iniciação tumoral), que pode decorrer ao longo de vários anos ou até mesmo décadas, ocorridas em determinados genes responsáveis pela regulação do ciclo celular, permitindo a estas células adquirir características fenotípicas (promoção) que asseguram o seu crescimento e sobrevivência (progressão) (Figura 1)(Pinto, A. M.,2007).



Figura 1 – Processo multifacetado do cancro. O cancro desenvolve-se a partir de uma célula normal, a qual se transforma numa célula iniciada, portadora de mutação iniciadora. Esta célula pode crescer tanto por indução da proliferação celular como através da inibição da apoptose. A subsequente lesão do ADN e a instabilidade genética podem permitir que as lesões focais progridam para cancro. (Imagem adaptada de Klaunig *et al.*, 1997).

1.2. Hematopoiese

Os tecidos que se encontram distribuídos por todo o organismo necessitam que ocorra migração de células estaminais de forma a originar os diversos tipos de células maduras. Um dos mecanismos pelo qual muitos tecidos regulam a formação de diferentes tipos celulares, em diferentes localizações, é padronizando as células estaminais, fazendo-as adquirir identidades “regionais” (Abrams *et al.*, 2003; Alvares *et al.*, 2003; Mikawa *et al.*, 2004), ou seja, as propriedades intrínsecas das células estaminais são alteradas em resposta aos sinais provenientes do microambiente que as rodeia (Kiel *et al.*, 2005).

O processo de formação e diferenciação das células do sangue denomina-se de hematopoiese. A hematopoiese é o processo pelo qual as diferentes populações celulares do sangue são continuamente renovadas através da diferenciação de uma célula progenitora comum, denominada de célula estaminal hematopoiética (CEH) (Nancy A. Speck *et al.*, 1999). Esta CEH possui capacidade de replicação e auto-renovação, permitindo que algumas se mantenham no estado pluripotente, enquanto outras sofrem diferenciação. Para que todo este processo ocorra em homeostasia, as células estaminais são mantidas num microambiente específico, a medula óssea, constituída por uma rede microvascular e diversas células do estroma medular que produzem fatores essenciais ao crescimento, diferenciação, maturação e morte celular das células do sistema hematopoiético. A

regulação dos processos de manutenção, diferenciação e auto-renovação das CEHs é efectuado por mediadores químicos, nomeadamente citocinas e quimiocinas, destacando-se a N-caderina, a NOTCH, a WNT, Hedgehog, o fator de crescimento transformante β (TGF β) e o factor de crescimento dos fibroblastos (FGF) (Hoffbrand, 2011). Este processo de diferenciação conduz à formação dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas (Serinsoz *et al.*, 2004).

A partir da diferenciação das células estaminais hematopoiéticas formam-se as células progenitoras de linhagem, mielóide e linfóide (figura 2). A primeira célula precursora da linhagem mielóide é o mieloblasto, e à medida que esta célula se diferencia, torna-se mais madura e especializada, originando células sanguíneas funcionais, incluindo: neutrófilos, monócitos, eosinófilos, basófilos, macrófagos, megacariócitos e eritrócitos. Por sua vez, a célula progenitora da linhagem linfóide, o linfoblasto, irá dar origem a linfócitos B e T, e as células *natural killer* (NK).

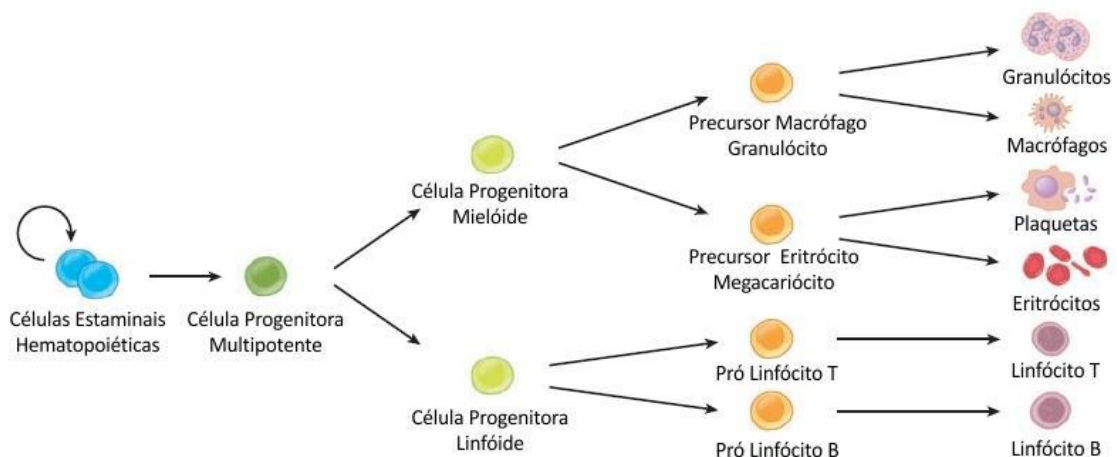


Figura 2 – Representação da hematopoiese. As células estaminais hemopoiéticas (CEH) auto-renovam-se e originam as células progenitoras multipotentes (CPM), que por sua vez se diferenciam em células precursoras da linhagem mielóide e linfóide (CMP e CLP). Estas vão originar os precursores dos diferentes elementos sanguíneos, que culminam em células maduras. (Adaptado de Lobo *et al.*, 2007).

1.3. Neoplasias hematológicas

As células hematopoiéticas, no decorrer do processo de diferenciação, vão perdendo a capacidade proliferativa e aumentando a propensão para a morte celular por apoptose. A proliferação descontrolada, o bloqueio da diferenciação e/ou a resistência à apoptose são

mecanismos associados ao desenvolvimento e progressão de neoplasias do sistema hematopoiético.

As Leucemias são neoplasias do tecido hematopoiético, que resultam da proliferação descontrolada de células hematopoiéticas imaturas que invadem a medula óssea (numa percentagem superior a 20%) e que posteriormente atingem o sangue periférico, podendo originar focos extra-hemáticos que se comportam como tumores (Sarmiento-Ribeiro, A.B., 2000; Hoffbrand, 2011).

A população celular neoplásica tem caráter clonal, ou seja, todas as células se originam de uma mesma célula, que sofreu transformação neoplásica e que foi capaz de proliferar e de perpetuar. A célula proliferante das leucemias agudas denomina-se “blasto”, por se tratar de uma célula pouco diferenciada, com alta relação núcleo/citoplasma e por vezes com nucléolos proeminentes (Mediavilla, J. D., 1999; Sarmiento-Ribeiro, A.B., 2000).

Mais recentemente, estas neoplasias, tal como acontece com os tumores sólidos, podem ter origem em células estaminais cancerígenas (CSC) (Ward *et al.*, 2007), neste caso Células Estaminais Leucémicas (CEL), análogas às CEHs, mas que sofrem organogénese descontrolada (Passegue *et al.*, 2003; Pui *et al.*, 2008).

Tradicionalmente as leucemias agudas são classificadas de acordo com a natureza ou origem da célula proliferante, em linfóides ou linfoblásticas, LLA, e não linfocíticas ou mielóides, LMA (Sarmiento-Ribeiro, A.B. 2000). As leucemias linfoblásticas agudas (LLA) podem-se desenvolver a partir de qualquer célula linfoide progenitora, B ou T, que sofreu um bloqueio em qualquer uma da sua etapa de maturação, e que prolifera activamente (Sarmiento-Ribeiro, A.B., 2000; Pui *et al.*, 2008).

1.3.1. Leucemia Linfoblástica Aguda

As leucemias agudas são, normalmente, doenças agressivas nas quais a transformação maligna ocorre na célula estaminal hematopoiética ou em progenitores precoces, como mencionado. As alterações genéticas observadas nestas neoplasias ocorrem em várias vias de sinalização celular, induzindo aumento da taxa de proliferação, diminuição da apoptose e bloqueio da diferenciação celular. Em consequência destas alterações ocorre a acumulação de percursoros hematopoiéticos na medula óssea, denominados de blastos. (Hoffbrand, 2011).

A leucemia linfoblástica aguda (LLA), provocada pela acumulação de linfoblastos na medula óssea, é a neoplasia com maior incidência em crianças. Estudos estatísticos mostram que a prevalência da doença se insere na faixa etária dos 2-7 anos de idade (Pui *et al.*, 2008), com 75% dos casos a ocorrer antes dos 6 anos. No entanto, existe também um aumento do risco de contrair a doença aos 40 anos. Por outro lado, 85% dos casos relacionam-se com a linhagem de células B, tendo incidência equivalente em ambos os sexos. No caso das LLAs de células T, verifica-se maior susceptibilidade no sexo masculino (cerca de 15%) (Pui *et al.*, 2008).

Esta patologia é bastante heterogénea. Na tabela 1 está representada a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) das LLA.

Tabela 1– Classificação da Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2008

Linfoma/Leucemia Linfoblástica em células B
 Linfoma/Leucemia com recorrência a abnormalidade genéticas em células B
 Linfoma/Leucemia em células com t(9;22) (q34;q11.2); BCR-ABL1
 Linfoma/Leucemia em células B com t(v;11q23); rearranjo MLL
 Linfoma/Leucemia em células B com t(12;21) (p13;q22); TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)
 Linfoma/Leucemia em células B com hiperdiploidia
 Linfoma/Leucemia em células B com hipoploidia (LLA hipodiplóide)
 Linfoma/Leucemia em células T

Adaptado de Hoffbrand, 2011

Como a tabela acima apresentada demonstra, a LLA-B está muito relacionada com alterações genéticas nomeadamente translocações, rearranjos e aneuploidias. No entanto, os casos de LLA-T apresentam, em 50-70% dos casos, cariótipo anormal e mutações na via NOTCH que a tornam constitutivamente activa (Hoffbrand,2011).

Os diferentes subtipos de LLA demonstram diferenças consideráveis em termos de características clínicas, valores laboratoriais e resposta ao tratamento. Sabe-se que os subtipos de LLA, como a de células B ou T maduras, tem uma taxa de sobrevivência acima dos 50%, enquanto no grupo dos precursores de células B e em LLA positiva para o Ph/BCR-ABL, se verifica apenas uma taxa de 10-20%. (Hoelzer *et al.*, 2002).

A análise molecular das alterações genéticas mais comuns em células leucémicas contribuiu grandemente para uma melhor compreensão da patogénese e prognóstico da LLA. Dentro dos mecanismos envolvidos nesta neoplasia encontram-se: expressão anómala de proto-

oncogenes, translocações cromossômicas que originam genes de fusão que codificam cinases ativas e alteração de fatores de transcrição, e hiperdiploidia que pode envolver mais do que 50 cromossomas. Estas alterações genéticas têm elevada contribuição na transformação de células estaminais hematopoiéticas em células leucémicas. O processo regulador chave desta transformação consiste na manutenção ou aumento da capacidade da célula transformada se auto-renovar de forma descontrolada, na existência de um bloqueio na diferenciação e na promoção de resistência a sinais de morte (apoptose) (Pui *et al.*, 2008).

1.4. Sinalização celular

As células humanas não são capazes de sobreviver isoladamente (Lodish *et al.*, 2003), sendo muito importante compreender o tipo de comunicação que existe entre elas. Para comunicar, as células utilizam um complexo sistema de mecanismos e vias de sinalização celular que governam e coordenam as actividades e funções celulares. O mecanismo principal é aquele que permite à célula induzir sinais intracelulares, a partir de uma estimulação extracelular. Assim após a (1) síntese e (2) libertação da molécula sinalizadora pela célula; ocorre (3) transporte do sinal para a célula-alvo; (4) ligação do sinal a um receptor proteico específico, a qual leva à sua activação; (5) iniciação de uma ou mais vias intracelulares de transdução de sinal; (6) alterações específicas na função, metabolismo e desenvolvimento da célula e (7) remoção do sinal, o qual determina a resposta celular (Lodish *et al.*, 2003; Sarmiento-Ribeiro *et al.*, 2007).

A manutenção do funcionamento normal da célula e a homeostase dos tecidos encontram-se dependentes da regulação específica de inúmeras vias de sinalização. Estas controlam as decisões celulares como a proliferação, diferenciação, saída do ciclo celular e possível entrada em morte celular programada (apoptose) (Trosko, J.E. and Ruch, J.T., 1998). Os tumores têm origem quando os clones de células mutadas escapam aos mecanismos de regulação celular, ocorrendo proliferação descontrolada sem que haja apoptose compensatória. Vários estudos indicam que a desregulação destas vias de sinalização se encontra associada à origem de cancro. Assim, é fundamental compreender o funcionamento normal destas vias, sendo também essencial estudar como é que elas se

relacionam, de forma a conseguir sincronizar os processos de crescimento e apoptose celulares (Rosalie *et al.*, 2002).

A ativação das vias de sinalização celular culmina na transcrição dos genes envolvidos na proliferação, diferenciação, regulação do ciclo celular e apoptose. No núcleo, proteínas conhecidas como fatores de transcrição, ativam genes que conduzem a célula através das diferentes fases do ciclo celular. O ciclo celular engloba 4 fases: a fase G1 (*Gap 1*), em que a célula aumenta de tamanho por síntese de ARN e proteínas, e se prepara para duplicar o ADN; a fase S (*Synthesis*), em que ocorre síntese de ADN, com aumento do seu conteúdo; a fase G2 (*Gap 2*), em que a célula se prepara para a mitose e a fase M (*Mitosis*), em que ocorre formação de duas células filhas, cada uma das quais entra imediatamente na fase G1, podendo aí permanecer temporária ou permanentemente (Figura 3) (Sarmiento-Ribeiro, 2000; Sarmiento-Ribeiro *et al.*, 2008). O ciclo celular é regulado por diversas moléculas, entre elas as proteínas fosfatases, CDC (Cell Division Control), proteínas supressoras tumorais como a pRb, a p53, a p16 e a p15 que desempenham um papel importante nos pontos de restrição regulando o ciclo celular, e complexos Ciclinas/CDKs (cinases dependente de ciclina), cujas funções estão interdependentes.

A ativação das vias de morte (apoptose) também envolve moléculas reguladoras, as quais são ativadas pela mitocôndria (via intrínseca ou mitocondrial) ou por receptores de morte (via extrínseca ou membranar) da família do fator de necrose tumoral (TNF), como os receptores do *TNF Related Apoptotic Inducing Ligand* (TRAIL-Rs), o FAS ou o receptor do TNF (TNF-R). A ligação do ligando aos respectivos receptores irá induzir uma resposta intracelular, que, posteriormente, irá conduzir à ativação de moléculas que se encontram envolvidas na ativação e/ou inibição da apoptose, como por exemplo as caspases e as proteínas inibidoras da apoptose (IAP), respectivamente. No entanto, o processo apoptótico também é regulado pela mitocôndria, estando envolvidas diferentes tipos de moléculas: as que inibem a apoptose como a proteína BCL-2, ou as que induzem este processo como a proteína BAX. Desta forma, a homeostase é mantida pelo equilíbrio entre a quantidade de proteínas pró e anti-apoptóticas (Hengartner *et al.*, 2000; Mita *et al.*, 2006).

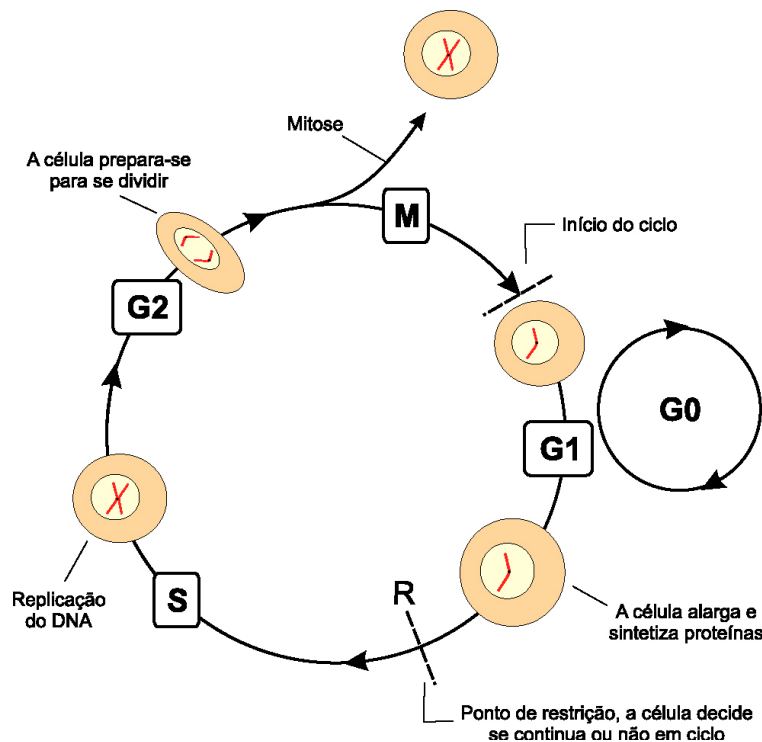


Figura 3 – As fases do ciclo celular. Em G1 (GAP 1), a célula aumenta de tamanho, sintetizando proteínas necessárias à síntese de ADN que ocorre na fase seguinte, a fase S. A célula pode permanecer em G1, num estado não divisível, também chamado de fase G0 (GAP 0), ou se decidir continuar em ciclo tem que ultrapassar o ponto de restrição (R), entrando em fase S (Síntese). Durante esta fase a célula duplica o seu ADN, preparando-se para a mitose na fase G2 (GAP 2). Na última fase do ciclo celular, a fase M (Mitose) a célula divide-se em duas células filhas, reiniciando cada uma delas novo ciclo celular. (Imagem retirada de Sarmento-Ribeiro *et al.*,2008).

Além disso, no desenvolvimento de células embrionárias e nos tecidos adultos como o hematopoietico, as vias de diferenciação desempenham um papel fundamental na hematopoiese, podendo a sua desregulação estar envolvida no desenvolvimento de neoplasias.

1.4.1. Vias de diferenciação

Um dos maiores desafios da biologia e bioquímica contemporânea é a compreensão dos mecanismos moleculares que determinam o desenvolvimento de um organismo adulto. O desenvolvimento e diferenciação das diferentes estruturas do corpo são regulados por complexas vias de sinalização celular, mediadas por clivagem proteolítica, que coordenam a atividade das células individuais, originando os diferentes tecidos dos seres vivos. Neste

estudo serão abordadas as principais vias envolvidas no desenvolvimento dos organismos que envolvem clivagem proteolítica, as vias Hedgehog, WNT e NOTCH.

1.4.1.1. Via WNT

As proteínas WNT são secretadas, modificadas por palmitoilação nos seus resíduos de cisteína. Esta reação é fundamental para o funcionamento da proteína WNT. Estes constituintes proteicos activam receptores que se encontram na superfície da célula, regulando, desta forma, inúmeras atividades celulares incluindo a determinação do destino da célula, proliferação, migração, polaridade e expressão génica (em especial durante a embriogénese e desenvolvimento embrionário precoce) (Gerke *et al.*, 2009). Mutações na via WNT são, normalmente, associadas a anomalias congénitas, cancro e outras doenças (Clevers, 2006).

As proteínas WNTs podem ativar três cascatas de sinalização diferentes: a via canónica, WNT/ β -catenina, e não canónica, Wnt/ Ca_2^+ e PCP (polaridade nas células planares) (Wilusz M. and Majka M.;2008). A via canónica determina o destino da célula, enquanto a via não-canónica controla o movimento celular e a sua polaridade (Massuko K. and Massaru K., 2011).

Na via de sinalização canónica (Figura 4) os sinais são transduzidos pela família de receptores *Frizzled* (FZD) e pelos coreceptores da cascata de sinalização β -catenina, LRP5/LRP6 (lipoprotein receptor-related protein 5/6). Quando não se verifica a ativação da via Wnt canónica, a β -catenina é fosforilada pela GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3 β*) e CKI alfa (*Kinase I alpha*), após a sua associação com o complexo APC/Axina. Esta fosforilação vai permitir a adição de uma cadeia de poliubiquitinas, no terminal amínico (NH₂) da β -catenina, pelo complexo β TRCP1 ou β TRCP2, havendo a posterior degradação da proteína no proteasoma. O inverso é observado quando estamos na presença da sinalização canónica. Neste caso, a proteína *Dishevelled* (DVL) é fosforilada pela CKI alfa. Esta via induz a associação da proteína DVL com o receptor transmembranar FZD e do complexo LRP5/6-Axina-FRAT, havendo, conseqüentemente, a libertação da β -catenina, a qual se encontrava fosforilada. Assim, esta fica livre, estável e apta para se translocar para o núcleo, induzindo ativação da transcrição de genes alvo, tais como FGF20, DKK1, WISP1, MYC e CCD1.

No entanto, podem existir vias estimulatórias alternativas. A sinalização pela Insulina, por exemplo, conduz à ativação da proteína cinase B (PKB/AKT), que por sua vez fosforila e inativa a GSK3 β , conduzindo à acumulação de β -catenina (Gehrke, I. *et al.*, 2009).

Uma das funções desta via sinalizadora está relacionada com a proliferação dos tímocitos e também de linfócitos pro-B, sugerindo que as proteínas WNT podem funcionar como fatores de crescimento de células progenitoras, tanto da linhagem B como T (Román-Gomez, J. *et al.*, 2006). Assim, a via de sinalização WNT/ β -catenina possui um papel importante na proliferação, diferenciação e sobrevivência das células hematopoiéticas. Foi demonstrado que a sobre-expressão de proteínas WNT iria aumentar a proliferação de células CD34⁺ e, deste modo, serão essenciais no processo de auto-renovação de células estaminais hematopoiéticas. Pode dizer-se, então, que estas proteínas WNT funcionam como fatores de crescimento hematopoiéticos (Wilusz, M. and Majka, M., 2008; Stall, F.J.T. and Fibbe, W.E., 2012). Devido à função fulcral da via WNT na hematopiese, a ocorrência de algum tipo de desregulação nesta via, aumenta o risco de formação de neoplasias hematológicas.

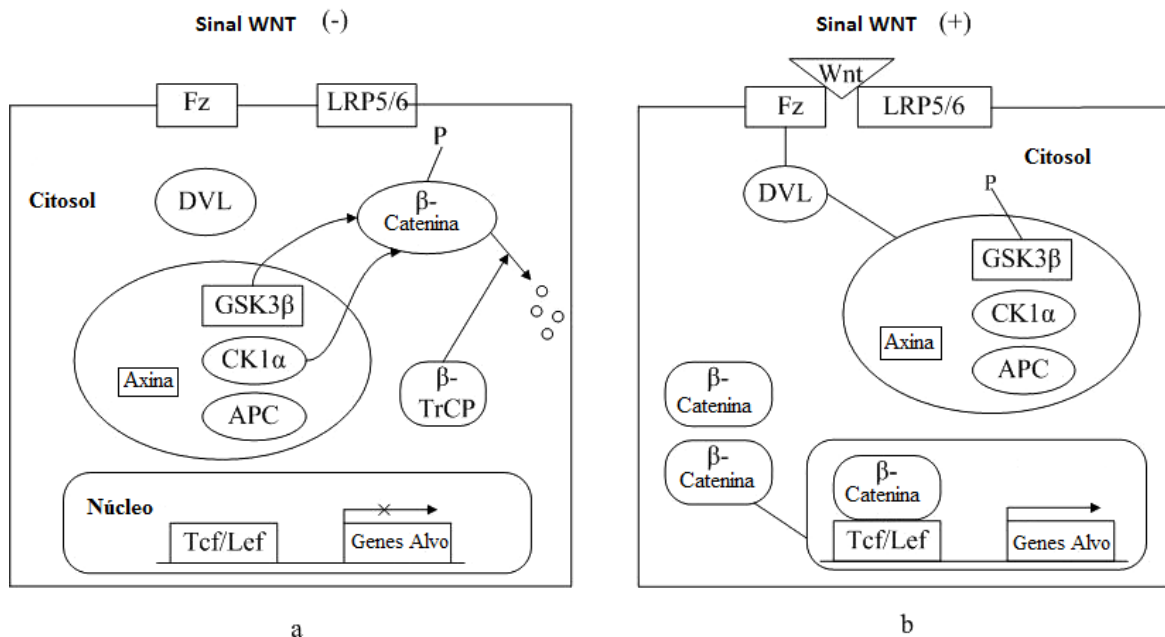


Figura 4 – Via WNT. (a) Na ausência do ligando WNT, a β -catenina citoplasmática é degradada pelo complexo de destruição. Neste complexo, a Axina actua como proteína âncora, no qual a ligação da APC, GSK3 β e CK1 facilitam a fosforilação sequencial da β -catenina. Assim, a β -catenina fosforilada é reconhecida pela β TrCP e é, posteriormente, degradada pela via de ubiquitinação no proteasoma. (b) Após a ligação do ligando WNT aos seus respectivos receptores Fz e LRP5/6, a proteína citoplasmática DVL é recrutada, fosforilada, ficando assim ativada. A ativação desta proteína induz a dissociação da GSK3 β da Axina, sendo que esta dissociação inibe a atividade da GSK3 β . De seguida, a fosforilação e degradação da β -catenina é inibida, em resultado da inativação do complexo de destruição. Subsequentemente, a β -catenina transloca-se para o núcleo. A β -catenina nuclear liga-se aos factores de transcrição Tcf/Lef, levando à alteração na expressão de diferentes genes alvo.

Assim, a via WNT encontra-se, frequentemente, alterada em tumores. Alguns estudos verificaram esta ocorrência em neoplasias linfóides (McWhirter *et al.*, 1999; Derksen *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2004; Mazieres *et al.*, 2005). Estudos realizados em leucemias linfoblásticas agudas e crónicas, evidenciam o fato da via WNT se encontrar envolvida na hematopoiese maligna. As células B de doentes com LLC sobreexpressam alguns genes da via WNT, em comparação com as células normais (Jose Roman-Gomez *et al.*, 2006). Além do seu envolvimento em vários tipos de leucemias, também o mieloma tem associado a uma disfunção na atividade da via WNT/ β -catenina.(Gehrke *et al.*, 2009).

Recentemente, a WNT-3a mostrou inibir a proliferação em linhas celulares de Leucemia Linfoblástica Aguda. O envolvimento da via WNT na regulação do crescimento e auto-renovação das células estaminais/progenitoras hematopoiéticas, em combinação com o seu potencial oncogénico em tumores linfóides, levou ao estudo dos efeitos diretos da activação da WNT em células B progenitoras de LLA (Khan *et al.*, 2007).

As células de leucemia linfoblástica aguda expressam WNTs e FZDs. A estimulação da WNT3a levou ao aumento dos níveis de β -catenina, a qual se acumulou no citoplasma, dirigindo-se, posteriormente, para o núcleo, situação que levou ao aumento da proliferação e sobrevivência das células tumorais, em condições *in vitro* (Lustig, B. and Behrens, J., 2003).

1.4.1.2. Via de sinalização NOTCH

A sinalização via NOTCH está implicada na regulação do destino celular, tal como na capacidade de auto-renovação de células estaminais adultas e diferenciação de células progenitoras. Além disso, e dependendo do contexto, tal como do desenvolvimento celular, a via NOTCH atua como regulador da proliferação e sobrevivência da célula (Dontu *et al.*, 2004).

Esta via de sinalização constitui um sistema fundamental utilizado por células vizinhas, de forma a estas conseguirem comunicar entre si. As proteínas NOCTH localizam-se na superfície celular, funcionando como receptores transmembranares e medeiam importantes funções celulares, através do contacto direto com a célula. A interacção do receptor NOTCH com os seus ligandos inicia a cascata de sinalização, a qual governa as decisões que implicam

o destino da célula, diferenciação celular proliferação e morte celular, durante a auto-renovação e desenvolvimento de tecidos adultos (Xenia *et al.*, 2007).

O conjunto dos elementos que constituem o sistema do NOTCH inclui o receptor NOTCH, os ligandos DSL (Delta e Serrate/Jagged em *Drosophila* e vertebrados e Lag-2 em *C.elegans*) e as proteínas CSL (CBF1) que se ligam ao DNA. Existem alguns elementos homólogos entre várias espécies, nomeadamente na *Drosophila*, quer do NOTCH (NOTCH 1-4), dos ligandos (ex. Jagged-1, Jagged-2) e componentes adicionais. A sua presença irá modular a sinalização NOTCH, dotando-a de alguma complexidade. (Lam *et al.*, 2000).

As proteínas (e ligandos) NOTCH possuem repetições extracelulares *EGF-like*, as quais interagem com os ligandos DSL. A ativação desta via, após associação do ligando ao receptor, é acompanhada por uma reação proteolítica, a qual irá libertar o NICD da membrana. O NICD é constituído por um domínio RAM (RAM23), o qual fortalece a interação com as proteínas CSL (*CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1, NLS (Nuclear Localization Signals)*), uma repetição *CDC10/Ankyrin* no domínio ANK, a qual medeia as interações da CSL com outras proteínas, e um domínio PEST (rico em resíduos de prolina, glutamato, serina e treonina) (Kopan, R., 2002).

O terminal carboxílico do receptor NOTCH possui um fragmento denominado NEXT. Este será clivado pela Gamma-Secretase (enzima que inclui a Presenilina e Nicastrina), libertando, por conseguinte, o NICD para o citoplasma (Figura 5). Em detrimento desta libertação, o NICD é translocado para o núcleo, onde se irá ligar ao CSL (família de proteínas que ligam DNA, formando um ativador da transcrição) induzindo a ativação da expressão de um grupo de genes alvo. Durante esta ativação, o NOTCH é clivado, pelo menos, três vezes. A primeira clivagem ocorre após a ação de uma protease, *Furin-like*, que converte, no complexo de Golgi, proteínas NOTCH em heterodímeros. Esta “clivagem S1” é necessária para que se verifique a expressão membranar do NOTCH, mas está, diretamente, envolvida na libertação do NICD (induzida pelo ligando). Em vez disso, a ligação dos ligandos ao heterodímero NOTCH dá início a uma proteólise em dois locais adicionais, S2 e S3. A clivagem S2 (executada pela TACE ou por metaloproteinases da família ADAM, como ADAM 10) divide/corta a maior parte do domínio extracelular do NOTCH e a S3 (realizada pela gamma-secretase), a qual ocorre dentro do domínio transmembranar, liberta o domínio intracelular transcricionalmente activo (Kopan, 2002).

Portanto, a ativação do NOTCH pelos ligandos DSL liberta, proteoliticamente, o domínio intracelular do NOTCH para a membrana plasmática, e a proteína resultante é translocada, diretamente para o núcleo participando na regulação da transcrição dos genes alvo.

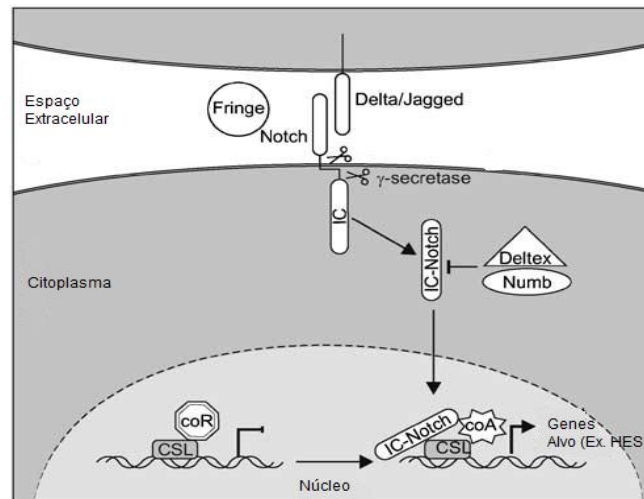


Figura 5 – Via de sinalização NOTCH. O receptor NOTCH é constituído por uma porção extracelular, a qual contém múltiplas repetições EGF e uma parte intracelular que media a transdução do sinal NOTCH. A ligação de ligandos da família Delta/Jagged, pode ser modulada por proteínas Fringe. A interação do NOTCH com o ligando induz clivagens proteolíticas sucessivas do NOTCH, tanto pela metaloproteínase como pela atividade da gama-secretase. Estas reações proteolíticas irão libertar parte intracelular da proteína, ICN(intercelular NOTCH). O ICN é translocado para o núcleo onde se liga a um fator de transcrição nuclear, CSL. Deltex 1 e Numb são reguladores citoplasmáticos da NOTCH. A ligação do ICN ao CSL induz o recrutamento de coativadores (coA) e corepressores (coR), sendo que os coA irão estimular a transcrição dos genes alvo do NOTCH. (Imagem adaptada de Weerkamp, F. *et al.*, 2006).

O NOTCH pode atuar através de duas vias: (i) como fator de transcrição, para regular a expressão génica ao nível da transcrição e (ii) como estimulador proteico, através de um mecanismo que envolve a destruição, mediada pelo proteasoma. Uma vez no núcleo, o NICD converte a CSL de repressor a ativador da transcrição. Esta conversão ocorre pela interação direta entre os fatores de transcrição NICD (*NOTCH intracellular domain*), SKIP (*Ski-Related Protein*) e CSL (*CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1*). O metabolismo do NICD no núcleo é controlado pela sua fosforilação e ubiquitinação, sendo esta feita pela ligase de ubiquitina E3. A degradação da NCID reinicia a célula, preparando-a para, uma possível, repetição de todos os passos desta via (Kopan, 2002).

A expressão anormal dos receptores do NOTCH foi encontrada em diferentes tipos de lesões metaplásicas epiteliais e lesões neoplásicas, sugerindo que o NOTCH poderá atuar como proto-oncogene (Dontu *et al.*, 2004). A via de sinalização NOTCH funciona, no sistema hematopoiético, em vários pontos decisivos. Durante a linfopoiese, a atividade do NOTCH 1 induz as células progenitoras descomprometidas a formar células T, em vez de células B comprometidas. Esta via, quando desregulada, é oncogénica, promovendo o desenvolvimento de leucemia linfoblástica aguda de células T. Deste modo, esta via pode constituir um bom alvo terapêutico neste tipo de leucemias. Assim, os inibidores de gama-secretase são compostos que podem ser considerados, como terapêutica alvo, visto bloquearem a ativação proteolítica dos receptores NOTCH (Rao *et al.*, 2009).

O gene *NOTCH1* encontra-se, frequentemente, mutado em células T de LLA, ocorrendo em mais de 50% em casos de doença. As mutações do *NOTCH1* incluem deleções, duplicações ou inserções, e originam alterações nos domínios PEST, HD, TAD e ANK da proteína. A grande maioria das mutações foi observada nos domínios PEST e HD, os quais são responsáveis pela associação estável entre a subunidade extracelular e a transmembranar do receptor NOTCH. Além disso, podem ainda ser detetadas mutações pontuais (tal como as deleções e inserções referidas acima) em células progenitoras pluripotentes hematopoiéticas, visto estas expressarem NOTCH. Estas alterações induzem as células filhas a adotar o destino das células T, aumentando deste modo o “aglomerado” de células, e também a sobre-expressão de fatores de transcrição (Zhu *et al.*, 2006).

Em suma, o receptor transmembranar NOTCH é essencial na regulação da formação de células T. Assim sendo, a ocorrência de alterações a nível desta via potencia a probabilidade de desenvolvimento de LLA.

1.4.1.3. Via de sinalização Hedgehog

A via Hedgehog (Hh) é uma via de sinalização celular altamente regulada e muito importante não só para o desenvolvimento embrionário mas também na padronização de tecidos (organogénese). Esta é também essencial na reparação tecidual e na manutenção de células estaminais em tecidos maduros. No sistema hematopoiético de adultos, a sinalização Hh regula o desenvolvimento intratímico de células T, funcionando também como mecanismo de sobrevivência em células foliculares dendríticas, prevenindo, assim, a apoptose em

células B germinais (Ok *et al.*, 2011). Assim sendo, a via Hedgehog desempenha uma função fulcral ao nível da hematopoiese, tanto primitiva (embrionária) como definitiva (adulto) (Dierks *et al.*, 2004).

Neste mecanismo de sinalização, foram encontrados 3 ligandos, homólogos do único gene Hh encontrado em *Drosophila*, sendo estes: Sonic hedgehog (SHH), Desert hedgehog (DHH) e Indian hedgehog (IHH). Estes ligandos são produzidos pelas células do estroma (Dierks, C. *et al.*, 2008). Embora estes elementos ativem o mesmo sinal de transdução, atuam em órgãos diferentes. O gene *SHH* é expresso no sistema nervoso central, pulmão, dente, vísceras e folículo do cabelo; o gene *IHH* encontra-se envolvido na formação dos côndilos do osso e o gene *DHH* é expresso, maioritariamente, nas gónadas. É importante referir que estas proteínas homólogas, antes de se tornarem ativas, são submetidas a um processo de maturação (Ok *et al.*, 2011).

O sinal Hh é transmitido por um determinado número de proteínas-chave, incluindo a PTCH (*Patched*) e a SMO (*Smoothed*), que se encontram na superfície da célula. A PTCH é constituída por doze domínios transmembranares e possui dois homólogos em humanos, PTCH 1 e PTCH2. Esta é formada por dois *loops* extracelulares, os quais irão permitir a ligação dos ligandos do Hh. Por sua vez, a proteína SMO é, também ela, dotada de domínios transmembranares, sendo estes tanto intra (tem homologia com GPCRs) como extracelulares (Peukert and Miller-Moslin, 2010; Scales and Sauvage, 2009).

A ligação do ligando ao PTCH induz endocitose do complexo PTCH-ligando, sendo esta seguida pela migração da SMO para o cílio primário (Figura 6). A SMO irá, posteriormente, regular as proteínas GLI que se encontram no citoplasma. Esta família de proteínas GLI (que inclui as proteínas GLI1, GLI2 e GLI3), encontra-se intimamente relacionada com a regulação da expressão de genes alvo, regulação esta que será feita pela interação direta das GLI com uma região consenso dos promotores dos genes em questão. No caso de não existirem ligandos, a PTCH inibe a SMO, e as proteínas GLI irão ser ubiquitinadas pela TrCP β , uma ligase E3 de ubiquitina, dependente de fosforilação. Antes da ubiquitinação das GLI são necessárias fosforilações pela PKA, CK1 e GSK3 β . Após a ubiquitinação, a GLI 1 é totalmente degradada e eliminada da célula via proteasoma, enquanto que as GLI 2 e 3 são, apenas, parcialmente degradadas, formando-se proteínas repressoras de baixo peso molecular, as quais migram para o núcleo, ligando-se, por conseguinte, a sequências consenso. Desta

forma, é reprimida a expressão de genes alvo da via Hh, como GLI1, PTCH1, PTCH2, BCL2, ABCG2, CCND2, entre muitos outros.

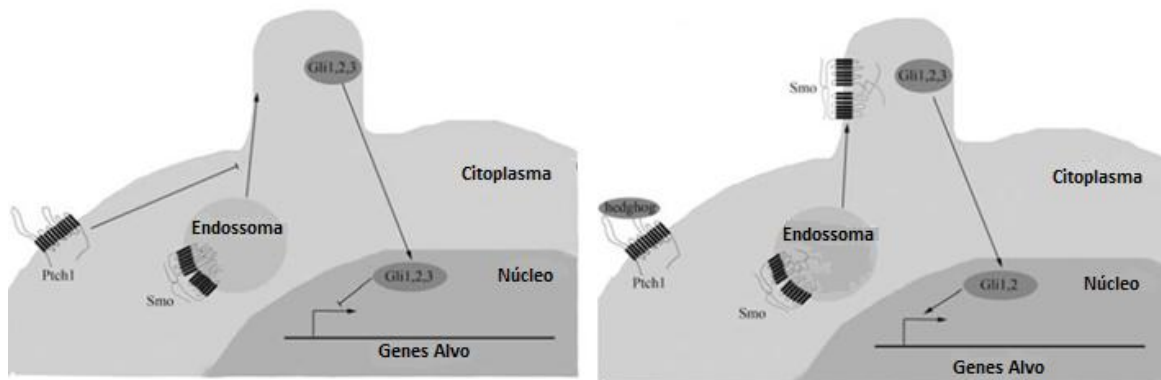


Figura 6 – Via de sinalização Hedgehog. Na ausência de ligandos Hh, a Ptch1 inibe a SMO, o que resulta na formação de formas repressoras dos fatores de transcrição GLI, GLI2 e GLI3. Na presença de ligandos Hh, a SMO já não é afetada pela Ptch1, havendo a ativação da via, levando isto à formação de formas ativas dos fatores de transcrição GLI, ocorrendo, por fim, a ativação de genes alvo. (Imagem adaptada de Yang *et al.*, 2011).

A ativação inapropriada desta via de sinalização ocorre em diversos tipos de tumores, estando envolvida em neoplasias hematológicas, nomeadamente em mieloma múltiplo, linfomas e leucemia mielóide crônica (Merchant and Matsu, 2010).

Apesar desta via não se encontrar bem estudada neste tipo de neoplasias, sabe-se que na grande maioria dos tumores hematológicos, a via Hh não possui um papel nos eventos iniciais da carcinogénese. Em vez disso, contribui para a manutenção tumoral, crescimento e resistência à quimioterapia. Alguns dados sugerem também que esta via de diferenciação participa na expansão e/ou sobrevivência das células estaminais cancerígenas, como acontece na leucemia mielóide crônica e leucemias agudas. Segundo Mar *et al.* (2011), a via de sinalização Hh promove o crescimento de células T em LLA.

1.5. As vias de diferenciação WNT, NOTCH, HEDGEHOG como alvos terapêuticos na Leucemia Linfoblástica Aguda

A leucemia linfoblástica aguda representa um grupo, clínica e biologicamente, heterogêneo de doenças caracterizadas pela proliferação anormal e acumulação de células linfóides imaturas dentro da medula óssea e dos tecidos linfóides (Vitale *et al.*, 2006).

Várias vias de sinalização, nomeadamente as vias Hh, NOTCH e WNT/ β -catenina possuem importantes funções nas decisões celulares tanto no desenvolvimento embrionário como no organismo adulto. Estas vias exercem funções importantes na hematopoiese, sendo que a desregulação das mesmas assume um papel fulcral em neoplasias hematológicas (Cerdan and Bhatia , 2010). De fato, algumas das leucemias foram associadas às vias WNT, NOTCH e Hh. Vários dados da bibliografia mostram a influência da desregulação destas vias sinalizadoras na formação e manutenção de células malignas em LLA.

Neste sentido, e sabendo que o complexo de destruição da β -catenina é fundamental para a estabilidade e bom funcionamento desta via, seria interessante verificar os efeitos que um estabilizador deste complexo, nomeadamente um estabilizador da Axina, como o IWR-1. Estando esta proteína estável, o complexo de destruição irá permanecer funcional, havendo posteriormente aumento da fosforilação da β -catenina e conseqüente destruição. Desta forma, os níveis desta diminuem, ocorrendo assim a inibição da transcrição de proteínas alvo que iriam contribuir para a ativação constitutiva desta via (Curtin and Lorenzi 2010).

Por outro lado, a modulação da via NOTCH através da utilização de um inibidor da gama-secretase (GSI), nomeadamente o composto Gamma-Secretase Inhibitor XXII, poderá também ser uma abordagem alternativa na LLA. Segundo, Lewis *et al.*,(2007) a utilização de GSI, para além de diminuir a proliferação celular, pode conduzir as células a apoptose.

O GSI actua na inibição da protease gama-secretase. Esta, através de uma clivagem de um dos domínios intracelulares do receptor NOTCH, irá concluir a ativação deste, induzindo a translocação do NICD para o núcleo, ativando a transcrição génica. A administração deste inibidor irá inibir a clivagem do receptor, fazendo com que não haja a conseqüente ativação da transcrição, inibindo assim esta via de sinalização (Rao *et al.*, 2009).

É importante referir que muitas das vezes se verifica resistência ao inibidor da gama-secretase (muitas das vezes devido às mutações referidas anteriormente), havendo necessidade de serem realizados testes complementares, para aferir qual a causa da resistência apresentada (Medyouf *et al.*, 2010).

A inibição dos efeitos estimulantes da via Hh observados nas células tumorais, os quais são induzidos por fatores de transcrição da família GLI, poderá também ser uma alternativa terapêutica. Neste sentido, os antagonistas da SMO, como o Vismodegib (GDC-0449), poderão ser utilizados em monoterapia ou como terapia adjuvante à quimioterapia. Este composto funciona como antagonista da SMO, o qual irá bloquear as atividades dos receptores membranares, SMO e/ou PTCH, inibindo desta forma a progressão da via de sinalização e, por conseguinte, a proliferação celular (Molckovsky, A. and Siu, L.L., 2008).

O Vismodegib (GDC-0449) é um antagonista da via Hedgehog, atuando ao nível da proteína SMO. A SMO é uma proteína transmembranar que se desloca para a superfície celular quando os ligandos Hedgehog (IHH, DHH, SHH) se ligam à PTCH1. Esta translocação da SMO vai dar início à ativação das proteínas da família GLI, as quais irão induzir a transcrição de genes alvo. Quando se verifica a inibição da SMO, a transcrição irá ser travada (Molckovsky and Siu, 2008).

Atendendo a estas observações e aos bons resultados observados em vários tipos de cancro, a eficácia terapêutica destes agentes na Leucemias Linfoblástica Aguda, isoladamente ou em associação terapêutica poderá permitir um tratamento efetivo destas neoplasias hematológicas.

Este trabalho teve como principal objectivo avaliar o potencial terapêutico dos inibidores das vias WNT, NOTCH e Hedgehog, quando são administrados separadamente ou em associação, numa linha celular de LLA.

2. Materiais e Métodos

2.1 Listagem do material e equipamento

- Linha Celular CEM (ATCC , American Type culture Collection)
- Moduladores das vias em estudo: GSI XXI (Calbiochem), IWR-1 (Sigma-Aldrich) e GDC 0449 (Vismodegib) (Selleckchem)
- Corante de May-Grunwald-Giemsa (Sigma-Aldrich)
- Microscópio ótico *Nikon Eclipse 80i*
- *kit* de deteção de morte celular da Immunostep (Anexina V e Iodeto de Propídeo)
- citómetro de fluxo FACScalibur
- *kit* IntraCell Immunostep (anti-BAX(Santa Cruz Biotechnology) e anti-BCL-2 (Santa Cruz Biotechnology))
- ApoStat (R&D Systems) (Caspases)
- Molecular Probes, Invitrogen (JC1)
- Solução de IP/RNase (Immunostep) (Ciclo Celular)

2.2 Caracterização da linha celular

Neste trabalho utilizou-se como modelo *in vitro* de Leucemia Linfoblástica Aguda a linha celular CEM, obtida no ATCC (American Type culture Collection). Esta foi isolada a partir de uma doente, de etnia caucasiana, de 4 anos de idade com Leucemia Linfoblástica Aguda (Foley, G. *et al*, 1965). A nível morfológico, esta linha exhibe características de células semelhantes a linfoblastos observados em esfregaços do sangue periférico de doentes com esta patologia. Os núcleos são caracteristicamente densos, contendo, frequentemente, profundos recortes e nucléolos proeminentes. Podem também existir células com morfologia aberrante. O citoplasma é reduzido, sendo a sua coloração pouco evidenciada (Foley, G. *et al*, 1965).

A linha celular foi mantida em cultura no meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute-1640*), pH 7.4, contendo 2mM L-Glutamina, 20 mM HEPES-Na, 1.5 g/L NaHCO₃, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, sendo posteriormente enriquecido com soro fetal

bovino (Gibco, Invitrogen), perfazendo uma concentração de 10%. As células são mantidas em cultura pela adição ou substituição de meio, a uma temperatura de 37°C num ambiente húmido, possuindo níveis de CO₂ a 5%, numa densidade celular entre 0.3/0.5 milhões de células/mL (10⁶ cels/mL).

2.3 Análise da proliferação e morte celular através da determinação da densidade e viabilidade celulares

Os estudos de densidade e viabilidade celular permitem fazer a avaliação dos efeitos exercidos pelos inibidores em estudo (GSI, IWR e GDC) nas células de leucemia linfoblástica aguda. De forma a avaliar estes parâmetros, recorreu-se ao teste de exclusão com azul tripano. Este corante vital permite, através da análise da permeabilidade da membrana celular, estabelecer se a célula se encontra viável ou não. Assim, a membrana plasmática das células viáveis, estando intacta, é impermeável ao azul tripano, impossibilitando a sua entrada para o citoplasma, apresentando-se incolor. O contrário acontece em células que se encontram mortas. Estas apresentam ruptura na membrana, permitindo a entrada do azul tripano, adquirindo coloração azul. Através desta técnica, avaliou-se o perfil de crescimento de da linha celular CEM, assim como o efeito citostático e citotóxico induzidos pelos diferentes fármacos em estudo através da análise da densidade e viabilidade celular.

Assim, a linha celular CEM foi mantida em cultura na ausência e na presença dos fármacos: do Gamma-Secretase inhibitor XXII (Calbiochem), um inibidor da enzima gama-secretase (GSI) da via NOTCH; do IWR-1 (Sigma-Aldrich), um estabilizador do complexo Axina/GS3K da via WNT; e do Vismodegib (GDC 0449, Selleckchem), um antagonista da SMO da via Hedgehog. As concentrações de fármaco testadas abrangem as gamas 50 a 75 µM, 10 a 50 µM e 50 a 200 µM, respectivamente para o GSI, IWR-1 e GDC 0449. As células foram incubadas na densidade celular inicial de 0.5x10⁶ cels/mL e mantidas em cultura durante 72h. A cada 24h foram retiradas alíquotas das células de modo a determinar a densidade e viabilidade celular. Os resultados apresentados representam a média ± o desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes.

2.4 Avaliação da morte celular

A avaliação do tipo de morte celular induzida pelos diferentes fármacos em estudo foi efetuada através da análise dos aspectos morfológicos, por microscopia ótica, e por citometria de fluxo recorrendo à dupla marcação com Anexina V e Iodeto de Propídeo.

2.4.1 Análise Morfológica (Coloração May Grunwald Giemsa)

A morfologia da linha celular CEM foi analisada em células incubadas na ausência (controlo) e na presença dos fármacos GSI, IWR-1 e GDC 0449, durante 24h, por microscopia ótica após realização de esfregaços de células e posterior coloração com o corante de May-Grunwald-Giemsa (Sigma-Aldrich). Para a realização dos esfregaços, procedeu-se à recolha de 50.000 células e à sua centrifugação durante 5 minutos a 300 xg. De seguida, foram lavadas com tampão fosfato (PBS), através de uma centrifugação similar à anterior. Para melhorar a adesão das células à lâmina, estas foram ressuspensas numa pequena quantidade de Soro Fetal Bovino (FBS). Após a preparação das lâminas, procedeu-se à coloração: os esfregaços foram corados durante 3 minutos com solução de May-Grünwald (preparada em 0,3 % de metanol e diluída na proporção de 1:1 com água destilada, aquando da utilização). Seguidamente, adicionou-se solução de Giemsa (1 g de corante de Giemsa dissolvido em 66 mL de glicerol e 66 mL de metanol, diluído na proporção de 1:8 com água destilada, aquando da utilização) durante 15 minutos. Finalmente, seguiu-se a lavagem dos esfregaços e, após a secagem, foi analisada a morfologia das células ao microscópio ótico. Para o efeito, utilizou-se o microscópio ótico *Nikon Eclipse 80i*, com câmara digital acoplada, que permitiu o registo e processamento de imagens recorrendo ao programa *Nikon ACT-1*.

2.4.2 Avaliação da morte celular por citometria de fluxo

Uma das técnicas utilizadas na deteção da morte celular é a citometria de fluxo, na qual são usados marcadores de necrose e apoptose, como por exemplo o Iodeto de Propídeo (IP) e a Anexina V, respetivamente.

Nas células em apoptose ocorre inicialmente alteração dos fosfolípidos da bicamada lipídica, em especial, a translocação da fosfatidilserina para o folheto externo, um fosfolípido com carga negativa que normalmente se encontra no folheto interno da membrana celular. A

Anexina V, quando se encontra na presença de cálcio, liga-se com grande afinidade a fosfolípidos com carga negativa, como a fosfatidilserina, permitindo desta forma a determinação das células em apoptose. Por outro lado, o IP liga-se ao ADN, intercalando-se estequiometricamente entre as bases emitindo fluorescência. A sua entrada na célula ocorre apenas quando a membrana se encontra desintegrada, sendo esta uma das principais características das células necróticas. Esta ruptura membranar pode também acontecer em situações de apoptose tardia. Ao recorrer à estes dois compostos, torna-se possível distinguir as células viáveis (negativas para Anexina V e IP), as células em apoptose inicial (positivas para Anexina V e negativas para IP), as células em necrose (negativas para Anexina V e positivas para IP) e, por fim, as células em necrose/apoptose tardia (positivas para ambos os compostos) (Darzynkiewicz, Z. *et al*, 1997).

De modo a avaliar a viabilidade e o tipo de morte celular induzida por estes compostos, nas respectivas condições experimentais, as células CEM foram marcadas com Anexina V e IP. Para o efeito, recolheu-se o volume equivalente a um milhão de células em suspensão celular e lavou-se com tampão fosfato (PBS) durante 5 minutos a 1.000 xg. O *pellet* foi ressuspenso em 100 µL de tampão de ligação frio e, posteriormente, incubado com 5 µL de Anexina V-FITC e 2 µL de IP, durante 15 minutos na ausência de luz, de acordo com o descrito no *kit* de detecção de morte celular da Immunostep. De seguida foram adicionados 400 µL de tampão de ligação e procedeu-se à análise das células num citómetro de fluxo FACScalibur equipado com um laser de árgon. Através do programa CellQuest™ foram adquiridas 10.000 células e os resultados obtidos foram posteriormente analisados com recurso ao programa Paint-a-Gate™. Os resultados são apresentados em percentagem, sendo cada uma das populações celulares identificadas com base na positividade para a marcação com a Anexina V e/ou com o IP.

2.4.2.1 Avaliação da expressão de moléculas envolvidas na morte celular por citometria de fluxo

A avaliação de moléculas relacionadas com a morte celular permite avaliar alguns dos mecanismos envolvidos no efeito citotóxico induzido pelos compostos em estudo. Através da citometria de fluxo, e recorrendo à utilização de anticorpos monoclonais marcados com sondas fluorescentes, foram analisados os níveis de expressão das proteínas pro-apoptóticas

BAX e caspases, e da anti-apoptótica, BCL-2. Para tal, aproximadamente, meio milhão de células da linha celular CEM foram incubadas nas condições referidas anteriormente, e, posteriormente lavadas com PBS pH7,4, durante 5 minutos a 1.000xg.

A avaliação da expressão intracelular das proteínas BAX e BCL-2 requer a permeabilização e fixação das células. De acordo com as instruções do fabricante do *kit* IntraCell (Immunostep), as células foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente, no escuro, com 100 μ L da solução A (solução de fixação). Após lavagem com PBS, as células foram novamente incubadas durante 15 minutos e no escuro, com 100 μ L da solução B (solução de permeabilização) e com 1 μ g dos respectivos anticorpos, anti-BAX ligado à sonda fluorescente ficoeritrina (PE) (Santa Cruz Biotechnology) e anti-BCL-2 ligado à sonda fluorescente isocitrato de fluoresceína (FITC) (Santa Cruz Biotechnology). Por fim, as células foram lavadas, novamente, com PBS por centrifugação a 1.000xg, durante 5 minutos. Finalmente, procedeu-se à aspiração do sobrenadante, e as células foram ressuspensas em 400 μ L da mesma solução tampão.

Os níveis das caspases foram avaliados por um *kit* de deteção intracelular de caspases, ApoStat (R&D Systems). Depois da lavagem inicial das células, estas foram ressuspensas em 500 μ L de PBS e incubadas com 0.5 g de ApoStat, um composto fluorescente que determina a presença de caspases activadas, durante 30 minutos a 37°C. Findo este período, as células foram analisadas no citómetro de fluxo como anteriormente descrito.

Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média de expressão das moléculas em análise nas células em estudo, incubadas na presença ou ausência dos compostos em estudo. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 ensaios independentes.

2.4.2.2 Avaliação intracelular da expressão de ciclina D1 e p53

Para além da indução de morte celular, vários compostos são também capazes de influenciar a proliferação celular e a regulação do ciclo celular. Neste sentido, avaliou-se a expressão das proteínas ciclina D1 e p53, por citometria de fluxo, na ausência e na presença dos fármacos em estudo (GSI, IWR-1 e GDC 0449). A marcação destas duas proteínas é muito semelhante à marcação das proteínas BAX e BCL-2, havendo, por isso, uma incubação prévia com uma solução de fixação e sua posterior lavagem. De seguida, foram adicionados 1 μ g dos respectivos anticorpos, anti-p53-FITC e anti-ciclina D1-PE, juntamente com a solução de permeabilização. Após incubação de 15 minutos no escuro, as células foram lavadas com

PBS por centrifugação a 1.000xg, durante 5 minutos. Por fim, as células foram ressuspensas em 300 µL da mesma solução tampão e analisadas no citómetro de fluxo. Os resultados são apresentados em MIF e representam a média de expressão intracelular de ciclina D1 e p53 nas células incubadas nas condições descritas anteriormente.

2.5 Avaliação intracelular do potencial de membrana mitocondrial

A mitocôndria, um organelo intracelular essencial na regulação de vários processos celulares entre eles a apoptose, apresenta diminuição do potencial membranar quando se encontra num estado não funcional (Salvioli *et al.*, 1997). Assim sendo, medir/avaliar a alteração do potencial de membrana da mitocôndria é um marcador de actividade mitocondrial, e indirectamente da viabilidade celular.

O potencial de membrana mitocondrial foi medido por citometria de fluxo, através da utilização da sonda 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC1). Esta sonda é um catião lipofílico que atravessa facilmente as membranas biológicas acumulando-se no interior da mitocôndria. Quando ocorre diminuição do potencial de membrana, ou seja, quando a membrana mitocondrial se encontra despolarizada, a sonda JC1 permanece no citoplasma sob a forma monomérica exibindo fluorescência verde no comprimento de onda de 525 nm. Quando o potencial de membrana aumenta os monómeros de JC1 entram na mitocôndria, verificando-se a formação de agregados que exibem fluorescência vermelha, a qual é detectada no comprimento de onda de 590 nm. (Salvioli *et al.*, 1997; Yao *et al.*, 2008) Assim, a estimativa do potencial de membrana é determinado pela razão entre a intensidade de fluorescência verde e vermelha, ou seja pela razão entre monómeros e agregados (M/A).

Tal como descrito anteriormente, aproximadamente meio milhão de células foram incubadas na ausência e na presença dos 3 fármacos em estudo durante um período de 24h. Findo o período de incubação, as células foram recolhidas e lavadas com PBS pH7,4 por centrifugação a 1.000xg, durante 5 minutos. Após lavagem, estas foram ressuspensas em 1 mL de PBS e incubadas durante 15 minutos a 37°C com 5 µg/mL de JC1 (Molecular Probes, Invitrogen), preparado em DMSO a 5 mg/mL. Após a incubação, as células foram lavadas, ressuspensas em 300 µL de PBS e analisadas no citómetro de fluxo.

Os resultados representam a média da razão entre os MIF dos monómeros e agregados de JC1, tendo-se realizado 3 ensaios independentes.

2.6 Avaliação do ciclo celular

De forma a analisar a influência dos inibidores em estudos nas diferentes fases do ciclo celular, recorreu-se à análise da distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular, G0/G1, S e G2/M, por citometria de fluxo com recurso a uma solução de IP/RNase (Immunostep).

Para tal, as células foram incubadas nas condições anteriormente descritas, e posteriormente lavadas com PBS, através de uma centrifugação a 1.000xg, durante 5 minutos. De seguida, adicionou-se 200 µL de etanol 70%, o qual ficou a incubar durante 30 minutos, no frio, de modo a fixar as células. Após este período de incubação, as células foram lavadas. Após a lavagem, as células foram ressuspensas e incubadas em 300 µL da solução de iodeto de propídeo (PI/RNASE) (Immunostep), durante 15 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Os resultados obtidos foram posteriormente analisados com recurso ao programa Mod-FIT™ e representam a percentagem de células em cada fase do ciclo celular.

2.7 Análise estatística

O tratamento estatístico dos resultados foi efetuado utilizando o programa Excell. Na análise estatística foram utilizados os testes t de Student. Em todos os testes utilizados considerou-se um nível de significância estatística 95% ($p < 0.05$).

3. Resultados

3.1. Caracterização da linha celular CEM

Neste trabalho utilizou-se como modelo *in vitro* de Leucemia Linfoblástica Aguda a linha celular CEM, obtida no ATCC (American Type Culture Collection). Esta foi isolada a partir de uma doente, de etnia caucasiana, de 4 anos de idade com Leucemia Linfoblástica Aguda (Foley, G. *et al*, 1965). Esta linha celular cresce em suspensão, sendo mantida em cultura a 37°C, em atmosfera humedecida, com os níveis de CO₂ a 5%. A fase de crescimento ocorre durante 72h.

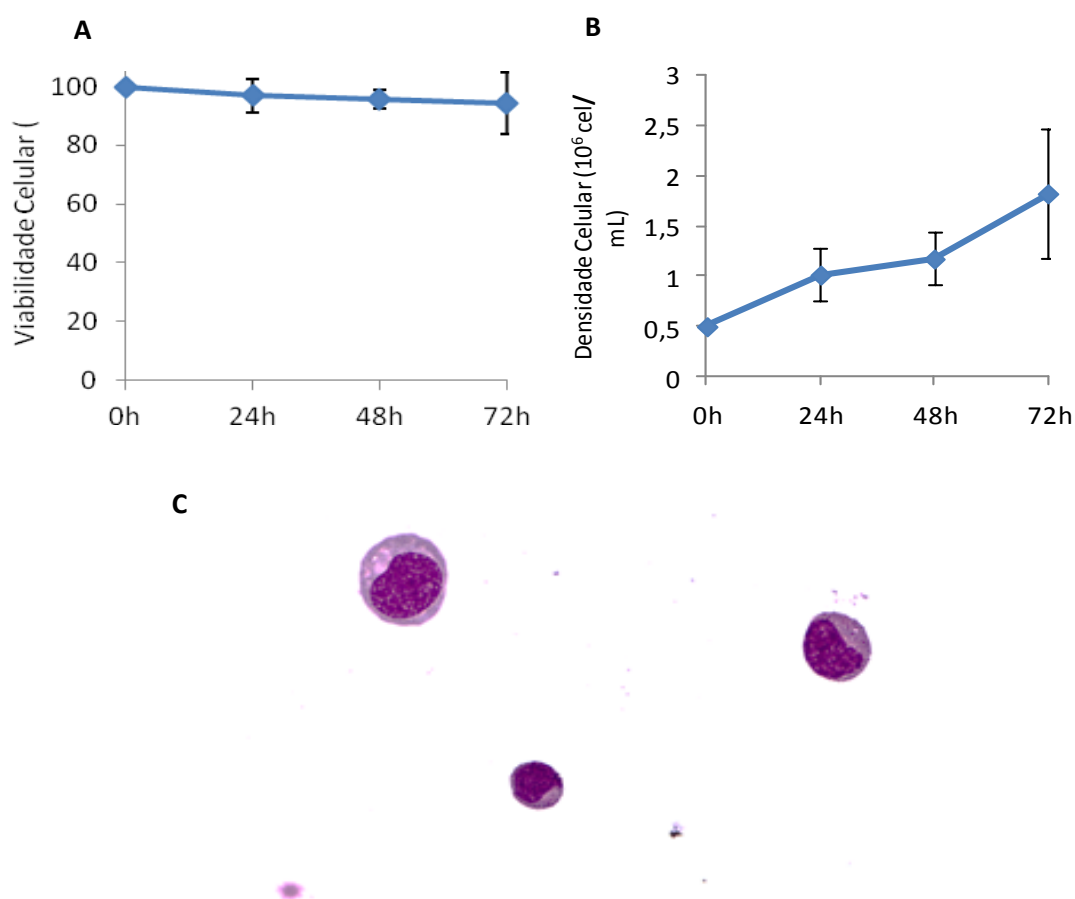


Figura 7 – Curvas de viabilidade (A) e de crescimento celular (B) e aspectos morfológicos (C) das células CEM. Em (A) e (B) estão representadas as curvas de viabilidade e crescimento celular das células CEM incubadas nas condições ótimas de densidade celular, às 24h, pela técnica de azul de tripano, sendo que os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes. Em (C) observa-se a representação das características morfológicas das células, após coloração May-Grunwald-Giemsa e, posterior, visualização por microscopia ótica a 500x.

A viabilidade celular (Figura 7-A) mantém-se próxima dos 100% ao longo das 72 horas para as células CEM e a densidade celular, durante a fase exponencial, duplica, aproximadamente, a cada 24 horas até a um máximo aproximado de $1,8 \times 10^6$ células/mL (Figura 7-B).

Como representado na Figura 7-C, as células CEM apresentam características típicas de blastos, ou seja elevada relação núcleo/citoplasma, acentuada basofilia citoplasmática e granulações citoplasmáticas, características morfológicas sugestivas de LLA-T. Nos esfregaços destas células é possível também observar várias células em mitose.

3.2. Efeito dos moduladores das vias de sobrevivência, na proliferação e morte celular

De seguida, procedeu-se à administração dos moduladores das vias de sinalização NOTCH, WNT/ β -catenina e Hedgehog. As figuras 8, 9 e 10 representam os efeitos do inibidor da Gamma-Secretase XXI, do IWR-1 e do GDC 0449, respetivamente, na densidade e viabilidade das células CEM. A análise das curvas de densidade e viabilidade celular obtidas quando as células foram incubadas na ausência e na presença destes compostos fornecem informações sobre os seus efeitos ao nível da proliferação e morte celular.

Na figura 8 estão representados os resultados da utilização do modulador da via NOTCH, o inibidor da gama-Secretase, na viabilidade e na densidade celular obtidos a partir da administração de várias concentrações do fármaco. Como se pode observar, logo às 24h, observa-se diminuição da viabilidade superior para 50% para concentrações iguais ou superiores a 50 μ M (Figura 8-A). Para estas concentrações, verifica-se um efeito dependente da dose e do tempo de exposição. Por outro lado, quando as células CEM são expostas a concentrações entre os 5 e os 25 μ M, o efeito citotóxico é reduzido e reversível para a concentração de 25 μ M. De igual modo se observa diferenças significativas no crescimento celular, verificando-se uma redução drástica da densidade celular concentrações superiores a 50 μ M (Figura 8-B). Estes resultados permitem-nos inferir que este fármaco possui tanto efeito citotóxico como citostático nas células CEM.

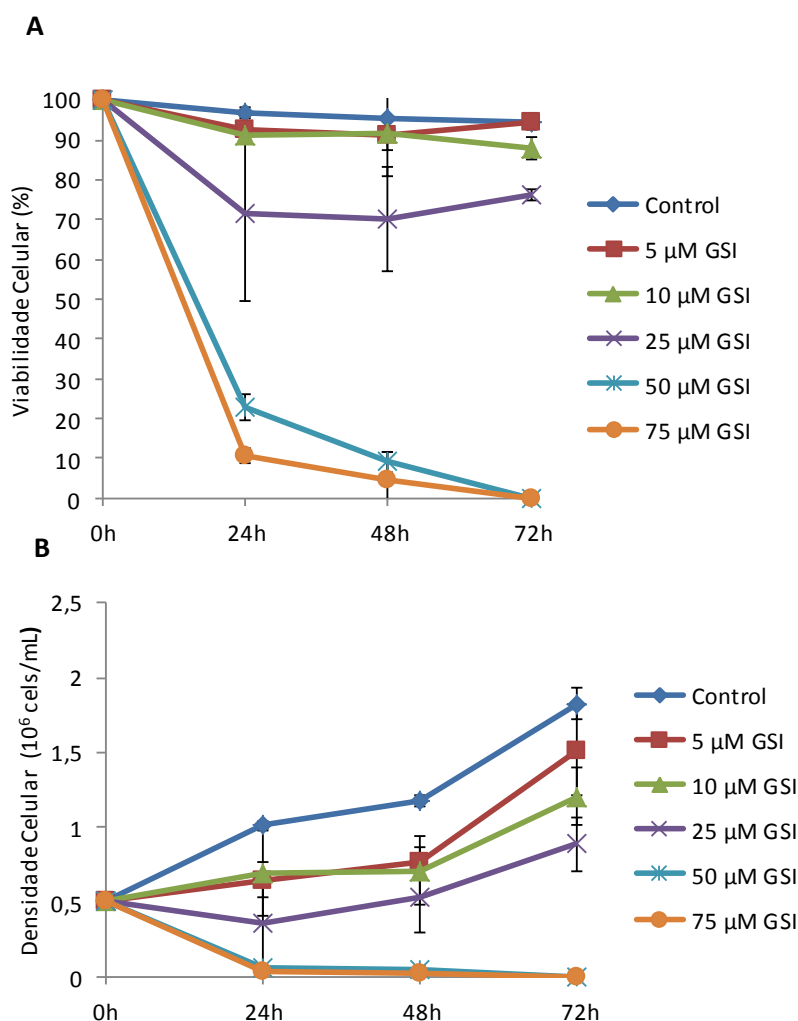


Figura 8 – Efeito do fármaco Inibidor da Gamma-Secretase XXII (GSI) na viabilidade (A) e na densidade (B) celular das células CEM. As células foram incubadas numa densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ células/mL, na ausência (controlo) e na presença de concentrações crescentes do inibidor da via NOTCH o *Gamma-Secretase Inhibitor XXII*, durante 72 horas. A viabilidade celular (A), e densidade celular (B) foram avaliadas recorrendo ao método de azul tripano como descrito na secção de materiais e métodos. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes.

Seguidamente, avaliou-se o efeito do fármaco IWR, um modulador da via WNT/ β -catenina, nas células CEM, após 72 horas de incubação (Figura 9). Como se pode observar na Figura 9-A, o IWR induz acentuada redução da viabilidade celular após 24h de incubação, quando as células são incubadas com concentrações de 40 e 50 μ M deste composto. Por outro lado, podemos também verificar que a incubação das células CEM com concentrações mais baixas deste compostos, entre os 10 e os 30 μ M, induzem efeito citotóxico pouco acentuado e reversível para a concentração de 30 μ M. O modulador da via WNT/ β -catenina estudado induz efeito citotóxico dependente da concentração e do tempo de exposição, com exceção

da concentração de 30 μM . Como se pode observar na Figura 9-B, este composto induz também diminuição da proliferação celular de forma dependente da concentração e do tempo de incubação.

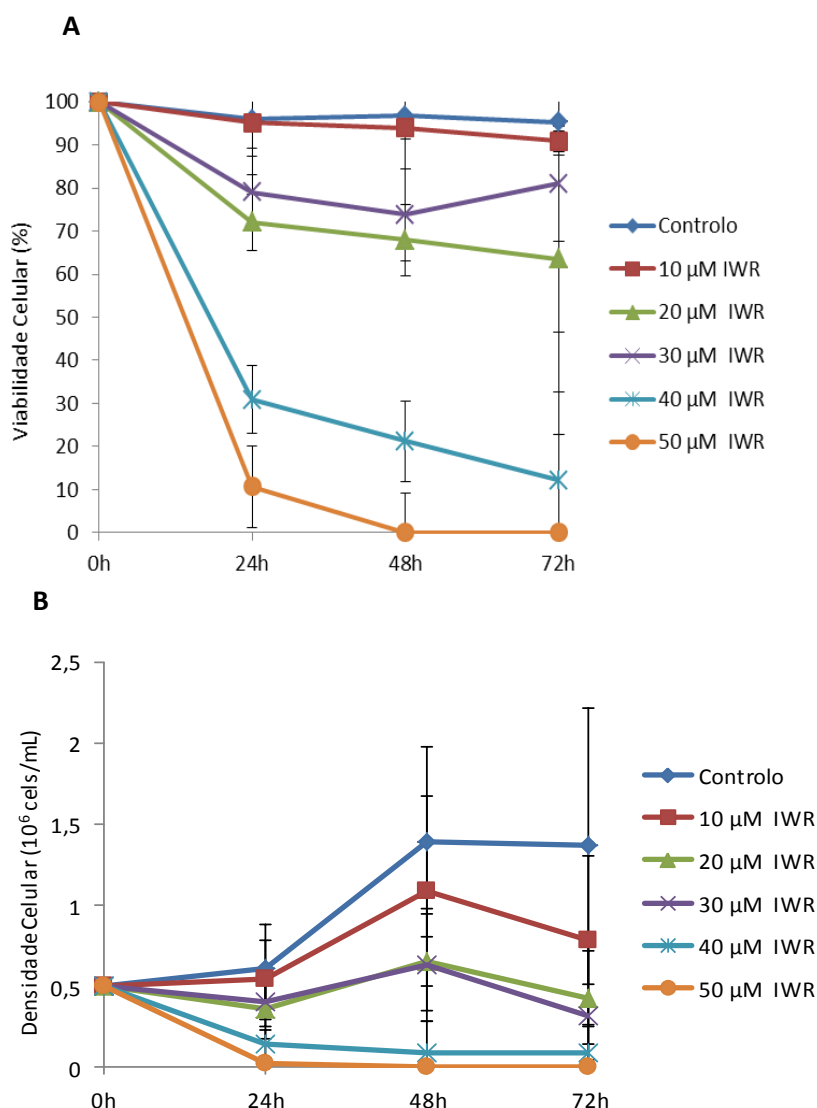


Figura 9 – Efeito do fármaco IWR-1 na viabilidade (A) e na densidade (B) celular das células CEM. As células foram incubadas numa densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ células/mL, na ausência (controlo) e na presença de concentrações crescentes IWR-1, durante 72 horas, e analisadas pelo método de contagem de azul tripano, como referido na secção de materiais e métodos. Em (A) encontra-se representado o gráfico referente viabilidade celular, com diferentes concentrações do inibidor da via WNT, enquanto em (B) verifica-se a densidade celular obtida após a administração do IWR-1. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes.

Por fim, analisou-se o efeito do modulador da via de sinalização Hedgehog, Vismodegib (GDC-0449), um antagonista da SMO (Figura 10). Assim, quando as células CEM são incubadas com concentrações crescentes de GDC-0449 verifica-se diminuição da viabilidade celular para valores próximos dos 50%, o IC_{50} , após 24 horas de incubação, quando estas

foram tratadas com 150 μM deste composto, relativamente ao controlo. A diminuição na viabilidade celular é acompanhada por diminuição na densidade das células CEM ao longo das 72h de incubação (Figura 10-B), registando-se redução do crescimento celular em todos as concentrações de fármaco testadas. Os efeitos citotóxicos e citostáticos observados são dependentes da dose de fármaco administrada e do tempo de incubação.

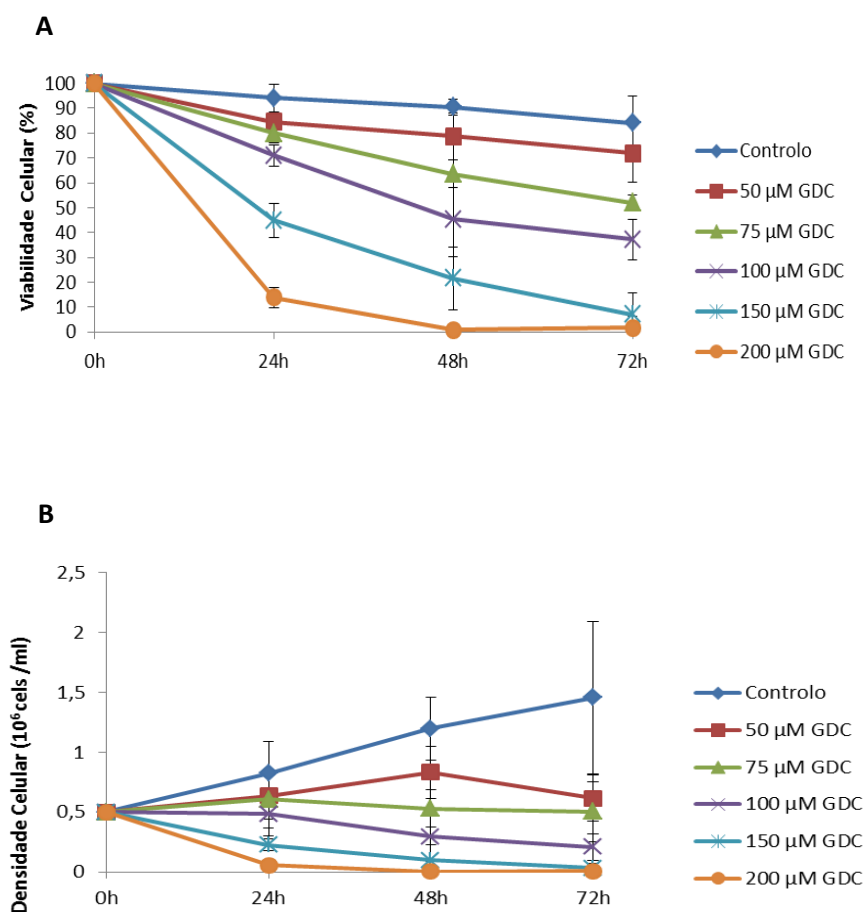


Figura 10 – Efeito do fármaco Vismodegib (GDC-0449) na viabilidade (A) e na densidade (B) celular das células CEM. As células foram incubadas numa densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ células/mL, na ausência (controlo) e na presença de concentrações crescentes GDC 0449 (GDC), durante 72 horas, e analisadas pelo método de contagem de azul tripano. Em (A) encontra-se representado o gráfico referente à viabilidade celular, com diferentes concentrações do inibidor da via Hedgehog, enquanto em (B) verifica-se a densidade celular obtida após a administração do inibidor da Hedgehog. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes.

Seguidamente, avaliou-se se o modo de administração destes compostos tinha influência no efeito citostático e citotóxico observado anteriormente. Assim, os compostos em estudo foram adicionados à cultura celular em administração diária, ou seja, a cada 24 horas de

incubação, em concentrações inferiores às utilizadas em toma única, e correspondentes ao IC_{20} ou seja numa concentração capaz de induzir aproximadamente 20% de morte celular (Figura 11).

Como se pode observar na figura 11, a administração diária, durante 72 horas, de 25 μ M de Gamma-Secretase Inhibitor XXII (GSI), induz efeito citotóxico e citostático semelhante ao observado quando as células são tratadas com a mesma concentração em administração única (75 μ M).

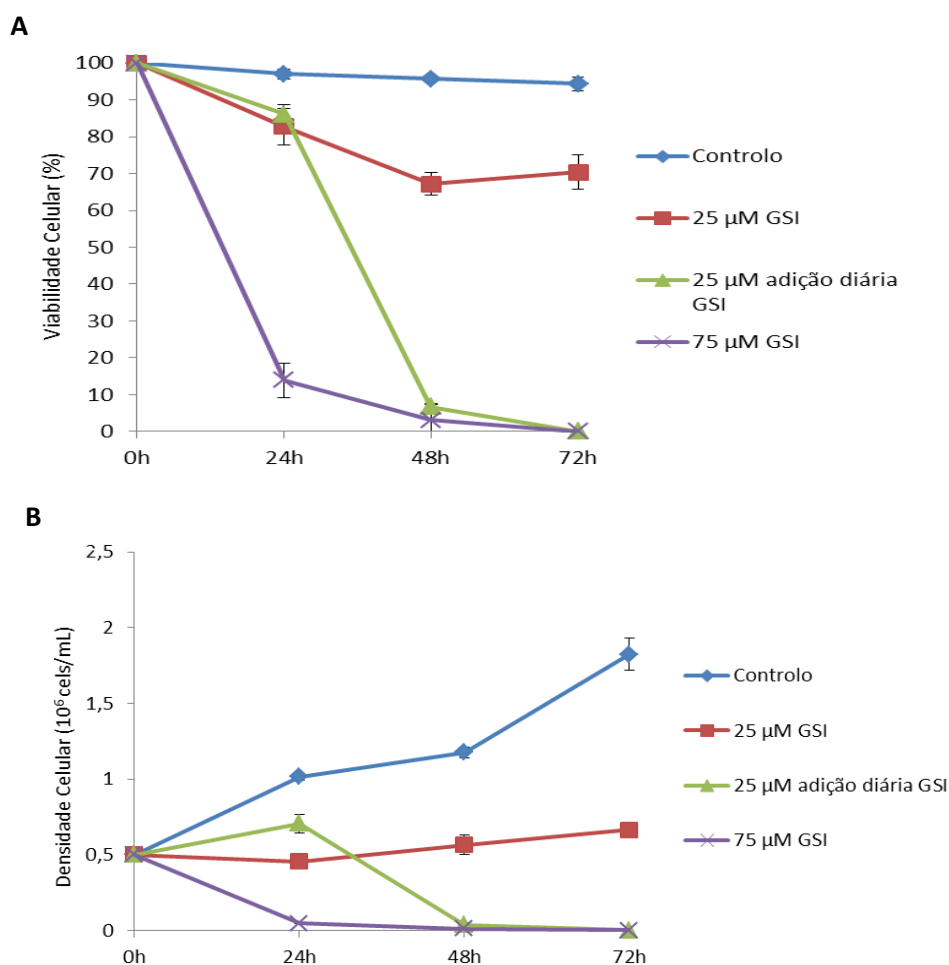


Figura 11 – Efeito da administração diária do fármaco *Gamma-Secretase Inhibitor XXII* (GSI) na viabilidade (A) e na densidade (B) celular das células CEM. As células foram incubadas numa densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ células/mL, na ausência (controlo) e na presença do GSI, durante 72 horas, e analisadas pelo método de contagem de azul tripano. Em (A) encontra-se representado o gráfico referente à viabilidade celular, com duas concentrações diferentes, sendo uma destas administrada diariamente, enquanto em (B) verifica-se a densidade celular obtida. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes.

Seguidamente, verificou-se que a administração diária do modulador da via WNT/ β -cadenina, o IWR-1, seria uma estratégia terapêutica mais eficaz que a administração única. Assim, e como se pode verificar na figura 12, a administração diária de 10 μ M de IWR-1 induz efeito citotóxico e citostático ligeiramente superior (10%) ao observado para os 30 μ M (dose única), após 72h de incubação, indicando que este esquema terapêutico poderá ser mais eficaz neste tipo de moduladores.

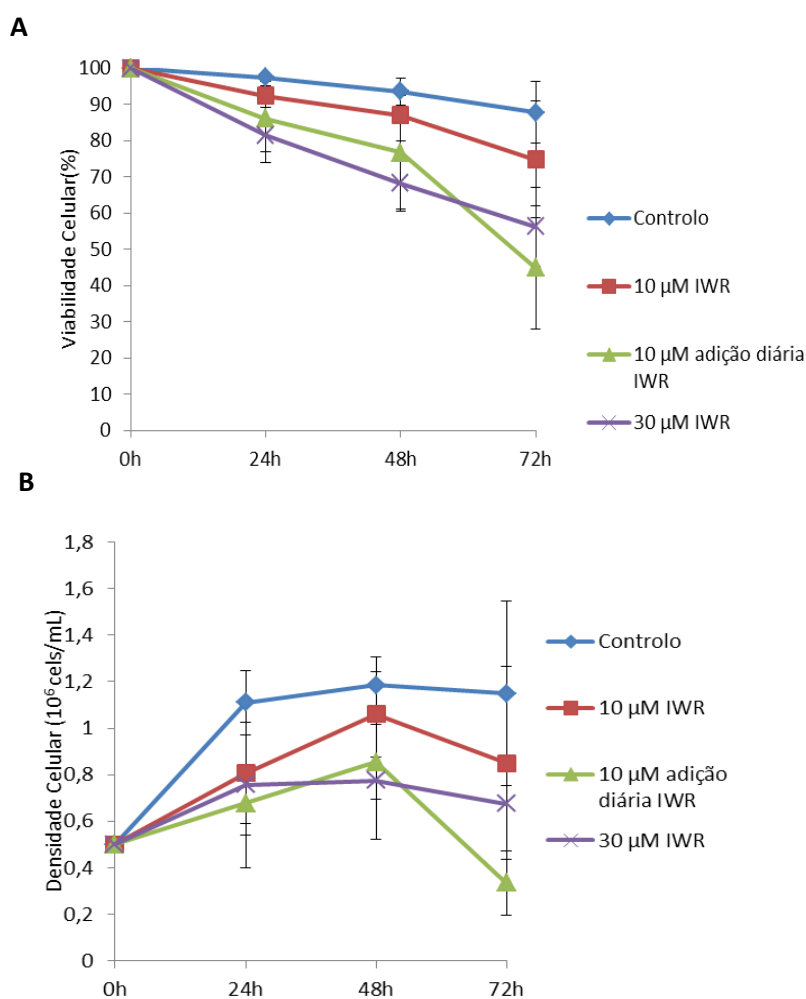


Figura 12 – Efeito da administração diária do fármaco IWR-1 na viabilidade (A) e na densidade (B) celular das células CEM. As células foram incubadas numa densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ células/mL, na ausência (controlo) e na presença do IWR, durante 72 horas, e analisadas pelo método de contagem de azul tripano. Em (A) encontra-se representado o gráfico referente à viabilidade celular, com duas concentrações diferentes, sendo uma destas administrada diariamente, enquanto em (B) se verifica a densidade celular obtida. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes.

Por fim, avaliou-se o efeito da administração diária do inibidor da via Hedgehog, o GDC-0449, como representado na Figura 13. Observou-se que, e ao contrário dos outros dois moduladores, existe uma diferença relativamente grande (cerca de 30% às 72h) entre a administração diária de doses mais baixas e a administração única de uma dose mais alta. Ainda que a viabilidade da adição diária ronde os 30%, às 72h, a adição da dose mais elevada mostrou-se mais eficiente tanto na indução de morte celular como na diminuição da proliferação.

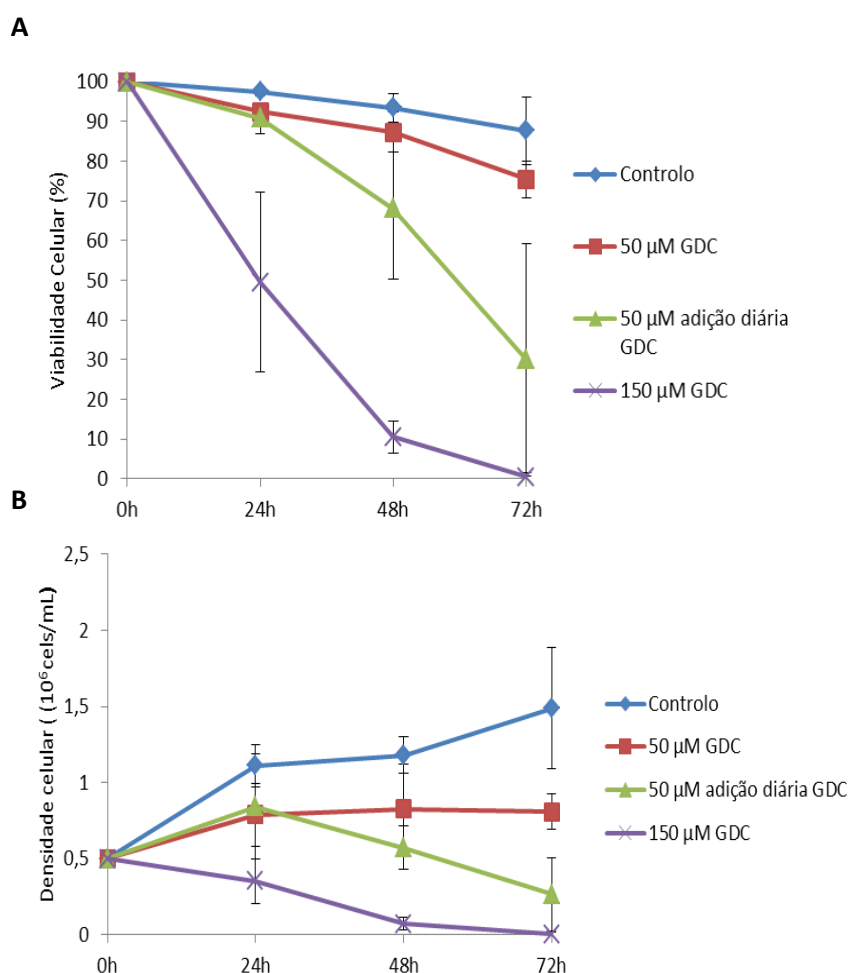


Figura 13 – Efeito da administração diária do fármaco Vismodegib (GDC 0449) na viabilidade (A) e na densidade (B) celular das células CEM. As células foram incubadas numa densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ células/mL, na ausência (controlo) e na presença do GDC 0449 (GDC), durante 72 horas, pelo método de contagem de azul tripano. Em (A) encontra-se representado o gráfico referente à viabilidade celular, com duas concentrações diferentes, sendo uma destas administrada diariamente, enquanto que em (B) verifica-se a densidade celular obtida. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes.

Os doentes oncológicos são muitas vezes tratados esquemas terapêuticos que incluem diversos fármacos anti-cancerígenos. Neste sentido, fomos verificar se a combinação terapêutica dos três moduladores das vias de sobrevivência celular poderia induzir efeito citotóxico e citostático mais acentuado, com recurso a menores concentrações de cada um deste composto (sinergismo). A utilização de baixas concentrações destes fármacos, concentrações inferiores ao IC₅₀ em monoterapia, poderá induzir menores efeitos secundários.

Após a administração destes compostos em associação terapêutica (Figura 14), nas células CEM tratadas com 50 µM de GDC, 30 µM de IWR-1 e 25 µM de GSI, em monoterapia, não se observou efeito citostático ou citotóxico significativo, tendo-se verificado diminuição da viabilidade celular para valores próximos dos 80%, após 72 horas de incubação. No entanto, quando se associaram simultaneamente estes compostos dois a dois, observou-se potenciação do efeito citotóxico em todas as combinações terapêuticas testadas. Contudo, o efeito sinérgico das associações terapêuticas foi mais evidente quando os três moduladores foram associados. Os mesmos resultados foram obtidos em relação ao efeito citotóxico (Figura 14-B).

Por fim, avaliou-se o efeito citotóxico do GDC nas células CEM, através da análise do tipo de morte celular, por citometria de fluxo com recurso à dupla-marcação Anexina V/Iodeto de Propídeo (IP) (Figura 15-A) e por microscopia ótica, através da análise dos aspetos morfológicos (Figura 15-B).

Como se pode observar na Figura 15-A, o Vismodegib (GDC 0449), na concentração de 75µM, induz morte celular, preferencialmente, por apoptose (células a vermelho, positivas para a anexina V e negativas para o iodeto de propídeo). Estes resultados foram confirmados por microscopia ótica, tendo-se verificado características morfológicas típicas de apoptose inicial, nomeadamente contração celular e presença de *blebbings* (Figura 15-B).

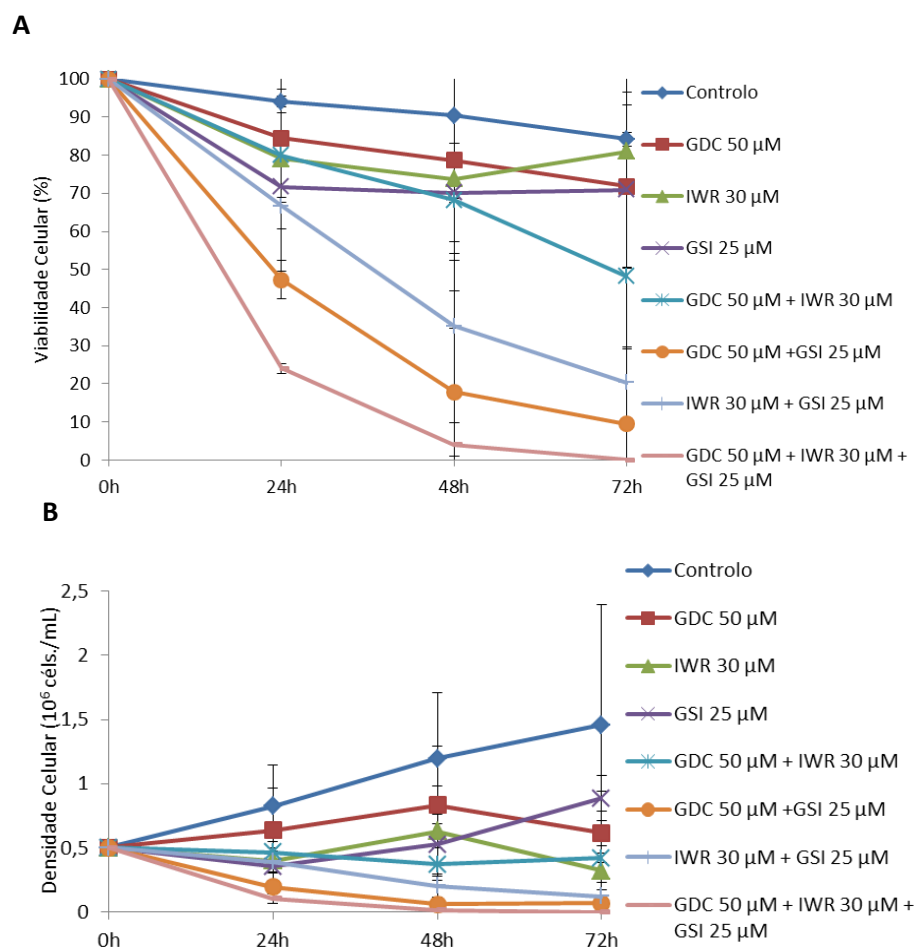


Figura 14 – Efeito da combinação terapêutica dos fármacos Gamma-Secretase Inhibitor XXI (GSI), IWR-1 e Vismodegib (GDC-0449) na viabilidade (A) e na densidade (B) celular das células CEM. As células foram incubadas numa densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ células/mL, na ausência (controlo) e na presença de concentrações crescentes GDC 0449, durante 72 horas, e analisadas pelo método de contagem de azul tripano. Em (A) encontra-se representado o gráfico referente à viabilidade celular, com diferentes concentrações dos inibidores das três vias em estudo, enquanto em (B) verifica-se a densidade celular obtida. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes.

Posteriormente fomos avaliar alguns dos mecanismos envolvidos na apoptose induzida nas células CEM por este inibidor. Como se pode observar na figura 16, as células CEM tratadas com $75 \mu\text{M}$ de GDC, durante 48h, apresentam aumento significativo da expressão de caspases ativadas, sendo este aumento de 1,7x quando comparado com células não tratadas (controlo).

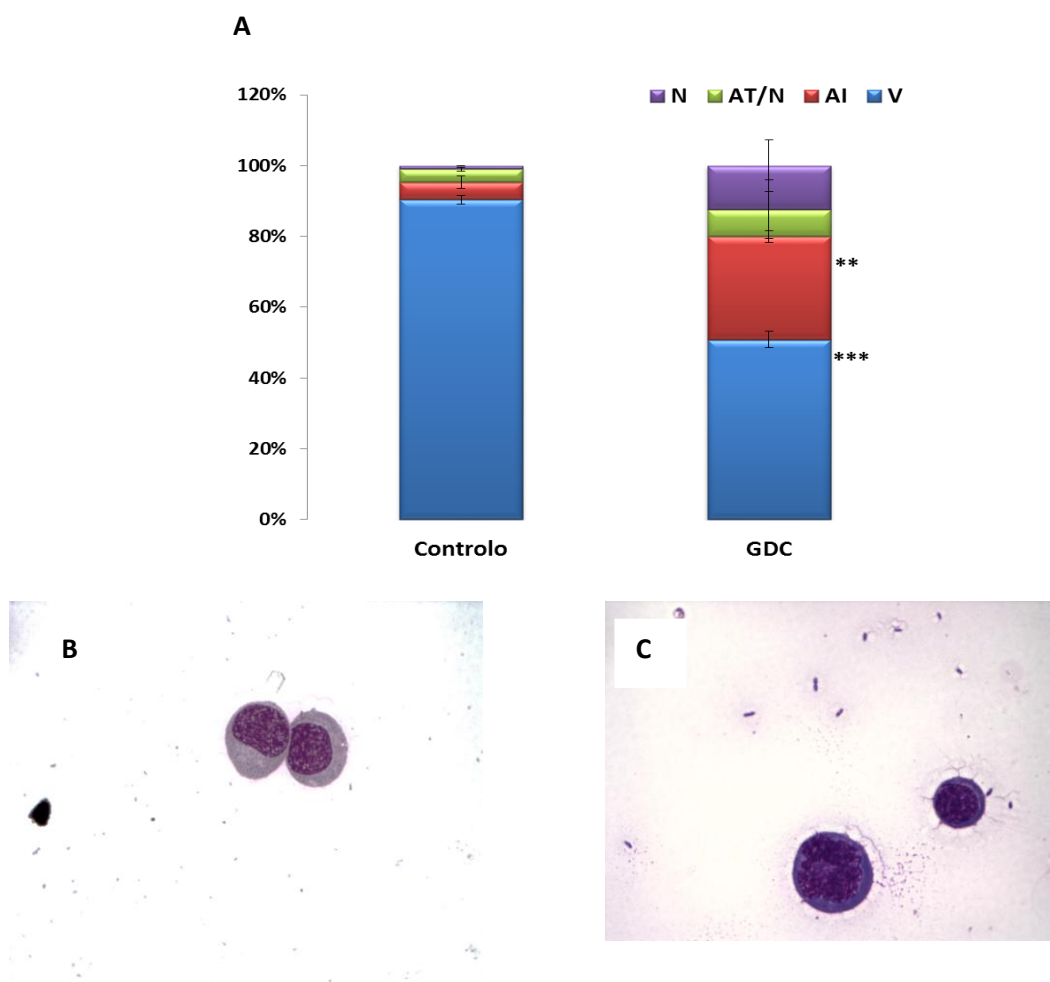


Figura 15 – Avaliação do tipo de morte celular induzida pelo GDC 0449(Vismodegib) nas células CEM por citometria de fluxo (A) e por microscopia óptica (B). As células foram incubadas numa densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ células/mL, durante 24h na ausência (Ctl) e na presença de $75 \mu\text{M}$ de GDC 0449 (GDC) e posteriormente marcadas (A) com anexina V e iodeto de propídeo. Em (B) estão representados os aspetos morfológicos das células CEM na ausência de tratamento (controlo) e em (C) tratadas com GDC 0449 o, após a coloração *May-Grünwald-Giemsa*, e análise por microscopia óptica com ampliação de 500x. As formações ao nível da membrana celular observadas em (C), designadas por *blebbings*, confirmam o fenómeno de morte celular por apoptose. Em (A) os resultados são expressos em percentagem (%) e representam a média \pm desvio padrão de 3 ensaios. A análise estatística foi efetuada por comparação com a linha celular parental, utilizando o teste de Tuckey, sendo $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$.

Para além dos níveis de caspases ativadas, foi também avaliado o efeito do GDC nos níveis de expressão das proteínas BAX e BCL2. Como indica a figura 17-A, quando as células CEM são tratadas com $75 \mu\text{M}$ de GCD, os níveis da proteína pró-apoptótica BAX aumentam significativamente para valores 1,38x superiores, enquanto os níveis da proteína anti-apoptótica BCL2 diminuem ligeiramente (4%). Estes resultados traduzem-se no aumento da razão BAX/BCL2 (Figura 17-B) em 1,4x comparativamente às células não tratadas, o que

pode contribuir para a susceptibilidade das células CEM à apoptose na presença deste composto.

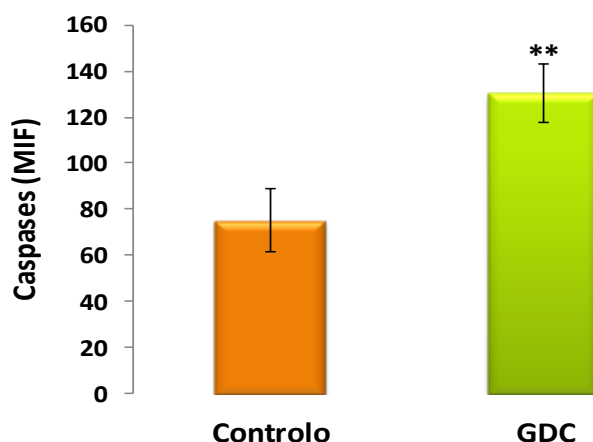


Figura 16 – Avaliação dos níveis de expressão intracelular de Caspases activadas nas células CEM expostas ao Vismodegib (GDC 0449), por citometria de fluxo. As células foram incubadas durante 24 horas com GDC 0449. A expressão das caspases encontra-se expressa em média de intensidade de fluorescência (MIF), na ausência e na presença de GDC. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efectuada por comparação, utilizando o teste de Tuckey, sendo $**p < 0,01$.

Para além da avaliação da morte celular, efectuou-se também a análise de proteínas envolvidas na indução/inibição do ciclo celular, a proteínas p53 e CCD1. Como se pode observar na Fig. 18, as células CEM controlo apresentam níveis de expressão de p53 superiores aos de ciclina D1 (CCD1). Mas, após tratamento com GDC, os níveis de expressão das proteínas p53 e CCD1 diminuem, comparativamente às células controlo. No entanto, a diminuição dos níveis de expressão da proteína p53 é mais acentuada (37%) relativamente ao observado para a proteína CCD1 (14%).

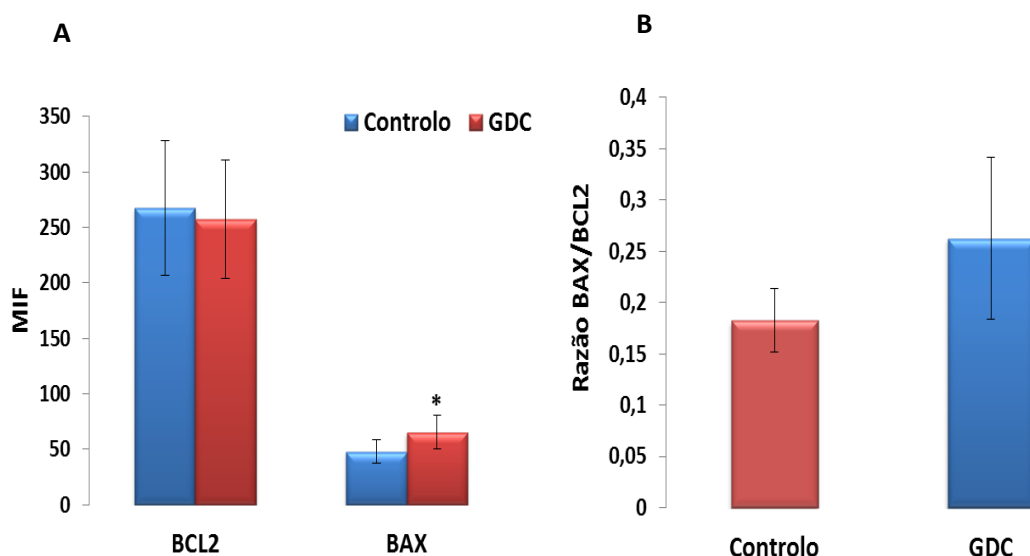


Figura 17 – Avaliação da expressão intracelular de BCL2, de BAX e da razão BAX/BCL2 em células tratadas com Vismodegib (GDC 0449), por citometria de fluxo. (A) A expressão intracelular de BCL2 e BAX na ausência (Ctl) e na presença de GDC 0449 (GDC) 75 μ M, foi avaliada após 24 horas de exposição, por citometria de fluxo recorrendo a anticorpos monoclonais como descrito na secção de materiais e métodos. Os resultados encontram-se expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média \pm desvio padrão de 3 ensaios independentes. (B) A razão BAX/BCL2 foi calculada através da razão entre os MIF de cada um das moléculas, nas diferentes condições de tratamento. A análise estatística foi efetuada por comparação, utilizando o teste de Tuckey, sendo * $p < 0.05$.

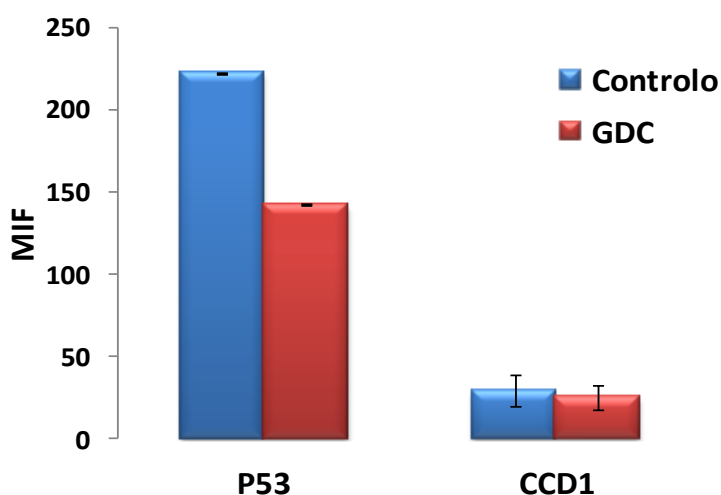


Figura 18 – Expressão intracelular de ciclina D1 e p53 em células CEM cultivadas, na ausência e na presença de Vismodegib (GDC-0449). As células CEM foram incubadas durante 24 horas na ausência (controlo) e na presença de 75 μ M de GDC. A expressão intracelular de ciclina D1 e da p53 encontra-se expressa em média de intensidade de fluorescência (MIF), e os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 ensaios independentes.

No presente trabalho, foi ainda realizado o estudo do ciclo celular em células CEM incubadas na ausência e na presença de GDC (Vismodegib), de forma a confirmar o efeito antiproliferativo do modelador da via Hedgehog e/ou se este é ciclo-dependente. Os resultados representados nos gráficos da figura 19 mostram a percentagem das células CEM nas diferentes fases do ciclo celular, na ausência e na presença de composto anticancerígeno. Como podemos verificar, o Vismodegib não induz alteração significativa da distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular. No entanto, na presença do GDC 0449, observa-se o aparecimento de um pico pré-G₀/G₁ resultante da fragmentação nuclear, confirmando os resultados anteriores, ou seja as células CEM entram em apoptose na presença deste composto.

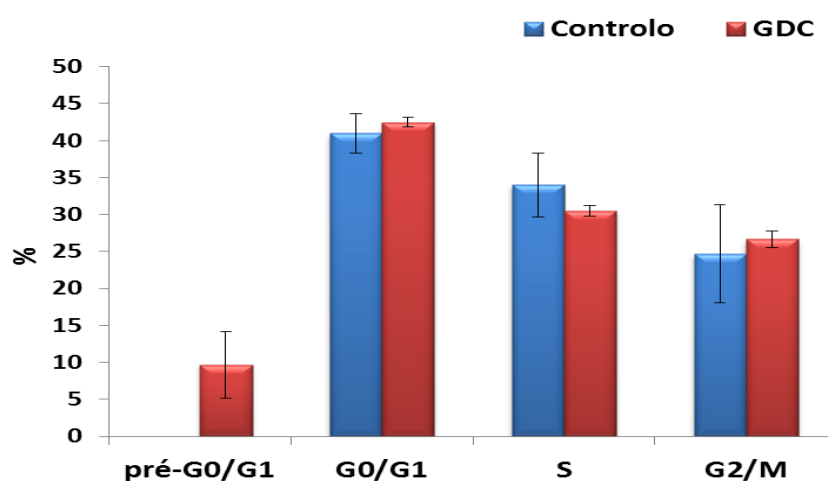


Figura 19 – Avaliação do ciclo celular na ausência e na presença de Vismodegib (GDC 0449). As células foram incubadas durante 24 horas na ausência e na presença de 75 μ M de GDC 0449 (GDC). A distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular encontra-se expressa em percentagem (%) e os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 ensaios independentes.

Por fim, e de modo a verificar se o GDC 0449 interfere com a função mitocondrial, as células CEM foram marcadas com a sonda fluorescente, JC1, a qual nos permite estudar o potencial de membrana mitocondrial. Na figura 20 pode-se observar que as células tratadas com GDC 0449, na concentração de 75 μ M, apresentam diminuição do potencial de membrana mitocondrial, traduzido pelo aumento da razão entre os monómeros (M) e agregados (A) de JC1, comparativamente ao controlo. De fato, nas condições testadas, observou-se aumento estatisticamente significativo da razão M/A de JC1 de aproximadamente 3,7x nas células tratadas com o GDC 0449 em relação às células controlo.

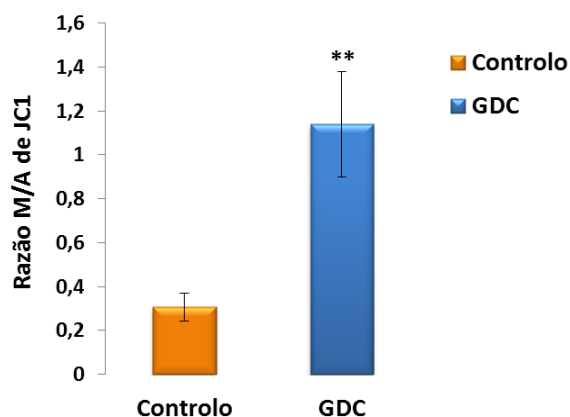


Figura 20 – Avaliação do potencial de membrana mitocondrial nas células CEM incubadas com Vismodegib (GDC 0449), por citometria de fluxo. A razão entre os monómeros (M) e os agregados (A) de JC1 foi calculada através da razão entre a média de intensidade de fluorescência (MIF) dos M e A, na ausência (Ctl) e na presença 75 μ M de GDC 0449 (GDC) , após 24 horas de exposição. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efetuada por comparação, utilizando o teste de Tuckey, sendo ** $p < 0.01$.

4. Discussão

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma patologia bastante heterogênea, podendo dar origem a aumento exponencial da proliferação de linfócitos, em consequência da desregulação de algumas vias envolvidas na proliferação, na diferenciação, na sobrevivência e na morte destas células (Hoffbrand, 2011). Uma vez que as vias de diferenciação que envolvem os receptores proteolíticos, WNT, NOTCH e Hedgehog, podem ter um papel relevante no desenvolvimento deste tipo de Leucemias Agudas, estas podem constituir um excelente alvo para o tratamento destas neoplasias hematológicas. Assim, neste estudo, foram feitos alguns testes que nos permitiram tirar algumas conclusões acerca do papel que os inibidores das vias WNT, NOTCH e Hedgehog poderão ter no tratamento da leucemia linfoblástica aguda, utilizando para o efeito uma linha celular deste tipo de leucemias, as células CEM.

4.1 Efeito dos moduladores das vias WNT, NOTCH e Hedgehog na viabilidade celular

Neste estudo, verificou-se que os fármacos moduladores das vias WNT, NOTCH e Hedgehog, respectivamente, IWR-1, inibidor da *Gamma-Secretase Inhibitor XXII*, e GDC 0449, possuem efeito tanto citotóxico como citostático nas células de leucemia linfoblástica aguda, as células CEM. (Figuras 8, 9 e 10).

Os nossos resultados demonstram que a administração do IWR-1 nas células CEM, diminui a sua viabilidade e proliferação celular, de forma mais significativa, a partir dos 40 μ M (Figura 9).

Segundo Serinsoz e colaboradores (2004), a ativação da via WNT/ β -catenina, através de mutações com perda de função das proteínas APC e da axina, ou mutações de ganho de função da β -catenina, encontra-se relacionada com vários tumores sólidos. No entanto, o papel da β -catenina em células hematopoiéticas normais e malignas ainda não foi devidamente avaliado. Chung (2002) avaliou várias linhas celulares leucémicas e sugere que a β -catenina, tal como se verifica em tumores sólidos, regula a adesão, proliferação e sobrevivência nestas linhas de neoplasias hematológicas.

A utilização de estabilizadores de proteínas mutadas, nomeadamente o IWR-1 que estabiliza a Axina, poderá resultar numa potencial nova abordagem terapêutica desta patologia, uma vez que o aumento dos níveis de Axina induzem diminuição dos níveis de β -catenina livre,

não havendo, por conseguinte, a ativação dos genes alvo e posterior ativação desta via de sinalização (Zhang, X. *et al.*, 2011).

Apesar da acumulação de β -catenina ser um grande ponto estimulatório na proliferação de células neoplásicas, também a epigenética possui um papel fundamental no que diz respeito à desregulação desta via. A hipermetilação de determinados genes antagonistas da WNT, nomeadamente os genes *SFRP1*, *SFRP2*, *SFRP 4*, *SFRP5*, *Wif-1*, induz ativação constitutiva desta via, com consequente perda do controlo negativo na proliferação e manutenção das células tumorais. Alguns estudos indicam que a alteração do perfil normal de metilação dos reguladores da via WNT confere mau prognóstico aos doentes portadores de LLA (Román-Gomez, J. *et al.*, 2006).

Assim sendo, a utilização de hipometilantes, nomeadamente a azacitidina ou a decitabina, em doentes que apresentem hipermetilação dos reguladores negativos da via WNT poderá constituir outra abordagem terapêutica para estes doentes, quer isoladamente quer em combinação com moduladores desta via de sinalização.

A via NOTCH, como já referido anteriormente, é uma das principais vias de sinalização celular envolvidas na patogénese da leucemia linfoblástica aguda (Okuhashi, Y. *et al.*, 2011). O receptor NOTCH necessita da ação da gama-secretase para que ocorra a transcrição de genes alvo. No entanto, na presença de mutações ativadoras do receptor NOTCH ocorre ativação constitutiva deste receptor, e consequentemente aumento da quantidade de proteína NOTCH 1 intracelular. A NOTCH 1 irá induzir aumento da transcrição génica. Assim sendo, a administração de um inibidor da gama-secretase poderá ser um importante alvo terapêutico (Keersmaecker, K. *et al.*, 2007). No entanto, o estudo deste composto necessita de ser aprofundado.

No decorrer deste trabalho, e como já referido anteriormente, as células CEM foram expostas a diferentes concentrações de inibidor da gama-secretase (GSI), o qual demonstrou possuir efeito citotóxico e citostático (Figura 8).

Para além da administração do inibidor desta via, teria sido também interessante, inferir se existe ou não mutação no receptor NOTCH na linha celular CEM e em quais dos domínios é que esta se encontra (Okuhashi, Y. *et al.*, 2011; Palomero, T. and Ferrando, A., 2009). Deste modo seria possível verificar a existência de correlação entre a presença de mutações neste receptor e a resposta ao modulador da via NOTCH utilizado. No entanto, segundo Liu e colaboradores (2009) várias linhas celulares de LLA apresentam sobre-expressão de NOTCH1

e que, no caso das células CEM, o aumento de expressão de NOTCH1 está relacionado com a presença de uma mutação ativadora no domínio de heterodimerização desta proteína. A presença de mutação no gene *NOTCH1* foi também verificado por outros autores (Rao *et al.*, 2009). Assim, os nossos resultados sugerem que o GSI utilizado neste estudo apresenta eficácia terapêutica em células de LLA com mutação ativadora de NOTCH1.

Segundo Lewis, H. *et al.* (2007), um modulador análogo ao utilizado neste estudo, o MERK-3, induz bloqueio do ciclo celular em fase G_0/G_1 e morte celular por apoptose. Assim sendo, um teste complementar que poderá ser feito será expor as células ao *Gamma-Secretase Inhibitor XXI* e verificar se, de fato, existe concordância nos resultados. No entanto, segundo Liu e colaboradores (2009) a inibição da sinalização NOTCH1 nas células CEM não induz alteração da distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular. A proteína RB é essencial na regulação do ciclo celular, em especial na transição da fase G_1 para S. A indução da CDKN2D ocorre antes da paragem do ciclo celular e o aumento da CDKN1B ocorre após bloqueio do mesmo. De salientar que estas duas proteínas estão envolvidas na inibição da fosforilação da proteína RB, induzindo, desta forma, a sua ativação (Rao *et al.*, 2009). Assim, o aumento da CDKN1B pode não ser o veículo para a acumulação inicial na fase G_0/G_1 , mas pode funcionar como um importante modulador no bloqueio do ciclo celular, em cooperação com a CDKN2D.

A hipofosforilação de proteínas da família RB, como RBL1/p70 e RBL2/p130 são necessárias para que ocorra uma eficiente paragem na proliferação e posterior paragem no ciclo celular na fase G_0 , promovendo desta forma a diferenciação. A família de proteínas RB possui funções únicas na carcinogénese, sendo que ambas as proteínas RBL1 e RRBL2 conseguem compensar a inativação ou perda da proteína RB. Assim sendo, o estudo realizado por Rao *et al.* (2009) demonstrou que para além das células de LLA entrarem em paragem celular na fase G_1 com o fármaco GSI, estas conseguem, através das proteínas referidas anteriormente, parar o ciclo celular, sem a influência do fármaco em estudo. Este fato pode tornar-se um bom ponto de partida para posterior estudo, de forma a que possamos entender um pouco mais esta via de diferenciação e a sua relação com as células tumorais.

A proteína supressora tumoral p53 possui um papel fundamental na manutenção da homeostase celular tanto em condições de desenvolvimento normal como em várias situações de stresse celular, incluindo quando ocorre lesão do ADN e privação de nutrientes. A ativação da p53 induz bloqueio do celular e/ou apoptose, dependendo do tipo e extensão

do sinal estimulatório. Beverly, J.E. *et al.* (2005) verificou que a sinalização induzida pelo NOTCH suprime a atividade da proteína p53 durante a leucemogénese. Após a inativação da via NOTCH, verifica-se acumulação da proteína p53, fazendo com que as células entrem, rapidamente, no programa apoptótico. A análise da relação entre a p53 e a via NOTCH, para além de nos ter permitido compreender melhor os efeitos dos moduladores da via NOTCH nas células CEM, teria sido um passo importante na compreensão do papel desta proteína, como um possível potencial alvo terapêutico nesta neoplasia.

Além das vias de sinalização referidas, a sinalização Hedgehog está envolvida na regulação do desenvolvimento normal e oncogénese de vários tipos de tecidos (Chen *et al.*, 2011). Segundo este autor, um inibidor desta via, o GDC 0449, é capaz de “reverter” o meduloblastoma. Os nossos resultados demonstram que este antagonista da proteína SMO funciona tanto como citotóxico como citostático em células de leucemia linfoblástica aguda T. O IC₅₀ obtido neste estudo foi de 75 µM. O efeito citotóxico observado nas células CEM pela exposição ao GDC 0449 foi induzido predominantemente por apoptose.

Um estudo efectuado por Robarge, K.D. *et al.*, (2009) em carcinoma de células basais (CCB) e de meduloblastoma, utilizando um análogo do GDC 0449, a ciclopamina, evidenciou que o IC₅₀ encontrado foi de 300 nM, uma concentração bastante inferior relativamente à utilizada no nosso estudo numa linha celular de leucemia. Estes resultados sugerem que o efeito deste composto depende da linha celular e/ou que as células do CCB são mais sensíveis ao fármaco. Por outro lado, Mazumdar e colaboradores (2011) estudaram o efeito terapêutico do GANT61, um inibidor das proteínas GLI1 e GLI2, comparativamente à ciclopamina, em 6 linhas celulares de cancro colorectal. Estes autores verificaram que 20 µM de ciclopamina induz entre 25 e 50% de morte celular, sendo o efeito citotóxico dependente da linha celular. Portanto, estes resultados podem indicar que a via Hh é necessária para a regulação das células leucémicas, sendo o GDC 0449 um possível inibidor terapêutico para travar a contínua ativação da via e, desta forma, constituir uma nova abordagem no tratamento deste tipo de leucemias.

Resultados, bastante positivos, publicados por Amin, S.H. *et al.* (2010), demonstram uma grande eficácia deste fármaco, quando administrado oralmente numa concentração de 150mg/dia, no tratamento de tumores, em especial no carcinoma células basais. Esta situação faz com que se deva aprofundar mais o estudo da influência desta via na LLA, ou na

generalidade dos tumores hematológicos, pois este modulador pode ser o “segredo da cura”.

De momento, decorrem vários ensaios clínicos visando o potencial terapêutico do Vismodegib (GDC 0449), sendo o cancro colorectal metastático, o cancro do ovário, o carcinoma de células basais e o meduloblastoma as neoplasias mais estudadas. Relativamente às neoplasias hematológicas, encontra-se em fase de recrutamento um ensaio clínico de fase 1b com o objectivo de testar a possível utilização de Vismodegib em doentes com mieloma múltiplo após transplante autólogo de células estaminais (<http://clinicaltrials.gov/> a 01 de setembro de 2012).

Neste trabalho foi também avaliado se o modo de administração dos moduladores das vias de sobrevivência poderia influenciar o efeito citostático e citotóxico dos compostos testados. Assim, observou-se que os moduladores das vias de sobrevivência, com excepção do GDC 0449, possuem um efeito citotóxico mais acentuada quando estes foram administrados diariamente em baixas concentrações, do que quando a mesma concentração é administrado em toma única. Este esquema terapêutico, que mimetiza a administração da maioria dos fármacos anticancerígenos utilizados na prática clínica, poderá permitir a utilização terapêutica destes compostos com o mínimo de efeitos tóxicos secundários sistémicos. No entanto, não foram estudados os mecanismos biológicos subjacentes a este esquema de administração.

Para além da administração diária dos respetivos fármacos, estudou-se também o efeito da combinação dos três fármacos. Como a Figura 14 demonstra, verifica-se uma maior eficácia na ação dos moduladores quando se combinam os três (GDC 50 μ M, IWR 30 μ M e GSI 25 μ M). No entanto, há que notar que também a combinação do IWR com o GSI e do GDC com o GSI induzem morte das células CEM bastante significativa. Estes resultados indicam que uma terapia combinada poderá trazer benefícios para o doente, visto as concentrações administradas de cada fármaco serem menores do que as administradas individualmente. Assim sendo, este método terapêutico poderá ser uma boa opção no tratamento da LLA, visando o aumento da qualidade de vida do doente e diminuição os efeitos secundários da terapia.

4.2. Análise dos efeitos dos moduladores na expressão de proteínas envolvidas nos mecanismos de morte celular

Para além da análise do tipo de morte que este fármaco induz nas células, foram também avaliados alguns dos mecanismos envolvidos. Neste sentido avaliámos a expressão das proteínas p53 e CCD1. Sabe-se que a p53 induz a inibição do crescimento celular e a reparação do ADN e que a CCD1 é ativada pela via Hh, estimulando a proliferação celular. No presente estudo, verificou-se diminuição dos níveis de expressão de ambas as proteínas, quando as células CEM são tratadas com GDC durante 24h.

A ciclina D1 é uma importante proteína reguladora do ciclo celular, a qual se encontra envolvida na transição da fase G₁ para a fase S durante o processo de divisão celular. A alteração da cinética do ciclo celular e a aceleração da fase G₁ a qual pode levar a uma proliferação anormal das células, foi associada à sobre-expressão desta proteína, CDD1. Durante a fase precoce da fase G₁, a ciclina D1 liga-se à CDK4 e CDK6, ativando-as. Consequentemente, estas cinases irão fosforilar a proteína RB, contribuindo assim para a sua posterior inativação. Estudos demonstraram a sobre-expressão da Ciclina D1 em doentes com LLA, sendo sugerido que esta proteína poderá ter um papel na mobilização de blastos desde a medula óssea até aos nódulos linfáticos. Estes estudos indicam que a CCND1 poderá servir como marcador na deteção da LLA, necessitando por isso de ser estudada com mais pormenor, de forma a concluir qual o seu papel na leucemogénese (Jayaraman, A. and Jamil, K., 2012).

Seguidamente avaliou-se o papel do GDC na modulação de proteínas relacionadas com a apoptose, nomeadamente as que ativam a apoptose como as caspases e a BAX e as que inibem, com a proteína BCL-2. Os resultados obtidos confirmam a indução de morte celular por apoptose, dado que os níveis de caspases aumentam bastante na presença do GDC 0449.

Apesar dos bons resultados apresentados por este fármaco na linha celular CEM, Mazumdar, T. *et al.* (2011), ao realizar estudos em linhas celulares de adenocarcinoma colorectal, demonstra que a utilização do GDC pode não ser suficiente para induzir a morte das células malignas, visto as proteínas GLI terem um papel essencial na transcrição da BCL-2. Segundo este autor, a BCL2 é expressa pelas células do adenocarcinoma colorectal, sendo regulado pela GLI 2, impedindo desta forma a morte celular por apoptose. Por vezes, a proteína SMO pode encontrar-se mutada, fazendo com que a ligação do GDC 0449 não seja eficaz. Assim

sendo, será necessário inibir esta via, por exemplo com o GANT61, bloqueando a atividade de transcrição das proteínas da família GLI. Para salientar o estudo feito por Mazumbar, Bigelow *et al.* (2004) em Carcinoma de Células Basais, estes autores demonstram que os níveis de BCL-2 se encontram aumentados nesta neoplasia, podendo este aumento estar relacionado com a proteína GLI, da via Hh. Portanto, este poderia ser um outro tipo de abordagem a ser aprofundada em neoplasias hematológicas.

4.3. Avaliação do efeito dos moduladores no potencial da membrana mitocondrial

Para além da avaliação das proteínas relacionadas com a morte celular, estudou-se a participação da mitocôndria na citotoxicidade induzida pelos compostos em estudo, em particular com o inibidor da via Hh, o GDC 0449. Para o efeito determinou-se o potencial de membrana, através de um composto fluorescente, o JC1. Através desta sonda, poderemos verificar se a membrana da mitocôndria se encontra ou não polarizada. Nas condições testadas, observou-se aumento da razão monómeros/agregados de JC1, indicando aumento do número de monómeros JC1 no citoplasma nas células tratadas com GDC comparativamente ao controlo (Figura 20). Este resultado indica que a membrana mitocondrial se encontra despolarizada, significando que a mitocôndria não se encontra funcional, levando-nos assim a concluir que a administração do GDC induz apoptose pela via mitocondrial. Contudo não exclui a participação de outras vias de sinalização na morte das células CEM.

4.4. Avaliação do efeito dos moduladores da via Hedgehog no ciclo celular

Por fim, avaliou-se o efeito do GDC, um inibidor da via Hedgehog, no ciclo celular das células CEM. Os resultados não evidenciam alteração significativa na percentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular, sendo o aparecimento de um pico pré-G₀/G₁ o resultado mais significativo (Figura 19). Sendo este pico característico de células em apoptose, confirma-se mais uma vez a indução deste tipo de morte em células tratadas com GDC. Este é mais um fator que nos indica que deverão ser realizados mais estudos, visto este fármaco poder vir a ser uma potencial terapia na LLA.

Há que salientar, ainda, o facto desta via ter sido muito pouco estudada em neoplasias hematológicas. Tendo isto em conta, seria interessante aprofundar o papel que esta via de sinalização possui na patogénese da LLA e quais as principais moléculas envolvidas, de modo a identificar eventuais marcadores de doença e/ou novos alvos terapêuticos para o tratamento destas neoplasias hematológicas.

5. Conclusão

O estudo da influência e potencial terapêutico das vias de diferenciação celulares, WNT, NOTCH e Hedgehog, referenciadas neste projecto na Leucemia Linfoblástica Aguda, permitiu-nos concluir que os moduladores utilizados referentes às respectivas vias, IWR-1, *Gamma-Secretase Inhibitor XXII* (GSI) e Vismodegib (GDC 0449), possuem efeitos citotóxicos e citostáticos nas células CEM, quer em monoterapia quer em associação terapêutica.

Além disso, observou-se que a administração diária, em concentrações mais baixas, de IWR-1 e de *Gamma-Secretase Inhibitor XXI* seria mais benéfica, podendo, nestas condições, diminuir a toxicidade e os efeitos secundários. Por outro lado, o efeito do GDC 0449 não parece depender do esquema de administração, uma vez que quer em toma única, quer fracionada, o efeito foi idêntico. Note-se ainda que a terapia combinada destes modeladores mostrou ser bastante eficiente no combate à proliferação das células, podendo ser um bom ponto de partida para uma futura abordagem terapêutica.

Os estudos complementares realizados com o inibidor da via Hedgehog sugerem que este inibidor induz morte celular por apoptose. Este fato foi comprovado pelo aumento dos níveis das caspases e pelo aparecimento de um pico apoptótico (pré-G₀/G₁), verificado no estudo do ciclo celular. Para além da análise destes mecanismos moleculares, foi também avaliado o potencial da membrana mitocondrial, o qual nos permitiu inferir que a utilização do Vismodegib induz disfunção mitocondrial a qual pode contribuir para a diminuição da viabilidade celular.

Em suma, podemos dizer que a utilização destes fármacos mostrou resultados bastante convincentes, sendo que estes poderão funcionar como uma terapia eficaz, tanto em associação como em administrações individuais, no tratamento da LLA.

Há que acrescentar que ainda há muito trabalho para aprofundar, no que toca ao estudo da influência destas vias de sinalização em neoplasias hematológicas. Contudo, este trabalho mostrou ser um bom ponto de partida para um projeto bastante aliciente e inovador, que poderá vir a dar frutos bastantes promissores no futuro, em particular para o tratamento dos doentes com Leucemia Linfoblástica Aguda.

6. Bibliografia

- Abe, Y. *et al.* (2008) **Hedgehog signaling overrides p53-mediated tumor suppression by activating Mdm2.** PNAS, Vol. 105, no. 12, 4838-4843.
- Abrams, E.W. *et al.* (2003) **Constructing an organ: the Drosophila salivary gland as a model for tube formation.** Trends Cell Biology, Vol. 13, 247 – 254.
- Alvares, L.E. *et al.* (2003) **Intrinsic, Hox-dependent cues determine the fate of skeletal muscle precursors.** Developmental Cell , Vol. 5, 379 – 390.
- Amin, S.H. *et al.* (2010) **Hedgehog Antagonist GDC-0449 Is Effective in the Treatment of Advanced Basal Cell Carcinoma.** Laryngoscope, 120:2456-2459.
- Amstrong, F. *et al.* (2009) **NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity.** Blood, 113:1730-1740.
- Beverly, J.E. *et al.* (2005) **Suppression of p53 by Notch in Lymphomagenesis: Implications for Initiation and Regression.** Cancer Research, 65:7159-7168.
- Bigas, A. *et al.* (1998) **Notch 1 and Notch 2 Inhibit Myeloid Differentiation in Response to diferente Cytokines.** Molecular and Celular Biology, 2324 – 2333.
- Bigelow, R.L.H. *et al.* (2004) **Transcriptional Regulation of *bcl-2* Mediated by the Sonic Hedgehog Signaling Pathway through gli-1.** The Journal Of Biological Chemistry, Vol. 279, No. 2, 1197–1205.
- Cerdan, C. and Bhatia M. (2010) **Novel roles for Notch, Wnt and Hedgehog in hematopoiesis derived from human pluripotent stem cells.** The International Journal of Developmental Biology, 54:955-964.
- Chiaramonte, R. *et al.* (2005) **A wide role of Notch1 signaling in acute leukemia.** Cancer Letters, 219:113-120.
- Chung, E.J. *et al.* (2002) **Regulation of leukemic cell adhesion, proliferation, and survival by beta-catenin.** Blood, 100, 982–990.
- Curtin, J.C. and Lorenzi, M.V. (2010) **Drug Discovery Approaches to Target Wnt signaling in Cancer Stem Cells.** Oncotarget, 1:563-566.

- Derksen, P. *et al.* (2004) **Illegitimate WNT signaling promotes proliferation of multiple myeloma cells.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 6122–6127.
- Dierks, C. *et al.* (2008) **Expansion of Bcr-Abl-Positive Leukemic stem Cells Is Dependent on Hedgehog Pathway Activation.** Cancer Cell, 14:238-249.
- Dijkgraaf, G.J.P. *et al.* (2011) **Small Molecule Inhibition of GDC-0449 Refractory Smoothened Mutants and Downstream Mechanisms of Drug Resistance.** Cancer Research, 71:435-444.
- Eguchi-Ishimae, M. *et al.* (2008) **NOTCH1 mutation can be an early, prenatal genetic event in T-ALL.** Blood journal, 111:376-378.
- Foley, G.E. *et al.* (1965) **Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia.**
- Gao, J. *et al.* (2009) **Hedgehog Signaling Is Dispensable for Adult Hematopoietic Stem Cell Function.** Cell, 4:548-558.
- Gehrke, I. *et al.* (2009) **Targeting the WNT/B-Catenin/TCF/LEF1 axis in solid and haematological cancers: Multiplicity of therapeutic options.** European Journal of Cancer, 45:2759-2767.
- Hengartner, M. O. (2000) **The biochemistry of apoptosis.** Nature. 407: 770-76.
- Hoelzer, D. *et al.* (2002) **Acute Lymphoblastic Leukemia.** American Society of Hematology.
- Hoffbrand, A.V. e Moss, P.A.H. (2011) **Essential Haematology.** Wiley-Blackwell publications, 6ª edição.
- Hoff, D.D.V. *et al.* (2009) **Inhibition of Hedgehog Pathway in Advanced Basal-Cell Carcinoma.** New England Journal of Medicine, 361:1164-1172.
- Hyman, J.H. *et al.* (2009) **Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade.** PNAS, Vol.106, no.33, pag. 14132-14137.
- Jamieson, C.H.M. *et al.* (2004) **Granulocyte-Macrophage Progenitors as Candidate Leukemic Stem Cells in Blasts-Crisis CML.** The New England Journal of Medicine, 351:657-667.

- Jayaraman, A. and Jamil, K. (2012) **Clusters of CDK2, CCND1, and CMYC genes involved in cancers: Acute Lymphocytic Leukemia (ALL) as a model.** *Biology and Medicine*, 4(1): 37-50.
- Ji, Z. *et al.* (2007) **Protein Kinase A, not Epac, Suppresses Hedgehog Activity and Regulates Glucocorticoid Sensitivity in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells.** *The journal of biological chemistry*, vol. 282, 52:37370-37377.
- Karanu, F.N. *et al.* (2000) **The Notch Ligand Jagged-1 Represents a Novel Growth Factor of Human Hematopoietic Stem Cell.** *Journal of Experimental Medicine*, vol. 192, no. 9, 1365-1372.
- Katoh, M. (2007) **Networking of WNT, FGF, Notch, BMP and Hedgehog Signaling Pathways during Carcinogenesis.** *Stem Cell Review*, 3:30-38.
- Katoh, M. and Katoh, M. (2007) **WNT Signaling Pathway and Stem Cell Signaling Network.** *Clinical Cancer Research*, 4042-4045.
- Keersmaecker, K. *et al.* (2008) **In vitro validation of g-secretase inhibitors alone or in combination with other anti-cancer drugs for the treatment of T-cell acute lymphoblastic leukemia.** *Haematologica*, 93(4):533-542.
- Khan, N.I. *et al.* (2007) **Activation of Wnt/B-catenin pathway mediates growth and survival in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia.** *British Journal of Haematology*, 138: 338-348.
- Kiel, M.J. *et al.* (2005) **Spatial differences in hematopoiesis but not in stem cells indicate a lack of regional patterning in definitive hematopoietic stem cells.** *Developmental Biology*, vol. 283, 29-39.
- Klauning, J.E. *et al.* (1997) **The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis.** *Environmental Health Perspectives*, 106:1, 289-295.
- Kopan, R. (2002) **Notch: a membrane bound transcription factor.** *Journal of Cell Science*, 115:1095-1097.

- Lewis, H. D. *et al.* (2007) **Apoptosis in T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells After Cell Cycle Arrest Induced by Pharmacological Inhibition of NOTCH Signaling.** *Chemistry & Biology*, 14:209-219.
- Liu, C. and He, X. (2009) **Destruction of a Destructor: A New Avenue for Cancer Therapeutics Targeting the Wnt Pathway.** *Journal of Molecular Cell Biology*, 2:70-73.
- Liu, S. *et al.* (2009) **Downregulation of Notch signaling by Gamma-Secretase inhibition can abrogate chemotherapy-induced apoptosis in T-ALL cell lines.** *Annals of Hematology*, 88:613-621.
- Lobo, N. A. *et al.*(2007). **The Biology of Cancer Stem Cells.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23(1): 675-699.
- Lodish, H. *et al.* (2003) **Molecular Cell Biology.** Freeman, W. H. & Company, 5ª edição.
- Low, J. A. and Sauvage, F. (2010) **Clinical Experience With Hedgehog Pathway Inhibitors.** *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 38, no. 36.
- Lu, D. *et al.*(2004) **Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 3118–3123.
- Lusting, B. and Behrens, J. (2003) **The Wnt signaling pathway and its role in tumor development.** *J Cancer Res Clin Oncol*, 129: 199–221.
- MacDonald, B.T. *et al.* (2009) **Wnt/B-catenin Signaling: Components, Mechanisms and Diseases.** *Developmental Cell* 17, July 21, 2009.
- Mar, B.G. *et al.*(2011) **The controversial role of the Hedgehog pathway in normal and malignant hematopoiesis.** *Leukemia*, 25: 1665-1673.
- Mazieres, J. *et al.* (2005) **Inhibition of Wnt16 in human acute lymphoblastoid leukemia cells containing the t(1;19) translocation induces apoptosis.** *Oncogene*, 24, 5396–5400.
- Mazumbar, T. *et al.* (2011) **Hedgehog signaling drives cellular survival in human colon carcinoma cells.** *Cancer Research*, 71:1092-1102.

McWhirter, J. *et al.* (1999) **Oncogenic homeodomain transcription factor E2A-Pbx1 activates a novel WNT gene in pre-B acute lymphoblastoid leukemia.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96, 11464–11469.

Medyouf, H. *et al.* (2010) **Acute T-cell leukemias remain dependent on notch signaling despite PTEN and INK4/ARf loss.** Blood, 115:1175-1184.

Mikawa, T. *et al.* (2004) **Induction and patterning of the primitive streak, an organizing center of gastrulation in the amniote.** Developmental Dynamics, Vol. 229, 422 – 432.

Mita, M. M. *et al.* (2006) **Apoptosis: mechanisms and implications for cancer therapeutics.** Target Oncology. 1: 197-214.

Molckovsky, A. and Siu, L.L. (2008) **First-in-class, first-in-human phase I results of targeted agents: Highlights of the 2008 American Society of Clinical Oncology meeting.** Journal of Hematology and Oncology, 1:20.

Muller-Tidow, C. *et al.* (2004) **Translocation Products in Acute Myeloid Leukemia Activate the Wnt Signaling Pathway in Hematopoietic Cells.** Molecular and Cellular Biology, p. 2890-2904.

Nickoloff, B.J. *et al.* (2003) **Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents.** Oncogene, 22:6598-6608.

Ok, C.Y. *et al.* (2011) **Aberrant Activation of the Hedgehog Signaling Pathway in Malignant Hematological Neoplasms.** The American Journal of Pathology, vol. 180.

Okuhashi, Y. *et al.* (2011) **Effects of Combination of Notch Inhibitor plus Hedgehog Inhibitor or Wnt Inhibitor on Growth of Leukemia Cells.** Anticancer Research, 31:893-896.

Palomero, T. *et al.* (2006) **Activating mutations in NOTCH1 in acute myeloid leukemia and lineage switch leukemias.** Leukemia, 20:1963-1966.

Palomero, T. and Ferrando, A. (2009) **Therapeutic Targeting of NOTCH1 Signaling in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia.** Clinical Lymphoma & Myeloma, vol. 9, Suppl. 3, 205-210.

Pinto, A. M. (2007) **Fisiopatologia – Fundamentos e Aplicações.** Lidel, edição e distribuição, Lda.

- Peukert,S. and Miller-Moslin,K. (2010) **Small-Molecule Inhibitors of the Hedgehog Signaling Pathway as Cancer Therapeutics**. ChemMedChem, 5:500-512.
- Pui, C.H. *et al.* (2008) **Acute Lymphoblastic Leukaemia**. The lancet, 371:1030-1043.
- Rao,S.S. *et al.* (2009) **Inhibition of Notch Signaling by Gamma Secretase Inhibitor Engages the RB Pathway and Elicits Cell Cycle Exit in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia**. Cancer Research, 69(7):3060–3068.
- Radke, F. and Raj,K. (2003) **The role of NOTCH in tumorigenesis: Oncogene or Tumor Suppressor?** Nature Reviews Cancer , Vol. 3, p. 756-767.
- Robarge, K.D. *et al.* (2009) **GDC-0449—A potent inhibitor of the hedgehog pathway**. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 19: 5576–5581.
- Roman-Gomez, J. *et al.* (2006) **Epigenetic regulation of WNT signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia**. Blood journal.
- Roy, M. *et al.* (2007) **The multifaceted role of Notch in cancer**. Current Opinion in Genetics & Development, 17:52-59.
- Sarmiento-Ribeiro, A. B. (2000) **Alterações fenotípicas da célula tumoral e a sua relação com a resistência à quimioterapia**. Tese de Doutorado.
- Sarmiento-Ribeiro, A. B. *et al.* (2008) **Integração do Metabolismo e Comunicação Celular**.In: Bioquímica-Organização Molecular da Vida. Lidel-EdiçõesTécnicas, pp: 599-647.
- Scales,S.J. and Sauvage,J. (2009) **Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy**. Cell Press, vol. 30, no. 6.
- Sengupta A. *et al.* (2007) **Deregulation and cross talk among Sonic hedgehog, Wnt, Hox and Notch signaling in chronic myeloid leukemia progression**. Leukemia, 21:949-955.
- Serinsoz, E. *et al.* (2004) **Aberrant expression of B-catenin discriminates acute myeloid leukaemia from acute lymphoblastic leukaemia**. British Journal of Haematology, 126:313-319.
- Shih, I.M. and Wang, T.L. (2007) **Notch Signaling, gamma-secretase Inhibitors and Cancer Therapy**. Cancer Research, 67:1879-1882.

- Singh, B.N. *et al.* (2011) **Hedgehog signaling Antagonist GDC-0449 (Vismodegib) Inhibits Pancreatic Cancer Stem Cell Characteristics: Molecular Mechanisms.** PLoS ONE, 6(11):e27306.
- Staal,F. and Fibbe,W.E. (2012) **Wnt cross-talk in the niche.** Blood, 119: 1618-1619.
- Takahashi-Yanaga, F. and Kahn,M. (2010) **Targeting Wnt Signaling: Can We Safely Eradicate Cancer Stem Cells?.** Clinical Cancer Research, 16:3153-3162.
- Tickenbrock,L. *et al.* (2005) **Flt3 tandem duplication mutations cooperate with Wnt signaling in leukemic signal transduction.** Blood, vol. 105, no. 9.
- Tremblay, M.R. *et al.* (2010) **New developments in the discovery of small molecule Hedgehog pathway antagonists.** Chemical Biology, 14:428-435.
- Trosko, J.E. and Ruch, J.E. (1998) **Cell-Cell Communication in Carcinogenesis.** Frontiers in Bioscience.
- Varjosalo,M. and Taipale,J. (2008) **Hedgehog: Functions and mechanisms.** Genes & Development, 22:2454-2472.
- Weerkamp, F. *et al.* (2006) **Notch and Wnt signaling in T-lymphocyte development and acute lymphoblastic leukemia.** Leukemia, 20:1197-1205.
- Wilusz, M. and Majka,M. (2008) **Role of the Wnt/B-catenin network in regulating hematopoiesis.** Arch. Immunol. Ther. Exp., 56:257-266.
- Wolfe, M.S. (2009) **Gamma-Secretase in biology and medicine.** Seminars in Cell & Developmental Biology,20:219-224.
- Xenia, M. *et al.* (2007) **SnapShot: Notch Signaling Pathway.** Cell, 128.
- Yang, L. *et al.* (2011) **Activation of Hedgehog pathway in gastroesophageal cancers.** Journal of Solid Tumours, Vol. 1, no. 3.
- Zhang, X. *et al.* (2011) **Mechanistic insight into Myc stabilization in breast cancer involving aberrant Axin1 expression.** PNAS, Vol. 109, no. 8, 2790–2795.

Zhu, Y.M. *et al.* (2006) **Notch1 mutations in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Prognostic significance and implication in multifactorial leukemogenesis.** *Clinical Cancer Research*, 12:3043-3049.