



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Importância do TRAIL e da Survivina
como alvos terapêuticos na Leucemia
Linfoblástica Aguda

Cátia Sofia da Costa Domingues

2012



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

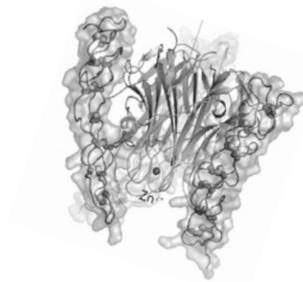
Importância do TRAIL e da Survivina como alvos terapêuticos na Leucemia Linfoblástica Aguda

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro, Professora Doutora Marília Dourado e da Professora Doutora Paula Veríssimo (Universidade de Coimbra)

Cátia Sofia da Costa Domingues

2012

«There is a paradox in the growth of scientific knowledge. As information accumulates in ever more intimidating quantities, disconnected facts and impenetrable mysteries give way to rational explanations, and simplicity emerges from chaos.»



(Alberts, B. *et al.*, 1983)

Agradecimientos

Apesar de ser um trabalho de realização individual, não queria deixar de agradecer àqueles que sempre me ajudaram directa ou indirectamente na sua realização. Por isso, agradeço:

À Professora Doutora Ana Bela Sarmento, pela sua orientação, disponibilidade, atenção, pelo grande exemplo que é na dedicação à investigação e em especial pela confiança! À Professora Doutora Marília Dourado, pela sua orientação, disponibilidade, e exemplo de rigor e determinação.

À Professora Doutora Paula Veríssimo pela sua disponibilidade e pelo gosto que demonstra no trabalho que desempenha.

À Mestre Cristina Gonçalves, pela sua disponibilidade, pela transmissão de conhecimentos, pela ajuda prestada e pela sua dedicação desde o início da realização deste projecto.

À Mestre Raquel Alves, pela sua disponibilidade, apoio e ensinamentos tão importantes na realização deste projecto.

Ao laboratório de Biologia Molecular Aplicada da Faculdade de Medicina da UC, a todos os seus investigadores e colaboradores, um obrigada pela ajuda prestada em cada momento.

Ao Professora Doutor Manuel Santos Rosa, director do serviço de Imunologia (FMUC), e à Dra. Vera Alves, pela disponibilidade e apoio na realização deste trabalho.

Às minhas colegas Patrícia Guarino, Joana Leite e Mariana Ferreira que estiveram sempre presentes, que me acompanharam e me ajudaram na realização deste projecto, com a sua amizade, companheirismo, dedicação e incentivo.

À Mafalda pelo apoio, pela força, pela confiança e pela tolerância, por seres quem és e porque apesar de longe por vezes estás sempre presente. Obrigada por tudo amiga!

À Lili, ao Pires, à Ana Rosa, à Cindy e à Rita, obrigada por todos estes anos tornarem cada momento difícil num sorriso acompanhado das palavras: “nós conseguimos!”.

A todos aqueles amigos que não estão aqui referidos de uma forma directa, o meu muito obrigada por serem o que de mais especial existe.

Aos meus pais, aos meus avós e a toda a minha família, que são o meu pilar, o meu suporte e o meu amparo, o meu muito obrigada pelo amor, carinho e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida!

Obrigada por estarem sempre comigo!

Resumo/Abstract

Resumo

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) representa um grupo de doenças biológica e clinicamente heterogêneo. A quimioterapia continua a ser a terapêutica mais utilizada, no entanto, muitos doentes desenvolvem mecanismos de resistência aos fármacos convencionais, nomeadamente por resistência à apoptose, associados ao aparecimento de recidivas hematológicas frequentes.

O TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*) ou APO2L (*APO 2 ligand*), é uma proteína transmembranar do tipo II, com capacidade selectiva de indução de morte celular. Esta citocina pode ligar-se a dois tipos de receptores da membrana celular: os receptores de morte celular 4 e 5 (DR4/TRAIL-R1 e DR5/TRAIL-R1) induzindo morte celular por apoptose; e os receptores armadilha (ou *decoy*) 1 e 2 (DcR1/TRAIL-R3 e DcR2/TRAIL-R4), que inibem a apoptose. Para além disto, verifica-se que apesar do TRAIL induzir apoptose de forma preferencial nas células cancerígenas, nem todas as células tumorais apresentam sensibilidade ao TRAIL, nomeadamente pelo aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas, como a survivina. Neste sentido, encontram-se em estudo vários moduladores da resistência à apoptose, nomeadamente os compostos naturais Ácido Gambóxico (GA) e Silibinina (SLB).

Tendo em conta estas observações pretendeu-se com este trabalho avaliar a eficácia terapêutica do rhTRAIL, e dos fármacos inibidores da survivina, GA e SLB, em monoterapia e em combinação terapêutica, entre si e com a quimioterapia convencional, em células de Leucemia Linfoblástica Aguda, em particular na recidiva da doença, bem como analisar alguns dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade e na sensibilidade das células a estes compostos.

Para tal, as células CEM e MOLT-4, obtidas de doentes com LLA de linhagem T (LLA-T) na fase de apresentação da doença e na recidiva hematológica, respectivamente, foram mantidas em cultura na ausência e na presença de concentrações crescentes destes fármacos, em monoterapia (em toma única e em administração diária) e em associação terapêutica entre si e com a quimioterapia convencional (Doxorrubicina e Vincristina), administrados simultaneamente e desfasados de 4 horas. A proliferação e viabilidade celular foram avaliadas pelo teste de exclusão com azul de tripano e o tipo de morte celular foi analisado por microscopia óptica, através da análise morfológica com solução de *May-Grünwald-Giemsa*, e por

citometria de fluxo (CF) recorrendo à dupla marcação com anexina V e Iodeto de Propídeo (IP). Os níveis de caspase 3, de citocromo *c*, bem como o ciclo celular e o potencial de membrana mitocondrial foram avaliados por CF com recurso a anticorpos monoclonais específicos, ao IP e à sonda fluorescente JC1, respectivamente. Os níveis de expressão basal do ligando TRAIL e dos seus receptores, do receptor da transferrina (TfR), bem como da survivina, foram também avaliados por CF.

Assim, os resultados obtidos neste trabalho mostram que os fármacos em estudo induzem diminuição na proliferação e viabilidade celular de forma dependente da dose, do tempo de exposição, do tipo de administração e da linha celular em estudo.

Os efeitos citotóxicos induzidos pelos diferentes compostos são mediados por apoptose, acompanhados de aumento da expressão de caspase 3 activada e de citocromo *c*, bem como de disfunção mitocondrial. As alterações ao nível do ciclo celular revelam aumento da população celular em G0/G1 e o aparecimento de pico apoptótico confirmando a morte celular por apoptose. A diferença na sensibilidade das células ao rhTRAIL pode estar relacionada com a razão entre os receptores pró- e anti-apoptóticos do TRAIL, a qual é superior nas células CEM em relação às células MOLT-4. Estes resultados podem justificar a maior sensibilidade das células CEM ao rhTRAIL. Além disso, os níveis de expressão basal da survivina e do receptor da transferrina (TfR) são também superiores nas células CEM, podendo explicar a maior sensibilidade destas células ao GA e a necessidade de maiores concentrações de SLB, para obter os mesmos efeitos que nas células MOLT-4. Adicionalmente, a administração diária e a associação entre os diversos fármacos revelou efeito sinérgico, o que sugere que estas associações para além de benéficas pela redução da toxicidade dos fármacos, poderão ser úteis para ultrapassar a resistência ao sinal efectivo de morte celular mediada pelo rhTRAIL.

Em suma, podemos concluir que os fármacos rhTRAIL, GA e SLB poderão constituir uma abordagem terapêutica promissora em leucemias agudas, nomeadamente na recidiva da doença, quer em monoterapia quer em terapêutica combinada com a quimioterapia convencional.

Palavras-chave:

- Leucemia Linfoblástica Aguda T
- Quimioterapia Convencional
- TRAIL recombinante
- Ácido Gambóxico
- Silibinina
- Apoptose

Abstract

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) represents a biologically and clinically heterogeneous group of diseases. Although, chemotherapy is a hallmark for ALL treatment many patients relapse. Take into account, development of new therapeutical approaches to treat these neoplasias may be explored. One promising approach in treatment of haematological neoplastic malignancies is the use of tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis inducing ligand (TRAIL/Apo-2L).

TRAIL is a member of the TNF superfamily with a selective apoptotic activity. This protein trigger and activate 2 death receptors, DR4 and DR5, that induce cell death by apoptosis; and 2 decoy receptors, DcR1 and DcR2, which in contrast with the pro-apoptotic receptors inhibit apoptosis. Nevertheless, in some cases treatment with TRAIL alone may not be sufficient for an effective response, namely by the increased of anti-apoptotic survivin levels. The natural compounds Gambogic Acid (GA) and Silibinin (SLB) appear to be a potential treatment to increase apoptotic response.

In this work, the main objective is to evaluate the therapeutic efficacy of a recombinant human TRAIL (rhTRAIL) and survivin inhibitors, namely gambogic acid (GA) and silibinin (SLB), alone and in combination with conventional chemotherapeutic agents, in Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) cell lines, namely in relapse, as well as the mechanisms that are involved in cytotoxicity and sensitivity for these compounds.

For this purpose we maintained in culture two ALL cell lines, the CEM (obtained from a patient at disease presentation) and MOLT-4 cells (established a patient at relapse), and tested the effect of different concentrations of rhTRAIL, GA and SLB in monotherapy (single administration and at a low daily administration), in association with each other and with conventional drugs (Doxorubicin or Vincristine), administrated simultaneously or 4 hours offset. Cell viability and proliferation were assessed by the trypan blue assay; cell death was analyzed by optical microscopy (May-Grunwald-Giemsa stain) and by flow cytometry (FC) using the Annexin V and Propidium Iodide (PI) double staining. Activated caspase 3 and cytochrome c, mitochondrial dysfunction and cell cycle analyze were accessed by FC using monoclonal antibodies, JC1 fluorescent probe and IP, respectively. TRAIL, TRAIL-

Receptors, survivin and TfR (*transferin receptor*) basal levels were evaluated by FC using monoclonal antibodies.

Our results show that all the tested drugs have an antiproliferative and cytotoxic effects in a dose, time, type administration and cell line dependent manner.

The results obtained by FC and morphological analyses show that the cell death occurs mainly by apoptosis with increase of activated caspase 3 and cytochrome *c* levels as well as mitochondrial dysfunction. In cell cycle analyze we observed that rhTRAIL, GA and SLB induce cell cycle arrest in G0/G1 phase and in pre G0/G1 which confirm cell death by apoptosis. The different therapeutic efficacy of rhTRAIL in both cell lines may also be correlated with the ratio between TRAIL pro and anti-apoptotic receptors, which are higher in CEM than in MOLT-4, in contrast with survivin and TfR levels. On the other hand, the combination of new rhTRAIL with survivin inhibitors and conventional drugs showed a synergistic effect, suggesting that besides the decrease in the toxicity, this combination may be useful in circumventing resistance for an effective apoptotic response.

In conclusion, our study suggests that rhTRAIL and survivin inhibitors, in monotherapy or in combination, may constitute a new potential therapeutic approach to overcome treatment failure and relapse in ALL treatment.

Key-words:

- Acute Lymphoblastic Leukemia
- Conventional Chemotherapy
- recombinant human TRAIL
- Gambogic Acid
- Silibinin

Índice

Agradecimentos	V
Resumo/Abstract	IX
Índice Figuras	XXI
Índice Tabelas	XXV
Lista de Abreviaturas	XXVII
Capítulo 1. Introdução	1
1.1. O Cancro	3
1.2. Bioquímica da carcinogénese - O Sistema Hematopoiético como exemplo.....	6
1.2.1. Proliferação celular e Regulação do ciclo celular	7
1.2.2. Sinalização celular envolvida na morte celular.....	12
1.2.3. Neoplasias Hematológicas	18
1.2.3.1. Leucemia Linfoblástica Aguda T (LLA-T)	18
1.2.4. rhTRAIL – uma nova abordagem terapêutica em hemato-oncologia	24
1.2.5. Inibidores da Survivina – um novo marco na modulação da resposta apoptótica em hemato-oncologia	30
1.2.5.1. Ácido Gambógico.....	31
1.2.5.2. Silibinina	32
1.3. Objectivos.....	34
Capítulo 2. Material e Métodos	37
2.1. Cultura das linhas celulares de leucemia linfoblástica aguda de células T humanas.....	39
2.2. Avaliação da expressão basal de moléculas envolvidas na regulação da apoptose por citometria de fluxo.....	40
2.2.1. Avaliação da expressão do ligando TRAIL e dos seus receptores, TRAIL- R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4 e do Tfr.....	40
2.2.2. Avaliação da expressão de survivina	41
2.3. Incubação das linhas celulares de leucemia linfoblástica aguda T com fármacos anticancerígenos	42
2.4. Análise da proliferação e morte celular através da determinação da densidade e da viabilidade celular.....	44
2.5. Análise da morte celular por microscopia óptica.....	44
2.6. Análise da morte celular por citometria de fluxo.....	45
2.7. Análise da expressão de moléculas envolvidas na morte celular por citometria de fluxo.....	47
2.8. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo	48

2.9. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo	49
2.10. Análise estatística	50
Capítulo 3. Resultados	51
3.1 Caracterização das linhas celulares humanas CEM e MOLT-4	53
3.2. Avaliação da expressão basal de moléculas envolvidas na apoptose celular	54
3.3. Efeito dos fármacos anticancerígenos na proliferação e morte celular.....	58
3.3.1. Curvas de proliferação e viabilidade celular	58
3.3.2. Análise da morte celular por citometria de fluxo	70
3.3.3. Análise do tipo de morte celular por morfologia celular	73
3.4. Influência dos fármacos anticancerígenos na expressão de moléculas envolvidas na morte celular por apoptose.....	75
3.5. Influência dos fármacos anticancerígenos no ciclo celular	76
3.6. Influência dos fármacos anticancerígenos no potencial de membrana mitocondrial	78
Capítulo 4. Discussão	81
Capítulo 5. Conclusão	99
Capítulo 6. Referências Bibliográficas	103

Índice Figuras

Figura 1 – Modelos explicativos para a heterogeneidade tumoral	4
Figura 2 – Esquema representativo da Hematopoiese	6
Figura 3 - Transdução de sinal pela via das proteínas cinases activadoras da mitose, a via das MAPK.....	9
Figura 4 – Via de sinalização JAK-STAT.....	10
Figura 5 – As fases do ciclo celular	11
Figura 6 – Vias de sinalização envolvidas na morte celular	15
Figura 7 – Aspecto morfológico de células de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA).....	19
Figura 8 – Fluxograma representativo das diferentes etapas de diagnóstico para a Leucemia Linfoblástica Aguda T (LLA-T).....	20
Figura 9 – Mecanismo de acção anticancerígena da Vincristina (VCR).....	22
Figura 10 – Esquema resumo de alguns dos mecanismos de actuação da Doxorrubicina (DOX)	23
Figura 11 - Representação do TRAIL e dos seus receptores	27
Figura 12 - Sinalização celular mediada pelo TRAIL	28
Figura 13 – Estrutura química do Ácido Gambóxico (GA).....	31
Figura 14 – Estrutura química da Silibinina (SLB).....	32
Figura 15 – Representação da estrutura química da sonda fluorescente 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'- tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide (JC1).....	49
Figura 16 – Curvas de proliferação (A) e de viabilidade celular (B) das células CEM e MOLT-4.....	54
Figura 17 – Aspectos morfológicos das células CEM (A) e MOLT-4 (B).....	54

Figura 18 – Análise da razão entre a expressão dos receptores pró-apoptóticos, TRAIL-R1 e TRAIL-R2, e anti-apoptóticos, TRAIL-R3 e TRAIL-R4, respectivamente nas células CEM e MOLT-4.....	57
Figura 19 – Efeito do fármaco rhTRAIL na densidade (A) e na viabilidade (B) celular das células CEM e MOLT-4.....	60
Figura 20 – Efeito do fármaco ácido gambóxico (GA) na densidade (A) e na viabilidade (B) celular das células CEM e MOLT-4.....	61
Figura 21 – Efeito do fármaco Silibinina (SLB) na densidade e na viabilidade celular das células CEM e MOLT-4.....	62
Figura 22 – Efeito dos compostos rhTRAIL, GA e SLB na densidade das células CEM e MOLT-4.....	64
Figura 23 – Efeito dos compostos rhTRAIL, GA e SLB na viabilidade das células CEM e MOLT-4.....	65
Figura 24 – Efeito da combinação terapêutica dos fármacos: ácido gambóxico (GA) e silibinina (SLB), doxorubicina (DOX) e vincristina (VCR) com o fármaco rhTRAIL na densidade das células CEM e MOLT-4, respectivamente	68
Figura 25 – Efeito da combinação terapêutica dos fármacos: ácido gambóxico (GA) e silibinina (SLB), doxorubicina (DOX) e vincristina (VCR) com o fármaco rhTRAIL na viabilidade das células CEM e MOLT-4, respectivamente.....	69
Figura 26 – Avaliação do efeito citotóxico induzido pelos fármacos rhTRAIL, ácido gambóxico (GA) e silibinina (SLB) nas células CEM e MOLT-4, respectivamente, por citometria de fluxo	70
Figura 27 – Avaliação do efeito citotóxico induzido pela combinação terapêutica dos fármacos: ácido gambóxico (GA) e silibinina (SLB), doxorubicina (DOX) e vincristina (VCR) com o fármaco rhTRAIL nas células CEM e MOLT-4, por citometria de fluxo	72
Figura 28 – Aspectos morfológico das células CEM e MOLT-4 na ausência de tratamento e após tratamento com os fármacos rhTRAIL, ácido gambóxico (GA) e silibinina (SLB)	74

Figura 29 – Avaliação do potencial de membrana mitocondrial nas células CEM e MOLT-4, respectivamente, incubadas na ausência e na presença dos fármacos anticancerígenos	78
Figura 30 – Mecanismos de acção de diferentes moduladores da apoptose.....	96

Índice Tabelas

Tabela 1 - Classificação da OMS para as Neoplasias Mielóides e Leucemias Agudas.....	18
Tabela 2 – Resumo dos fármacos agonistas dos receptores de morte 4 e 5 (DR4/DR5) desenvolvidos até ao momento, a fase clínica e as patologias intervenientes	29
Tabela 3 – Condições de incubação das células CEM e MOLT-4, respectivamente, com os compostos Dulanermine (rhTRAIL), Ácido Gambóxico (GA) e Silibinina (SLB), Doxorrubicina (DOX) ou Vincristina (VCR)	43
Tabela 4 – Avaliação da expressão de proteínas envolvidas na regulação da apoptose celular por citometria de fluxo.....	55
Tabela 5 – Influência dos fármacos anticancerígenos na expressão de citocromo c e caspase 3 activada, nas células CEM e MOLT-4 respectivamente	76
Tabela 6 – Influência dos fármacos anticancerígenos na distribuição das células CEM e MOLT-4 pelas diferentes fases do ciclo-celular	77

Lista de Abreviaturas

- A293**, células de embrião humano de rim
- ADN**, ácido desoxirribonucleico
- APAF-1**, *apoptosis protease activating factor-1*
- APC**, alofococianina
- Apollon**, *ubiquitin-conjugating BIR domain enzyme apollon* ou BIRC6
- AR**, receptores de androgénio
- ATP**, adenosina trifosfato
- ATRA**, ácido *all trans* retinóico
- BAD**, *BCL-2-associated X protein*
- BAK**, *BCL-2-homologous antagonist/killer 1*
- BAX**, *BCL-2 associated X protein*
- BCL-2**, *B-cell leukemia/lymphoma*
- BCL-X_L**, *B cell lymphoma extra large*
- BID**, *BH3-interacting domain death agonist*
- BIR**, *baculoviral IAP repeat*
- BIRC5**, survivina
- CDK**, *cyclin dependent kinase*
- c-FLIP**, *cellular-FLICE-like inhibitory protein*
- c-IAP1**, *cellular-IAP1* ou BIRC2
- c-IAP2**, *cellular-IAP2* ou BIRC3
- c-JUN**, *cellular ju-nana*
- c-MYC**, *cellular myelocytomatosis viral oncogene homolog*
- CD**, *cluster differentiation*
- CE**, célula estaminal
- CEC**, célula estaminal cancerígena
- CEH**, célula estaminal hematopoiética
- CEM**, Linha celular obtida de doente com LLA-T na presença da doença
- CFU**, unidades formadoras de colónias
- CFU-B**, Unidades Formadoras de Colónias da Linhagem Basofílica
- CFU-D**, Unidades Formadoras de Colónias da Linhagem Dendrítica
- CFU-E**, Unidades Formadoras de Colónias da Linhagem Eritróide
- CFU-G**, Unidades Formadoras de Colónias da Linhagem Granulocítica

CFU-M, Unidades Formadoras de Colônias da Linhagem Monocítica

CFU-MEG, Unidades Formadoras de Colônias da Linhagem Megacariocítica

CIS, *cytokine-induced SH2-containing protein*

CLP, célula linfóide progenitora

CMP, célula mielóide progenitora

CPH, célula progenitora hematopoiética

CTL, controlo

Cyt C, citocromo c

DcR1, receptor armadilha 1 (do inglês *decoy receptor 1*)

DcR2, receptor armadilha 1 (do inglês *decoy receptor 2*)

DD, Domínio de morte

DED, Domínio efector de morte

DIABLO, *direct IAP binding protein with low isoelectric point*

DISC, *death-inducing signalling complex*

DMSO, dimetilsulfóxido

DP, desvio padrão

DR4, receptor de morte celular 4

DR5, receptor de morte celular 5

DOX, doxorubicina

EGF, *epidermal growth factor*

ELK-1, *E-26-like protein 1*

ERK, *extracellular regulated kinase*

Epo, eritropoetina

FADD, *FAS-associated death domain*

FAS, *tumor necrosis factor receptor superfamily member 6*

FBS, Soro Fetal Bovino

FC, Factor de crescimento

FITC, isocianato de fluoresceína

FLICE, *FAS-associated death domain-like IL-1-converting enzyme*

FLIP, *FLICE-like inhibitory protein*

FLT3, *FMS-like tyrosine kinase 3*

FSC, *forward scatter*

- G-CSF**, factor estimulador da colónia (do inglês *granulocyte colony-stimulating factor*)
- GM-CSF**, factor estimulador das colónias dos granulócitos e macrófagos (do inglês *Granulocyte and Macrophage Colony-Stimulating factor*)
- G0**, *Gap 0*
- G1**, *Gap 1*
- G2**, *Gap 2*
- GA**, Ácido Gambóxico
- GA3**, GA-dicyclohexylcarbodiimide, 1-hydroxybenzotriazole (HOBt)
- GRB2**, *growth factor receptor bound protein 2*
- GTP**, guanina trifosfato
- h**, horas
- HL-60**, linha celular de leucemia promielocítica aguda
- HDAC**, histonas decetilases
- IAP**, proteínas inibidoras da apoptose (do inglês *inhibitor of apoptosis protein*)
- IC₅₀**, Concentração à qual um composto possui a capacidade de reduzir a viabilidade celular para 50%
- IGF**, *insulin-like growth factor*
- IκB**, *inhibitor of NF-κB protein*
- IL**, interleucinas
- ILP2**, *IAP-like protein2* ou BIRC8
- IP**, iodeto de propídeo
- IP**, iodeto de propídeo
- I-κB**, Inibidor do factor κB
- JAK**, *just another kinase*
- JC1**, *5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide*
- JURKAT**, células de leucemia linfoblástica aguda
- K-562**, linha celular de leucemia mielóide crónica
- KIAP**, Livina ou BIRC9
- KBM-5**, células de leucemia mielóide
- LLA**, Leucemia Linfocítica ou Linfoblástica Aguda
- LLA-T**, Leucemia Linfocítica ou Linfoblástica Aguda de células T
- LMA**, Leucemia Mielóide Aguda

LY30, inibidor da via do PI3K

M/A, razão monómeros/agregados de JC1

M-CFS, factor estimulador das colónias dos macrófagos (do inglês *macrophage colony-stimulating factor*)

MAb, anticorpo monoclonal

MAPK, *mitogen-activated protein kinase*

MAPK, *mitogen-activated protein kinase kinase*

MIF, média de intensidade de fluorescência

min, minutos

MCL1, *myeloid cell leukaemia differentiation protein 1*

ML-IAP, *melanoma IAP* ou BIRC7

MOLT-4, Linha celular de doente com LLA-T no estado recidivo

MPO, Mieloperoxidase

NAIP, *neuronal apoptosis inhibitor protein* ou BIRC1

NF-κB, *nuclear factor-kappa B*

NHL, Linfoma não Hodgkin

NK, células *natural killers*

NSCLC, cancro do pulmão de não pequenas células

OMS, Organização Mundial de Saúde

OPG, Osteoprotegerina

p53, Proteína envolvida na progressão do ciclo celular

PDGFR, *platelet derived growth factor receptor*

PE, ficoeritrina

PI3K, fosfatidilinositol-3-fosfato

PTK, protein-tirosine kinase

PTD, protein-tirosine phosphatase

RAS, *rat sarcoma*

RAF, *ras function*

RANK, *receptor activator NF-κB*

RANKL, *receptor activator NF-κB ligand*

RI, receptor da insulina

RIP 1, *receptor-interacting protein 1*

RPMI, Meio de cultura celular *Roswell Park Memorial Institute*

rhTRAIL, *recombinant human TRAIL*

RSK, *MAPKAP-K1 ou MAPK-activated protein kinase-1*

RTK, receptores tirosina cinase

SCF, factor das células estaminais (do inglês *stem cell factor*).

SH, *src-homology*

SHP, *phosphatase containing SH2*

SKW6.4, células linfoblastóides, as

SLB, silibinina

SMAC, *second mitochondria-derived activator of caspase*

SNC, sistema nervoso central

SSC, *side scatter*

STAT, *signal transducers and activators of transcription protein*

t-BID, *truncated BID*

TdT, *Terminal deoxynucleotidyl Transferase*

Tf, transferrina

TfR, receptor da transferrina

TNF, factor de necrose tumoral (do inglês *tumor necrosis factor*)

TNF α , factor de necrose tumoral alpha (do inglês *tumor necrosis factor alpha*)

TNFR-1, *TNF receptor 1*

TRADD, *TNF receptor-associated death domain*

TRAF1, *Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 1*

TRAF2, *Tumor necrosis factor receptor (TNFR)- associated factor 2*

TRAIL, ligando indutor de apoptose relacionado com o TNF (do inglês *TNF-related apoptosis inducing ligand*).

TRAIL-R, receptor relacionado com o TNF (do inglês *TNF-related apoptosis inducing ligand receptor*).

TRAIL-R1, TRAIL receptor-1

TRAIL-R2, TRAIL receptor-2

TRAIL-R3, TRAIL receptor-3

TRAIL-R4, TRAIL receptor-4

TRANCE, *tumour necrosis factor related activation induced cytokine*

Tpo, trombopoetina

UCB, células estaminais hematopoiéticas

VCR, vincristina

XIAP, *X-linked inhibitor of apoptosis protein* ou BIRC4

Ψ_{mit} , potencial de membrana mitocondrial

Capítulo 1. Introdução

1.1. O Cancro

O desenvolvimento e manutenção de um organismo multicelular, como é o Homem, depende de um elaborado sistema de contacto inter e intracelular, que permite controlar e manter o equilíbrio entre crescimento, proliferação, diferenciação, sobrevivência, morte e/ou metabolismo celular nos diversos tecidos e órgãos (Sarmiento-Ribeiro, A. *et al.*, 2008). Neste sentido, alterações nestes processos podem conduzir ao aparecimento de variadas patologias, como é o caso do cancro.

Actualmente, o cancro surge como uma das principais causas de morte a nível mundial, prevendo-se aumentos consideráveis desta patologia devido a um aumento dos índices de envelhecimento global da população (Visvader, J., 2011).

O cancro é uma doença multifactorial, normalmente associada à combinação de factores ambientais, genéticos e/ou epigenéticos, que culminam na alteração das normais vias de proliferação, diferenciação e/ou morte celular (Hanahan, D. & Weinberg, R., 2000).

Por outro lado, a carcinogénese é um processo multifásico e multifactorial em que várias e progressivas alterações genéticas e/ou epigenéticas levam à aquisição do fenótipo maligno pelas células normais (Tysnes, B. & Bjerkvic, R., 2007). Este processo engloba três fases distintas: a iniciação, em que ocorrem alterações genéticas irreversíveis; a promoção, em que ocorre aumento da proliferação das células iniciadas, conduzindo à sua acumulação; e a progressão, em que há formação de novas mutações genéticas que conduzem à aquisição de um fenótipo maligno ou invasivo irreversível (Sarmiento-Ribeiro, A., 2000; Martinez, J., 2003).

Assim, apesar das alterações genéticas e/ou epigenéticas serem consideradas amplamente aceites como as principais responsáveis pelo fenótipo tumoral, os mecanismos moleculares e celulares subjacentes à heterogeneidade tumoral continuam a assumir uma questão de interesse central em Oncobiologia clínica. Deste modo, estudos recentes colocam em evidência dois modelos distintos para explicar a heterogeneidade tumoral: o modelo da célula estaminal cancerígena (CEC) ou hierárquico e o modelo estocástico (Figura 1) (Fulda, S. & Shazib, P., 2010).

No processo de divisão celular normal uma célula estaminal (CE) pluripotente, que por definição possui elevada capacidade de divisão e elevado potencial de auto-

renovação e diferenciação, dá origem por divisão assimétrica a novas células estaminais e a células precursoras de linhagem, que por sua vez originarão as células diferenciadas e maduras (Figura 1A). Estas células por possuírem elevado potencial de divisão são mais susceptíveis a alterações genéticas relativamente às suas derivadas diferenciadas (Shakleton, M., 2010, Dourado, M. *et al.*, 2010).

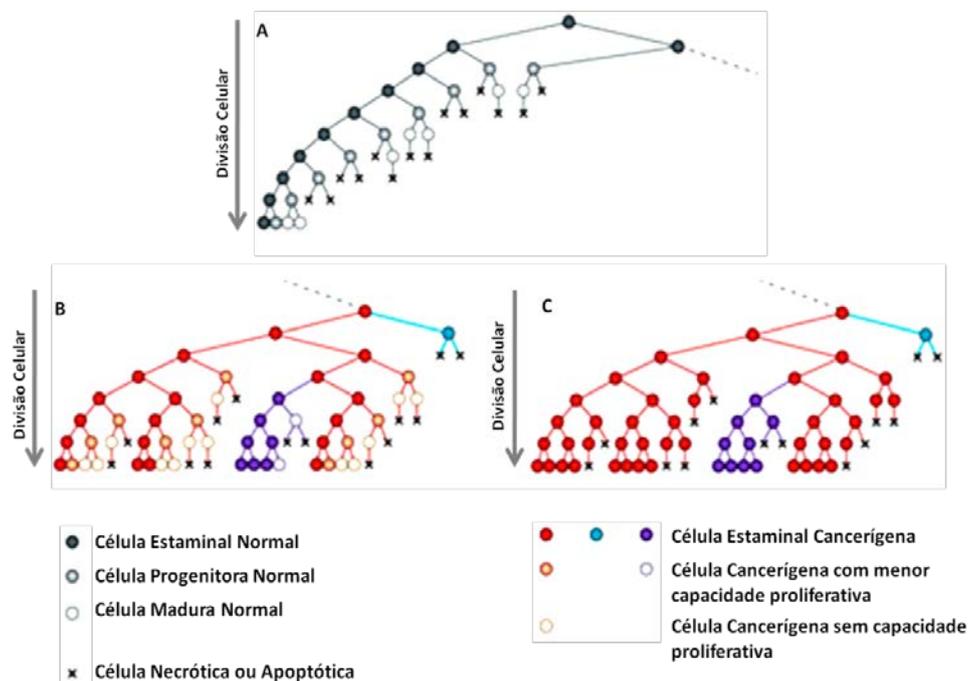


Figura 1 – Modelos explicativos para a heterogeneidade tumoral. Na normal divisão celular (**A**) uma célula estaminal pluripotente com elevado potencial de auto-renovação, divisão e proliferação dá origem a células-filhas progenitoras, que por várias etapas de diferenciação dão origem a células maduras, com menor capacidade de proliferação. O **modelo hierárquico (B)** refere que as células cancerígenas são heterógenas e somente as células estaminais cancerígenas possuem o potencial de proliferar activamente e formar novos tumores. O **modelo estocástico (C)** preconiza a heterogeneidade das células tumorais, todavia a maioria destas possui a capacidade de proliferar e formar novos tumores (Adaptado de Nguyen, L. *et al.*, 2012).

O modelo hierárquico ou da célula estaminal cancerígena (CEC) refere que todas as células se encontram organizadas de forma hierárquica, tal como no modelo de divisão celular normal, havendo maioritariamente dois tipos de subpopulações distintas dentro da população total de células malignas, as CECs e outras células cancerígenas com potencial de divisão mais baixo. De acordo com este modelo, a progressão e crescimento tumoral são mantidas por células que possuam a capacidade de CECs, isto é, por definição apresentem potencial de auto-renovação e capacidade proliferativa autónoma (Lobo, N. *et al.*, 2007; Fulda, S. & Shazib, P., 2010; Fulda, S.,

2011). No entanto, este modelo dita que à semelhança das suas homólogas normais, as CECs mantêm a resposta, e inclusivamente a dependência de factores externos, de forma a potenciar as suas capacidades intrínsecas de sobrevivência, crescimento e diferenciação, independentemente da forma como o processo de diferenciação possa ter sido afectado (Figura 1B) (Nguyen, L. *et al.*, 2012). Segundo esta perspectiva, a eliminação das CECs é fundamental para travar a progressão e o crescimento tumorais, bem como para evitar a recidiva oncológica dos doentes com cancro (Reya, T., *et al.* 2001).

Por outro lado, o modelo estocástico preconiza que todas as células cancerígenas dentro de um tumor possuem a mesma capacidade de funcionar como CECs e, deste modo, de proliferar extensivamente e formar novos tumores, sendo a sua actividade regulada por uma variável estocástica intrínseca. Desta forma, experimentalmente, este modelo pode ser comparado com uma hierarquia em que as CECs são raras e produzem células com baixo potencial proliferativo, pois só uma pequena população celular num determinado momento exhibe actividade de CEC (Figura 1C) (Fulda, S. & Shazib, P., 2010; Shakleton, M., 2010; Nguyen, L. *et al.*, 2012). Segundo este modelo, para a erradicação completa de doenças, como o cancro, é necessária a eliminação de todas as células cancerígenas (Reya, T., *et al.* 2001).

Deste modo, o cancro pode surgir quer a partir de CECs quer a partir de células mais diferenciadas (Shakleton, M., 2010; Visvader, J., 2011), que acumulam alterações genéticas e/ou epigenéticas que resultam num aumento da expressão de proto-oncogenes ou na diminuição da expressão de genes supressores tumorais, ou ainda na expressão de genes anti-apoptóticos ou diminuição da expressão dos genes pró-apoptóticos, que culminam em alterações nos processos de crescimento, divisão, diferenciação e/ou morte celular por apoptose normais (Sarmiento-Ribeiro, A., 2000).

Neste sentido, mostra-se de suma importância a identificação dos diferentes mecanismos celulares e moleculares envolvidos na heterogeneidade tumoral, de forma a identificar novos agentes de diagnóstico e tratamento na luta contra a patologia tumoral.

1.2. Bioquímica da carcinogênese - O Sistema Hematopoético como exemplo

A Hematopoiese é o processo de formação, desenvolvimento, diferenciação e maturação das células sanguíneas a partir de um precursor celular comum e indiferenciado, a célula estaminal hematopoética (CEH). Esta célula iniciadora dá origem por auto-renovação a uma nova CEH e a uma célula progenitora hematopoética multipotente (CPH), que por sua vez origina a célula progenitora para a linhagem linfóide (CPL) e para a linhagem mielóide (CPM). Estas células multipotentes podem, por sua vez, diferenciar-se noutros tipos celulares respectivos. As CPL dão origem aos linfoblastos, que se diferenciam em linfócitos B, linfócitos T e/ou em células *natural killer* (NK). Por sua vez, as CPM podem diferenciar-se em proeritroblastos que dão origem aos eritrócitos; mieloblastos, que se diferenciam em granulócitos, basófilos, eósinófilos e neutrófilos; monoblastos, precursores dos monócitos e macrófagos; e megacarioblastos que se diferenciam em plaquetas (Figura 2) (Hoffbrand, A. *et al.*, 2006; Lobo, N. *et al.*, 2007; Myatt, S. *et al.*, 2007).

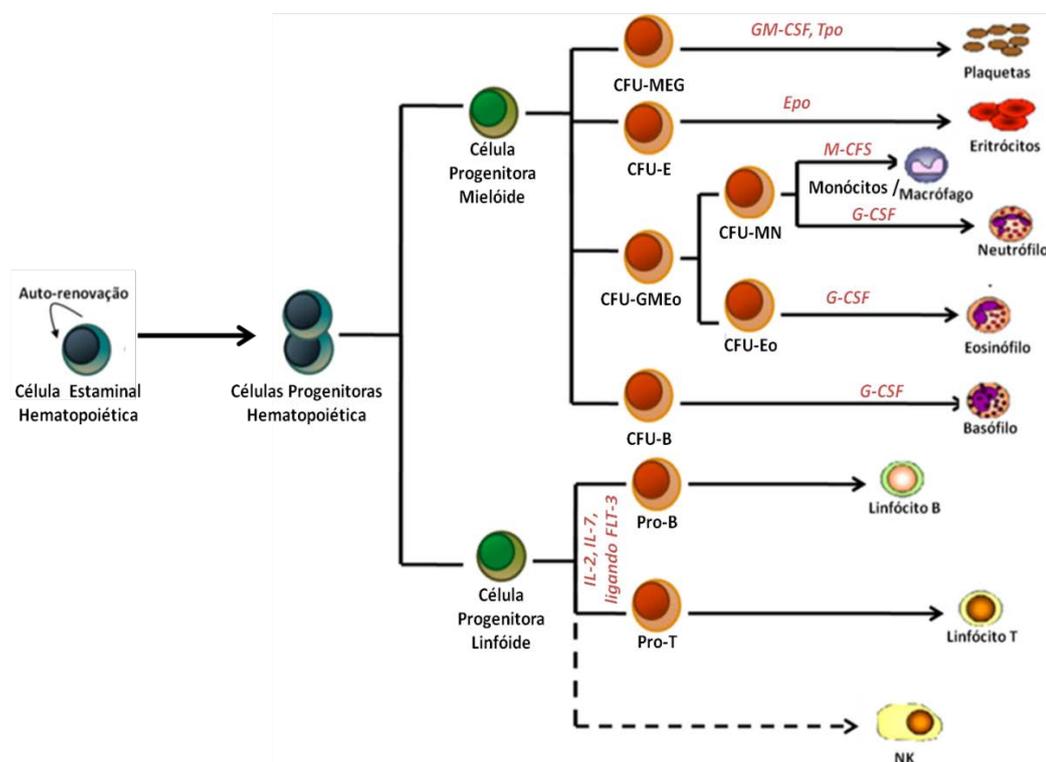


Figura 2 – Esquema representativo da Hematopoiese. As células progenitoras hematopoéticas (ou células estaminais pluripotentes - CEH) podem auto-renovar-se ou originar as células progenitoras multipotentes (CPH) que por sua vez originam os precursores das linhagens mielóide e linfóide (CMP e CLP). Estes pela acção de factores de crescimento e posterior diferenciação celular dão origem aos vários progenitores das diferentes células maduras sanguíneas, como as plaquetas, os eritrócitos, os monócitos/macrófagos, os neutrófilos, os eosinófilos e os basófilos; e os linfócitos B, T e células *Natural*

Killer (NK), respectivamente. Sendo que as unidades formadoras de colónias (CFU) de megacariócitos (MEG), de eritrócitos (E), de monócitos/macrófagos (M), neutrófilos (N), eosinófilos (Eo) e de basófilos (B), se encontram respectivamente identificadas. Entre as citocinas que regulam a hematopoiese estão representadas o factor estimulador das colónias dos granulócitos (G-CSF, *Granulocyte Colony-Stimulating factor*), a trombopoetina (Tpo), a eritropoetina (Epo), o factor estimulador das colónias dos monócitos/macrófagos (M-CFS, *Monocyte/Macrophage Colony-Stimulating factor*), o factor estimulador das colónias dos granulócitos e monócitos/macrófagos (GM-CFS, *Granulocyte and Macrophage Colony-Stimulating factor*), as interleucinas 2 e 7 (IL-2 e IL-7, respectivamente) e o factor das células estaminais (SCF, *Stem Cell factor*)

As células estaminais hematopoiéticas têm a sua origem na medula óssea, sendo esta a única fonte de formação de novas células sanguíneas durante a adolescência e a vida adulta. O microambiente medular é composto por uma rede microvascular e células do estroma, como os adipócitos, fibroblastos, células endoteliais e macrófagos, que secretam factores de crescimento, essenciais ao crescimento, diferenciação, maturação e morte das células hematopoiéticas. Deste modo, a manutenção do microambiente medular é fundamental, para que as células maduras alcancem a circulação sanguínea (Smith, C. *et al.*, 2005, Hoffbrand, A. *et al.*, 2006).

1.2.1. Proliferação celular e Regulação do ciclo celular

A homeostase tecidual é alcançada através de um complexo sistema de comunicação mediada por uma vasta variedade de moléculas sinalizadoras, sintetizadas pelo organismo, os ligandos, que interagem com receptores da membrana celular encaminhando sinais para o interior da célula, permitindo, assim, a elaboração de uma resposta fisiológica, de sobrevivência, proliferação, diferenciação ou morte celular.

As vias de sinalização conducentes à proliferação celular iniciam-se, geralmente, pela ligação de factores de crescimento a receptores membranares, a maioria dos quais com função tirosina-cinase. O ponto-chave deste processo é a regulação de proteínas por mecanismos de fosforilação e desfosforilação. Neste sentido, este mecanismo reversível e dinâmico, é controlado por cinases (PTK), que catalisam as reacções de fosforilação, e por fosfatases (PTP), que catalisam as reacções de desfosforilação, culminando o processo com a activação da transcrição de genes que

regulam a diferenciação e progressão no ciclo celular (Sarmiento-Ribeiro, A. *et al.*, 2008).

Deste modo, a interação dos factores de crescimento das células hematopoiéticas com os seus receptores activam essencialmente duas vias de sinalização celular, a via MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) e a via JAK-STAT (*Just Another Kinase – Sinal Transductor and Activator of Transcription*) (Sarmiento-Ribeiro, A. *et al.*, 2008).

A via de sinalização celular das proteínas cinases activadoras da mitose, a via MAPK, é activada pela ligação de um factor de crescimento ao respectivo receptor, com função tirosina-cinase, incluindo os receptores de insulina (RI), os receptores para factores de crescimento, como os factores de crescimento de colónias dos monócitos/macrófagos (M-CFC), os factores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e o factor de crescimento das células estaminais (SCF). Esta activação do receptor leva à sua alteração conformacional, com dimerização de monómeros individuais e respectiva activação por auto-fosforilação em resíduos de tirosina. A existência de grupos fosfato nos resíduos de tirosina permite a ligação do domínio citoplasmático do receptor a proteínas alvo existentes no citoplasma que possuam resíduos SH2 (*Src-Homology 2*), como é o caso das proteínas GRB2 (*Growth-factor Receptor Bound protein 2*) e RAS (*Rat Sarcoma*). Algumas destas proteínas alvo são também cinases que podem, por sua vez, fosforilar outras cinases desencadeando uma cascata de fosforilações sucessivas, neste caso em resíduos de serina e de treonina, que culminam na activação de proteínas que alteram a transcrição genética ou a estrutura celular (Figura 3) (Sarmiento-Ribeiro, A. *et al.*, 2008).

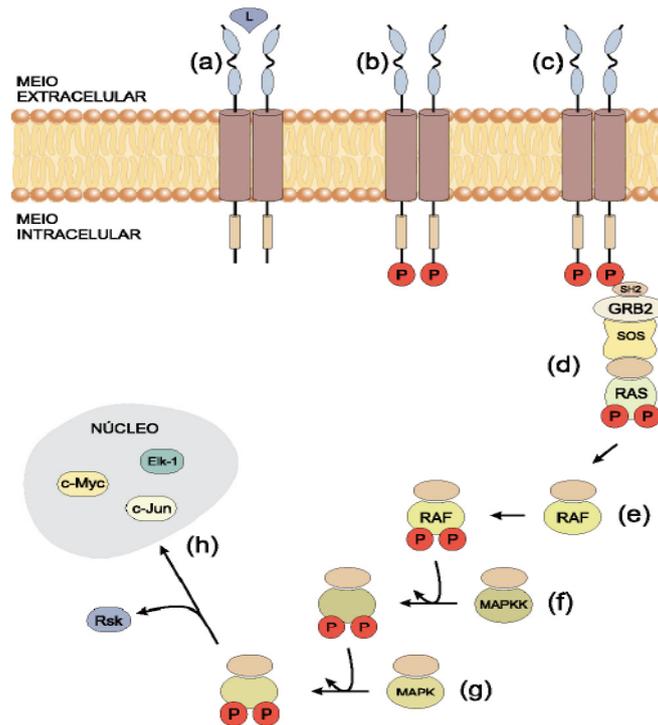


Figura 3 - Transdução de sinal pela via das proteínas cinasadoras da mitose, a via das MAPK. A ligação do ligando (L), normalmente um factor de crescimento (por exemplo PDGF, EGF, FLT3), induz dimerização do receptor R (a), auto-fosforilação do mesmo (b) e activação do seu domínio intracitoplasmático de tirosina quinase (c). Uma vez activada a quinase, esta vai fosforilar, em resíduos de tirosina, proteínas alvo com resíduos SH2 (*Src-Homology 2*), como por exemplo a proteína adaptadora GRB2, que através da proteína SOS permite a recolocação da proteína trocadora de GTP, a proteína RAS na membrana, e sua conseqüente activação (d). O sinal é assim transmitido ao longo de uma cascata de cinases. A proteína RAS, uma vez activada, actua como serina treonina quinase interagindo com a proteína RAF, fosforilando-a em resíduos de serina e de treonina (e). A proteína RAF induz uma cascata de sucessivas fosforilações em proteínas, primeiro em resíduos de serina e treonina na proteína MAPKK (ERK), activando a actividade de tirosina treonina quinase desta proteína (f). A MAPKK vai então fosforilar em resíduos de tirosina e treonina a proteína MAPK (MEK) (g) que termina com a activação directa de factores de transcrição nucleares, como o C-MYC, o C-JUN, e o ELK-1, por fosforilação em resíduos de serina e de treonina ou através da proteína RSK (h) (Retirado de Sarmiento-Ribeiro, A. *et al.*, 2008).

Por sua vez, a via de sinalização celular JAK-STAT é activada por citocinas, que desempenham funções fundamentais no crescimento, diferenciação e sobrevivência celular das células dos sistemas hematopoiético e imunitário. A ligação da citocina ao seu receptor leva à dimerização do mesmo e conseqüente activação de cinases citoplasmáticas com actividade de tirosina-quinase, as cinases *Janus* ou JAKs. Estas, por sua vez, activam factores de transcrição citoplasmáticos, os factores STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), que após fosforilação se dirigem para o núcleo onde se ligam a sequências específicas, as GAS (*Gama Activated Sequences*)

activando, deste modo, a transcrição de genes (Figura 4) (Levy, D. & Darnell, J., 2002; O'Shea, J. *et al.*, 2002; Sarmiento-Ribeiro, A. *et al.*, 2008).

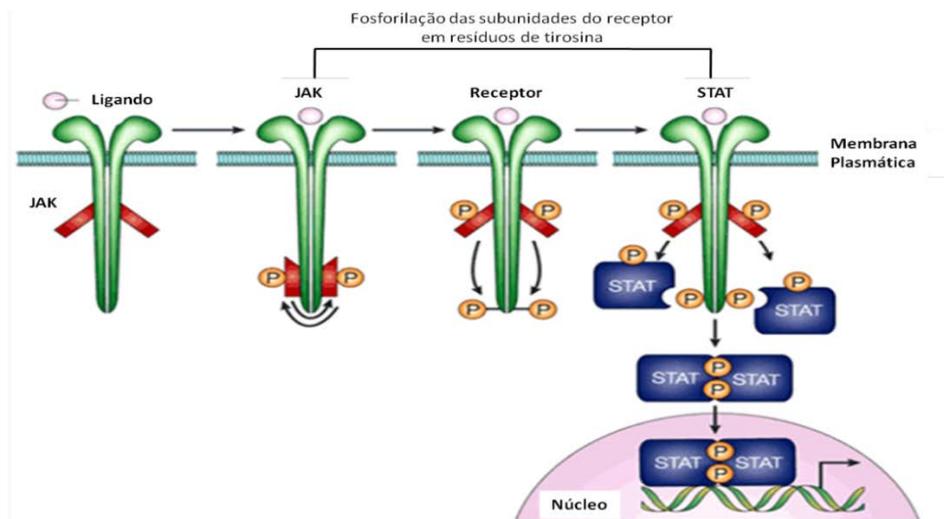


Figura 4 – Via de sinalização JAK-STAT. A ligação do ligando, neste caso uma citocina, ao seu receptor conduz à dimerização do mesmo, levando à activação da respectiva JAK associada, e à fosforilação das subunidades do receptor em resíduos de tirosina. Este processo leva, por sua vez, à activação das STAT, pela ligação ao seu domínio SH2 (*Src-Homology 2*), e directa ou indirectamente, à activação de outros componentes de sinalização, incluindo factores de transcrição e sequências de ADN específicas, no núcleo. JAK- *Just Another Kinase*; STAT- *Signal Transducers and Activators of Transcription* (Adaptado de Levy, D. & Darnell, J., 2002).

O controlo e regulação desta via de sinalização celular é sujeito a mecanismos de *feedback* negativo levados a cabo pela família de proteínas CIS (*Cytokine-induced SH2-containing protein*) que inibem a cinase JAK e pelas fosfatases SHP (*Phosphatase containing SH2*), que inactivam a via por desfosforilação. Outros mecanismos, como a degradação endossómica dos complexos JAK/receptor, através da endocitose mediada por receptores, e a actividade de variantes de STATs com acção predominantemente negativa, são também responsáveis pela regulação negativa desta via (Lodish, H. *et al.*, 2004; Sarmiento-Ribeiro, A. *et al.*, 2008).

Como já referido anteriormente, a activação destas vias de sinalização celular culmina na activação de factores de transcrição envolvidos na proliferação, diferenciação e regulação das diferentes fases do ciclo celular.

O ciclo celular consiste numa sequência de eventos preparatórios da divisão celular, a mitose. Este processo, nos seres eucariontes, comporta quatro fases

principais: a fase G1 (*Gap 1*) caracterizada pelo crescimento celular e preparação para a síntese de ADN (ácido desoxirribonucleico); a fase S (Síntese), em que ocorre síntese de ADN; a fase G2 (*Gap 2*) onde a célula se prepara para a mitose, sintetizando proteínas; e a fase M (Mitose) durante a qual ocorre divisão celular e citocinese, com formação de duas células-filhas. Estas células filhas reiniciam, cada uma, um novo ciclo celular em fase G1, podendo aí permanecer de forma temporária ou permanente, num estado não divisível (quiescente) designado por fase G0 (Figura 5) (Lodish, H. *et al.*, 2004; Sarmiento-Ribeiro, A. *et al.*, 2008).

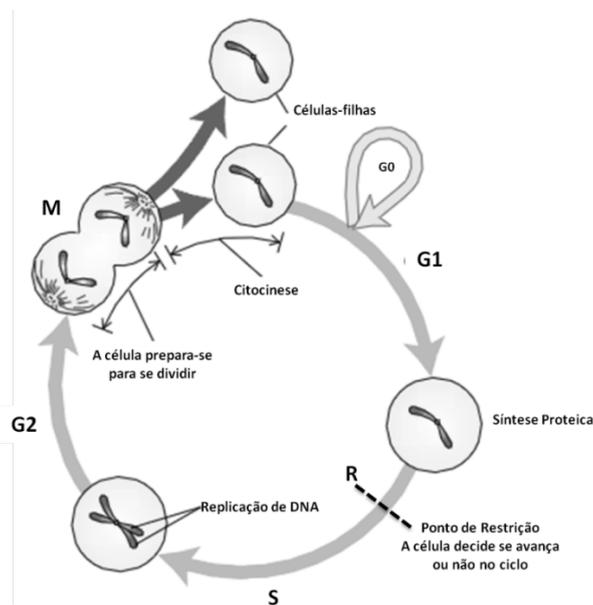


Figura 5 – As fases do ciclo celular. Em G1 (*Gap 1*), a célula aumenta de tamanho, sintetizando proteínas necessárias à síntese de ADN que ocorre na fase seguinte, a fase S. A célula pode permanecer em G1, num estado não divisível, também chamado de fase G0 (*Gap 0*), ou se decidir continuar em ciclo 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 (Adaptado de Lodish, H. *et al.*, 2004; Sarmiento-Ribeiro, A. *et al.*, 2008).

No caso das células estaminais hematopoiéticas (CEH), estas encontram-se predominantemente em fase G0/G1 podendo progredir no ciclo, quando activadas por factores de crescimento (Sarmiento-Ribeiro, A. *et al.*, 2008).

As diferentes fases do ciclo celular são estreitamente reguladas por múltiplas moléculas, que impedem o avanço no ciclo celular, funcionando como pontos de restrição (ponto R), caso haja algum erro, deficiência metabólica ou lesão do ADN. Assim, os complexos proteicos ciclinas/ciclinas dependentes de cinases (*CDKs – cyclin-*

dependent kinases), actuam nas diferentes fases do ciclo celular permitindo a sua progressão. Estes complexos proteicos possuem actividade de serina/treonina-cinase e são regulados por mecanismos de fosforilação e desfosforilação permitindo, assim, a sua activação ou inactivação e, por conseguinte a passagem e/ou o bloqueio pelas diferentes fases do ciclo celular.

As CDKs estão presentes durante todo o ciclo celular de uma forma inactiva, possuem actividade catalítica e a sua activação é dependente da ligação a ciclinas. As ciclinas, por sua vez, são sintetizadas em fases específicas ao longo do ciclo, em resposta a determinados estímulos (Lodish, H. *et al.*, 2004; Sarmiento-Ribeiro, A. *et al.*, 2008). Deste modo, verifica-se que a ligação ciclina/CDK, ou a desactivação destes complexos constituem o ponto-chave essencial na regulação do ciclo celular (Sarmiento-Ribeiro, A., 2000).

O ciclo celular é também regulado por múltiplas proteínas com funções de supressão tumoral, como a pRb, a p15, a p16 e a p53 (considerada a guardiã do genoma), que desempenham um papel importante nos pontos de restrição existentes ao longo do ciclo (Sarmiento-Ribeiro, A. *et al.*, 2008).

1.2.2. Sinalização celular envolvida na morte celular

O tecido hematopoiético é um tecido que apresenta elevado potencial de renovação sendo necessário, e inevitável, que ocorra morte celular para que este mantenha o seu perfeito equilíbrio celular. De facto, a homeostasia de um organismo multicelular, como é o Homem, depende não só da sua capacidade de produzir novas células, mas também da capacidade destas, individualmente, se autodestruírem quando se tornam supérfluas ou desordenadas, ou seja, depende de um equilíbrio entre proliferação e morte celular (Sarmiento-Ribeiro, A. *et al.*, 2008).

A morte celular pode ocorrer por dois mecanismos principais, a necrose e a apoptose, dependendo de vários factores, nomeadamente do estado energético das células (Evan, G. & Vousden, K., 2001; Zigler, U. & Groscurth, P., 2004).

A necrose, tradicionalmente chamada de morte celular passiva ou acidental, ocorre quando há uma situação de stresse que conduz a uma diminuição abrupta dos níveis de ATP (adenosina trifosfato). Morfologicamente, a célula apresenta aumento

de volume, os organelos intracelulares rompem, com excepção do núcleo, a membrana plasmática perde a sua integridade, deixando sair para o exterior da célula o seu conteúdo, culminando num processo inflamatório severo, convergindo para o local macrófagos e outras células do sistema imunitário, fagocitando as células necróticas, protegendo, assim, os tecidos vizinhos (Sarmiento-Ribeiro, A., 2000; Zigler, U. & Groscurth, P., 2004).

A apoptose, por sua vez, é um mecanismo fisiológico de morte celular programada ou activa, que desempenha um importante papel na manutenção da homeostasia celular, no desenvolvimento embrionário, na supressão tumoral e no correcto funcionamento do sistema hematopoiético (Testa, U. & Riccioni, R., 2007; Yang, A. *et al.*, 2010). Este mecanismo de morte celular necessita de ATP para manter a integridade celular e a síntese de proteínas envolvidas no processo, podendo ser despoletado por estímulos extrínsecos, como fármacos citotóxicos, ligandos de receptores de morte celular, como são exemplo os ligandos relacionados com superfamília do factor de necrose tumoral (TNF), e/ou por estímulos intrínsecos, por lesão do ADN ou por stresse oxidativo (Rossi, D. & Gaidano, G., 2003; Zigler, U. & Groscurth, P., 2004). Deste modo, dependendo do agente indutor de apoptose as células podem seguir por duas vias apoptóticas, a via extrínseca (ou via dos receptores de morte celular) ou a via intrínseca (ou via mitocôndrial). No entanto, ambas as vias apoptóticas convergem num tronco comum, a activação de uma família de proteases de cisteína, as caspases, que são responsáveis pela clivagem de diversos substractos celulares, levando a alterações morfológicas e bioquímicas características da apoptose (Figura 6) (Igney, F. & Krammer, P., 2002; Testa, U. & Riccioni, R., 2007).

A via extrínseca da apoptose é mediada pela ligação de ligandos específicos, a maioria dos quais pertencentes à superfamília de citocinas do TNF (*Tumour necrosis Factor*), incluindo o TNF *alpha* (TNF α), o FAS ligando (FASL) e o TRAIL (*TNF-related apoptosis ligand*), aos seus respectivos receptores membranares TNFR-1 (*TNF receptor 1*), FAS e DR4/DR5 (*Death Receptor 4/5*), respectivamente. Todos estes receptores da família do TNF possuem um subdomínio extracelular rico em resíduos de cisteína, que lhes permite o reconhecimento dos seus ligandos. A ligação dos respectivos ligandos activa o receptor por oligomerização e subsequentemente, a sinalização é mediada pela parte citoplasmática do receptor de morte que contém uma sequência de

aminoácidos conservada, denominada de domínio de morte (*DD*) que irá interagir com outras proteínas que também possuem o mesmo domínio, como a proteína adaptadora FADD (*FAS-Associated Death Domain*) no caso dos ligandos FAS e TRAIL ou TRADD (*TNF Receptor-Associated Death Domain*) no caso do ligando TNF. A proteína adaptadora FADD também contém um domínio efector de morte (*DED*) que constitutivamente liga proteases de cisteína, as pró-caspases iniciadoras 8 e/ou 10, que contêm o mesmo domínio, as quais são recrutadas por interações homotípicas (*DED-DED*) para a formação do complexo DISC (*death-inducing signalling complex*). Uma vez no complexo DISC, por oligomerização, a caspase 8 torna-se activa. Uma vez activa esta pode em células do tipo I iniciar directamente a cascata de activação de caspases efectoras (caspase 3), culminando numa resposta efectiva de sinalização apoptótica. No entanto, em células descritas como do tipo II para que haja uma resposta efectiva ao sinal apoptótico é necessário que ocorra interacção da caspase 8 com a proteína BID (*BH3-interacting domain death agonist*) de modo a activar a via mitocondrial (Igney, F. & Krammer, P., 2002). A proteína BID é clivada pela caspase 8 e na sua forma truncada, t-BID, liga-se à proteína BAX, contribuindo para a permeabilização da membrana mitocondrial, activando, assim, a via mitocondrial (Figura 6) (Testa, U. & Riccioni, R., 2007; Fulda, S. & Vucic, D., 2012).

Contudo, a activação da caspase 8 pode ser inibida pela proteína inibidora FLICE celular, a c-FLIP (*FLICE-like inhibitory protein*), que é estruturalmente semelhante à pró-caspase 8, podendo ligar-se ao complexo DISC, impedindo, assim, a activação desta caspase iniciadora, e consequentemente inibindo a apoptose. Deste modo, uma diminuição dos níveis de c-FLICE proporcionaria aumento no recrutamento de proteínas FADD e pró-caspases 8, para a formação do complexo DISC, e consequente aumento da activação das caspases 8, estimulação de caspases efectoras e subsequente indução de apoptose (Figura 6) (Testa, U. & Riccioni, R., 2007; Johnstone, R. *et al.*, 2009).

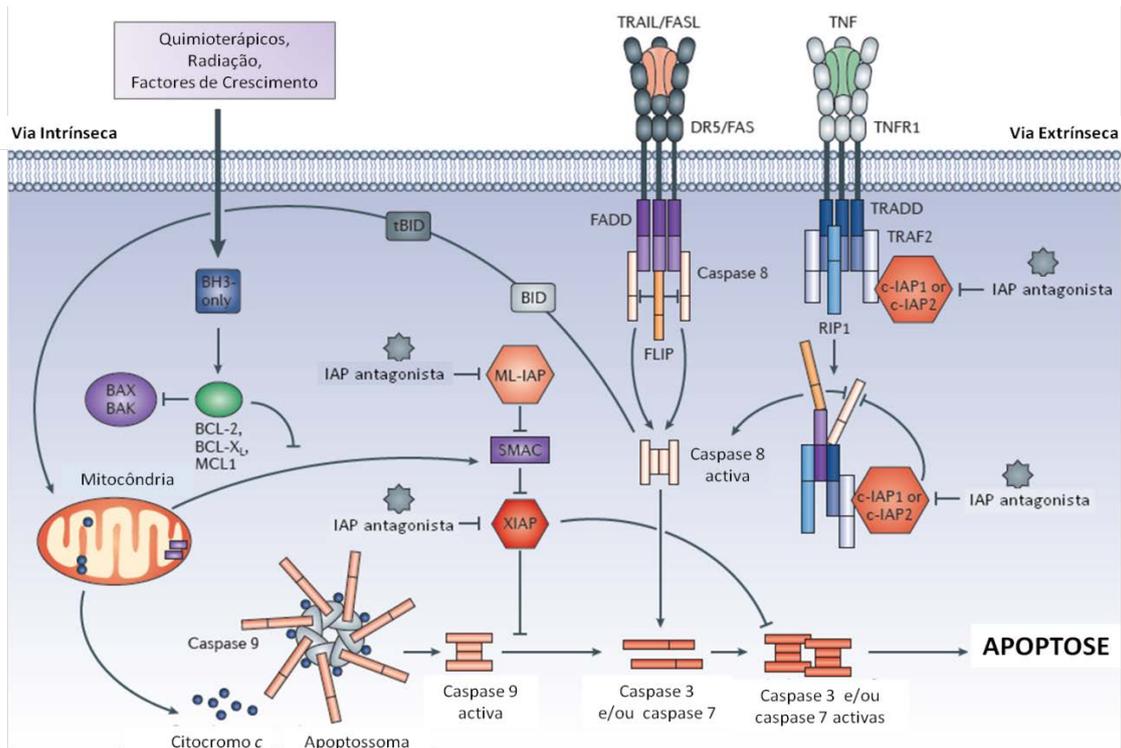


Figura 6 – Vias de sinalização envolvidas na morte celular. Na via dos receptores de morte (via extrínseca), a ligação do ligando TRAIL (tumour necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand) ou FAS (FASL) aos respectivos receptores, DR5 (death receptor 5) ou FAS, respectivamente, resulta na trimerização do seu receptor, recrutamento do adaptador molecular FADD (FAS-associated death domain protein) e activação da caspase 8. Este processo pode ser inibido pelo complexo FLIP (FLICE-like inhibitory protein). De um modo semelhante o complexo TNF-L/TNFR1 (TNF-stimulated TNF receptor 1), na ausência de c-IAP (cellular-inhibitor of apoptosis proteins) impede a ubiquitinação da proteína RIP1 (receptor-interacting protein 1), o que permite a associação desta com o FADD e a caspase 8, para a formação do complexo TRADD (TNFR1-associated death domain protein) promovendo a activação da caspase 8 e conseqüentemente da caspase 3. A caspase 8 activa, pode ainda, clivar a proteína BID (BH3-interacting domain death agonist) para a sua forma truncada, t-BID, que, assim, contribui para a permeabilização da membrana mitocondrial com activação e libertação da SMAC (second mitochondria-derived activator of caspase) e de citocromo c. Na via mitocondrial (via intrínseca), a libertação de citocromo c para o citosol induz a activação da caspase 9, formação do apoptossoma (em associação da APAF1) e, conseqüente activação da caspase 3, enquanto que a libertação da SMAC promove a apoptose por se ligar e inibir as IAP (inhibitor of apoptosis proteins). Esta via de sinalização celular é ainda regulada por proteínas da família BCL-2 (B cell lymphoma 2), como as proteínas anti-apoptóticas BCL-2 e BCL-xL, e as pró-apoptóticas BAX, BAK e BID. BAK (BCL-2 antagonist/killer 1); BAX (BCL-2-associated X protein); BCL-xL, B cell lymphoma extra large; BH3-only; MCL1, myeloid cell leukaemia differentiation protein 1; ML-IAP (Melanoma IAP); TRAF2, receptor-associated factor 2; XIAP, X chromosome-linked IAP. (Adaptado de Fulda, S. & Vucic, D., 2012).

A via apoptótica intrínseca, ou via mitocôndria, por sua vez, é activada por vários factores de stress extracelular ou intracelular, nomeadamente a privação de factores de crescimento, lesões no ADN, ativação de oncogenes, hipóxia e fármacos citotóxicos (Testa, U. & Riccioni, R., 2007). Estes diferentes sinais celulares convergem na activação do sinal de morte, regulado pela mitocôndria. A permeabilização da

mitocôndria é estreitamente regulada por proteínas da família BCL-2 (*B cell lymphoma 2*) pró-apoptóticas, como a BAX (*BCL-2-associated X protein*), BAK (*BCL-2 antagonist/killer 1*), BID (*BCL-2 homology 3 (BH3)-only proteins*) e por proteínas anti-apoptóticas, como a BCL-2, a BCL-X_L (*B cell lymphoma extra large*), e a MCL1 (*myeloid cell leukaemia differentiation protein 1*), que induzem ou impedem a heterodimerização dos seus membros. Esta via de sinalização é, deste modo, mediada pela libertação de proteínas apoptogénicas, ou pró-apoptóticas, como é o caso do citocromo *c* e da proteína SMAC (*second mitochondria-derived activator of caspase*), também conhecida como DIABLO (*Direct IAP binding protein with low isoelectric point*), do espaço intermembranar mitocondrial para o citosol. Uma vez no citosol, o citocromo *c* funciona como co-factor para a formação, dependente de ATP, de um complexo proteico circular constituído pelas proteínas APAF-1 (*Apoptosis protease activating factor-1*) e pró-caspase 9, o apoptossoma, que conduz à activação da caspase 9, que subsequentemente activa a caspase 3, havendo uma rápida amplificação do sinal de morte, através de uma activação massiva de outras caspases. Por outro lado, a SMAC promove a activação das caspases, por se ligar a múltiplas proteínas inibidoras da apoptose, as IAP (*inhibitor of apoptosis proteins*) (Figura 6) (U. & Riccioni, R., 2007; Fulda, S. & Vucic, D., 2012).

As IAP são uma família de proteínas responsáveis pela regulação negativa das vias apoptóticas por inibição directa ou indirecta das caspases. Estas proteínas são caracterizadas pelo seu domínio conservado BIR (*baculoviral IAP repeat*), estando presentes no homem em nove tipos, a NAIP (*neuronal apoptosis inhibitor protein*) ou BIRC1, a c-IAP1 (*cellular-IAP1*) ou BIRC2, a c-IAP-2 (*cellular-IAP2*) ou BIRC3, a XIAP (*X chromosome-linked IAP*) ou BIRC4, a Survivina ou BIRC5, a Apollon (*ubiquitin-conjugating BIR domain enzyme apollon*) ou BIRC6, a ML-IAP (*Melanoma IAP*) ou BIRC7, ILP2 (*IAP-like protein2*) ou BIRC8 e a Linina ou KIAP ou BIRC9 (Igney, F. & Krammer, P., 2002). A proteína X-IAP actua directamente ao nível das caspase 3, caspase 7 e caspase 9 comprometendo, desta forma, todo o processo de apoptose mediado pela via intrínseca. Todavia, como já referido, a acção destas proteínas pode ser, também ela bloqueada pela intervenção de proteínas mitocondriais, como as SMAC/DIABLO, que permeabilizando a membrana mitocondrial, neutralizam a acção

das IAPs no citosol e promovem, assim, a activação das caspases efectoras e consequentemente da apoptose.

Por outro lado, as proteínas c-IAP1 e c-IAP2 apresentam um papel crucial na regulação das vias de sinalização mediadas pelo factor de transcrição NF- κ B, que regula a expressão de múltiplas citocinas e proteínas anti-apoptóticas. A ligação do TNF ao seu receptor TNFR1 (*TNF-stimulated TNF receptor 1*) envolve o recrutamento do TRADD (*TNFR1-associated death domain protein*), da proteína RIP 1 (*receptor-interacting protein 1*) e do factor TRAF2 (*receptor-associated factor 2*), bem como da c-IAP1 e c-IAP2. A presença destas IAP leva à ubiquitinação da RIP1, impedindo, deste modo, a formação do complexo apoptótico e por conseguinte a progressão e inactivação do sinal de morte (Figura 6) (Igney, F. & Krammer, P., 2002; Fulda, S. & Vucic, D., 2012).

Ao nível morfológico o processo apoptótico é, geralmente, acompanhado de retracção celular, com condensação da cromatina, degradação internucleossómica de ADN e destruição do citosqueleto, modificações na membrana citoplasmática com projecções em forma de vesículas (*blebs*), culminando na fragmentação celular e formação de corpos apoptóticos, posteriormente degradados por fagocitose (Igney, F. & Krammer, P., 2002; Lodish, H. *et al.*, 2004; Zigler, U. & Groscurth, P., 2004).

A apoptose pode ser, assim, considerada um processo de morte celular que elimina células incapazes de receber sinais de sobrevivência, células capazes de receber sinais de morte provenientes de outras células e/ou células incapazes de reparar uma lesão. Contudo, nas células transformadas podem ocorrer mutações/traslocações que conduzem ao aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas, conferindo à célula possibilidade de sobrevivência por resistência à morte celular por apoptose. Por outro lado, estas células podem também possuir a capacidade de produzir factores de crescimento autócrinos, assegurando a sua proliferação e escapando à apoptose. Deste modo, podemos aferir que a perda de mecanismos de sobrevivência para garantir a longevidade das células pós-mitóticas ou a resistência das células à morte, em tecidos com elevado potencial de renovação celular, podem conduzir ao aparecimento de diversas patologias, como é o caso das doenças neoplásicas hematológicas (Sarmiento-Ribeiro, A., 2000; Evan, G. & Vousden, K., 2001).

1.2.3. Neoplasias Hematológicas

As Leucemias constituem um grupo heterogêneo de doenças, que diferem quanto à etiopatogenia, ao prognóstico e à resposta ao tratamento.

A classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), publicada em 2001 e revista em 2008, para os tumores dos tecidos hematopoiéticos e linfóides, baseia-se na combinação de aspectos morfológicos, citoquímicos, imunofenotípicos, genéticos e clínicos, permitindo a divisão destas neoplasias em dois grupos: neoplasias mielóides e neoplasias linfóides (Tabela 1) (Swerdlow, S. *et al.*, 2008; Vardiman, J. *et al.*, 2009).

Tabela 1 - Classificação da OMS para as Neoplasias Mielóides e Linfóides.

Neoplasias Mielóides	Neoplasias Linfóides
Neoplasias Mieloproliferativas	Neoplasias dos precursores linfóides
Neoplasias Mielóides associadas a eosinofilia	<ul style="list-style-type: none"> • Leucemia linfoblástica/linfoma da linhagem B • Leucemia linfoblástica/linfoma da linhagem T
Neoplasias Mielodisplásicas / Mieloproliferativas	
Síndromes Mielodisplásicas	Neoplasias de células B maduras
Leucemias Mielóides Agudas	Neoplasias de células T e NK maduras

(Adaptado de Swerdlow, S. *et al.*, 2008)

1.2.3.1. Leucemia Linfoblástica Aguda T (LLA-T)

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) representa um grupo de doenças biologicamente e clinicamente heterogêneo, caracterizado por um bloqueio na diferenciação e proliferação descontrolada de células hematopoiéticas imaturas, os blastos, que invadem a medula óssea (MO) numa percentagem superior a 20%, segundo a OMS, e que posteriormente atingem o sangue periférico, podendo originar focos extra-hemáticos que se comportam como tumores (Swerdlow, S. *et al.*, 2008; Foà, R. *et al.*, 2009).

Este tipo de patologia está dividida em três subgrupos, como indicado na tabela 1: as neoplasias dos precursores linfóides B ou T, nas quais se incluem as leucemias linfoblásticas agudas da linhagem T (LLA-T); as neoplasias de células B maduras; e as neoplasias de células T e NK maduras.

Relativamente aos níveis de incidência, as LLA são mais comuns em crianças entre os três e os sete anos de idade, sendo que mais de 75% dos casos ocorre depois dos seis anos de idade, verificando-se um segundo pico de prevalência da doença depois dos quarenta anos. Dentro das LLA, 85 a 90% dos casos pertencem à linhagem do tipo B. Contudo as LLA do tipo T apresentam maior predominância nos indivíduos do sexo masculino no período da adolescência representando, aproximadamente, 15 e 25% dos casos de LLA em crianças e em adultos, respectivamente (Swerdlow, S. *et al.*, 2008; Hoffbrand, A. *et al.*, 2011). Ao nível clínico as manifestações são variáveis e os sintomas podem ocorrer de forma prolongada ou emergente, dependendo do grau de extensão da doença (Narayanan, S. & Shami, P., 2011). No entanto, tipicamente as LLA-T estão associadas a uma elevada percentagem de leucócitos acompanhada de uma larga massa mediastínica, bem como de linfadenopatias, podendo distinguir-se das LLA do tipo B pela preservação de uma hematopoiese normal na MO.

Nas LLA-T de células precursoras, as células proliferantes, os linfoblastos, são pouco diferenciadas com elevada relação núcleo/citoplasma, podendo ser pequenos linfoblastos com a cromatina muito condensada e nucléolos impreceptíveis ou linfoblastos de grandes dimensões com a cromatina dispersa e nucléolos proeminentes (Figura 7) (Swerdlow, S. *et al.*, 2008).

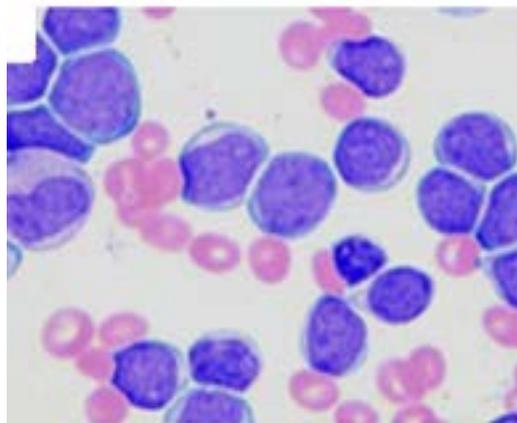


Figura 7– Aspecto morfológico de células de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). (Adaptado de Han, X. *et al.*, 2007).

O diagnóstico de leucemias agudas baseia-se na percentagem de blastos (superior a 20%), sendo os diferentes subtipos caracterizados através de uma análise

multiparamétrica, tendo em conta as características morfológicas, citoquímicas, imunofenotípicas, citogenéticas e moleculares (Figura 8).

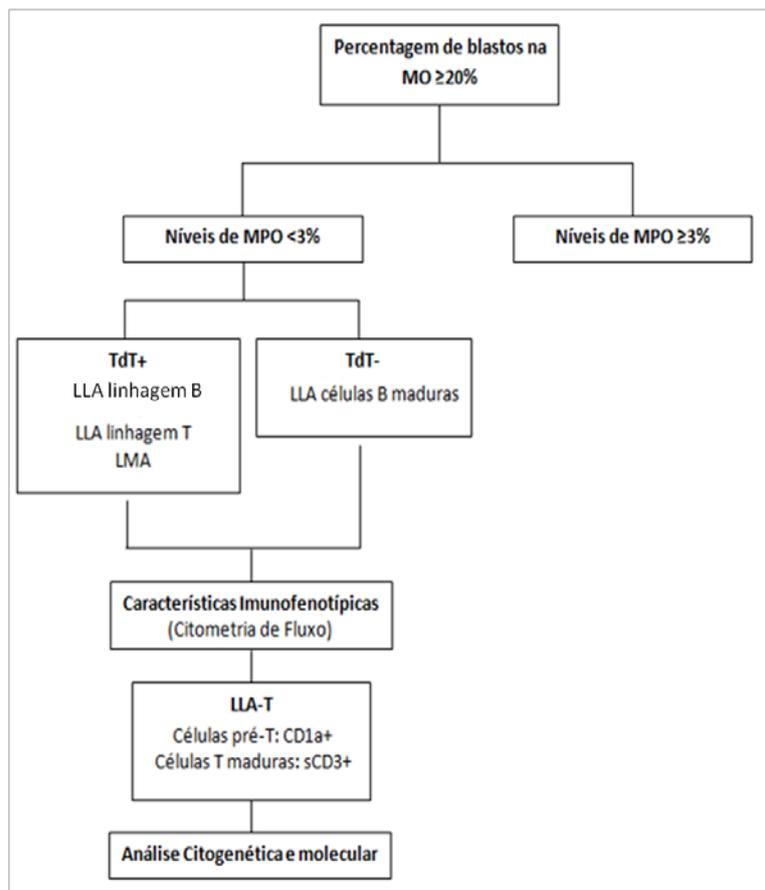


Figura 8 – Fluxograma representativo das diferentes etapas de diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda T (LLA-T). LMA, Leucemia Mielóide Aguda; CD, *Cluster Differentiation*; MO, Medula Óssea; MPO, Mieloperoxidase; TdT, *Terminal deoxynucleotidyl Transferase*; +, positivo; -, negativo. (Baseado em Swerdlow, S. *et al.*, 2008).

O tratamento destas neoplasias tem como principal objectivo a destruição das células leucémicas, para que a medula óssea volte a produzir novas células normais. Neste sentido, este pode ser dividido em quatro fases fundamentais: a indução, a consolidação, e a manutenção. O tratamento directo da doença do sistema nervoso central (SNC) é fundamental neste tipo de leucemias (Pieters, R. & Carroll, W., 2010).

Assim, a quimioterapia tem sido o tratamento mais utilizado recorrendo-se, actualmente, à terapêutica combinada de fármacos (poliquimioterapia), de modo a prevenir a doença no sistema nervoso central. Neste contexto, alguns dos fármacos convencionais utilizados em Hemato-oncologia Clínica, para o tratamento deste tipo de patologias, são os compostos naturais derivados da vinca, como a vincristina (VCR) que bloqueiam a formação do fuso acromático e as antraciclina, como é o caso da

doxorubicina (DOX), que se intercalam na cadeia de ADN, desencadeando mecanismos de morte celular através da produção de espécies reactivas de oxigénio (Hoffbrand, N. *et al.*, 2006).

A vincristina (VCR) é um alcalóide da vinca, isolado das folhas de *Catharanthus roseus*, que tem a capacidade de se ligar à tubulina, bloqueando a polimerização dos microtubulos, inibindo, assim, a formação do fuso acromático aquando da fase mitótica celular. Deste modo, a vincristina ao ligar-se aos dímeros de tubulina num local de reconhecimento específico, forma agregados policristalinos, o que leva a uma redução da concentração de dímeros de tubulina livres, não havendo uma formação correcta do fuso acromático. Consequentemente, os cromossomas não se alinham na placa equatorial, não havendo progressão no ciclo para anafase. As células ficam, assim, paradas em mitose, podendo seguir diferentes destinos, como por exemplo originar uma divisão desigual da célula-mãe para as células-filhas (aneuploidia). Alternativamente, a célula pode sair do ciclo celular, sem sofrer divisão celular por um processo denominado deslizamento mitótico ou adaptação. Estas células podem, desta forma, continuar a progressão no ciclo celular como células tetraplóides (fase de adaptação I), podem avançar para a fase G1 e sofrerem apoptose ou senescência (fase de adaptação II), ou podem, ainda, avançar para a interfase (fase de adaptação III) e sofrer apoptose. Outra possibilidade é a morte celular ocorrer logo na fase mitótica (Figura 9) (Gascoigne, K. & Taylor, S. 2009; Chiu, W. *et al.*, 2011).

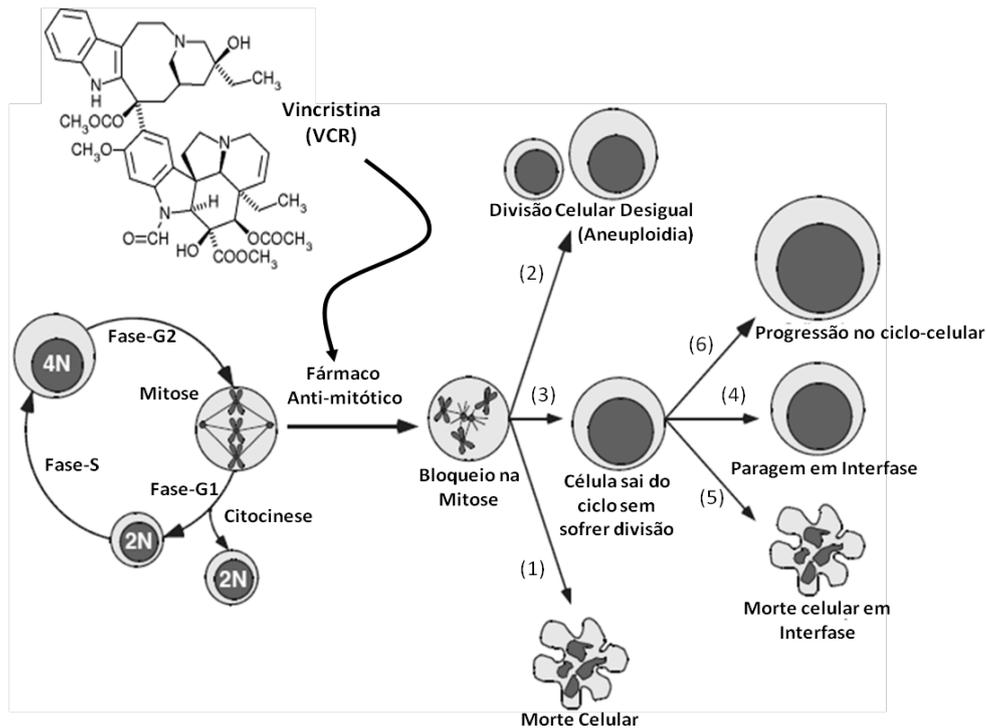


Figura 9 – Mecanismo de ação anticancerígena da Vincristina (VCR). Quando as células são expostas a agentes anti-mitóticos, como é o caso da Vincristina, há bloqueio do fuso acromático, na fase mitótica do ciclo celular. As células ficam, assim, paradas em mitose podendo seguir diferentes caminhos: (1) morrem directamente em mitose; (2) dividem-se de forma desigual, originando células-filhas aneuplóides; ou (3) podem sair do ciclo sem sofrer divisão. Neste último caso, a célula pode, (4) parar indefinidamente o crescimento em interfase, (5) morrer em interfase ou ainda (6) progredir no ciclo (Adaptado de Gascoigne, K. & Taylor, S. 2009).

A doxorrubicina (DOX) é uma antraciclina, inicialmente isolada a partir de um pigmento produzido por *Streptomyces peucetius*. Este agente anticancerígeno tem múltiplas utilizações clínicas, no entanto os seus mecanismos de ação, nas células neoplásicas, mantêm-se controversos. De uma forma geral, as antraciclinas podem: intercalar a cadeia de ADN inibindo, assim, a síntese de macromoléculas; produzir radicais livres, que causam lesões no ADN ou nos lípidos (peroxidação lipídica); ligar-se ao ADN alquilando-o; impedir a formação da dupla hélice de ADN, por interferência com as ADN helicases; lesar directamente a membrana celular; inibir a síntese de ADN por interacção com a topoisomerase II; induzir apoptose por inibição da topoisomerase II (Figura 10) (Giorgio, M. *et al.*, 2004; Kisec, R. *et al.*, 2011).

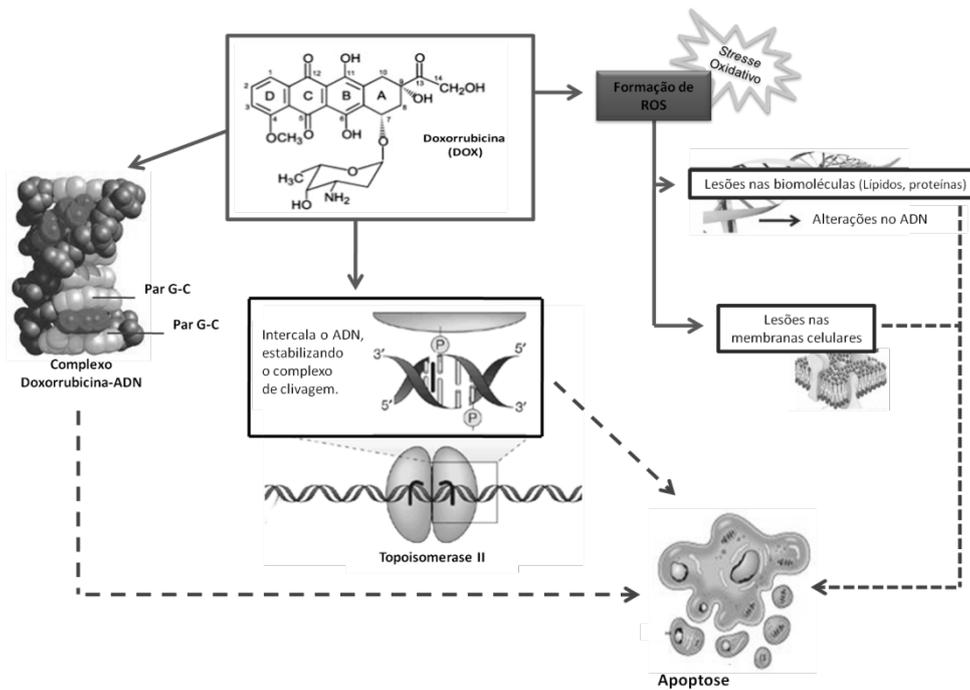


Figura 10 – Esquema resumo de alguns dos mecanismos de acção da Doxorubicina (DOX). A DOX pode intercalar o ADN (ácido desoxirribonucleico) e ligar-se de forma eficaz à topoisomerase II, impedindo a replicação do ADN. Esta antraciclina pode ainda formar radicais livres (ROS, *reactive oxygen species*) que causam lesões irreparáveis no ADN e peroxidação lipídica, alterando as membranas celulares. Estes mecanismos de actuação culminam na injúria celular e conseqüente apoptose.

No entanto, estudos adicionais revelam que apesar de a quimioterapia ser uma arma eficiente no combate à patologia tumoral tem, ainda, uma eficácia relativa, apresentando taxas de cura e de sobrevivência a longo prazo reduzidas, recidivas frequentes e inúmeros efeitos colaterais (De Vita, V., 1993). Para além disso, o desenvolvimento de resistência à quimioterapia, desde o início da doença ou no decurso do tratamento, contribui também para a falência da terapêutica e recidiva do doente com cancro.

Assim, a investigação na área da Oncobiologia molecular revela-se de extrema importância, uma vez que só o esclarecimento aprofundado dos mecanismos relativos à etiopatogenia tumoral e responsáveis pela falência da terapêutica convencional, e que conduzem muitas vezes a recaídas durante o tratamento, permitirão avanços no desenvolvimento de novas terapêuticas dirigidas para o tratamento destes doentes.

1.1.4. rhTRAIL – uma nova abordagem terapêutica em hemato-oncologia

A evasão da morte celular, nomeadamente por apoptose, surge como um dos mecanismos chave para o aparecimento da patologia tumoral e representa um ponto crucial para a aquisição de resistência ao tratamento convencional e ao aparecimento de recidivas frequentes. Neste sentido, a reactivação dos mecanismos de morte celular mostra-se uma estratégia promissora para superar um dos maiores problemas da Oncologia clínica, a aquisição de resistências ao tratamento convencional, bem como o aparecimento de recaídas frequentes (Fulda, S. & Vucic, D., 2012).

A maioria dos agentes quimioterapêuticos convencionais induz morte celular tendo como principais focos de acção a indução de stresse celular e de lesões no ADN, bloqueando a replicação de ADN e, deste modo, a divisão celular (Mahalingam, D. *et al.*, 2009). A activação da proteína supressora tumoral, p53, em resposta a lesões no ADN é um importante elemento regulador do processo apoptótico. No entanto, verifica-se que num elevado leque de tumores esta proteína se encontra mutada, não exercendo a sua função (Hellwig, C. & Rehm, M., 2012). Para além do descrito, estes agentes quimioterapêuticos apresentam, também, uma elevada toxicidade sistémica, não sendo totalmente eficazes e, eventualmente, contribuem para a resistência ao tratamento (Mahalingam, D. *et al.*, 2009).

Nas últimas décadas, com a descoberta dos membros da família do TNF (*Tumor Necrosis Factor*) e dos seus respectivos receptores de morte, uma nova geração de fármacos tem vindo a ser desenvolvida, de forma a colmatar as falhas evidentes da quimioterapia convencional, de forma independente da p53 (Hellwig, C. & Rehm, M., 2012). Os primeiros estudos realizados nesta área demonstraram que estes ligandos de receptores de morte induziam morte celular efectiva nas células tumorais, nomeadamente por apoptose, com poucos efeitos colaterais (Mahmood, Z. & Shukla, Y., 2010). No entanto, estudos subsequentes evidenciaram que o TNF e os anticorpos agonistas do receptor de morte FAS, quando administrados em concentrações clinicamente relevantes, apresentavam elevada toxicidade em culturas primárias de hepatócitos e noutras células não transformadas (Hellwig, C. & Rehm, M., 2012). Pelo contrário, estudos relacionados com o TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) mostraram que este possui características ímpares em relação aos seus parentes da

família de citocinas do TNF, como a sua capacidade selectiva de indução de morte celular numa elevada percentagem de células tumorais *in vitro* e *in vivo* sem causar toxicidade nas células normais (Dimberg, L. *et al.*, 2012), para além da sua expressão transitória em células activadas, nomeadamente nas células NK, que por estabelecimento de contacto célula-célula, podem activar o processo apoptótico dependente do TRAIL (Hellwig, C. & Rehm, M., 2012). Estas observações acarretaram consigo um grande interesse sobre o TRAIL, como um promissor agente anticancerígeno num elevado número de neoplasias (Jacquemin, G. *et al.*, 2010, Dimberg, L. *et al.*, 2012; Hellwig, C. & Rehm, M., 2012,).

O TRAIL foi identificado e clonado por Willey e seus colaboradores em 1995, tendo meses mais tarde Pitti e colaboradores (1996) descrito a mesma proteína dando-lhe o nome de APO2L (APO2 *ligand*). Deste modo, a descoberta do TRAIL/APO2L teve como base a sua estrutura homóloga com os outros ligandos de morte membros da superfamília das citocinas do TNF, apresentando 28% de homologia com a sequência de aminoácidos do ligando FASL (também conhecido como CD95) e 23% de identidade com o ligando TNF (Kelley, S. & Ashkenazi, A., 2004; Holoch, P. & Griffith, T., 2009, Hellwig, C. & Rehm, M., 2012).

O TRAIL/APO2L endógeno, humano, é expresso sobre a forma de uma proteína transmembranar do tipo II, constituída por 281 aminoácidos, que se encontra presente na superfície celular, ancorada à membrana celular, com o seu N-terminal localizado no interior da célula e o C-terminal no exterior (Kelley, S. & Ashkenazi, A., 2004). O seu domínio extracelular pode ser clivado por proteólise, havendo libertação de uma molécula solúvel que, de forma semelhante aos restantes membros da superfamília do TNF, forma homotrimeros, estabilizados por um átomo de Zinco (Zn^{2+}) central coordenado a três resíduos de cisteína, um dos quais na posição 230 da subunidade do ligando (LeBlanc, H. & Ashkenazi, A., 2003; Kelley, S. & Ashkenazi, A., 2004, Hellwig, C. & Rehm, M., 2012).

Ao nível fisiológico o papel do TRAIL/APO2L ainda não se encontra bem definido, no entanto, estudos revelam que este é essencial na regulação de processos como a formação de células T de memória, a hematopoiese, a sobrevivência do sistema imunitário e/ou a imunidade relacionada com a supressão tumoral (Dimberg, L. *et al.*, 2012; Hellwig, C. & Rehm, M., 2012).

Na investigação decorrente deste promissor agente quimioterapêutico verificou-se que esta proteína, nos humanos, se pode ligar a quatro tipos de receptores da superfície celular, podendo estes ser subdivididos em duas classes, os receptores de morte celular e os receptores armadilha (também designados como receptores *decoy*), que ao contrário dos primeiros inibem a morte celular por apoptose (Figura 11). Estruturalmente todos os receptores TRAIL possuem domínios extracelulares ricos em cisteína, que lhes confere elevada afinidade ao seu respectivo ligando. Os receptores de morte 4 (DR4/também designado como TRAIL *receptor 1*, TRAIL-R1) e 5 (DR5/também designado como TRAIL *receptor 2*, TRAIL-R2) são estruturalmente transmembranares e possuem um domínio citoplasmático, denominado domínio de morte (DD), responsável pela activação da sinalização de morte celular por apoptose. Por outro lado, o receptor *decoy 1* (DcR1/ também designado como TRAIL *receptor 3*, TRAIL-R3) estruturalmente consiste num domínio extracelular rico em cisteína, que se encontra ancorado à membrana celular por um C-terminal do glicosil-fosfatidilinositol (Hellwig, C. & Rehm, M., 2012), não possuindo domínio intracelular, enquanto o receptor *decoy 2* (DcR2/também conhecido como TRAIL *receptor 4*, TRAIL-R4) é estruturalmente semelhante aos receptores DR4 e DR5, no entanto, só possui um domínio citoplasmático truncado. Deste modo, este tipo de receptores é incapaz de transduzir o sinal apoptótico (Figura 11) (Holoch, P. & Griffith, T., 2009, Mahmood, Z. & Shukla, Y., 2010; Dimberg, L. *et al.*, 2012).

Para além destes quatro receptores o TRAIL pode ainda ligar-se a um quinto receptor, denominado Osteoprotegerina (OPG). A OPG é uma proteína maioritariamente secretada na forma solúvel, responsável pela regulação negativa da osteoclastogénese. O seu mecanismo de interacção com o TRAIL ainda não está bem esclarecido, porém supõe-se que a OPG funcione como sequestrador do TRAIL (Hellwig, C. & Rehm, M., 2012), não por ligação directa a este ligando, pois à temperatura fisiológica possuem baixa afinidade (LeBlanc, H. & Ashkenazi, A., 2003), mas por afinidade com uma outra citocina da família do TNF, a TRANCE (*TNF related activation induced cytokine*)/RANKL (*receptor activator NF- κ B ligand*), a qual também se liga a um receptor activador de NF- κ B (RANK) (Figura 11) (Falschlehner, C. *et al.*, 2007).

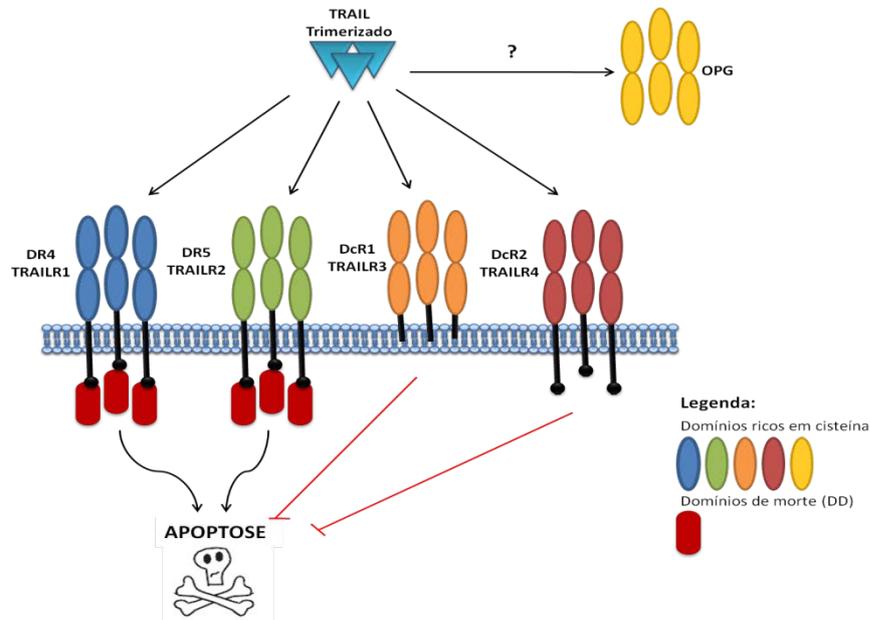


Figura 11 - Representação do TRAIL e dos seus receptores. O TRAIL trimerizado pode ligar-se a quatro tipos de receptores, os receptores que induzem morte celular por apoptose, DR4 e/ou DR5 (DR4/TRAIL-R1 e DR5/TRAIL-R2), e os receptores *decoy* 1 e/ou 2 (DcR1/TRAIL-R3 e DcR2/TRAIL-R4), respectivamente, que inibem apoptose. Todos estes receptores possuem à superfície domínios de aminoácidos ricos em cisteína. Os receptores DR4/DR5 são estruturalmente transmembranares e possuem domínios citoplasmáticos de morte, responsáveis pela activação da apoptose celular. O receptor DcR1 não é transmembranar, estando ancorado à membrana plasmática. O receptor DcR2 é um receptor transmembranar, no entanto, o seu domínio citoplasmático encontra-se truncado. Deste modo, os receptores *decoy* não induzem apoptose. O TRAIL pode, ainda, ligar-se a um quinto receptor a Osteoprotegerina (OPG) que pode servir como *scavenger* do TRAIL, inibindo, assim, a apoptose

A expressão diferencial dos receptores TRAIL, nomeadamente a existência dos receptores armadilha em células normais pode justificar a ineficácia do TRAIL como agente indutor de apoptose nestas células e desta forma fundamentar a sua actividade anti-tumoral selectiva, e portanto de baixa toxicidade (Johnstone, R. *et al.*, 2009).

A ligação do TRAIL aos receptores de morte DR4 e/ou DR5 resulta na trimerização do receptor, e consequente activação da via extrínseca da apoptose (secção 1.2.2.). Na maioria das células, chamadas habitualmente de células do tipo I, a activação da via extrínseca é suficiente para induzir apoptose. No entanto, nouro tipo de células, conhecidas como células do tipo II, a activação da via intrínseca (mitocôndrial) também é necessária para um sinal efectivo de morte celular por apoptose. A via intrínseca, como já foi referido anteriormente, é tipicamente activada por lesões no ADN ou por outros tipos de stress celular, no entanto, também pode ser activada por intermédio da activação de caspases intimamente correlacionadas

com a activação dos receptores DR4 e/ou DR5 do TRAIL, nomeadamente a caspase 8 (Figura 12) (Mahalingam, D. *et al.*, 2009).

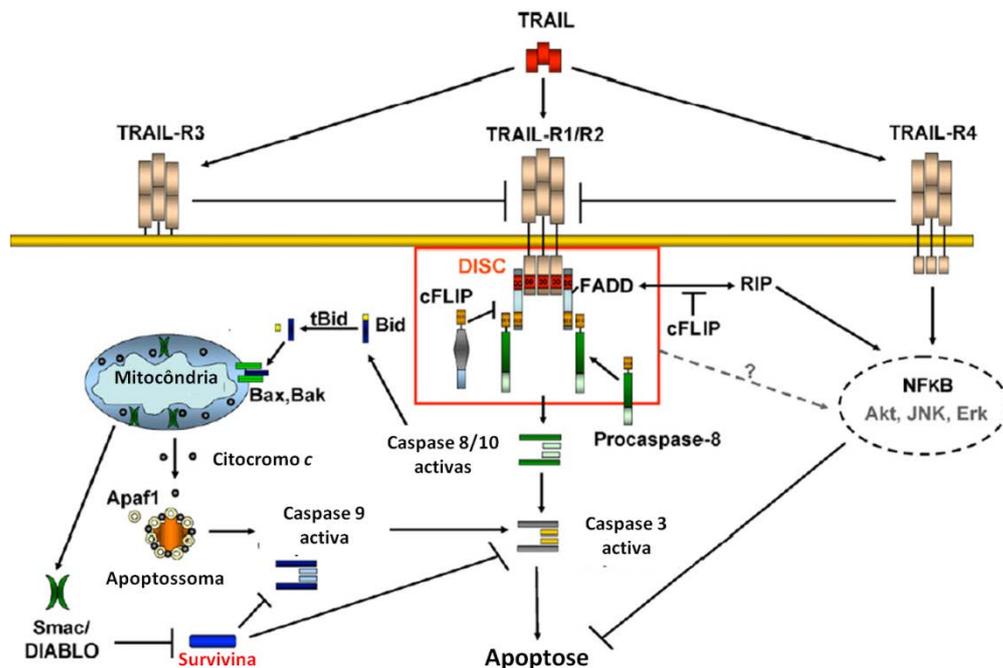


Figura 12 - Sinalização celular mediada pelo TRAIL. A apoptose ocorre através de duas vias principais, a via extrínseca (ou via dos receptores de morte celular) e a via intrínseca (ou via mitocondrial). A via extrínseca é activada pela ligação de TRAIL aos receptores de morte DR4/TRAIL-R1 e/ou DR5/TRAIL-R2 e consequente recrutamento das proteínas FADD (*FAS-associated death domain protein*). Estas ligam-se e activam as caspases 8, pela formação do DISC (complexo iniciador de apoptose). Uma vez activadas as caspases efectoras 3, 6 e/ou 7, as duas vias apoptóticas convergem. A caspase-8, activada pela ligação de receptores de morte celular, cliva a BID (*BH3-interacting domain death agonist*)), que se torna activa, na forma truncada (tBID). Por sua vez a tBID liga-se a BAX e a BAK contribuindo para a permeabilização da membrana mitocondrial, e, deste modo, para a activação, da via mitocondrial da apoptose. Seguidamente há libertação de citocromo c e de SMAC/DIABLO. O citocromo c juntamente com APAF-1 e caspase 9 na presença de ATP (adenosina trifosfato) formam o complexo funcional Apoptossoma, que irá promover a clivagem e activação da caspase 9, que por conseguinte activará as caspases 3, 6 e 7. O DIABLO vai promover indirectamente a apoptose, pois antagoniza os membros da família IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*). As caspases efectoras podem por sua vez activar as caspases 8 criando uma cascata de sinalização, amplificando o sinal de morte. O receptor *decoy* TRAIL-R4 pode competir com os receptores de morte pelo ligando TRAIL impedindo a apoptose, por activação de vias de proliferação celular mediadas pelo NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) (Adaptado de Falschlehner, C. *et al.*, 2007).

Assim, com a descoberta do TRAIL, surgiu a possibilidade de produzir um novo fármaco capaz de induzir morte celular nas células cancerígenas com pouca toxicidade nas células normais, uma vez que a expressão dos receptores de morte, TRAIL-R1 e TRAIL-R2, é superior nas células cancerígenas (Johnstone, R. *et al.*, 2009). Neste sentido, desde a descoberta do TRAIL muito se tem feito de forma a aproveitar as características ímpares desta proteína como nova terapêutica anticancerígena.

Deste modo, até ao momento a produção de proteínas TRAIL recombinantes, como formas solúveis optimizadas do TRAIL endógeno, e a produção de anticorpos monoclonais (MAbs) específicos para os receptores de morte, DR4/TRAIL-R1 ou DR5/TRAIL-R2, têm sido alvo de vários estudos (Yerbs, R. *et al.*, 2011; Dimberg, L. *et al.*, 2012; Hellwig, C. & Rehm, M., 2012).

Neste sentido, actualmente, pelo menos seis fármacos, agonistas dos receptores DR4 e DR5 estão em desenvolvimento. Os anticorpos monoclonais Canatumumab, Lexatumumab, Mapatumumab, CS-1008 e PRO95780 e, por outro lado, foram também desenvolvidos os TRAIL recombinantes (rhTRAIL, *recombinant human TRAIL*), nomeadamente o rhTRAIL/APO2L (Dulanermin) (Yerbs, R. *et al.*, 2011; Dimberg, L. *et al.*, 2012) (Tabela 2).

Tabela 2 – Resumo dos fármacos agonistas dos receptores de morte 4 e 5 (DR4/DR5) do TRAIL desenvolvidos até ao momento.

Fármacos	Alvo	Fase clínica	Tipo de cancro
Canatumumab AMG 655	MAb agonista DR5	I	Tumores sólidos avançados
CS-1008	MAb humanizado agonista DR5	I	Tumores sólidos avançados
Dulanermin rhTRAIL	Receptores pró apoptóticos (DR4/DR5)	I Ia Ia	Tumores sólidos avançados Linfomas Tumores sólidos
Lexatumumab	MAb agonista DR5	I	Tumores sólidos avançados
PRO95780	MAb integralmente humano agonista DR5	I	Tumores sólidos avançados
Mapatumumab	MAb agonista DR4	I II II II	Tumores sólidos avançados NHL Cancro colorectal NSCLC

MAB, anticorpo monoclonal; NHL, Linfoma não Hodgkin; NSCLC, cancro do pulmão de não pequenas células.

(Adaptado de Dimberg, L. *et al.*, 2012)

Contudo, verifica-se que apesar de o TRAIL induzir apoptose de forma preferencial nas células cancerígenas, nem todas as células tumorais apresentam sensibilidade ao TRAIL. Por exemplo, a sinalização de apoptose mediada pelo TRAIL pode ser sujeita a regulação negativa pela família de proteínas FLIP (*FLICE-like*

inhibitory protein), que devido à sua homologia com a pró-caspase 8, ocupa o lugar desta na formação do complexo DISC, impedindo a activação da cascata de caspases. Por outro lado, o efeito induzido pelo TRAIL pode ser ainda sujeito a *feedback* negativo pelo aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas, como é o caso das IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Protein*), como a survivina, que actuam ao nível das caspases, bloqueando a sua acção, ou mesmo, pela acção das proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2, que podem contribuir para a resistência ao sinal apoptótico induzido pelo TRAIL, em células do tipo II (Mahalingam, D. *et al.*, 2009).

1.2.5. Inibidores da Survivina – um novo marco na modulação da resposta apoptótica em hemato-oncologia

A survivina é um membro da família das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) que possui, tal como as suas parentes, um ou mais domínios conservados BIR (*baculovirus IAP repeat*). No entanto, ao contrário das outras IAPs, que se encontram amplamente expressas nos tecidos humanos, no caso da survivina esta só se encontra primariamente expressa na fase fetal, mas não nos tecidos adultos, encontrando-se sobre expressa num elevado leque de tumores, como o carcinoma do pulmão, do pâncreas, da mama e em múltiplas neoplasias hematológicas. Para além disto, esta proteína é a única IAP cuja expressão depende do ciclo celular. A survivina aparece, então, como responsável pelo aumento da resistência tumoral, por inactivar a acção de agentes quimioterapêuticos e nomeadamente por interferir com moléculas envolvidas na apoptose, nomeadamente as caspases 3, 7 e 9, estando a sua sobreexpressão correlacionada com um pior prognóstico em doentes com tumores sólidos, leucemias agudas e linfomas (Fukuda, S. & Pelus, L., 2001; Fukuda, S. & Pelus, L., 2006).

Neste sentido, encontram-se em estudo vários moduladores da resistência à apoptose, nomeadamente os compostos naturais Ácido Gambóxico (GA) e Silibinina (SLB), que têm sido apontados como potenciais inibidores da acção anti-apoptótica da survivina.

1.2.5.1. Ácido Gambógico

O Ácido Gambógico (GA) (Figura 13) é o componente principal do gamboge, uma resina extraída da árvore *Garcinia hanburyi*. Este composto natural apresenta vários efeitos biológicos funcionando como agente anti-inflamatório, analgésico e anti-pirético, bem como anticancerígeno (Wang, T. *et al.*, 2008; Tan, W. *et al.*, 2011).

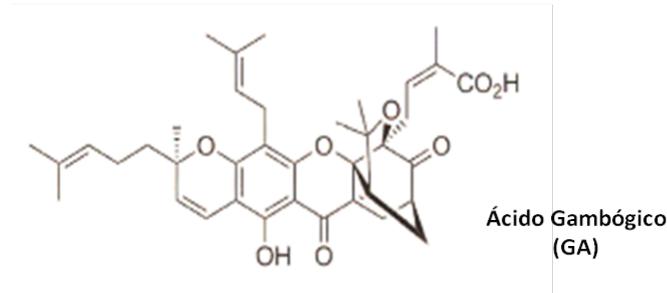


Figura 13 – Estrutura química do Ácido Gambógico (GA) (Adaptado de Tan, W. *et al.*, 2011).

O GA induz apoptose em vários tipos de células, estando o seu mecanismo de acção primário relacionado com o receptor da transferrina (TfR). Deste modo, a ligação do GA ao TfR, de uma forma independente do local de ligação da transferrina, origina uma rápida indução de apoptose nas células tumorais (Tan, W. *et al.*, 2011). Para além destes mecanismos de acção o GA interfere também, com outros alvos moleculares, envolvidos com a regulação da apoptose, nomeadamente com a proteína supressora tumoral p53 (Tan, W. *et al.*, 2011), com as proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2 (Zhai, D. *et al.*, 2008), bem como com a topoisomerase I e II (Qin, Y. *et al.*, 2007), e ainda com o factor de transcrição nuclear NF-κB (Pandey, M. *et al.*, 2007).

Para além destes múltiplos mecanismos de actuação, estudos recentes revelam que este composto desempenha importantes funções na regulação negativa da proteína anti-apoptótica survivina, potenciando a acção de quimioterapias convencionais, tanto por bloqueio da função desta proteína ao nível do ciclo celular como por incrementar a apoptose (Wang, T. *et al.*, 2008).

O ácido gambógico (GA) surge, assim, como um potencial agente quimioterapêutico, com múltiplos alvos moleculares.

1.2.5.2. Silibinina

A silibinina (SLB) (Figura 14) é um flavonoide derivado de *Silybum marianum*, com reconhecidos efeitos terapêuticos em doenças hepáticas. Estudos recentes revelam neste composto comprovados efeitos anticancerígenos, nomeadamente por induzir bloqueio do ciclo celular, apoptose, bem como prevenir a angiogénese e a invasão celular (Tan, W. *et al.*, 2011).

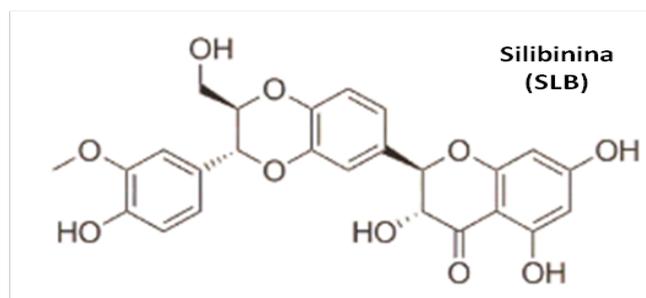


Figura 14 – Estrutura química da Silibinina (SLB) (Adaptado de Tan, W. *et al.*, 2011).

A silibinina está, assim, envolvida na regulação de múltiplas vias de sinalização celular quer proliferativas quer apoptóticas. Desta forma, ao nível da proliferação celular actua ao nível das ciclinas dependentes de cinases (CDKs), interage com os receptores tirosina cinase (RTKs) reprimindo a sua activação, bem como ao nível da cascata das JAK-STAT inibindo a acção da STAT-3. Este composto interage também, ao nível dos receptores de androgénio (AR), como quimiopreventivo, na supressão tumoral, e ao nível da sinalização mediada pelo NF- κ B, impedindo a proliferação celular. Por outro lado, ao nível da apoptose a silibinina apresenta um importante papel na regulação negativa das proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2, bem como das IAPs, apresentando um papel fulcral na inibição da acção da survivina, responsável por um pior prognóstico em múltiplos tumores (Jacqemin, G. & Shirley, S., 2010; Li, L. *et al.*, 2010).

Deste modo, a silibinina aparece como um promissor agente na terapêutica anti-tumoral, não só por inibir a proliferação celular mas também por interagir com proteínas envolvidas na resistência tumoral, não só por actuar directamente com moléculas anti-apoptóticas, mas também por re-sensibilizar as células tumorais resistentes à reactivação de caspases (Son, Y. *et al.*, 2007).

Assim, o recurso a compostos que inibem ou diminuem a expressão da proteína anti-apoptótica survivina, mostra-se uma estratégia promissora, no sentido de contornar uma das principais causas da falência da quimioterapia convencional e também da acção efectiva do sinal de morte levada a cabo por agonistas de ligandos de receptores de morte, como é o rhTRAIL (Tan, W. *et al.*, 2011).

Tendo em linha de conta estas observações e apesar dos estudos efectuados com o rhTRAIL e os anticorpos monoclonais do TRAIL, bem como com a SLB e o GA revelarem bons resultados em vários cancros, a sua eficácia terapêutica em leucemias agudas, bem como nos mecanismos moleculares subjacentes à recidiva hematológica desta doença, ainda não estão bem esclarecidos. Deste modo, é de suma importância alargar o espectro de conhecimento e investigação nesta área de interesse, com o objectivo de identificar um novo leque de agentes para o tratamento efectivo destas neoplasias hematológicas.

1.3. Objectivos

O tratamento actual das leucemias inclui a quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e o transplante de medula óssea. Embora o transplante medular seja a terapêutica mais eficaz para a remissão completa destas neoplasias, este apresenta, ainda, diversas restrições, devido não só à necessidade de um dador compatível, mas também pela elevada morbilidade e mortalidade. Por outro lado, apesar de a quimioterapia ser a forma de tratamento mais utilizada, visando inibir a proliferação celular ou induzir a apoptose, a resistência aos fármacos é uma das causas da falência da terapêutica convencional e do aparecimento de recidivas hematológicas frequentes.

O TRAIL é um ligando indutor de apoptose da família do TNF que, como vimos pela análise da literatura, tem a capacidade de induzir apoptose de forma selectiva em células cancerígenas. Contudo, devido à existência de proteínas inibidoras da apoptose, como a survivina, a sua actividade é muitas vezes restringida e afectada, não se obtendo um sinal apoptótico efectivo. Este processo pode, no entanto, ser contornado utilizando compostos, que actuem de forma a inibir a expressão deste tipo de proteínas e desta forma reformular o sinal apoptótico, nomeadamente o GA e a SLB.

Dentro deste contexto, os objectivos gerais deste trabalho são avaliar a importância do TRAIL e da Survivina como alvos terapêuticos na Leucemia Linfoblástica Aguda. Em particular pretendemos:

- Avaliar a eficácia terapêutica do Dulanermin-TRAIL recombinante (rhTRAIL, *recombinant human TRAIL*), e dos inibidores da survivina, ácido gambóico (GA) e silibilina (SLB), em monoterapia, em células de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), na altura do diagnóstico e na recidiva;
- Avaliar o potencial terapêutico do fármaco rhTRAIL em associação quer com os compostos inibidores da survivina, GA e SLB, quer com os

fármacos convencionais, doxorrubicina (DOX) e vincristina (VCR), em linhas celulares de LLA, na altura do diagnóstico e na recidiva;

- Estudar alguns dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade mediada pelo rhTRAIL e pelo GA e SLB.

Desta forma, com este trabalho pretende-se contribuir para a elucidação da eficácia terapêutica do rhTRAIL, do GA e da SLB, em Leucemias Linfoblásticas Agudas, de modo a identificar novos agentes moleculares para o tratamento dos doentes com estas patologias, nomeadamente na recidiva da doença, mais eficazes e de menor toxicidade.

Capítulo 2. Material e Métodos

2.1. Cultura das linhas celulares de leucemia linfoblástica aguda de células T humanas

Nestes estudos foram utilizadas, como modelo *in vitro* de leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T), as linhas celulares CCRF-CEM e MOLT-4, obtidas no *American Type Culture Collection* (ATCC).

A linha celular CCRF-CEM, ou simplesmente CEM, foi estabelecida a partir de células T de sangue periférico de uma criança caucasiana, do sexo feminino, de 4 anos de idade, portadora de leucemia linfoblástica aguda do tipo T, na altura do diagnóstico (Foley, G. *et al.*, 1965). As células CEM, morfologicamente, apresentam características típicas de leucemia linfoblástica aguda, nomeadamente uma relação núcleo/citoplasma elevado e uma acentuada basofília citoplasmática (Sarmiento-Ribeiro, A., 2000). No que respeita a características imunofenotípicas, as células CEM expressam antígenos de superfície típicos de células T, designadamente os CD3, CD4, CD5 e CD7.

A linha celular de leucemia linfoblástica aguda T, MOLT-4, foi inicialmente obtida a partir de linfócitos T de sangue periférico, de um indivíduo do sexo masculino, de 19 anos de idade, numa recidiva hematológica da doença (Minowada, J. *et al.*, 1972). À semelhança das células CEM, também, as células MOLT-4 apresentam imunofenotipicamente expressão de antígenos típicos de células T, nomeadamente os CD3, CD5 e CD7. Ao nível citogenético esta linha celular humana é hipertetraploide, apresentando um número modal de 96 cromossomas (Greenberg, J. *et al.*, 1988).

As linhas celulares CEM e MOLT-4 foram mantidas em cultura, em suspensão, em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI 1640) (SIGMA) a pH 7,4, contendo 2 mM de L-glutamina, 20 mM de HEPES-Na, 1,5 g/l de NaHCO₃, 100 U/ml de penicilina (GIBCO), 100µg/ml estreptomomicina (GIBCO) e enriquecido com soro fetal bovino (FBS) (GIBCO, Invitrogen) a 10%. As células foram propagadas e mantidas em cultura no meio apropriado à temperatura de 37°C numa atmosfera humedecida contendo 5% de CO₂, iniciando-se a cultura a uma densidade de 0,3 a 0,5 milhões de células por ml (10⁶ cel/ml). A densidade celular foi aferida pelo teste de exclusão com azul de tripano e o meio de cultura foi renovado a cada dois/três dias de incubação.

2.2. Avaliação da expressão basal de moléculas envolvidas na regulação da apoptose por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que permite a quantificação e análise multiparamétrica de partículas biológicas em suspensão, assente nas propriedades ópticas (dispersão de luz e fluorescência) apresentadas pelas mesmas. Esta técnica baseia-se, assim, na dispersão de luz frontal (*forward scatter* – FSC) e lateral (*sidescatter* – SSC), emitida por uma fonte de luz (laser de argon), e pela fluorescência emitida por fluorocromos ligados a anticorpos monoclonais ou outros compostos (Bernas, T. *et al.*, 2006).

A avaliação da expressão basal de moléculas envolvidas na apoptose, nas linhas celulares CEM e MOLT-4, nomeadamente do ligando TRAIL (*TNF- related apoptosis ligand*) e dos seus receptores (TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4), da proteína anti-apoptótica survivina, bem como do receptor da transferrina (TfR), foi realizada por citometria de fluxo com recurso a anticorpos monoclonais conjugados directamente com sondas fluorescentes.

2.2.1. Avaliação da expressão basal do ligando TRAIL e dos seus receptores, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4 e do TfR

O TRAIL é um ligando indutor de apoptose da família dos factores de necrose tumoral cuja relação com um sinal efectivo de morte celular está muitas vezes correlacionado com a diferente expressão dos seus receptores, sendo que os receptores de morte, TRAIL-R1 e TRAIL-R2, induzem morte celular por apoptose e os receptores armadilha, TRAIL-R3 e TRAIL-R4, ao contrário dos primeiros inibem a apoptose.

De um modo análogo, também a diferente expressão dos TfR tem vindo a ser apontada como um factor discriminatório na indução de um sinal efectivo de morte celular. Assim, a avaliação da expressão basal destas moléculas mostra-se um ponto-chave na compreensão da sensibilidade das células ao sinal apoptótico. Para tal, recolheu-se o volume equivalente a um milhão de células, CEM e MOLT-4, e lavou-se com tampão fosfato (PBS) a pH=7,4, por centrifugação, durante 5 minutos a 300 xg. Posteriormente as suspensões celulares foram incubadas durante 15 minutos, à

temperatura ambiente, no escuro, com 1 µg de anticorpo monoclonal anti TRAIL-L ligado à sonda fluorescente ficoeritrina (PE) (BD Biosciences), bem como com 1 µg de anticorpo anti-TRAIL-R1 PE, anti-TRAIL-R2 PE, anti-TRAIL-R3 PE e anti-TRAIL-R4 PE (R&D Systems), respectivamente, bem como com 1 µg de anticorpo anti-TfR/CD71-ligado à sonda fluorescente isocitrato de fluoresceína (-FITC) (BD Biosciences). Findo o período de incubação as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 300 xg, durante 5 minutos e ressuspensas em 300 µl de PBS.

Os resultados foram obtidos recorrendo à utilização de um citómetro de fluxo, FACSCalibur (BD Bioscience), e são expressos em Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) que representa a média de expressão das moléculas em estudo nas células CEM e MOLT-4, bem como pela percentagem (%) de células que expressam estas moléculas. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes.

2.2.2. Avaliação da expressão basal de survivina

A survivina é uma proteína anti-apoptótica muitas vezes associada à falência de terapêuticas anticancerígenas e recaídas frequentes. Assim, mostra-se fulcral a análise da sua expressão basal nas células CEM e MOLT-4. Deste modo, recolheu-se o volume equivalente a um milhão de células, que foram lavadas por centrifugação, durante 5 minutos a 1000 xg, com PBS, a pH=7,4. Como a survivina é uma proteína intracelular a sua análise requer a fixação e permeabilização celular. Deste modo, as células foram incubadas, durante 15 minutos, ao abrigo da luz, com 100 µl de solução de fixação, segundo instruções do fabricante do *kit* IntraCell (ImunnoStep). Findo o tempo de incubação, procedeu-se à lavagem das células com PBS por centrifugação, durante 5 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas com 100 µl de solução de permeabilização e 1 µg de anticorpo anti-survivina FITC (R&D Systems), durante 15 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Por fim, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 300 xg, durante 5 minutos e ressuspensas em 300 µl de PBS.

Os resultados foram obtidos com recurso ao citómetro de fluxo, FACSCalibur (BD Bioscience), e são expressos em MIF, representando a média de expressão das moléculas em estudo nas células CEM e MOLT-4, e em percentagem (%) de células que

expressam esta proteína. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes.

2.3. Incubação das linhas celulares de leucemia linfoblástica aguda T com fármacos anticancerígenos

As células de LLA-T, CEM e MOLT-4, foram mantidas em cultura nas condições referidas em 2.1., na ausência e na presença de concentrações crescentes dos fármacos anticancerígenos, Dulanermin (rhTRAIL), Ácido Gambóxico (GA), Silibinina (SLB), Doxorubicina (DOX) e Vincristina (VCR), nas concentrações expostas na tabela 3, durante um período de 72 horas, a 37°C, numa atmosfera humedecida contendo 5% de CO₂. As suspensões celulares foram mantidas em frascos de cultura com área de 75 cm², ou em placas de cultura de 12 a 48 poços, dependendo da quantidade de células necessárias aos estudos subsequentes, a uma densidade celular inicial de 0,3 a 0,5x10⁶ cel/ml.

Tabela 3 – Condições de incubação das células CEM e MOLT-4, respectivamente, com os compostos Dulanermine (rhTRAIL), Ácido Gambóxico (GA) e Silibinina (SLB), Doxorrubicina (DOX) ou Vincristina (VCR).

Fármacos	Concentrações	Linhas Celulares	
		CEM	MOLT-4
rhTRAIL	25ng/ml	✓	
	50ng/ml		✓
	75ng/ml	✓	
	100ng/ml	✓	
	150ng/ml		✓
	500ng/ml	✓	✓
	750ng/ml		✓
	1000ng/ml	✓	✓
GA	50nM		✓
	100nM	✓	✓
	150nM		✓
	200nM	✓	✓
	275nM	✓	
	300nM		✓
	400nM	✓	
	500nM		✓
	750nM		✓
	1000nM		✓
SLB	1μM		✓
	3μM		✓
	10μM		✓
	25μM	✓	✓
	50μM	✓	✓
	75μM	✓	
	100μM	✓	
DOX	20nM		✓
	100nM	✓	
VCR	1nM	✓	✓

Para a realização dos diferentes estudos foram preparadas soluções concentradas dos vários compostos. Deste modo, as soluções do fármaco Dulanermine-rhTRAIL (AMGEN) foram preparadas com água ultra-pura, tendo sido armazenadas a -80°C . No caso dos quimioterápicos convencionais, VCR (SIGMA) e DOX (SIGMA), as soluções concentradas foram previamente preparadas com água ultra-pura e armazenadas a -20°C e a 4°C , respectivamente. As soluções *stock* para os inibidores da survivina, GA (SIGMA) e SLB (SIGMA), foram preparadas com dimetilsufóxido (DMSO) e armazenadas no frio, a -20°C , conforme indicado pelo fornecedor.

2.4. Análise da proliferação e morte celular através da determinação da densidade e da viabilidade celular

A densidade e viabilidade celular das células CEM e MOLT-4 foram avaliadas pelo teste de exclusão com azul de tripano.

O teste de exclusão com azul de tripano baseia-se no facto deste corante vital permear de forma distinta as células viáveis das células não viáveis, pois como apresenta carga não consegue permear a membrana celular quando esta se encontra íntegra, ou seja, quando as células são viáveis. Por outro lado, as células mortas, que apresentam a membrana plasmática comprometida, são permeáveis a este corante azul, permitindo a sua entrada para o citoplasma, o qual fica corado de azul (Durkin, W. *et al.*, 1979). Assim, mediante a capacidade de exclusão deste corante, foram avaliados o perfil de crescimento de cada uma das linhas celulares em estudo, bem como o efeito citostático e citotóxico induzido pelos diferentes fármacos anticancerígenos através da análise da densidade e viabilidade celular das células CEM e MOLT-4 na ausência e na presença dos fármacos anticancerígenos, nas concentrações indicadas na tabela 3. Os fármacos foram administrados em monoterapia em dose única e em administração diária.

O efeito do fármaco rhTRAIL foi ainda testado por combinação com os inibidores da survivina, GA e SLB, bem como com os fármacos convencionais, DOX e VCR, em administração simultânea ou desfasada de 4 horas entre fármacos.

Para tal, as células foram incubadas com os diferentes compostos a uma densidade celular inicial de $0,5 \times 10^6$ cel/ml, por um período de 72 horas, sendo que a cada período de 24h foi retirada uma alíquota de suspensão celular e após contagem do número de células vivas e mortas, num hemocitómetro, foram determinadas a densidade e viabilidade celulares. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 5 ensaios independentes.

2.5. Análise da morte celular por microscopia óptica

Para avaliar o tipo de morte celular induzida pelos fármacos em estudo, analisou-se as características morfológicas das células CEM e MOLT-4, incubadas na ausência e na presença dos fármacos anticancerígenos, por microscopia óptica, após a

realização de esfregaços de células e coloração dos mesmos com corante *May-Grünwald-Giemsa* (SIGMA).

Assim, os esfregaços foram preparados a partir da recolha de células previamente incubadas, na ausência e na presença dos fármacos em estudo, nas condições referidas anteriormente em 2.3. Desta forma, foram recolhidas 50 mil células que foram sujeitas a centrifugação durante 5 minutos a 300 xg e posteriormente lavadas com tampão fosfato (PBS), por centrifugação similar à anterior. As células então obtidas foram ressuspensas num pequeno volume de soro fetal bovino (FBS), de forma a melhorar a sua adesão à lâmina, para a realização dos esfregaços. Os esfregaços realizados foram posteriormente corados durante 5 minutos com solução de *May-Grünwald* (preparada em 0,3% de metanol e diluída de 1:1 com água destilada, na altura da sua utilização), adicionando-se de seguida solução de *Giemsa* (1gr de corante *Giemsa*, 66 ml de glicerol e 66 ml de metanol, diluída numa razão de 1 para 8 com água destilada na altura da utilização) por um período de 15 minutos (Houwen, B., 2001). Por fim, os esfregaços foram lavados com água destilada e secos ao ar, tendo a morfologia celular sido, posteriormente, analisada por microscopia óptica. Para o efeito, utilizou-se o microscópio óptico *Axioskop2* (ZEISS), com câmara digital acoplada, tendo-se registado e processado as imagens recorrendo ao programa *AxioVision LE*.

2.6. Análise da morte celular por citometria de fluxo

A aplicação da citometria de fluxo para a avaliação da morte celular é realizada recorrendo à dupla marcação com anexina V (ligado à sonda fluorescente alofocianina – Anexina V-APC) e iodeto de propídeo (IP), permitindo não só a distinção entre células viáveis e não viáveis como também, dentro das não viáveis, as que se encontram em apoptose ou em necrose (Sarmiento-Ribeiro, A., 2000).

Uma das características da morte celular por apoptose, numa fase inicial do processo, é a translocação da fosfatidilserina do folheto interno para o folheto externo da membrana celular. A anexina V é uma molécula, que na presença de cálcio, apresenta grande afinidade por fosfolípidos de carga negativa, como é o caso da fosfatidilserina. Assim, a anexina V ligada a um fluorocromo, permite determinar a

localização da fosfatidilserina e, deste modo, identificar células que se encontrem em apoptose inicial (Sgonc, R. & Gruber, J., 1998). Por outro lado, o IP é um composto que tem capacidade de intercalar a dupla cadeia de ADN de forma inespecífica, emitindo fluorescência. No entanto, devido à sua baixa lipossolubilidade, o IP, só entra na célula quando há perda de integridade da membrana celular, fenómeno característico de células em necrose. Todavia, em fases mais tardias da apoptose também pode haver perda de integridade da membrana sendo também possível a internalização do IP na célula.

Assim, quando se expõem as células, simultaneamente à anexina V e ao IP é possível discriminar entre células viáveis (não apresentam marcação nem com anexina V nem com IP), células em apoptose inicial (marcadas apenas com anexina V), células em necrose (marcadas apenas com IP) e células em apoptose tardia e/ou necrose (marcadas simultaneamente com anexina V e IP) (Aubry, J. *et al.*, 1999).

Deste modo, aproximadamente um milhão de células das linhas celulares CEM e MOLT-4 foram incubadas nas condições referidas na secção 2.3, na ausência e na presença dos fármacos anticancerígenos. Estas foram, depois, lavadas por centrifugação, durante 5 minutos a 300 xg, com tampão fosfato salino (PBS) a pH=7,4.

Seguidamente, foi adicionado ao sedimento 100 µl de tampão de ligação, e incubado, durante 15 minutos, com 5 µl de anexina V marcada com alofococianina (APC) e 2 µl de IP, ao abrigo da luz, segundo o descrito no *kit* de detecção da morte celular da BD Bioscience. Findo o tempo de incubação foram adicionados mais 300 µl de tampão de ligação e procedeu-se à análise num citómetro de fluxo FACSCalibur (BD Bioscience) equipado com um laser de árgon, utilizando os comprimentos de onda de excitação de 785 nm para a anexina V-APC e de 640 nm para o IP.

Através do programa CellQuest™ (BD Bioscience) foram adquiridas 10 000 células e os resultados foram analisados com recurso ao programa Paint-a-Gate™ (BD Bioscience). Os resultados são expressos em percentagem de células, tendo em conta cada uma das subpopulações com marcação positiva e/ou negativa para a anexina V e para o IP. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes.

2.7. Análise da expressão de moléculas envolvidas na morte celular por citometria de fluxo

A expressão de moléculas envolvidas na morte celular, como o citocromo *c* e a forma activada da caspase 3, mostra-se relevante para a identificação dos mecanismos citotóxicos desencadeados pelos vários fármacos, nas diferentes linhas celulares em estudo. Para o efeito, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo com recurso a anticorpos monoclonais anti-citocromo *c* e anti-caspase 3 activada conjugados directamente com sondas fluorescentes.

Assim, aproximadamente um milhão de células das linhas celulares CEM e MOLT-4 foram incubadas nas condições referidas na secção 2.3, na ausência e na presença de fármacos anticancerígenos. Posteriormente foram lavadas por centrifugação, durante 5 minutos a 300 xg, com PBS a pH=7,4.

A avaliação dos níveis de expressão das proteínas intracelulares caspase 3 activada e do citocromo *c*, requer a fixação e permeabilização das células em estudo. Deste modo, as células foram incubadas, durante 15 minutos, ao abrigo da luz, com 100 µl de solução de fixação, segundo instruções do fabricante do *kit* IntraCell (ImunnoStep). Findo o tempo de incubação, procedeu-se à lavagem das células com PBS por centrifugação, durante 5 minutos, a 300 xg. Posteriormente, as células foram incubadas com 100 µl de solução de permeabilização e 1 µg de anticorpo anti-caspase 3 activada-FITC (BD Bioscience), bem como 1 µg de anticorpo anti-citocromo *c*-FITC (Santa Cruz Biotechnology), respectivamente, durante 15 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Por fim, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 300 xg, durante 5 minutos e ressuspensas em 300 µl de PBS.

Os resultados foram obtidos com recurso ao citómetro de fluxo FACSCalibur (BD Bioscience), e são expressos em MIF, que representam a média de expressão das moléculas em estudo nas células CEM e MOLT-4, e em percentagem de células que expressam estas proteínas. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes.

2.8. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

A aplicação da citometria de fluxo para a quantificação do ácido desoxirribonucleico (ADN) em suspensões celulares, recorrendo à utilização de IP, permite avaliar a distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular, G₀/G₁, S e G₂/M, num determinado momento, uma vez que a intensidade de fluorescência do IP é proporcional à quantidade de ADN. Esta parametrização é possível devido à existência de três grupos de células, um que corresponde ao pico G₀/G₁ do histograma de ADN, que apresenta menor quantidade de ADN e outro que corresponde à fase G₂/M, que apresenta quantidades maiores de ADN, exibindo o dobro da intensidade de fluorescência em relação ao primeiro. Entre estes dois grupos existe um terceiro cuja quantidade de ADN é intermédia, correspondendo à fase de síntese (S) (Órfão, A. *et al.*, 1995).

Deste modo, para avaliar o efeito dos diferentes fármacos na distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular, as células CEM e MOLT-4 foram mantidas em cultura na ausência e na presença dos fármacos rhTRAIL, GA e SLB, nas respectivas concentrações indicadas na secção 2.3. Findo um período de incubação de 24h recolheu-se o volume equivalente a um milhão de células, para cada condição experimental, e lavou-se com PBS por centrifugação durante 5min a 1000 xg. Seguidamente, as células foram incubadas, durante 30 minutos, a 4°C, com 200 µl de etanol a 70%, que foi adicionado por pipetagem lenta e em agitação. Findo o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 300 xg, durante 5 minutos. Após a lavagem, as células foram ressuspensas e incubadas em 500 µl da solução de iodeto de propídeo e RNASE (PI/RNASE) (Immunostep), durante 15 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Seguidamente, os resultados relativos ao conteúdo de ADN foram analisados recorrendo a um citómetro de fluxo, FACSCalibur (BD Bioscience), e ao programa ModFit LTTM. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes.

2.9. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_{mit}$) foi realizada recorrendo à citometria de fluxo, por marcação com a sonda fluorescente 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide (JC1). Este catião lipofílico (Figura 15) permeia a membrana e quando se encontra no citoplasma apresenta-se sob a forma monomérica (M) emitindo fluorescência verde, a um comprimento de onda de 525 nm. Contudo, se o potencial membranar aumentar os monómeros de JC1 permeiam a membrana mitocôndria, formando agregados (A) que emitem fluorescência vermelha, a um comprimento de onda de 590 nm. Se o potencial mitocondrial voltar a baixar o JC1 sai da mitocôndria para o citoplasma, onde permanece sob a forma monomérica (M) (Yao, J. *et al.*, 2008). Desta forma, a razão entre a fluorescência verde e vermelha (razão M/A), determinada com recurso à técnica de citometria de fluxo, fornece uma estimativa acerca do $\Delta\psi_{mit}$.

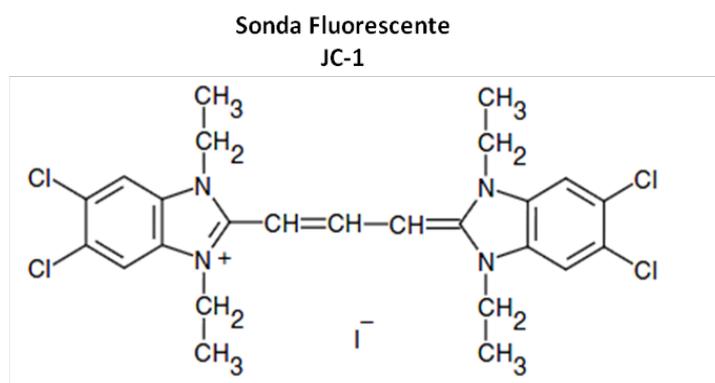


Figura 15 – Representação da estrutura química da sonda fluorescente 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide (JC1). Esta sonda encontra-se no citosol da célula na forma monomérica (M), quando a membrana mitocondrial se encontra despolarizada. No entanto, quando há polarização da membrana mitocôndria o JC1 permeia a mitocôndria, formando agregados (A). (Adaptado de JC-1 and JC-9 Mitochondrial Potential Sensors, Molecular Probes^R, Invitrogen).

Deste modo, as células CEM e MOLT-4 foram mantidas em cultura na ausência e na presença dos fármacos rhTRAIL, GA e SLB, nas respectivas concentrações indicadas na secção 2.3. Findo um período de incubação de 24h recolheu-se o volume equivalente a um milhão de células, para cada condição experimental, e lavou-se com PBS por centrifugação durante 5 minutos a 1000 xg. Seguidamente, as células foram incubadas com 1 ml de tampão fosfato e 1 μ l da sonda JC1 (Molecular Probes^R,

Invitrogen), ficando esta a uma concentração final de 5 mg/ml, a 37°C, na ausência de luz. Decorridos 15min de incubação, a suspensão foi lavada com 2 ml de PBS e o sedimento ressuspenso em 300 µl de PBS. Posteriormente o potencial de membrana foi avaliado por citometria de fluxo, num citómetro de fluxo, como referido anteriormente. Os resultados representam a média da razão entre os MIF dos monómeros e dos agregados (M/A) de JC1, correspondendo à média \pm desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes.

2.10. Análise estatística

O tratamento estatístico dos resultados obtidos nas diferentes condições em estudo foram realizados recorrendo à análise de variância estatística de dois ou mais grupos em simultâneo pelo teste ANOVA, tendo-se utilizado o teste de Dunnett para a comparação entre todas as condições em estudo.

Os resultados foram analisados utilizando os programas GraphPad 5.0 e Microsoft Excel, sendo que em todas as análises efectuadas se considerou um nível de significância de 95% ($p < 0,05$), apresentando-se os dados sobre a forma de média \pm desvio padrão.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Caracterização das linhas celulares humanas CEM e MOLT-4

No presente trabalho foram utilizadas duas linhas celulares de leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T), as células CEM, obtidas a partir de uma criança caucasiana do sexo feminino, de 4 anos de idade, na altura do diagnóstico, e as células MOLT-4 estabelecidas a partir de um indivíduo do sexo masculino, de 19 anos de idade, numa recidiva hematológica da doença. Estas células crescem em suspensão, quando mantidas em cultura num meio nutritivo apropriado e à temperatura de 37°C, em atmosfera humedecida contendo 5% de CO₂.

Deste modo, como se pode observar pela figura 16-A, o perfil de crescimento das duas linhas celulares é ligeiramente distinto, apresentando as células CEM um crescimento celular mais acentuado que as células MOLT-4. Assim, a fase exponencial de crescimento decorre ao longo de 72 horas, após o qual estas células entram numa fase estacionária. Durante a fase exponencial, a densidade celular nas células CEM duplica a cada 24 horas até um máximo aproximado de 2,5 a 3,5 milhões de células por ml ($\times 10^6$ cel/ml). No caso das células MOLT-4 a densidade celular duplica a cada 48 horas para um máximo de $1,4 \times 10^6$ cel/ml. A viabilidade celular (Figura 16-B) mantém-se próxima dos 100% ao longo das 96 horas para as células CEM, verificando-se para as células MOLT-4 um decréscimo deste parâmetro ao longo do tempo para valores na ordem dos 70 a 75%, findo o período de incubação de 96 horas.

Ao nível morfológico, como se representado na figura 17, as células CEM e MOLT-4 apresentam características morfológicas típicas de leucemia linfoblástica aguda T, LLA-T, nomeadamente elevada relação núcleo/citoplasma, com acentuada basofilia citoplasmática e granulações citoplasmáticas. Nos esfregaços destas células é possível também observar várias células em mitose.

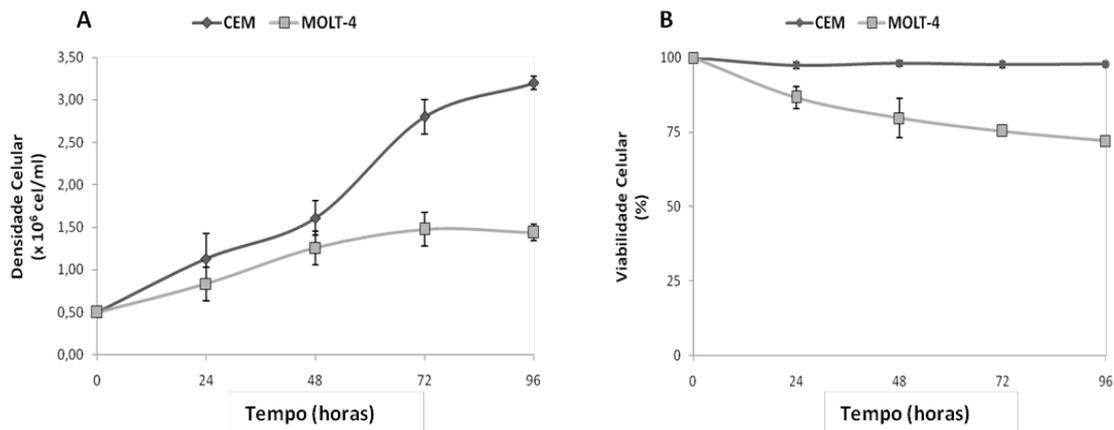


Figura 16 – Curvas de proliferação/densidade (A) e de viabilidade celular (B) das células CEM e MOLT-4. As células foram incubadas nas condições ótimas de crescimento [a 0,5x 10⁶ cel/ml, com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS)]. A cada período de 24 horas de incubação foram recolhidos 20 µl de amostra das suspensões celulares e aferidas a densidade e viabilidade celulares, pela técnica de exclusão com azul de tripano. A densidade celular foi calculada pelo número de células vivas por ml e a viabilidade celular em % de células viáveis, de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos. Os resultados apresentados representam a média ± desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes.

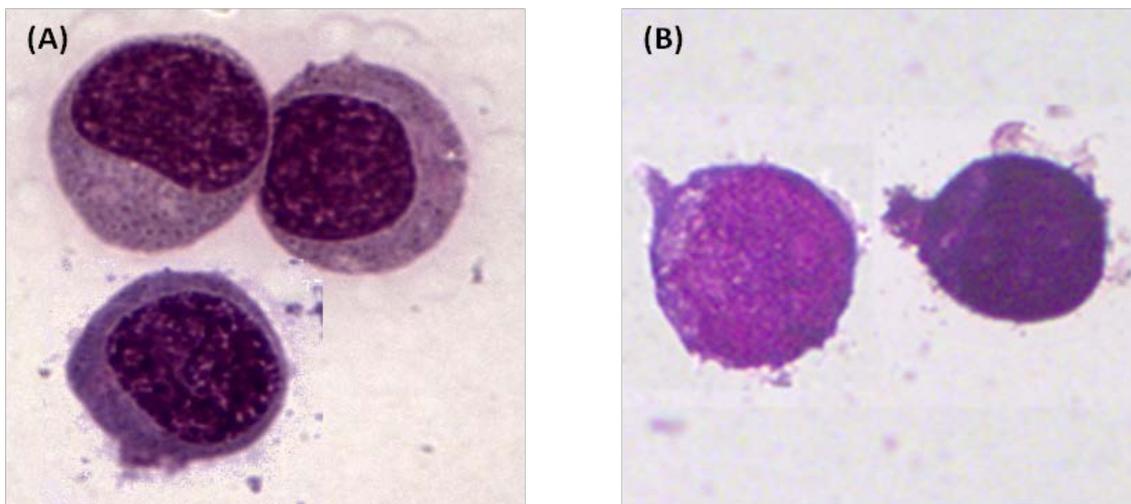


Figura 17 – Aspectos morfológicos das células CEM (A) e MOLT-4 (B). Os esfregaços de células foram corados com solução de *May-Grünwald-Giemsa* e observados ao microscópio óptico, de acordo com o descrito na secção de material e métodos (Ampliação 500x).

3.2. Avaliação da expressão basal de moléculas envolvidas na apoptose

A evasão da morte celular, nomeadamente por apoptose, surge como um dos mecanismos chave para o aparecimento da patologia tumoral e representa um ponto crucial para a aquisição de resistência ao tratamento convencional e ao aparecimento de recidivas frequentes.

Neste sentido, recorrendo à técnica de citometria de fluxo foram avaliados os padrões de expressão basal de moléculas co-relacionadas com a apoptose, como o ligando TRAIL (*TNF-related apoptosis ligand*) e os seus receptores, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3 e TRAIL-R4 e a survivina, bem como o receptor da transferrina (TfR), por forma a aferir sobre a eficácia terapêutica de fármacos direccionados a estes alvos celulares. Esta metodologia permite não só quantificar a expressão destas moléculas, como também saber a percentagem de células que as expressa dentro do total da população celular (Tabela 4).

Tabela 4 – Avaliação da expressão de proteínas envolvidas na regulação da apoptose por citometria de fluxo.

Linha Celular Molécula	CEM		MOLT-4	
	Percentagem (%) de Células	MIF	Percentagem (%) de Células	MIF
TRAIL L	6 ± 3	121 ± 96	3	184 ± 87
TRAIL-R1	2 ± 1	51 ± 21	3 ± 1	87 ± 34
TRAIL-R2	34 ± 23	30 ± 11	12 ± 6	43 ± 7
TRAIL-R3	4 ± 1	32 ± 6	3 ± 1	34 ± 1
TRAIL-R4	9 ± 10	23 ± 4	6 ± 2	80 ± 27
TfR	100 ± 0	515 ± 63	100 ± 0	303 ± 79
Survivina	100 ± 0	120 ± 13	100 ± 0	71 ± 11

As células CEM e MOLT-4 foram mantidas em cultura em meio e condições atmosféricas apropriadas e as suas marcações foram realizadas com recurso a anticorpos monoclonais específicos, como descrito na secção material e métodos. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes, e estão expressos em percentagem (%) e em média de intensidade de fluorescência (MIF). TRAIL L, ligando TRAIL (*TNF-related apoptosis ligand*); TRAIL-R1, TRAIL receptor 1; TRAIL-R2, TRAIL receptor 2; TRAIL-R3, TRAIL receptor 3; TRAIL-R4, TRAIL receptor 4.

Assim, pela análise global da tabela 4, podemos verificar que a percentagem de células CEM e MOLT4 que expressa as moléculas reguladoras da apoptose em estudo, com excepção do TRAIL-R2, não apresenta diferenças acentuadas entre as duas linhas celulares. De facto, verificámos que, apenas para o receptor R3 do TRAIL, um maior número de células CEM expressa este receptor relativamente às células MOLT-4. Pelo

contrário os níveis de expressão das moléculas analisadas são diferentes nas duas linhas celulares, excepto para o receptor R3 do TRAIL que apresenta níveis de expressão em ambas as linhas celulares sem diferenças significativas.

No entanto, verifica-se que, apesar das células MOLT-4 terem uma percentagem ligeiramente inferior de células a expressar o TRAIL relativamente às células CEM, apresentam maior quantidade deste ligando comparativamente ao observado nas células CEM, uma vez que a média de intensidade de fluorescência (MIF) é de 184 ± 87 para as células MOLT-4 e de 121 ± 96 para as células CEM. Além disso, no geral, além do aumento da expressão de TRAIL, as células MOLT-4 apresentam maior expressão dos receptores TRAIL-R1, R2 e R4 e menor expressão de survivina e de receptores de transferrina (TfR) em relação às células CEM.

Por outro lado, quando analisamos a percentagem de células CEM e MOLT-4 que expressa os receptores pró-apoptóticos do TRAIL em relação à que expressa os anti-apoptóticos, verifica-se que os receptores pró-apoptóticos, TRAIL-R1 e TRAIL-R2, são expressos numa maior percentagem de células relativamente aos receptores anti-apoptóticos, TRAIL-R3 e TRAIL-R4. No entanto, existem diferenças entre as duas linhas celulares, sendo as células CEM as que apresentam maior percentagem de células a expressar os receptores pró-apoptóticos TRAIL-R1 e TRAIL-R2 (36%), enquanto que apenas 15% das células MOLT-4 expressam estes receptores. Contudo, os níveis de expressão dados pela média da intensidade de fluorescência revelam que as células MOLT-4 expressam maior quantidade destes receptores (Tabela 4).

Relativamente, aos receptores armadilha do ligando TRAIL, o TRAIL-R3 é expresso em maior percentagem de células na linha celular MOLT-4, bem como em maior quantidade, como mencionado. O receptor TRAIL-R4, apesar de ser expresso em maior percentagem de células na linha celular CEM, que na linha celular MOLT-4, a média da intensidade de fluorescência é superior nas células MOLT-4, o que indica que estas apresentam maior quantidade deste receptor.

Não obstante, uma vez que a sensibilidade das células à apoptose pode ser influenciada pela proporção de moléculas pró- e anti-apoptóticas existentes, foi calculada a razão entre a quantidade de receptores pró- e anti-apoptóticos TRAIL nas duas linhas celulares. Deste modo, verificou-se que a razão entre os receptores pró-

apoptóticos (TRAIL-R1 + TRAIL-R2) e anti-apoptóticos (TRAIL-R3 + TRAIL-R4) é 1,4x superior nas células CEM comparativamente às células MOLT-4 (Figura 18).

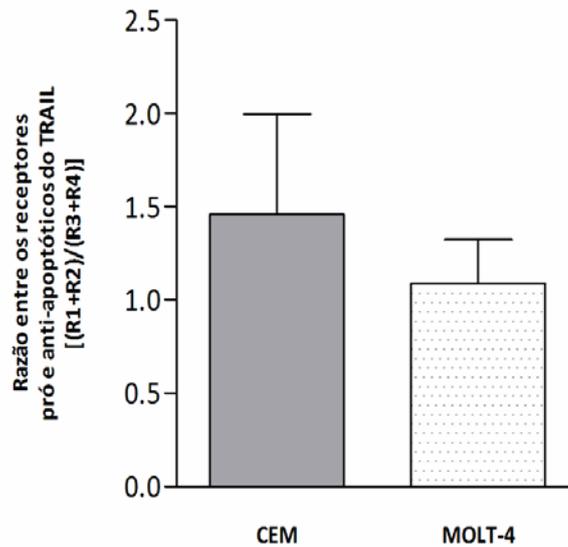


Figura 18 – Análise da razão entre a expressão dos receptores pró-apoptóticos, TRAIL-R1 e TRAIL-R2, e anti-apoptóticos, TRAIL-R3 e TRAIL-R4, respectivamente nas células CEM e MOLT-4. Os resultados representam a razão obtida entre os MIF dos receptores expressos, respectivamente, nas células CEM e MOLT-4, calculada pela fórmula $[(TRAIL-R1+TRAIL-R2)/(TRAIL-R3+TRAIL-R4)]$. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 2 ensaios independentes.

Do mesmo modo, a avaliação da expressão dos níveis de survivina, uma proteína anti-apoptótica frequentemente associada à resistência inata e/ou adquirida à quimioterapia e a recidivas em doentes com cancro, foi avaliada nas células CEM e MOLT-4. Neste sentido, como podemos avaliar pelos resultados expressos na tabela 4, verifica-se que todas as células das linhas celulares CEM e MOLT-4 expressam esta proteína intracelular, sendo que as células CEM apresentam uma quantidade de expressão 1,7x superior relativamente às células MOLT-4.

Quanto à expressão do receptor da transferrina (TfR), verifica-se que todas as células apresentam expressão deste receptor. No entanto, podemos observar na tabela 4 que as células CEM apresentam um nível de expressão aproximadamente 1,7x superior em relação às células MOLT-4 (515 ± 63 MIF vs 303 ± 79 MIF).

3.3. Efeito dos fármacos anticancerígenos na proliferação e morte celular

O conhecimento de proteínas chave envolvidas no processo apoptótico proporciona a possibilidade de utilização de novos fármacos direccionados a esses alvos moleculares. Neste sentido, foram utilizados neste trabalho três compostos distintos, nomeadamente o fármaco Dulanermin-rhTRAIL (*recombinant human TRAIL*), que é uma proteína recombinante do TRAIL endógeno que pode ligar-se ao TRAIL-R1 e/ou ao TRAIL-R2, induzindo morte celular por apoptose; e o ácido gambógico (GA) e a silibinina (SLB), que têm vindo a ser apontados como potenciais inibidores da proteína anti-apoptótica survivina.

Os efeitos citostáticos e citotóxicos induzidos por estes fármacos, nas linhas celulares CEM e MOLT-4, foram avaliados através da variação na densidade e viabilidade celular, por recurso ao teste de exclusão com azul de tripano. Por outro lado, foi também avaliado o tipo de morte celular induzido pelos diferentes fármacos, recorrendo à técnica de citometria de fluxo utilizando a dupla marcação anexina V/iodeto de propídeo, e pela avaliação das alterações morfológicas, por microscopia óptica.

3.3.1. Curvas de proliferação e viabilidade celular

Nas figuras 19, 20 e 21 estão representados os efeitos dos fármacos anticancerígenos, rhTRAIL, GA e SLB, respectivamente, na densidade e viabilidade das células CEM e MOLT-4. A análise das curvas de densidade e viabilidade celular obtidas para cada linha celular, quando incubadas na ausência e na presença destes compostos, dão-nos informações sobre os seus efeitos induzidos pelos compostos em estudo ao nível da proliferação e morte celular.

Neste sentido, verifica-se que os efeitos anti-proliferativo (citostáticos) e essencialmente citotóxicos dependem da concentração, do tempo de exposição das células aos diferentes fármacos em estudo (rhTRAIL, GA e SLB) e da linha celular em estudo.

Assim, quando as células CEM e MOLT-4 são incubadas com concentrações crescentes de rhTRAIL (Figura 19) verifica-se redução na velocidade de crescimento celular medida ao longo de 72 horas, relativamente ao controlo. Este efeito é

dependente da dose de fármaco administrada, isto é, quanto maior a concentração de rhTRAIL menor a densidade celular, sendo mais acentuado nas células CEM relativamente às células MOLT-4. A diminuição na densidade celular é acompanhada por diminuição na viabilidade das células CEM ao longo das 72h de incubação, registando-se redução da viabilidade celular para valores próximos dos 50%, quando as células foram tratadas com rhTRAIL 1000 ng/ml durante 72 horas (IC_{50}). No entanto, nas células MOLT-4 o efeito deste fármaco é mais moderado, sendo o máximo de diminuição da viabilidade celular de cerca de 35% observado às 24 horas de incubação, comparativamente às células não tratadas. Além disso verifica-se uma reversibilidade no efeito citotóxico deste composto após este período de incubação. A reversibilidade do efeito citostático é também observada na densidade celular. Deste modo, verifica-se que o fármaco rhTRAIL exerce maior acção anti-proliferativa e citotóxica nas células CEM do que nas células MOLT-4.

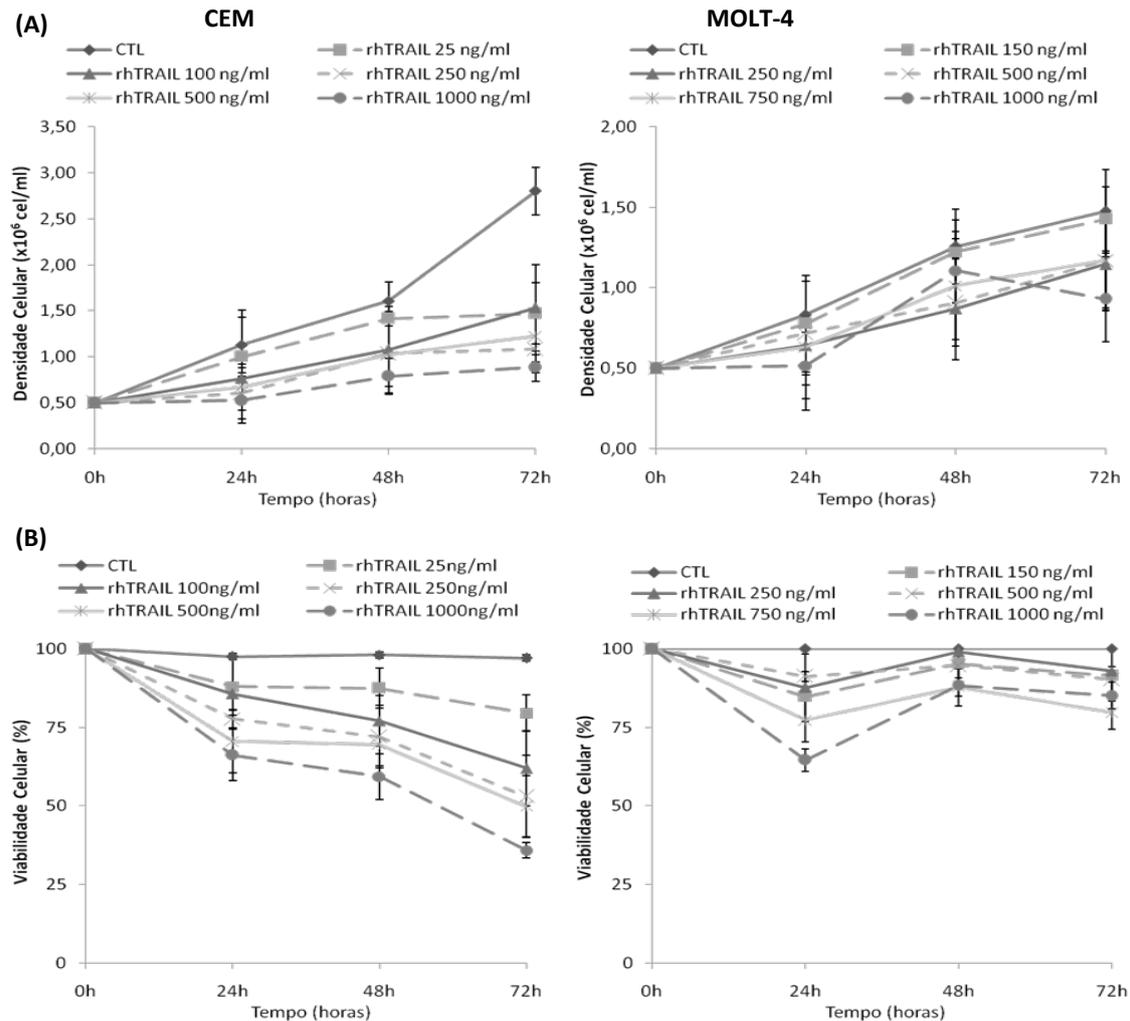


Figura 19 – Efeito do fármaco rhTRAIL na densidade (A) e na viabilidade (B) celular das células CEM e MOLT-4. As células CEM e MOLT-4 foram incubadas a uma densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ cel/ml, durante 72h, com diferentes concentrações de fármaco rhTRAIL, como indicado no gráfico. Após cada 24h horas de incubação recolheu-se uma amostra da suspensão celular e efectuou-se o teste de exclusão com azul de tripano, como descrito na secção material e métodos. O número de células representadas nas curvas de densidade celular diz exclusivamente respeito ao número de células viáveis. Os resultados relativos ao efeito deste fármaco na viabilidade das células MOLT-4 encontram-se normalizados ao controlo. Os resultados apresentados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes. CTL, controlo.

Seguidamente, avaliou-se o efeito dos fármacos inibidores da survivina, GA (Figura 20) e SLB (Figura 21), nas células CEM e MOLT-4, após 72 horas de incubação, tendo-se registado os valores de IC_{50} após 24 horas de incubação. Tal como observado com o rhTRAIL, o efeito dos fármacos é dependente da dose, do tempo de incubação e da linha celular. Assim, nas células CEM tratadas com GA e com SLB, o IC_{50} foi atingido para as concentrações de 400 nM e 100 μ M, respectivamente, enquanto que nas células MOLT-4 o IC_{50} para o GA foi de 750 nM e para a SLB de 25 μ M.

Neste sentido, podemos aferir que as células MOLT-4 necessitam de doses mais elevadas de fármaco GA para induzirem efeito citotóxico semelhante ao observado nas células CEM. Por outro lado, as células MOLT-4 mostram-se mais sensíveis à indução de morte celular induzida pela SLB, necessitando, assim, de doses mais baixas que as células CEM.

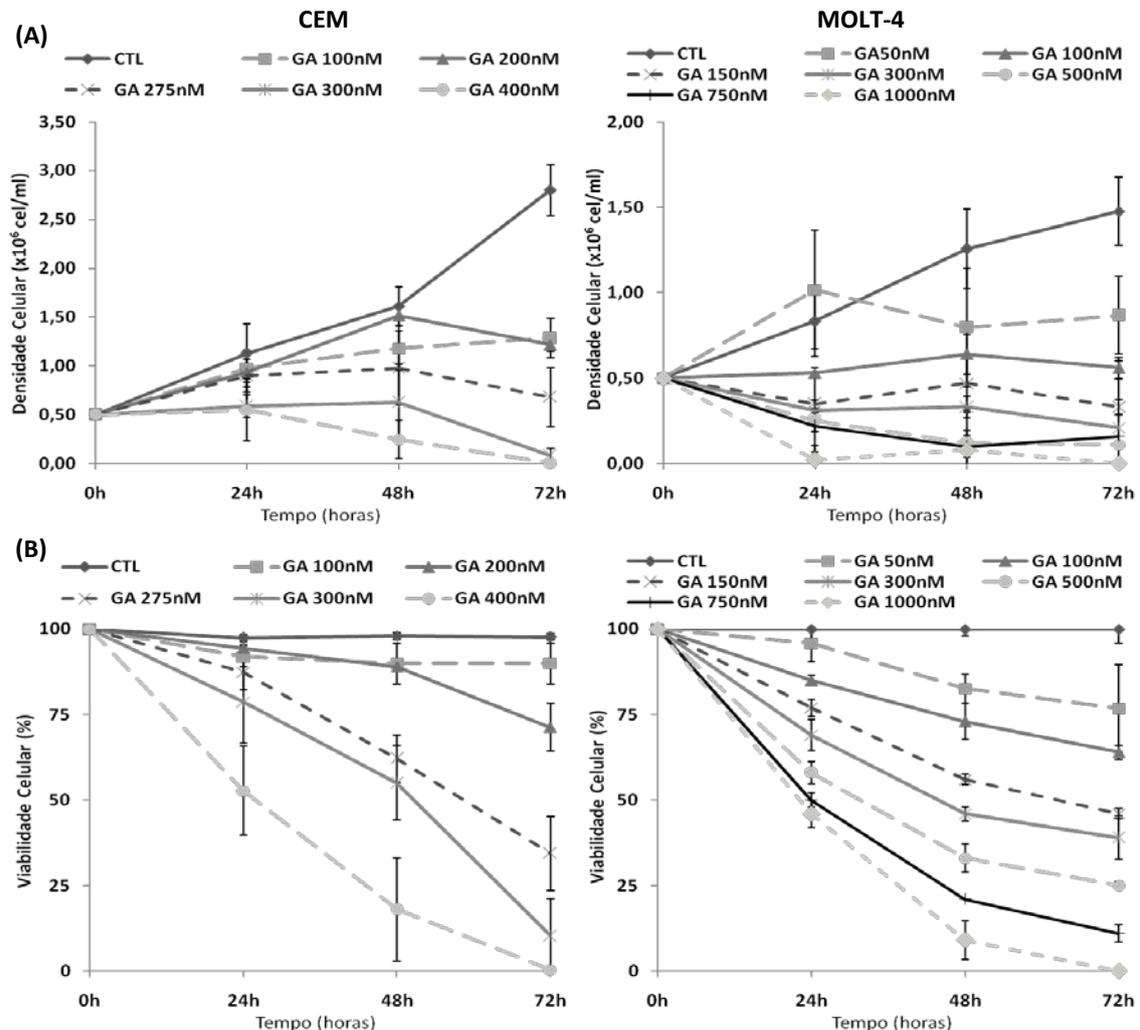


Figura 20 – Efeito do ácido gambóxico (GA) na densidade (A) e na viabilidade (B) celular das células CEM e MOLT-4. As células CEM e MOLT-4 foram incubadas a uma densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ cel/ml, durante 72h, com diferentes concentrações de fármaco GA, como indicado no gráfico. Após cada 24h horas de incubação recolheu-se uma amostra da suspensão celular e efectuou-se o teste de exclusão com azul de tripano, como descrito na secção material e métodos. O número de células representado nas curvas de densidade celular diz exclusivamente respeito ao número de células viáveis. Os resultados relativos ao efeito deste fármaco na viabilidade das células MOLT-4 encontram-se normalizados ao controlo. Os resultados apresentados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes. CTL, controlo.

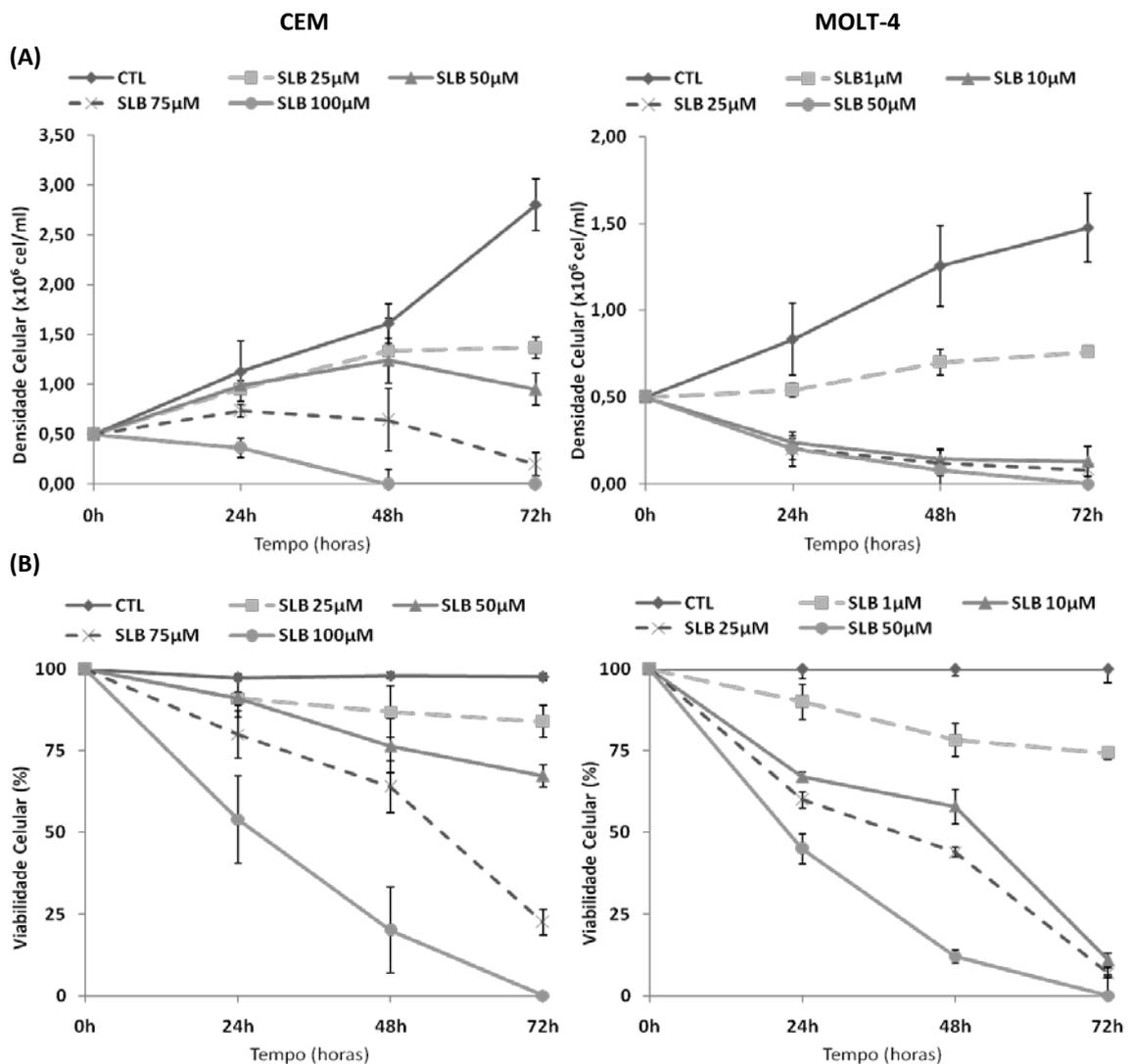


Figura 21 – Efeito da Silibinina (SLB) na densidade e na viabilidade celular das células CEM e MOLT-4. As células CEM e MOLT-4 foram incubadas a uma densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ cel/ml, durante 72h, com diferentes concentrações de fármaco SLB, como indicado no gráfico. Após cada 24h horas de incubação recolheu-se uma amostra da suspensão celular e efectuou-se o teste de exclusão com azul de tripano, como descrito na secção material e métodos. O número de células representado nas curvas de densidade celular diz exclusivamente respeito ao número de células viáveis. Os resultados relativos ao efeito deste fármaco na viabilidade das células MOLT-4 encontram-se normalizados ao controlo. Os resultados apresentados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes. CTL, controlo.

Posteriormente, foi avaliado se o modo de administração destes compostos tinha influência no efeito citostático e citotóxico dos mesmos. Assim, adicionou-se à cultura celular os compostos em estudo, a cada 24 horas de incubação, em concentrações inferiores às utilizadas em toma única, correspondentes ao IC_{20} , ou seja, concentrações capazes de induzir aproximadamente 20% de morte celular. O efeito biológico dos fármacos rhTRAIL, GA e SLB nas células MOLT-4 e CEM, segundo este modo de administração encontra-se registado nas figuras 23 e 24.

Assim, como se pode observar pela análise das figuras 23 e 24, de uma forma geral os diferentes compostos, rhTRAIL, GA e SLB, quando administrados diariamente em baixas doses induzem diminuição quer na densidade celular (Figura 23) quer na viabilidade celular (Figura 24) das células CEM e MOLT-4, de forma dependente do tempo de exposição. Este efeito citostático e citotóxico é superior ao observado quando as células são tratadas com a mesma concentração em administração única, após 72 horas de incubação, para as duas linhas celulares em estudo.

Assim, os efeitos citostáticos e citotóxicos induzidos pelo rhTRAIL em administração diária mostram-se mais notórios nas células CEM que nas células MOLT-4, mesmo numa dose de administrada menor (25 ng/ml* *versus* 50 ng/ml*). Por outro lado, as células MOLT-4 mostram-se mais sensíveis à terapêutica diária com a SLB (1 µM) do que as células CEM (25 µM). No entanto, quando as células CEM são tratadas com GA a 100 nM diariamente, não se verifica aumento do efeito citotóxico comparativamente com a administração única. Pelo contrário o efeito citostático e citotóxico do GA a 50 nM em administração diária nas células MOLT-4 mostra-se superior que em administração única.

Deste modo, podemos aferir que os efeitos citostáticos e citotóxicos da administração diária dos diferentes fármacos em baixas doses é mais evidente nas células MOLT-4.

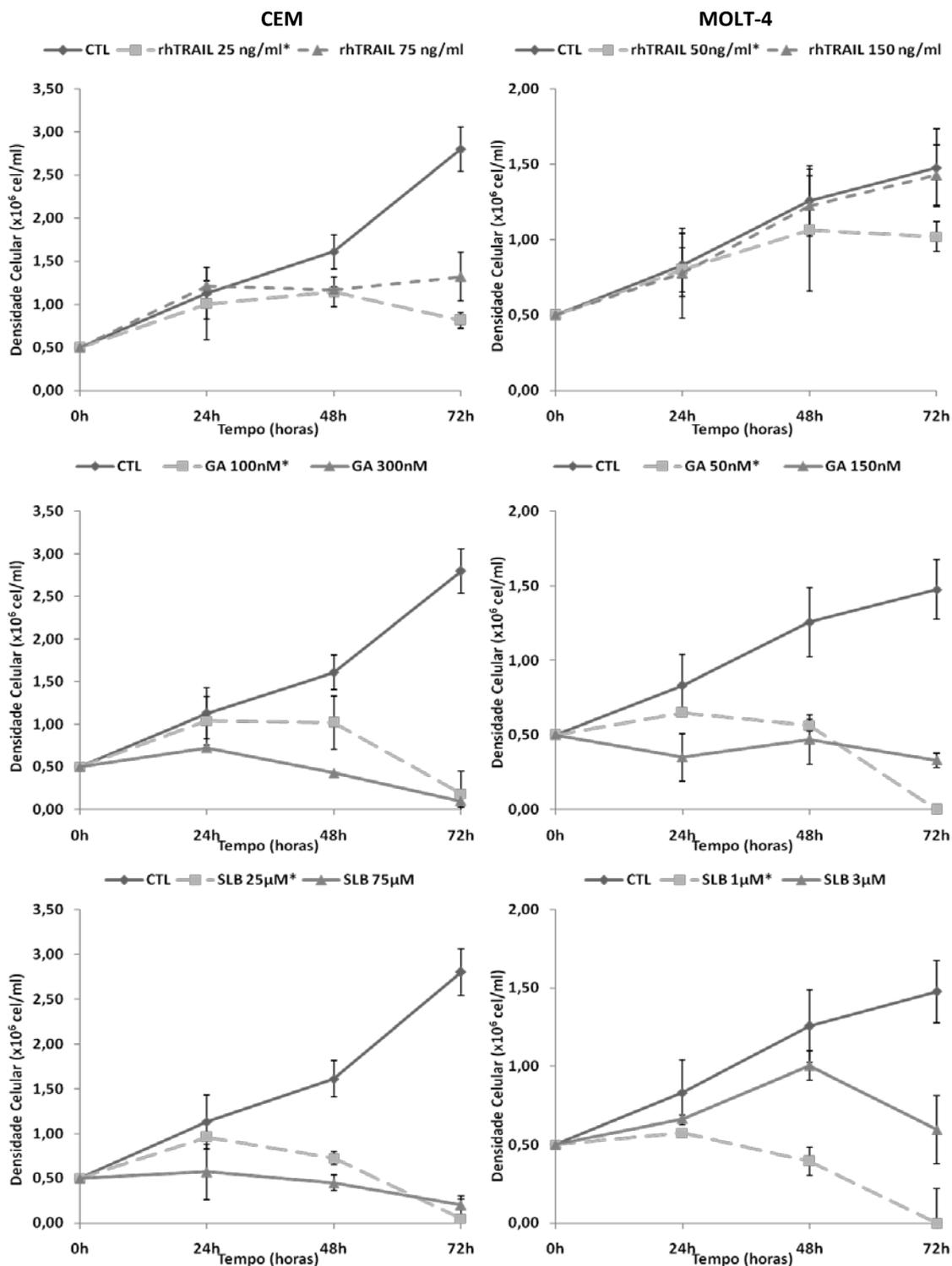


Figura 22 – Efeito da administração diária dos compostos rhTRAIL, GA e SLB na densidade das células CEM e MOLT-4. As células CEM e MOLT-4 foram incubadas a uma densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ cel/ml, durante 72h, com as concentrações de fármaco rhTRAIL, ácido gambóxico (GA) e Silibinina (SLB) indicadas no gráfico, onde o * corresponde à dose administrada diariamente. Após cada 24h horas de incubação recolheu-se uma amostra da suspensão celular e efectuou-se o teste de exclusão com azul de tripano, como descrito na secção material e métodos. O número de células representado nas curvas de densidade celular diz exclusivamente respeito ao número de células viáveis. Os resultados apresentados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes. CTL, controlo.

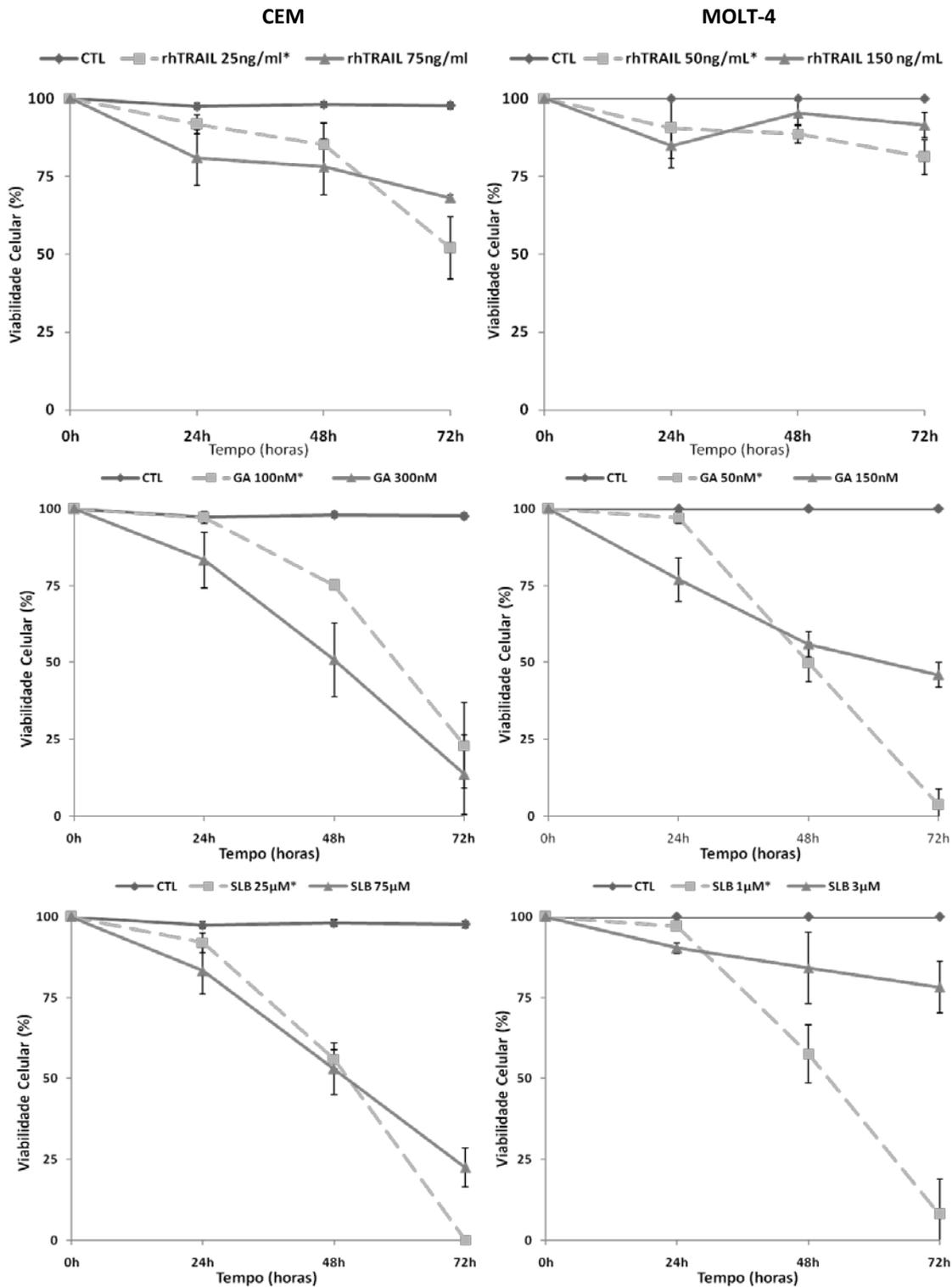


Figura 23 – Efeito da administração diária dos compostos rhTRAIL, GA e SLB na viabilidade das células CEM e MOLT-4. As células CEM e MOLT-4 foram incubadas a uma densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ cel/ml, durante 72h, com as concentrações de fármaco rhTRAIL, ácido gambógico (GA) e Silibinina (SLB) indicadas no gráfico, onde o * corresponde à dose administrada diariamente. Após cada 24h horas de incubação recolheu-se amostra da suspensão celular e efectuou-se o teste de exclusão com azul de tripano, como descrito na secção material e métodos. Os resultados relativos ao efeito dos diferentes fármacos na viabilidade das células MOLT-4 encontram-se normalizados ao controlo. Os resultados apresentados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes. CTL, controlo.

Quando se trata doentes com fármacos anti-cancerígenos convencionais verifica-se habitualmente o aparecimento de efeitos secundários, fruto das elevadas doses utilizadas nos esquemas terapêuticos bem como da forma como são administrados. Para além do mais, verifica-se que depois de um longo período de tratamento com o mesmo fármaco muitos doentes acabem por se tornar resistentes à terapêutica, o que pode conduzir ao aparecimento de recidivas hematológicas frequentes.

Neste sentido, após a realização dos testes com os diferentes fármacos em monoterapia, as células CEM e MOLT-4 foram incubadas na ausência e na presença do fármaco rhTRAIL em administração simultânea e com desfasamento de 4 horas entre a administração dos fármacos inibidores da survivina, GA e SLB, bem como com os compostos utilizados na quimioterapia convencional para o tratamento das LLA, doxorrubicina (DOX) e vincristina (VCR).

Como podemos observar, pela análise das figuras 24 e 25, quando as células CEM são tratadas com 100 nM de GA, 25 μ M de SLB, 100 nM de DOX ou 1 nM de VCR, em monoterapia, não se observou efeito citostático ou citotóxico significativo, tendo-se observado diminuição da viabilidade celular para valores nunca inferiores aos 80%, após 72 horas de incubação. No entanto, em associação simultânea com 25 ng/ml de rhTRAIL, observou-se potenciação do efeito citotóxico em todas as combinações terapêuticas, com excepção das combinações com o fármaco VCR. O efeito de potenciação das associações terapêuticas foi mais proeminente na associação da SLB com o rhTRAIL. Do mesmo modo, verificou-se que o efeito sinérgico é independente da forma de administração do composto, isto é, se administrarmos primeiro o fármaco rhTRAIL e passado 4 horas um dos outros fármacos ou vice-versa, não se verifica nenhum aumento na morte celular. Estas associações terapêuticas induzem também potenciação do efeito citostático destes fármacos.

No mesmo sentido, as células MOLT-4, foram tratadas com 50 nM de GA, 1 μ M de SLB, 20 nM de DOX ou 1 nM de VCR em monoterapia e em associação simultânea ou desfasada de 4 horas com 50 ng/ml de rhTRAIL. Assim, e como se pode observar nas figuras 24 e 25, verificou-se potenciação do efeito citostático em todas as combinações terapêuticas, com excepção das combinações com o fármaco VCR. Tal como observado nas células CEM, também nas células MOLT-4, a SLB é o composto

que tem maior efeito sinérgico nas células MOLT4. Podemos também aferir que nas células MOLT-4 o efeito de potenciação é resultado do modo de administração dos vários compostos, sendo a administração do rhTRAIL precedida dos outros compostos em estudo o melhor esquema terapêutico.

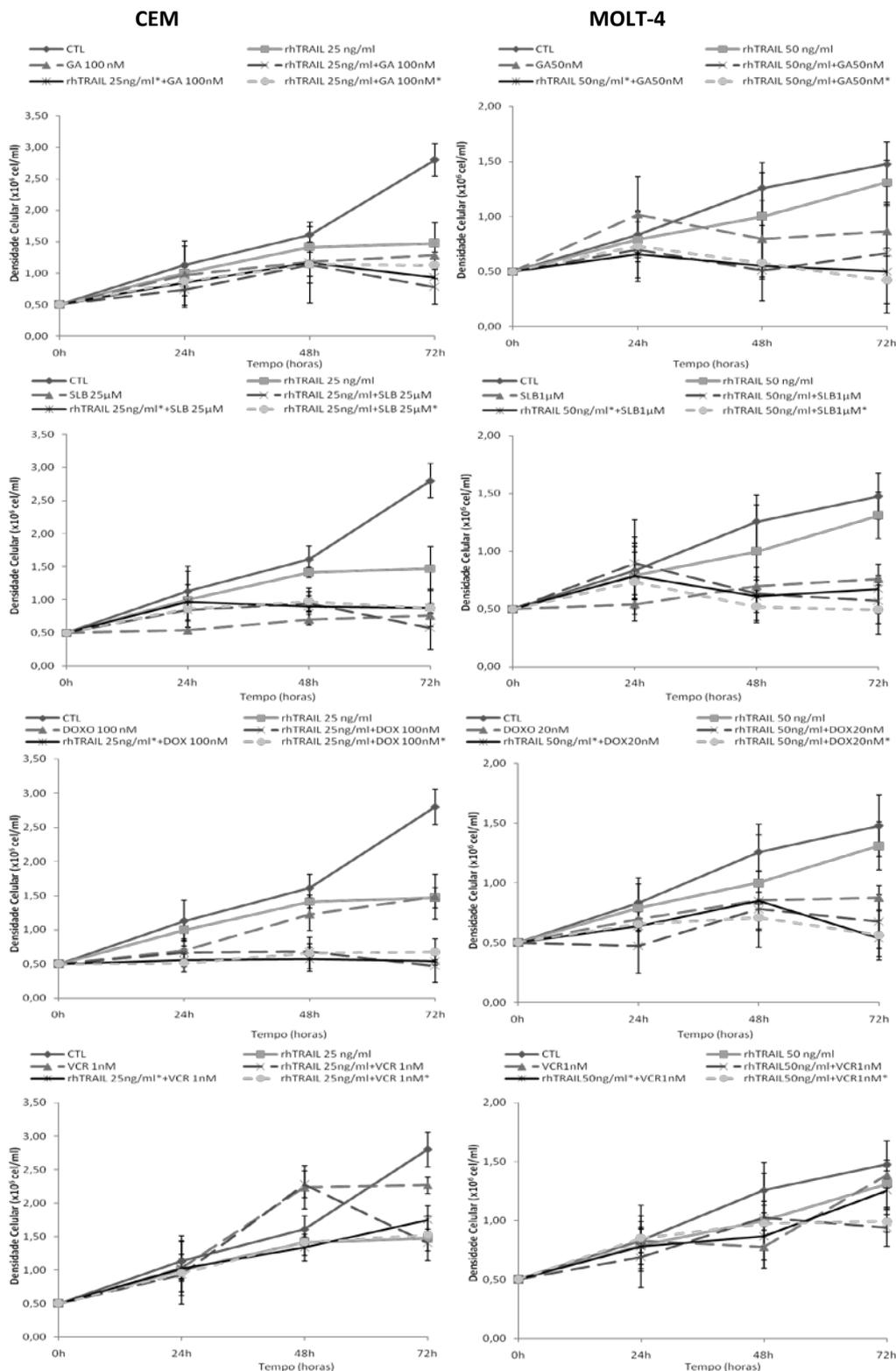


Figura 24 – Efeito da combinação terapêutica dos fármacos ácido gambóico (GA) e silibina (SLB), doxorrubicina (DOX) e vincristina (VCR) com o fármaco rhTRAIL na densidade das células CEM e MOLT-4, respectivamente. As células CEM e MOLT-4 foram incubadas a uma densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ cel/ml, durante 72h, com as concentrações de fármaco rhTRAIL, ácido gambóico (GA), Silibina (SLB), doxorrubicina (DOX) e vincristina (VCR) nas concentrações indicadas no gráfico, onde o * significa adição do fármaco com intervalo de 4 horas. Após cada 24h horas de incubação recolheu-se uma amostra da suspensão celular e efectuou-se o teste de exclusão com azul de tripano, como descrito na secção material e métodos. O número de células representado nas curvas de densidade celular diz exclusivamente respeito ao número de células viáveis. Os resultados apresentados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes. CTL, controlo.

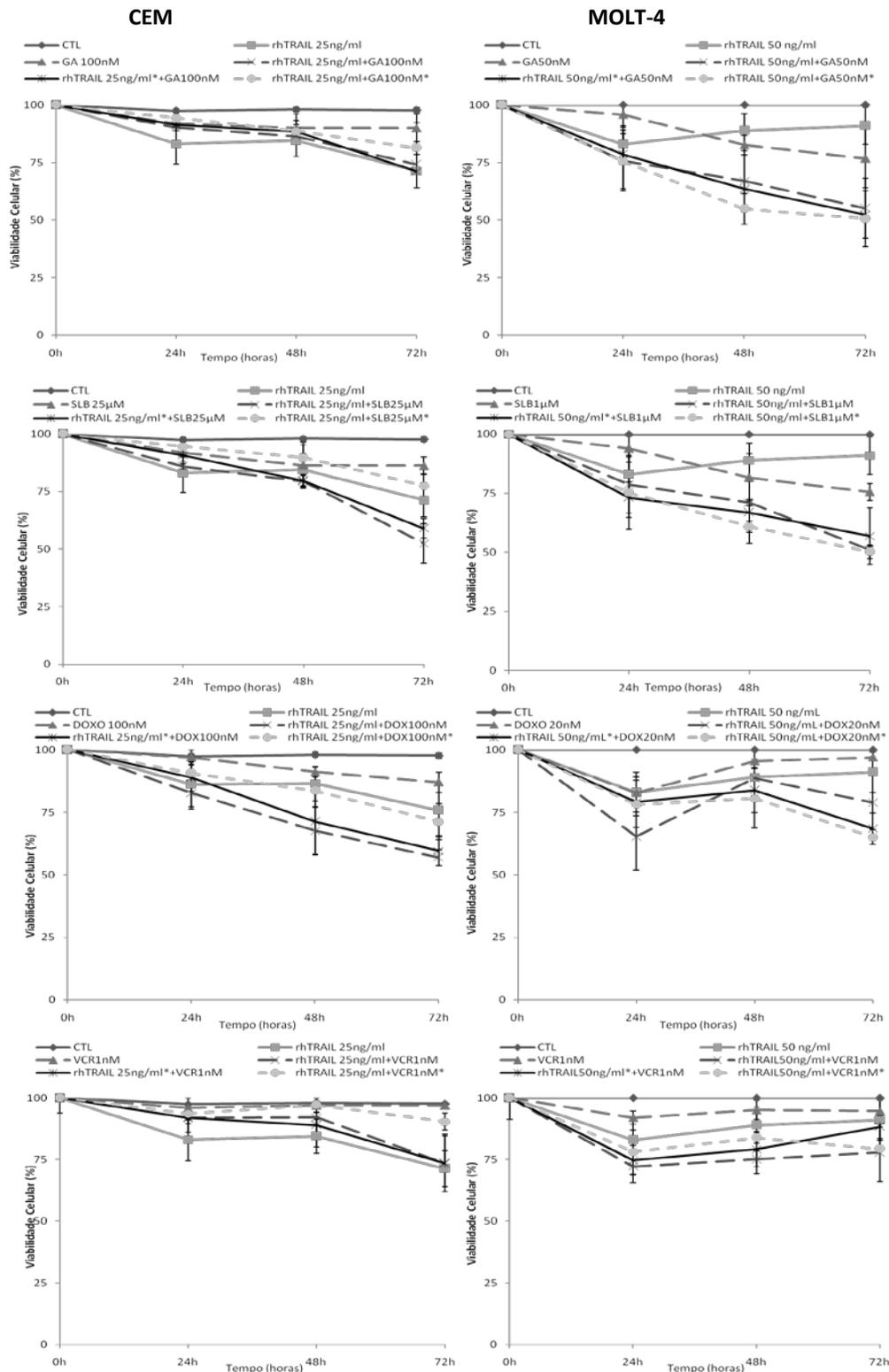


Figura 25 – Efeito da combinação terapêutica dos fármacos: ácido gambóico (GA) e silibina (SLB), doxorrubicina (DOX) e vincristina (VCR) com o fármaco rhTRAIL na viabilidade das células CEM e MOLT-4, respectivamente. As células CEM e MOLT-4 foram incubadas a uma densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ cel/ml, durante 72h, com as concentrações de fármaco rhTRAIL, ácido gambóico (GA), Silibina (SLB), doxorrubicina (DOX) e vincristina (VCR) nas concentrações indicadas no gráfico, onde o * significa adição do fármaco com intervalo de 4 horas. Após cada 24h horas de incubação recolheu-se uma amostra da suspensão celular e efectuou-se o teste de exclusão com azul de tripano, como descrito na secção material e métodos. Os resultados relativos ao efeito dos diferentes fármacos na viabilidade das células MOLT-4 encontram-se normalizados ao controlo. Os resultados apresentados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes. CTL, controlo.

3.3.2. Análise da morte celular por citometria de fluxo

Os efeitos citotóxicos dos fármacos rhTRAIL, GA e SLB, nas células CEM e MOLT-4 foram analisados por citometria de fluxo com recurso à dupla-marcação anexina V/Iodeto de Propídeo (IP). Esta técnica permite discriminar entre células viáveis e não viáveis através da alteração da permeabilidade e composição da membrana distinguindo-se se a morte celular ocorreu maioritariamente por apoptose ou necrose. Na figura 25 estão representados os gráficos representativos da viabilidade e do tipo de morte induzida pelos fármacos rhTRAIL, GA e SLB, respectivamente, nas células CEM e MOLT-4.

Como se pode observar os compostos induzem morte celular predominantemente por apoptose, no entanto, a percentagem de células que se encontram em apoptose e/ou necrose depende da concentração de cada fármaco e da linha celular em teste. De facto, as células MOLT4 parecem ser mais sensíveis ao GA e à SLB do que as células CEM, uma vez que se verifica uma diminuição da viabilidade e aumento da percentagem de células mais acentuada e com menor concentração de composto em relação ao utilizado nas células CEM (Figura 26).

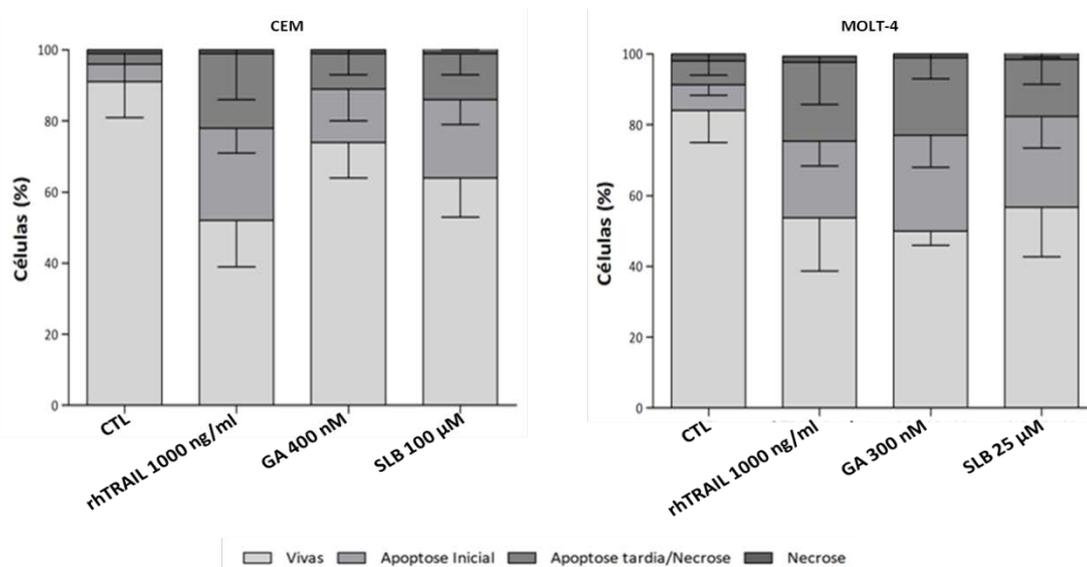


Figura 26 – Avaliação do efeito citotóxico induzido pelos fármacos rhTRAIL, ácido gambóxico (GA) e silibinina (SLB) nas células CEM e MOLT-4, por citometria de fluxo. As células CEM e MOLT-4 foram incubadas a uma densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ cel/ml, durante 24h, com as concentrações de fármaco rhTRAIL, ácido gambóxico (GA) e silibinina (SLB) indicadas na legenda da figura. Posteriormente as células foram marcadas com anexina V-APC e iodeto de propídeo (IP), de acordo com o descrito na secção material métodos, sendo possível distinguir entre percentagem de células vivas, em apoptose inicial, em apoptose tardia/necrose e/ou necrose. Os resultados apresentados em percentagem (%) representam a média \pm desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes. CTL, controle.

Assim, os fármacos rhTRAIL, GA e SLB induzem morte celular nas células CEM e MOLT-4 predominantemente por apoptose inicial e por apoptose tardia/necrose. Contudo, é de salientar que apesar dos resultados obtidos na secção 3.3.1 em que as curvas relativas ao efeito citotóxico do rhTRAIL em ambas as linhas celulares evidenciavam baixa eficiência terapêutica, os resultados da citometria de fluxo comprovam que o fármaco rhTRAIL, após 24 horas de exposição, reduz a viabilidade para cerca de 45-50% quando comparado com o controlo, quer nas células CEM quer nas células MOLT-4. Este resultado deve-se ao facto das células em apoptose inicial ainda possuírem a membrana citoplasmática íntegra, não permitindo, a entrada do corante azul de tripano, impossibilitando a sua discriminação das células viáveis.

O efeito citotóxico das associações terapêuticas foi também avaliado por citometria de fluxo (Figura 27). No caso das células CEM estes ensaios foram realizados em administração simultânea, enquanto que nas células MOLT-4 foram realizados em adição desfasada de 4 horas entre fármacos, pois revelou-se o melhor esquema terapêutico pela análise das curvas de viabilidade celular (Figura 25).

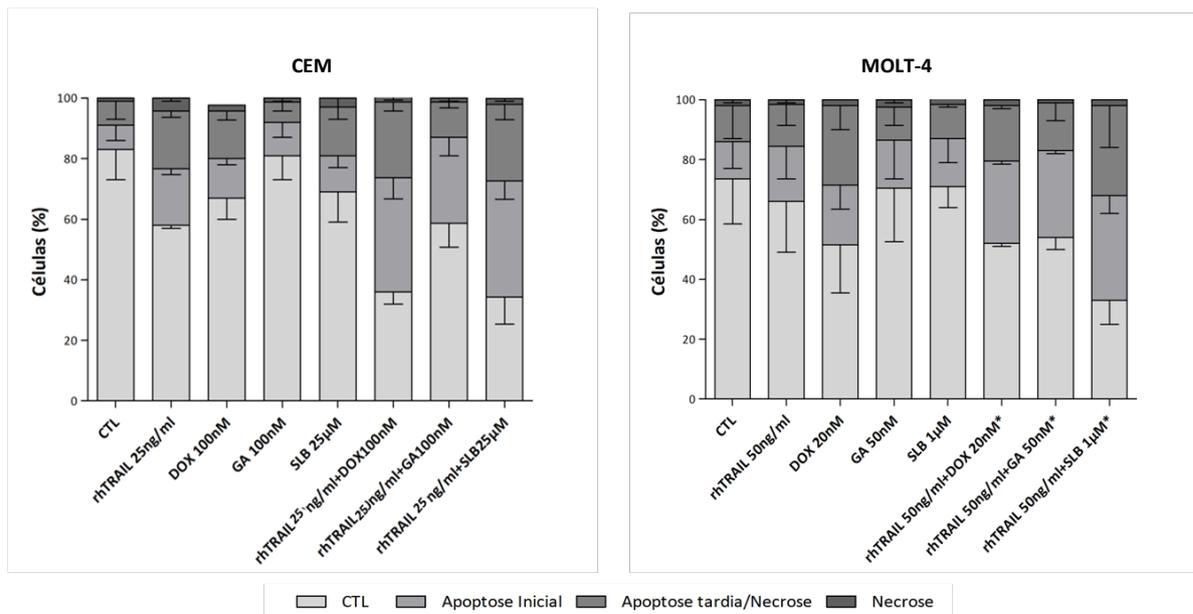


Figura 27 – Avaliação do efeito citotóxico induzido pela combinação terapêutica de ácido gambóico (GA) e silibinina (SLB), doxorubicina (DOX) e vincristina (VCR) com o fármaco rhTRAIL nas células CEM e MOLT-4, por citometria de fluxo. As células CEM e MOLT-4 foram incubadas a uma densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ cel/ml, durante 72h, com as concentrações de fármaco rhTRAIL, ácido gambóico (GA), Silibinina (SLB), doxorubicina (DOX) e vincristina (VCR) nas concentrações indicadas no gráfico, onde o * significa adição do fármaco com intervalo de 4 horas. Após as 72 horas de incubação as células foram marcadas com anexina V-APC e iodeto de propídeo (IP), de acordo com o descrito na secção material e métodos, sendo possível distinguir entre percentagem de células vivas, em apoptose inicial, em apoptose tardia/necrose e/ou necrose. Os resultados apresentados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes. CTL, controlo.

Os resultados obtidos mostram que o efeito citotóxico induzido pelos diferentes fármacos, GA, SLB e DOX, nas células CEM e MOLT-4, nas concentrações indicadas na legenda da figura 27, em monoterapia corresponde a uma percentagem inferior a 30% relativamente ao controlo, sendo que o tipo de morte celular é predominantemente por apoptose. Quando associamos estes fármacos com o fármaco rhTRAIL verifica-se que há um aumento da percentagem de células em apoptose e morte. De acordo com os resultados referidos no ponto anterior, para as curvas de viabilidade celular, verificamos que os efeitos sinérgicos mais evidentes se observam para ambas as linhas celulares na combinação do fármaco rhTRAIL com a silibinina, um composto que inibe a actividade da proteína pró-apoptótica survivina. Por outro lado, e como se pode verificar na figura 27, a associação de rhTRAIL com GA nas células CEM e de rhTRAIL com DOX nas células MOLT-4 não apresenta efeito sinérgico.

3.3.3. Análise do tipo de morte celular por morfologia celular

O efeito citotóxico induzido pelos diferentes fármacos em estudo rhTRAIL, GA e SLB foram também caracterizados pela análise da morfologia celular por microscopia óptica na ausência e na presença destes compostos.

A figura 28 mostra os aspectos morfológicos característicos dos efeitos citotóxicos induzidos pelos fármacos anticancerígenos rhTRAIL, GA e SLB, em esfregaços de células CEM e MOLT-4, corados com solução *May-Grünwald-Giemsa*.

Como podemos observar na figura 28, as células tratadas com o fármaco rhTRAIL na concentração 1000 ng/ml, apresentam características morfológicas características de células em apoptose, com várias projecções citoplasmáticas (*blebs*), contracção celular e fragmentação nuclear, o que está de acordo com os resultados obtidos anteriormente.

Características semelhantes são também observadas quando as linhas celulares em estudo são tratadas na presença de GA a 400 nM e 300 nM e de SLB a 100 µM e 25 µM, respectivamente para as células CEM e MOLT-4.

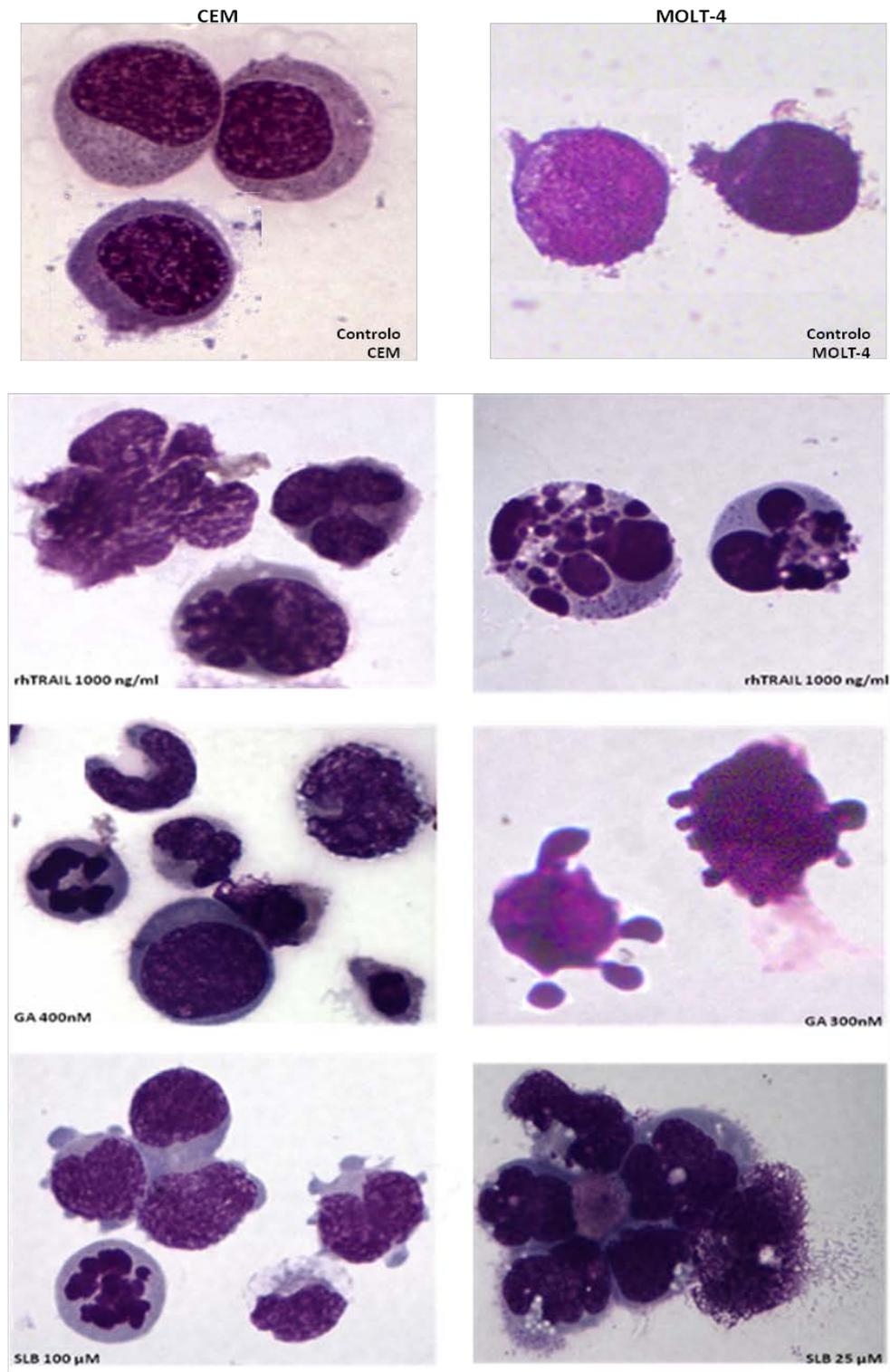


Figura 28 – Aspectos morfológico das células CEM e MOLT-4 na ausência de tratamento e após tratamento com rhTRAIL, ácido gambógico (GA) e silibinina (SLB). As linhas celulares em estudo foram incubadas a uma densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ cel/ml na ausência (controlo) e na presença de rhTRAIL a 1000 ng/ml, GA a 400 nM e 300 nM e SLB a 100 μ M e 25 μ M, respectivamente para as células CEM e MOLT-4. Após um período de incubação de 24 horas efectuaram-se esfregaços de células e coloração com solução de *May-Grünwald-Giemsa*, de acordo com o descrito na secção material e métodos. As células foram observadas ao microscópio óptico a uma ampliação de 500x.

3.4. Influência dos fármacos anticancerígenos na expressão de moléculas envolvidas na morte celular por apoptose

Com o objectivo de esclarecer alguns dos mecanismos envolvidos na morte celular por apoptose induzida pelos compostos em estudo nas células de LLA-T foi avaliada a expressão de moléculas envolvidas na regulação da morte celular por apoptose, nomeadamente a proteína caspase 3 activada bem como o citocromo *c*.

A tabela 5 representa o efeito dos fármacos anticancerígenos na expressão do citocromo *c* e da caspase 3 activada nas células CEM e MOLT-4. Como se pode observar pela tabela 5 o tratamento das células CEM com rhTRAIL numa concentração de 1000 ng/ml aumenta a expressão de citocromo *c* em cerca de 10%, de forma mais significativa que de caspase 3 activada (4%), ao contrário do que acontece nas células MOLT-4 tratadas nas mesmas condições, em que existe aumento mais acentuado na expressão da caspase 3 activada, sendo este aumento de 14%.

Por outro lado, nas células CEM tratadas com GA numa concentração de 400 nM não se verificam grandes diferenças de expressão nestas moléculas relativamente ao controlo. No entanto, nas células MOLT-4 tratadas com 300 nM de GA verifica-se mesmo diminuição nos níveis de citocromo *c*, acompanhada de aumento de 25% nos níveis da caspase 3 activada. Relativamente ao efeito do fármaco SLB no tratamento das células CEM, verifica-se aumento de 24% na expressão de citocromo *c* acompanhada de ligeiro aumento na expressão dos níveis de caspase 3 activada (5%). Em relação às células MOLT-4 tratadas com 25 μ M de SLB verifica-se que há aumento de 8% na expressão de caspase 3 activada com ligeiro aumento dos níveis de citocromo *c* (4%).

Tabela 5 – Influência dos fármacos anticancerígenos na expressão de citocromo c e caspase 3 activada, nas células CEM e MOLT-4 respectivamente.

Condição Incubação	Concentração	Citocromo c (MIF)		Caspase 3 activada (MIF)	
		CEM	MOLT-4	CEM	MOLT-4
CTL	-----	47 ± 21	46 ± 28	30 ± 8	23 ± 18
rhTRAIL	1000 ng/ml	57 ± 22	48 ± 26	34 ± 10	37 ± 11
GA	300 nM		19 ± 0		48 ± 0
	400 nM	47 ± 26		30 ± 14	
SLB	25 µM		50 ± 29		
	100 µM	63 ± 24		35 ± 14	31 ± 11

As células foram incubadas por um período de 24 horas, na ausência e na presença dos fármacos anticancerígenos, rhTRAIL, ácido gambóico (GA) e silibinina (SLB), nas concentrações referidas na tabela. Posteriormente as células foram marcadas com anticorpos, anti-citocromo c-FITC e anti-caspase 3 activada-FITC, de acordo com o descrito na secção material e métodos. Os resultados encontram-se expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média ± desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes. Não se observou diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo ($p < 0,05$, teste ANOVA). CTL, controlo.

Assim, podemos dizer que os fármacos anticancerígenos em estudo de uma maneira geral aumentam a expressão intracelular de citocromo c, bem como de caspase 3 activada.

3.5. Influência dos fármacos anticancerígenos no ciclo celular

Muitos fármacos têm efeito antiproliferativo por activação dos *check-points* celulares induzindo bloqueio do ciclo celular, sendo reconhecidos como ciclo-dependentes.

Para caracterizar o efeito do rhTRAIL, GA e SLB na distribuição das células CEM e MOLT-4 pelas diferentes fases do ciclo celular, analisou-se por citometria de fluxo, o conteúdo de ADN após marcação prévia das células com solução de Iodeto de Propídeo/RNase, de acordo com o descrito na secção de material e métodos.

A tabela 6 mostra a distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular tanto na linha celular CEM como MOLT-4. Assim, verifica-se que as células CEM e MOLT-4 na ausência de tratamento encontram-se maioritariamente em fase G0/G1 e

S. No entanto, quando as células são incubadas na presença de SLB observa-se ligeiro aumento da percentagem de células em fase G0/G1 em relação às células controlo (CEM: CTL 45±5%, SLB 53±8%; MOLT-4: CTL 57±3%, SLB 63±6%), com diminuição da percentagem de células em fase S (CEM: CTL 41±10%, SLB 32±9%; MOLT-4: CTL 41±5%, SLB 35±7%). Quando as células são incubadas com GA verifica-se um ligeiro aumento da percentagem de células em G2/M, sendo o efeito mais acentuado nas células CEM (CEM: CTL 14±7%, GA 23±6%; MOLT-4: CTL 3±2%, GA 7±0%). No entanto as alterações observadas não são estatisticamente significativas.

Tabela 6 – Influência dos fármacos anticancerígenos na distribuição das células CEM e MOLT-4 pelas diferentes fases do ciclo celular.

	Condição Incubação	% de Células			
		Pré-G0/G1	G0/G1	S	G2/M
CEM	Controlo	0 ± 0	45 ± 5	41 ± 10	14 ± 7
	rhTRAIL 1000 ng/ml	9 ± 4	46 ± 7	43 ± 8	12 ± 6
	GA 400 nM	6 ± 3	48 ± 4	29 ± 7	23 ± 6
	SLB 100 µM	8 ± 4	53 ± 8	32 ± 9	16 ± 6
MOLT-4	Controlo	3 ± 4	57 ± 3	41 ± 5	3 ± 2
	rhTRAIL 1000 ng/ml	6 ± 1	62 ± 4	36 ± 5	2 ± 0
	GA 300 nM	24 ± 0	57 ± 0	36 ± 0	7 ± 0
	SLB 25 µM	13 ± 8	63 ± 6	35 ± 7	3 ± 1

As células foram incubadas por um período de 24 horas, com os fármacos anticancerígenos, rhTRAIL, ácido gambóico (GA) e silibinina (SLB), nas concentrações referidas na tabela. Posteriormente foram avaliadas as diferentes fases do ciclo celular de acordo com o descrito na secção de material e métodos. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes, que se encontram expressos em percentagem (%) de células em cada fase do ciclo celular. Não se observou diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo ($p < 0,05$, teste ANOVA). CTL, controlo.

Além disso, observa-se o aparecimento de um pico pré-G0/G1, mais acentuado nas células MOLT4 tratadas com GA e SLB. Estes resultados confirmam, mais uma vez, a indução de apoptose.

3.6. Influência dos fármacos anticancerígenos no potencial de membrana mitocondrial

Para avaliar possíveis alterações no potencial de membrana mitocondrial pelos compostos em estudo, determinou-se o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{mit}$) das células CEM e MOLT-4 por citometria de fluxo, na ausência e na presença dos compostos rhTRAIL, GA e SLB, com recurso à sonda fluorescente JC1, nas condições descritas na secção material e métodos.

Na figura 29 observam-se as alterações do potencial de membrana mitocondrial, expressas pela razão monómeros/ agregados de JC1 (M/A), nas células CEM e MOLT-4, na ausência (controlo) e na presença dos compostos em estudo. Os resultados obtidos são dependentes da linha celular e do tipo de fármaco em estudo.

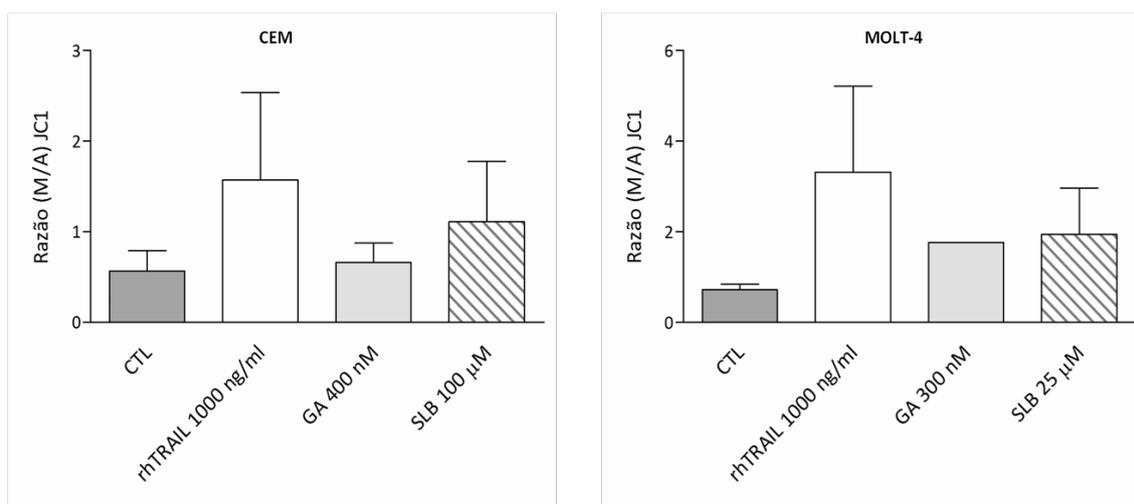


Figura 29 – Avaliação do potencial de membrana mitocondrial nas células CEM e MOLT-4, incubadas na ausência e na presença dos fármacos anticancerígenos. As células foram incubadas por um período de 24 horas, com os fármacos anticancerígenos, rhTRAIL, ácido gambóxico (GA) e silibinina (SLB), nas concentrações referidas na figura. Posteriormente, o potencial de membrana mitocondrial foi avaliado por citometria de fluxo por recurso à sonda fluorescente JC-1, como descrito na secção de material e métodos. Os resultados são expressos pela razão monómeros/agregados de JC1 (M/A JC1) e representam a média \pm desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes. Não se observou diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo ($p < 0,05$, teste ANOVA). CTL, controlo.

Como se pode verificar pela análise da figura 29, quando as células CEM e MOLT-4 são tratadas com os diferentes fármacos anticancerígenos, verifica-se aumento da razão M/A de JC1, em todas as condições testadas, sendo que estes resultados são mais evidentes na linha celular MOLT-4, relativamente ao controlo

(CTL). Por outro lado, verifica-se que esta razão é consideravelmente maior quando as células são tratadas com rhTRAIL 1000 ng/ml comparativamente com os outros fármacos.

Capítulo 4. Discussão

A evasão da morte celular, nomeadamente por apoptose, surge como um dos mecanismos chave para o aparecimento e desenvolvimento do cancro e representa um ponto crucial para a aquisição de resistência ao tratamento convencional e ao aparecimento de recidivas frequentes (Fulda, S. & Vucic, D., 2012).

A maioria dos fármacos anti-cancerígenos convencionais induzem morte celular tendo como principais focos de acção a indução de stresse celular e de lesões no ADN, bloqueando a replicação de ADN e, deste modo, a divisão celular (Mahalingam, D. *et al.*, 2009). Neste sentido, a reactivação dos mecanismos de morte celular mostra-se uma estratégia promissora para superar um dos maiores problemas da Oncologia clínica, a aquisição de resistências ao tratamento convencional, bem como o aparecimento de recaídas frequentes (Fulda, S. & Vucic, D., 2012).

Nas últimas décadas, com a descoberta dos membros da família do TNF (*tumor necrosis factor*) e dos seus respectivos receptores de morte, uma nova geração de fármacos tem vindo a ser desenvolvida, de forma a colmatar as falhas evidentes da quimioterapia convencional, e a activar a apoptose dirigida à célula tumoral de forma independente da p53 (Hellwig, C. & Rehm, M., 2012).

O TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) ou APO2L (APO2 ligand) é um membro da superfamília de citocinas do TNF (*tumor necrosis factor*), que pode ligar-se a quatro tipos de receptores da membrana celular, os receptores de morte 4 e 5 (DR4/TRAIL-R1 e DR5/TRAIL-R2), que activam a apoptose, e os receptores armadilha (*decoy receptors*) 1 e 2 (DcR1/TRAIL-R4 e DcR2/TRAIL-R3), que actuam de forma oposta aos primeiros. Esta proteína apresenta características ímpares em relação aos seus parentes, nomeadamente a sua capacidade selectiva de indução de morte celular numa elevada percentagem de células tumorais *in vitro* e *in vivo* com baixa toxicidade nas células normais (Dimberg, L. *et al.*, 2012). Assim, a descoberta do TRAIL possibilitou a produção de um novo fármaco capaz de induzir morte celular nas células cancerígenas com pouca toxicidade nas células normais, uma vez que nas células cancerígenas a expressão dos receptores de morte, TRAIL-R1 e TRAIL-R2, é superior à das células não neoplásicas (Johnstone, R. *et al.*, 2009).

Actualmente estão em desenvolvimento pelo menos seis fármacos agonistas dos receptores DR4 e DR5. Uns são anticorpos monoclonais, como o Canatumumab, Lexatumumab, Mapatumumab, CS-1008 e PRO95780; outros que foram também

desenvolvidos são os TRAIL recombinantes (rhTRAIL, *recombinant human TRAIL*), nomeadamente o rhTRAIL/APO2L (Dulanermin) (Yerbs, R. *et al.*, 2011; Dimberg, L. *et al.*, 2012). O efeito destes agentes em monoterapia está claramente comprovado com respostas significativas em tumores sólidos avançados, nomeadamente no adenocarcinoma do pulmão, bem como no sarcoma sinovial (Dimberg, L. *et al.*, 2012). No entanto, o seu potencial terapêutico em leucemias não está ainda totalmente esclarecido.

Além disso, verifica-se que apesar do TRAIL induzir apoptose de forma preferencial nas células cancerígenas, nem todas as células tumorais apresentam sensibilidade ao TRAIL. Assim, múltiplos mecanismos têm sido associados à resistência de algumas células ao sinal efectivo de morte celular mediado por este ligando, nomeadamente o aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas, como a survivina (Mahalingam, D. *et al.*, 2009).

A survivina é um membro da família das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs), que está habitualmente associada ao aumento da resistência tumoral, por inactivar a acção de agentes quimioterapêuticos e por interferir com moléculas envolvidas na apoptose celular, nomeadamente as caspases 3, 7 e 9, estando a sua sobreexpressão correlacionada com um pior prognóstico em doentes com tumores sólidos, leucemias agudas e linfomas (Fukuda, S. & Pelus, L., 2001; Fukuda, S. & Pelus, L., 2006). Neste sentido, encontram-se em estudo vários moduladores da resistência à apoptose, nomeadamente os compostos naturais Ácido Gambóxico (GA) e Silibinina (SLB), que têm sido apontados como potenciais inibidores da acção anti-apoptótica da IAP survivina (Wang, T. *et al.*, 2008; Li, L. *et al.*, 2010). Assim, o recurso a compostos que inibem ou diminuem a expressão da proteína anti-apoptótica survivina, mostra-se uma estratégia promissora, no sentido de contornar uma das principais causas da falência da quimioterapia convencional e também da acção efectiva do sinal de morte levada a cabo por agonistas de ligandos de receptores de morte, como é o rhTRAIL (Tan, W. *et al.*, 2011).

Tendo em linha de conta estas observações e apesar dos estudos efectuados com os fármacos Dulanermin/rhTRAIL recombinante (rhTRAIL, *recombinant human TRAIL*), ácido gambóxico (GA) e silibinina (SLB), revelarem bons resultados em vários

tipos de cancro, a sua eficácia terapêutica em neoplasias hematológicas, em particular na recidiva da doença, ainda não está bem esclarecida. Deste modo, o presente trabalho teve como principal objectivo avaliar o potencial terapêutico destes fármacos na modulação da resposta à apoptose, em leucemias agudas, nomeadamente na recidiva da doença.

Além disso, tendo em conta que uma das estratégias mais promissoras no tratamento da patologia tumoral se relaciona com a acção combinada de vários fármacos, avaliou-se também o potencial terapêutico do fármaco rhTRAIL em leucemias agudas em associação terapêutica com os fármacos GA e SLB, bem como com os fármacos anti-cancerígenos convencionais, doxorrubicina (DOX) e vincristina (VCR).

Para o efeito foram utilizadas como modelo *in vitro* duas linhas celulares de leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T), as células CEM, obtidas a partir de uma criança caucasiana do sexo feminino, de 4 anos de idade, e as células MOLT-4, estabelecidas a partir de um indivíduo do sexo masculino, de 19 anos de idade, no decurso e na recidiva hematológica da doença, respectivamente.

Assim, os resultados obtidos neste trabalho mostram que os novos fármacos em estudo, nomeadamente o rhTRAIL, ácido gambóxico e silibinina induzem diminuição na proliferação e viabilidade celular de uma forma dependente da dose, do tempo de exposição, do tipo de administração e da linha celular em estudo.

Os resultados obtidos com o fármaco rhTRAIL nas células CEM e MOLT-4, em monoterapia, sugerem que este agente induz um efeito citostático e citotóxico mais acentuado nas células CEM, tendo-se registado o IC₅₀ após 72 horas de tratamento, para uma concentração de 500 ng/ml. Não obstante, apesar das células MOLT-4 também terem sido expostas a concentrações crescentes de rhTRAIL não se verificou redução da viabilidade celular destas células para os 50%, mesmo em doses mais elevadas, verificando-se mesmo uma reversibilidade no efeito citotóxico induzido por este composto após 48 horas de incubação. Estes resultados estão de acordo com os estudos realizados por Rezacova, M. *et al.* (2008), para gamas de concentrações de rhTRAIL (ALEXIS) entre os 10 e os 100 ng/ml. Estudos semelhantes nas células JURKAT e MOLT-4 revelaram que, de forma semelhante ao que obtivemos, estas células

apresentam um painel de resposta ao rhTRAIL (ALEXIS) diferente, sendo que as primeiras são mais sensíveis, apresentando as células MOLT-4 alguma resistência ao tratamento. Na mesma linha de estudo, no nosso laboratório, Coelho, S. (2009) mostrou que em linhas celulares de leucemia mielóide, as células HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e as células K-562 (leucemia mielóide crónica) o efeito citostático e citotóxico induzido pelo fármaco rhTRAIL (AMGEN) são mais acentuados nas células HL-60 que nas células K-562, para as mesmas condições de tratamento. Estes resultados foram também comprovados por Hietakangas, V. *et al.*, 2003, nas células K-562 utilizando outra variante de rhTRAIL (ALEXIS) e nas células HL-60 por Scchiero, P. *et al.* (2003) utilizando uma proteína Histidina-rhTRAIL.

No entanto, a resistência à terapêutica com o rhTRAIL verificada em algumas linhas celulares pode ser contornada recorrendo à terapêutica combinada. De facto, segundo, Wudtiwai, B. (2011), a associação do rhTRAIL (ALEXIS) com metoxiflavonas (flavonoide obtido de *Kaempferia parviflora*) induz potenciação do efeito citotóxico deste fármaco nas células MOLT-4 e nas células U937 (células monocíticas). Também, Coelho, S. (2009) mostra que a associação terapêutica do fármaco rhTRAIL (AMGEN) com os fármacos ácido *all trans* retinóico (ATRA) e Imatinib, nas células HL-60 e K-562, respectivamente, induzem um efeito sinérgico de potenciação.

Actualmente, encontram-se em curso quatro ensaios clínicos (fase I/II) com fármacos, que resultam da combinação do fármaco Dulanermine com outros agentes reguladores das vias de sinalização celular, como moduladores epigenéticos, inibidores da via do fofatidilinositol-3-fosfato (PI3K), com comprovados efeitos em tumores do pulmão de não pequenas células e em linfomas não-Hodgkin (Hellwig, C. & Rehm, M., 2012).

Esta diferença na resposta ao tratamento com este fármaco nas linhas celulares de LLA-T em estudo pode, no entanto, ser justificada devido ao facto das células CEM comparativamente com as células MOLT-4 apresentarem uma razão entre a expressão basal de receptores pró-apoptóticos (TRAIL-R1, TRARIL-R2) e anti-apoptóticos (TRAIL-R3, TRAIL-R4) superior à observada nas células MOLT-4 (Holoach, P. & Griffith, T., 2009; Park, S. *et al.*, 2010; Picarda, G. *et al.*, 2010; Horinaka, M. *et al.*, 2012). Estes resultados podem contribuir para a maior sensibilidade à morte celular induzida pelo rhTRAIL nas

células CEM. De facto, Coelho, S. (2009) já havia reportado que a resposta diferencial ao tratamento com o fármaco rhTRAIL (AMGEN) verificada nas células K-562 e HL-60, poderia dever-se ao facto de as células K-562 apresentarem maior percentagem de células a expressar receptores anti-apoptóticos do TRAIL (TRAIL-R3 e TRAIL-R4), podendo este facto estar implicado na evolução da doença e na resistência à quimioterapia convencional. Do mesmo modo, Lee, N. *et al.* (2003) avaliaram a expressão dos quatro receptores TRAIL (TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4) para aferir a sensibilidade das células JURKAT, MOLT-4 e UCB (células estaminais hematopoiéticas) ao fármaco rhTRAIL (ALEXIS). Estes autores verificaram que as três linhas celulares apresentam expressão dos receptores TRAIL-R1, TRAIL-R2 e TRAIL-R3, no entanto, só as células UCB apresentam expressão de TRAIL-R4 (DcR2) sugerindo que a resistência ao tratamento com o TRAIL nas células estaminais hematopoiéticas se deve ao aumento da expressão deste receptor. Estes resultados vêm ao encontro do que tem sido postulado por vários autores, que indicam que tumores derivados do mesmo tipo de tecido apresentam diferente sensibilidade *in vitro* ao TRAIL (Chabner, B. *et al.* 1996; Lee, N. *et al.* 2003). Além disso, este estudo mostra que o rhTRAIL reduz a viabilidade celular nas duas linhas celulares por mecanismos de morte celular programada, comprovados por citometria de fluxo e morfologia celular, assim como pelo aumento da caspase 3 activada nas células MOLT-4, e de citocromo *c* nas células CEM. Estes resultados sugerem que a resposta a este fármaco observado nas células é acompanhada da activação da via apoptótica mitocondrial. De facto, a citotoxicidade mediada pelo fármaco rhTRAIL nas células CEM e MOLT-4 poderá estar relacionada também com a disfunção mitocondrial, uma vez que se detectou diminuição no potencial de membrana mitocondrial (Ψ_{mit}), visível através do aumento da razão monómeros/agregados de JC1 (Hao, X. *et al.*, 2003).

Como já referido anteriormente, a apoptose pode ser induzida de forma dependente ou independente da via mitocondrial (via intrínseca). A despolarização da mitocôndria e a libertação de proteínas do espaço intramembranar mitocondrial para o citosol, como é o caso do citocromo *c*, aparecem como eventos preliminares da activação da via apoptótica mitocondrial (Fandy, T., *et al.* 2005). Com efeito, Scaffidi, C. *et al.* (1998) referem que as células de leucemia linfoblástica, CEM e JURKAT, são

células do tipo II, necessitando da activação da via mitocondrial para um sinal efectivo de morte celular. Do mesmo modo, Fandy, T. e os seus colegas (2005) mostram que em células de mieloma múltiplo a acção do TRAIL (BIOMOL) é incrementada pela acção de fármacos inibidores das histonas decetilases (HDAC) que promovem a libertação de proteínas, como o citocromo *c* e a SMAC para o citosol, resultando numa cascata de eventos celulares que culminam na apoptose.

De forma semelhante, Poh e os seus colaboradores (2007) referem que a acção do TRAIL (BIOMOL) pode ser sensibilizada em algumas células, nomeadamente nas JURKAT e nas células HeLa (linha celular de cancro da cervical), através da combinação com inibidores da via de proliferação celular do fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3K/AKT), como o LY-30. Assim, o fármaco LY-30 induz sensibilização ao TRAIL, nestas linhas celulares, por activação da via mitocondrial, com libertação de citocromo *c* e de SMAC com consequente activação da caspase 9, embora não verifiquem grande efeito na diminuição do potencial de membrana mitocondrial. No mesmo sentido, e como referido na literatura, uma abertura mínima no poro de permeabilidade transitória da mitocondria (MPO) induz libertação de citocromo *c* sem afectar o Ψ_{mit} (Garrido, C. *et al.* 2006; Poh, T. *et al.* 2007).

Também, a caspase 3 efectora apresenta um papel central na activação da apoptose. Deste modo, também Lee, N. *et al.* (2003) foram aferir a participação desta protease de cisteína no mecanismo de acção do rhTRAIL (ALEXIS), nas células JURKAT e MOLT-4 tendo verificado que o aumento de expressão desta enzima está directamente correlacionado com a sensibilidade das células ao tratamento com este fármaco.

No entanto, múltiplos alvos celulares estão envolvidos no processo de sensibilidade/resistência ao fármaco rhTRAIL. Assim, a acção do fármaco rhTRAIL pode estar também relacionada com o aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas ou por diminuição da expressão de proteínas pró-apoptóticas intra-celulares. Deste modo, seria interessante avaliar-se a variação da expressão da proteína celular inibidora da apoptose, *c-FLIP (FLICE-inhibitory protein)*, directamente relacionada com a inactivação da proteína caspase 8, assim como a expressão da caspase 8. A avaliação da expressão de caspase 8 seria um parâmetro importante para esclarecer a participação da via apoptótica, visto que esta protease de cisteína pode activar directa

e indirectamente a apoptose pela via membranar, por activação de caspases efectoras ou por ligação à proteína BID e consequente activação da via mitocondrial, respectivamente.

Deste modo, seria possível verificar se o aumento da expressão desta proteína está ou não relacionado com a activação directa da apoptose mediada pelo TRAIL ou se, pelo contrário, nestas células em estudo é necessário a activação da via mitocondrial por diminuição da expressão intracelular desta proteína. Neste sentido seria, ainda, interessante a avaliação da expressão de proteínas reguladoras da apoptose na via mitocôndrial, como as proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2, nomeadamente a BCL-2 e a BCL-X_L, bem como da família das IAPs, como a XIAP, a c-IAP1 e c-IAP2, a survivina e a livina. Outra questão interessante de ser avaliada seria a expressão diferencial do ligando TRAIL e dos seus receptores ao longo do tratamento com o fármaco rhTRAIL, nas linhas celulares de LLA de forma a avaliar as suas implicações no aumento/diminuição da sua acção terapêutica.

Não obstante, estudos pioneiros realizados por Jin, Z. *et al.* (2002) revelam que o efeito terapêutico de uma variante de rhTRAIL (R&D Biosciences) é ciclo-dependente, isto é, a sua actividade efectiva está correlacionada com o ciclo celular. Deste modo, estes investigadores mostraram através da sincronização das células de cancro do cólon (SW480) e de cancro do pulmão (H460) nas diferentes fases do ciclo celular, que as células em fase G₀/G₁ apresentam maior sensibilidade ao rhTRAIL, comparativamente às restantes fases. Estes investigadores também demonstraram que não existe aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas nesta fase do ciclo, podendo a via extrínseca não estar correlacionada com este efeito no bloqueio do ciclo celular. Contudo, os estudos realizados nas células SW480 revelaram que devido ao *cross-talk* existente entre a via mitocondrial e a via extrínseca da apoptose, nomeadamente por activação da caspase iniciadora 8, a via mitocondrial é passível de ser activada quando as células se encontram bloqueadas em fase G₀/G₁. Este efeito parece estar associado à diminuição do Ψ_{mit} e ao aumento da sensibilidade ao TRAIL.

Neste sentido, fomos avaliar o efeito do rhTRAIL (AMGEN) no ciclo celular nas células CEM e MOLT-4 tendo-se observado ligeiro aumento da percentagem de células em G₀/G₁, bem como aumento do pico pré-G₀/G₁, comprovando a morte celular por

apoptose. Estes resultados estão de acordo com os resultados do grupo de Jin, Z. (2002), contudo um estudo mais recente revela que nas células linfoblásticas, as SKW6.4, não existe correlação directa entre a sua sensibilidade ao rhTRAIL e o bloqueio do ciclo celular em G1/S ou em G2/M. Outros autores, afirmam ainda que, a indução efectiva de apoptose em associação terapêutica se deve aos mecanismos combinados entre os fármacos por activação da p53 e não por bloqueio do ciclo celular em fase G1 (Barbarotto, E. *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos pela análise da morfologia celular nas células tratadas com os compostos em estudo evidenciaram características morfológicas típicas de apoptose, numa fase mais inicial, com projecções citoplasmáticas (*blebs*) e vacuolização, e células com contração e fragmentação nuclear, características típicas de estados mais avançados de morte celular por apoptose

Os estudos efectuados nas células CEM e MOLT-4 com o ácido gambóxico (GA) sugerem que as células CEM são mais sensíveis a este composto comparativamente às células MOLT4. De facto, verificámos que este fármaco exerce um efeito antiproliferativo e citotóxico máximo para concentrações mais baixas nas células CEM relativamente às utilizadas nas células MOLT-4, (400 nM vs 1000 nM). Estes resultados poderão estar relacionados com a maior expressão de TfR nas células CEM relativamente às células MOLT-4, o que pode influenciar a eficácia terapêutica deste fármaco nestas células. Os nossos resultados estão de acordo com estudos recentes que revelam que a acção apoptótica do GA está associada à expressão do receptor da transferrina (TfR), isto é, quanto mais expresso for o TfR maior será a resposta ao sinal apoptótico mediada pelo GA (Pandey, M., *et al.*, 2007).

O TfR é uma proteína transmembranar do tipo II envolvida em múltiplos processos celulares nomeadamente na captação do ferro. No entanto, estudos recentes revelam que este receptor se encontra sobreexpresso em células de glioma, de cancro do cólon e de cancro do pâncreas, podendo constituir uma abordagem terapêutica no tratamento destas patologias. As primeiras abordagens neste sentido propuseram a construção de anticorpos anti-TfR ou de quelantes de ferro que de uma forma directa ou indirecta bloqueassem este receptor, todavia a indução de apoptose por estes mecanismos mostra-se morosa e de elevada toxicidade sistémica. Neste

sentido, o grupo de Kasibhatla, S. (2004) apresentou uma nova abordagem terapêutica que correlaciona os comprovados efeitos apoptóticos do ácido gambóxico com o aumento da expressão do TfR. Assim, a ligação do GA ao TfR é realizada de forma independente do local de ligação da transferrina (Tf) e activa rapidamente a cascata de sinalização apoptótica, por activação da caspase iniciadora 8.

Neste sentido, também Pandey, M., *et al.*, 2007, ao utilizarem células de leucemia mielóide, as células KBM-5, e células de embrião humano de rim, as células A293, referem que a resposta celular apoptótica ao GA (Gaia Chemical) é suprimida quando o TfR é regulado de forma negativa. Mais estudos são, no entanto, necessários de forma a averiguar os mecanismos subjacentes à acção do GA e a sua correlação com o TfR. Por exemplo, seria interessante averiguar a expressão diferencial de caspase 8 nas linhas celulares em estudo durante o tratamento com concentrações crescentes de GA e ir monitorizando a expressão de TfR verificando, deste modo, se estes parâmetros estão correlacionados. Para além disto, seria também interessante averiguar se a interacção deste fármaco não influencia a expressão de outros receptores da superfície celular como os receptores TRAIL, devido à sua interacção com a via mitocondrial em células do tipo II.

Por outro lado, verificou-se que nas células CEM e MOLT-4, o ácido gambóxico induz morte celular preferencialmente por apoptose, estando o seu mecanismo de morte celular possivelmente associado à disfunção mitocondrial, pois verifica-se aumento da razão monómeros/agregados de JC1, o que está relacionado com a diminuição do potencial de membrana mitocondrial. Estes resultados são acompanhados de um aumento significativo dos níveis de caspase 3, nas células MOLT-4, o que justifica os resultados obtidos nesta linha celular. Estes resultados vão ao encontro dos obtidos por outros grupos, que ao testarem diferentes concentrações de GA em linhas celulares de tumores hematológicos, também verificaram diminuição do potencial de membrana mitocondrial e aumento dos níveis de caspase 3, bem como de outras proteínas envolvidas na apoptose (Jack, 2011; Yang, L. *et al.*, 2012). Resultados semelhantes foram obtidos por Xie, H. *et al.* (2009) com um derivado do GA, o GA3 (GA, dicyclohexylcarbodiimide, 1-hydroxybenzotriazole (HOBt)), nas células HL-60, comprovando a correlação entre a acção deste fármaco e a disfunção mitocondrial. Estes autores, observaram que nas células HL-60, a disfunção

mitocondrial é acompanhada de aumento na razão BAX/BCL-2, com aumento significativo da libertação de citocromo *c*.

De modo a completar o presente trabalho, seria interessante aferir a expressão de caspase 8 e caspase 9, de forma a esclarecer a relação existente entre a activação da via extrínseca e da via intrínseca da apoptose mediada pelo GA. Estudos recentes comprovam que este fármaco é um potente inibidor da survivina em células tumorais de cancro gástrico, potenciando o efeito do docetaxel nesta patologia (Wang, T. *et al.*, 2008). Assim, seria interessante em estudos posteriores aferirmos o potencial terapêutico deste fármaco em associação com a quimioterapia convencional, em células de tumores hematológicos, avaliando as variações na expressão da proteína anti-apoptótica survivina ao longo do tratamento.

A avaliação das diferentes fases do ciclo celular revela que este composto induz aparecimento de pico pré-G0/G1, correspondendo ao pico apoptótico, e aumento da percentagem de células em fase G2/M, confirmando que o GA induz alteração do ciclo celular. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Wang, T. *et al.* (2008), que referem que o GA exerce bloqueio do ciclo celular em fase G2/M, em células do cancro gástrico. Também, Zaho, W. (2011) refere que o ácido gambóxico (SIGMA) medeia o bloqueio do ciclo celular em fase G0/G1 em células de osteossarcoma, as células U2OS, acompanhado de diminuição da ciclina D1. Do mesmo modo, estes autores também demonstraram que nas células MG63, o GA induz bloqueio do ciclo celular na fase G2/M. Assim, como estudo complementar poderíamos ter avaliado a expressão diferencial de ciclinas, nomeadamente da ciclina D1 ou da A e B, de modo a aferir a correlação existente entre a expressão desta ciclina e a acção ciclo-dependente do GA, nomeadamente o bloqueio na fase G2/M do ciclo celular.

A avaliação do potencial terapêutico da silibinina (SLB) nas células CEM e MOLT-4, mostraram que este composto exerce efeito citostático e citotóxico mais acentuado para doses mais baixas nas células MOLT-4, relativamente às células CEM. Estudos recentes apontam como um dos mecanismos de actuação da silibinina a inibição da proteína anti-apoptótica survivina (Son, Y. *et al.*, 2007). Neste sentido, diferenças na expressão basal desta proteína, podem estar correlacionados com a resposta celular a fármacos direccionados a este alvo terapêutico (Kelly, R. *et al.*, 2011). De facto, os

nossos resultados mostram que os níveis de expressão basal de survivina nas células CEM são 1,7x mais elevados que nas células MOLT-4, o que pode justificar a necessidade de maior concentração de SLB para induzir o mesmo efeito nas células CEM.

Além disso, a SLB induz nas células CEM E MOLT-4 morte celular por apoptose acompanhada de aumento de expressão de citocromo *c* e caspase 3 nas duas linhas celulares, com maior evidência nas células CEM. O efeito citotóxico observado pode estar ainda relacionado com o aumento da razão monómeros/agregados de JC1, o que sugere activação da via mitocondrial. De facto, os múltiplos mecanismos de actuação da silibinina mostram que este composto apresenta comprovados efeitos na inibição de proteínas envolvidas na regulação negativa da via mitocondrial da apoptose, como as proteínas da família BCL-2, bem como efeitos na potenciação do efeito de moléculas pró-apoptóticas, como é o caso da BAX e da BAK (Kelly, R. *et al.*, 2011).

Por outro lado, a silibinina tem sido apontada como um agente inibidor da progressão do ciclo celular em fase G0/G1 em células de humanas de cancro do cólon. Com efeito, analisando os nossos resultados verificamos que este composto induz um aumento da percentagem de células na fase G0/G1, para além do aparecimento de um pico apoptótico que confirma a apoptose. Neste sentido, seria interessante avaliar as alterações da expressão da proteína survivina ao longo do tratamento de células, de tumores hematológicos, com a silibinina de forma a aferir a sua acção nas diferentes fases do ciclo celular, bem como os alvos responsáveis por estas alterações avaliando, por exemplo, a expressão de ciclina D1.

Além da administração em toma única, avaliámos também a acção dos fármacos rhTRAIL, GA e SLB, nas células CEM e MOLT-4, em administração diária. Os resultados mostram que os fármacos administrados diariamente, apresentam efeitos citostáticos e citotóxicos mais significativos quando comparado com a aplicação da mesma dose em administração única. Estes resultados poderão apresentar vantagem significativa, pois a administração de doses mais reduzidas de composto, poderá induzir menor toxicidade sistémica e portanto menos efeitos secundários.

Posteriormente, foi avaliado o potencial terapêutico do fármaco rhTRAIL em associação farmacológica com os fármacos inibidores da survivina, GA e SLB, e com os fármacos convencionais utilizados no tratamento da LLA, doxorubicina (DOX) e vincristina (VCR), quer em administração simultânea quer desfasada de 4h entre os fármacos. Assim, os resultados revelaram que quer para as células CEM quer para as células MOLT-4 o efeito citostático e citotóxico induzidos pela combinação dos diferentes fármacos é dependente do tempo de incubação, da forma de administração, do tipo celular e dos fármacos associados.

A associação de rhTRAIL com os restantes compostos evidenciou um efeito sinérgico quer nas células CEM quer nas MOLT-4, mais significativos após 72 horas de incubação. Contudo, nas células CEM o efeito sinérgico destes fármacos foi observado quando estes foram administrados em simultâneo, com excepção da VCR. Por outro lado, nas células MOLT-4 o efeito de adição foi obtido, quando o rhTRAIL foi adicionado à cultura 4 horas após a adição do fármaco DOX, SLB ou GA. Pelos estudos de citometria de fluxo podemos verificar que os diferentes compostos, em monoterapia ou em associação farmacológica, induzem morte celular predominantemente por apoptose.

Assim, os resultados da associação do TRAIL com os fármacos inibidores da survivina revelam que estes fármacos potenciam a acção do rhTRAIL (AMGEN). De facto, Kauntz, H. *et al.* (2011) sugerem que a silibinina (SIGMA) potencia o efeito do fármaco rhTRAIL (KOMA Biotech) em células de glioma. De forma semelhante, Kelly, R. *et al.* (2011) provam o mesmo resultado em células de cancro colo-rectal, utilizando outra variante do rhTRAIL (Enzo Life Sciences). Estudos semelhantes associando o fármaco GA ao ligando indutor de apoptose TNF- α evidenciaram resultados de potenciação dos efeitos deste ligando, da família do TRAIL, de forma dependente da expressão dos receptores da transferrina (Pandey, M., *et al.*, 2007). Seria, contudo, interessante completar o nosso trabalho verificando o papel da mitocôndria no aumento da acção destes fármacos em conjunto, nomeadamente pela análise da variação do potencial de membrana. De modo a aferir a contribuição da via intrínseca e extrínseca para esta potenciação do efeito citotóxico a análise da expressão de caspase 8 e caspase 9, poderá também ser importante. Neste contexto, seria também

interessante avaliar a variação dos níveis de survivina durante o tratamento, de forma a aferir a sua correlação nos mecanismos de actuação destes fármacos.

Não obstante, vários estudos têm mostrado que a combinação do fármaco rhTRAIL com os fármacos convencionais ou com a radioterapia, resulta numa resposta apoptótica sinérgica (Srivastava, K., 2001; Klener, P. *et al.*, 2008). Segundo Horinaka, M. e seus colaboradores (2012), a acção de compostos da família das antraciclinas como a doxorrubina e a aclarubicina, induzem a potenciação do efeito apoptótico induzido por uma variante de rhTRAIL (Peprotech), correlacionando esse aumento com o aumento da expressão do receptor de morte DR5, em células de LLA, as células JURKAT. Estas evidências estão de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, uma vez que se verificou um efeito mais acentuado quando os fármacos DOX e rhTRAIL foram administrados simultaneamente em concentrações abaixo do IC₅₀. No entanto, seria importante verificar as alterações induzidas por estes fármacos na expressão das proteínas BAX e BCL-2, bem como nos níveis da proteína p53, visto que os fármacos convencionais actuam muitas vezes de forma dependente desta proteína. Um estudo interessante seria também medir as alterações nos níveis de proteínas inibidoras apoptose, como a XIAP.

Assim, a aplicação destes esquemas terapêuticos no tratamento das LLA poderá permitir o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas utilizando os mesmos compostos, em doses inferiores, proporcionando uma resposta mais eficaz com menor toxicidade.

Como já foi referido anteriormente, a sensibilidade aos fármacos derivados do TRAIL endógeno nas diferentes linhas celulares, pode dever-se ao facto de existirem mais receptores armadilha que receptores pró-apoptóticos e/ou ao facto da razão entre os receptores pró-apoptóticos e anti-apoptóticos ser menor (Johnstone, R. *et al.*, 2009; Dimberg, L. *et al.*, 2012). Contudo, vários autores têm demonstrado que a resistência ao TRAIL, não se restringe apenas aos elevados níveis de expressão dos receptores anti-apoptóticos, podendo estar também relacionado com as proteínas FLIP, BCL2 e MLC1 e a survivina (Figura 30) (Dimberg, L. *et al.*, 2012; Hellwig, C. & Rehm, M., 2012).

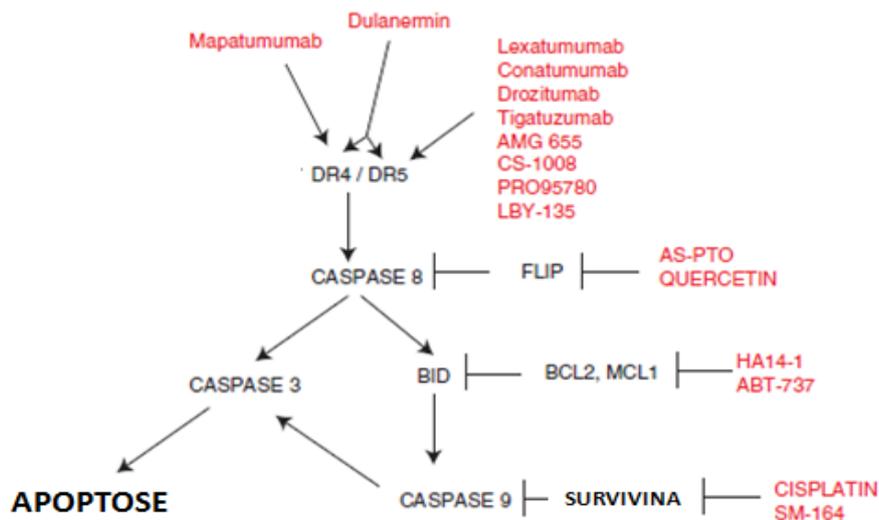


Figura 30 – Mecanismos de acção de diferentes moduladores da apoptose. Os receptores DR4 and DR5 podem ser activados pelos agonistas dos receptores de morte como o mapatumumab (DR4), lexatumumab (DR5) e dulanermin (quer DR4 quer DR5). A caspase 8 é consequentemente activada, sendo esta activação inibida pela acção da proteína celular FLIP, a qual pode ser inibida pela queratina. A via mitocondrial é activada pela clivagem da proteína BID, que pode ser inibida pela família de proteínas BCL-2 e pela proteína inibidora da apoptose MLD1, que por sua vez podem ser inibidas por HA14-1 e ABT-737. Também, a activação da caspase 9 é limitada pela survivina, que pode ser bloqueada pela acção da cisplatina (Dimberg, L. *et al.*, 2012).

Assim, além do ligando TRAIL e dos seus receptores, foram estudados neste trabalho, moléculas envolvidas no processo apoptótico, como o citocromo *c* e a caspase 3, que evidenciaram que este fármaco nas linhas celulares em estudo necessita da activação da via mitocondrial da apoptose para um sinal efectivo de morte celular. Este resultado foi também comprovado pela diminuição do potencial de membrana mitocondrial, indicativo de disfunção mitocondrial, como observado por outros autores (Scaffidi, C. *et al.* 1998; Fandy, T., *et al.* 2005; Garrido, C. *et al.* 2006; Poh, T. *et al.* 2007).

Para além dos comprovados efeitos clínicos dos fármacos agonistas dos receptores TRAIL, a expressão diferencial destes receptores poderá constituir um novo marcador de diagnóstico, uma vez que a expressão e a localização dos receptores DR4 e DR5 é superior em tumores malignos do ovário, do cólon e do cólo do útero, do que em tumores benignos e em tecidos epiteliais normais (Mahalingam, D. *et al.*, 2009). Além disso, podem influenciar o prognóstico e a sensibilidade à terapêutica.

Em suma, podemos concluir que os fármacos dirigidos a alvos moleculares das vias apoptóticas, rhTRAIL, GA e SLB poderão constituir uma

abordagem terapêutica promissora em leucemias agudas, quer em monoterapia quer em terapêutica combinada entre si. Do mesmo modo verifica-se que o fármaco rhTRAIL tem um efeito sinérgico quando associado com a doxorubicina, DOX, um fármaco anticancerígeno convencional utilizado no tratamento de leucemias agudas, o que pode contribuir para maximizar a eficácia terapêutica com diminuição da toxicidade e dos efeitos secundários.

Capítulo 5. Conclusão

A definição de novas estratégias terapêuticas para o tratamento do cancro constitui o ponto central da Oncobiologia Clínica.

Assim, os resultados obtidos com este trabalho revelam de uma forma geral, que os fármacos Dulanermin-rhTRAIL, ácido gambóxico (GA) e silibinina (SLB) podem constituir abordagens terapêuticas promissoras no tratamento de leucemias agudas, quer como terapêutica de indução, quer na recidiva hematológica da doença.

Desta forma, este estudo permite-nos retirar as seguintes conclusões:

- Os efeitos citostáticos e citotóxicos induzidos pelos fármacos rhTRAIL, GA e SLB nas células de LLA-T, CEM e MOLT4, são dependentes do tempo, da dose e do tipo de administração do fármaco, bem como da linha celular em estudo. Assim, verifica-se que as células CEM são mais sensíveis ao tratamento com rhTRAIL e GA, enquanto as células MOLT-4 revelaram ser mais sensíveis ao tratamento com SLB;
- Estes fármacos induzem morte celular preferencialmente por apoptose estando a via mitocondrial intimamente ligada ao seu mecanismo de actuação, comprovada pelo aumento da expressão de citocromo *c*, bem como pela diminuição do potencial de membrana mitocondrial avaliado pela razão monómeros/ agregados de (JC1). Este processo culmina, de uma maneira geral, com o aumento de expressão de caspase 3 activada nas duas linhas celulares;
- A diferente resposta ao tratamento verificada entre as células CEM e MOLT4 pode estar correlacionada com a diferente expressão basal de moléculas envolvidas na morte celular por apoptose. Assim, verifica-se que a razão entre os receptores pró- e anti-apoptóticos do TRAIL é superior nas células CEM que nas células MOLT-4. O receptor Tfr frequentemente associado à resposta celular à apoptose mediada pelo GA encontra-se mais expresso nas células CEM relativamente às células MOLT-4. A survivina, uma proteína anti-apoptótica, encontra-se mais expressa nas células CEM, o que pode justificar a necessidade de doses superiores deste fármaco nestas células comparativamente com as células MOLT-4;
- Destaca-se ainda o aumento da eficácia terapêutica do rhTRAIL, GA e SLB quando administrados diariamente em doses inferiores ao IC₅₀, bem como das associações do fármaco rhTRAIL com os outros compostos, nomeadamente

com os fármacos convencionais o que permitirá a diminuição da toxicidade e dos respectivos efeitos secundários. Assim, verifica-se que a administração de terapêuticas combinadas, de vários fármacos dirigidos a alvos moleculares poderá ser uma estratégia promissora a aplicar como opção terapêutica no tratamento das leucemias agudas, quer na apresentação quer na recidiva da doença, podendo constituir uma alternativa para ultrapassar a falência da terapêutica convencional.

Capítulo 6. Referências Bibliográficas

Aubry, J. P. [et al.] (1999) **Annexin-V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity.** *Cytometry*. 37 197-204.

Bernas, T. [et al.] (2006) **Integrating cytomics and proteomics.** *Molecular and Cellular Proteomics*. 5: 2-13.

Chabner, B. [et al.] (1996) **Cancer Chemotherapy and Biotherapy.** 2nd Edition, Lippincott-Raven, Philadelphia.

Chiou, S. [et al.] (2003) **Survivin – an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond.** *Med Sci Monit* 9(4): 43-47.

Coelho, S. (2009) **rhAPO2L/TRAIL como nova terapêutica anti-cancerígena em neoplasias hematólicas.** Tese de Mestrado.

De Vita, V. (1993) **Principles of chemotherapy.** *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 4th Edition, J.B. Lippincott.

Dimberg, L. [et al.] (2012) **On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics.** *Oncongene* 1-10.

Dourado, M. [et al.] (2010) **Stem cells Implications in biology and cancer therapeutics.** *RBOC*: 7 (20): 7-14.

Durkin, W. J. [et al.] (1979) **A methodological approach to the prediction of anticancer effect in humans.** *Cancer Research*. 39: 402-407.

Evan, G. & Vousden, K. (2001) **Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer.** *Nature* 411: 342-8.

Falschelehner, C. [et al.] (2007) **TRAIL signalling: decisions between life and death.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 1462-75.

Fandy, T. [et al.] (2005) **Interaction effects of HDAC inhibitors and TRAIL on apoptosis are associated with changes in mitochondrial functions and expressions of cell cycle regulatory genes in multiple myeloma.** *Neoplasia* 7(7): 646-57.

Foà, R. [et al.] (2009) **Adult Acute Lymphoblastic Leukemia**. Revista Brasileira hematologia e Hemoterapia 31(2): 41-47.

Foley, G. [et al.] (1965) **Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with Acute Leukemia**. Cancer 18(4):522-29.

Fukuda, S. & Pelus, L. [et al.] (2001) **Regulation of the inhibitor-of-apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD341 cells by hematopoietic growth factors: implication of survivin expression in normal hematopoiesis**. Blood 98(7): 2091-100.

Fukuda, S. & Pelus, L. [et al.] (2006) **Survivin, a cancer target with na emerging role in normal adult tissues**. Mololecular Cancer Therapeutics 5(5): 1087-98.

Fulda, S. & Pervaiz, S. (2010) **Apoptosis signaling in cancer stem cells**. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology 42: 31-8.

Fulda, S. & Vucic, D. (2012) **Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer**. Nature Reviews Drug Discovery 11: 109-24.

Fulda, S. (2012) **Regulation of apoptosis pathways in cancer stem cells**. Cancer Letters.

Garrido, C. [et al.] (2006) **Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria**. Cell Death and Differentiation 13: 1423–33.

Gascoigne, K. & Taylor S. (2009) **How do anti-mitotic drugs kill cancer cells?** Journal of Cell Science 122: 2579-85.

Greenberg, J. [et al.] (1988) **T- lymphoid cell lines with rearrangement of chromosome 7 immunophenotypic and cytogenetic analysis of Molt-3 and Molt-4: human**. Blood 72(5): 1755-60.

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000) **The hallmarks of cancer**. Cell 100(1): 57-70.

Hao, X. [et al.] (2003) **Potential mechanisms of leukemia cell resistance to TRAIL-induced apoptosis**. Apoptosis 8: 601–7.

- Hellwig, C. & Rehm, M. (2012) **TRAIL Signaling and Synergy Mechanisms Used in TRAIL-Based Combination Therapies**. *Molecular Cancer Therapeutics* 11: 3-13.
- Hietakangas, V. [et al.] (2003) **Erythroid Differentiation Sensitizes K562 Leukemia Cells to TRAIL-Induced Apoptosis by Downregulation of c-FLIP**. *Molecular and Cellular Biology* 23: 1278–91.
- Hoffbrand, N. [et al.] (2006) **Essential Haematology**. 5th Edition, Blackwell Publishing.
- Holoch, P. & Griffith, T. (2009) **TNF-related apoptosis ligand (TRAIL): a new path to anti-cancer therapies**. *European Journal of Pharmacology* 625: 63-72.
- Horinaka, M. [et al.] (2012) **Aclarubicin enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis through death receptor 5 upregulation**. *Cancer Science* 103(2): 282-87.
- Houwen, B. (2000) **Blood Film Preparation and Staining Procedures**. *Laboratory Hematology* 6: 1–7.
- Igney, F. & Krammer, P. (2002) **Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis**. *Nature Reviews Cancer* 2: 277-87.
- Jack (2011) **The Apoptosis-Inducing Effect of Gambogic Acid on Malignant Hematologic Cell Lines and Its Mechanism**. [www.res-medical.com/oncology/2489].
- Jacquemin, G. [et al.] (2010) **Combining naturally occurring polyphenols with TNF-related apoptosis-inducing ligand: a promising approach to kill resistant cancer cells?** *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 3115-30.
- Jin, Z. [et al.] (2002) **Enhanced sensitivity of G1 arrested human cancer cells suggests a novel therapeutic strategy using a combination of simvastatin and TRAIL**. *Cell Cycle* 1(1): 82-89.
- Johnstone, R. [et al.] (2008) **The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy**. *Macmillan Publishers Limited* 8: 782-792.

Kasibahtla, S. [et al.] (2005) **A role for transferring receptor in triggering apoptosis when targeted with gambogic acid.** PNAS 102(34): 12095-100.

Kauntz, H. [et al.] (2012) **The flavonolignan silibinin potentiates TRAIL-induced apoptosis in human colon adenocarcinoma and in derived TRAIL-resistant metastatic cells.** Springer Science Apoptosis.

Kelley, S. & Ashkenazi, A. (2004) **Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL.** Current Opinion in Pharmacology 4: 333-39.

Kelly, R. [et al.] (2011) **Impacting tumor cell-fate by targeting the inhibitor of apoptosis protein survivin.** Molecular Cancer 10: 34-45.

Kisek, R. [et al.] (2012) **Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: Recent advances.** Pharmacology & Therapeutics 13: 26–39.

Klener, P. [et al.] (2009) **TRAIL-induced apoptosis of HL60 leukemia cells: two distinct phenotypes of acquired TRAIL resistance that are accompanied with resistance to TNF α but not to idarubicin and cytarabin.** Blood Cells, Molecules & Diseases 42: 77-84.

LeBlanc, H.N. & Ashkenazi, A. (2003) **Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors.** Nature Publishing Group, Cell Death and Differentiation, 10: 66-75.

Lee, N. [et al.] (2003) **Ex vivo purging of leukemia cells using tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand in hematopoietic stem cell transplantation.** 17: 1375–83.

Levy, D. & Darnell, J. (2002) **Stats: transcriptional control and biological impact.** Nature Reviews Molecular Cell Biology 3: 651-62.

Li, L. [et al.] (2010) **Targeting silibinin in the antiproliferative pathway.** Informa Healthcare Expert Opin Investig 19(2): 243-55.

Lobo, N. [et al.] (2007) **The biology of cancer stem cells.** Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 23: 675-99.

- Lodish, H. [et al.] (2004) **Molecular Cell Biology**. 5th Edition, W.H. Freeman & Co., U.S.A.
- Mahalingam, D. [et al.] (2009) **TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL?** *Cancer Treatment Reviews*, 35: 280-288.
- Mahmood, Z. & Shukla, Y. (2010) **Death receptors: targets for cancer therapy**. *Experimental Cell Research* 316: 887-99.
- Martinez, J. D. [et al.] (2003) **Molecular Biology of Cancer**. In: Berger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. 6th Edition, John Wiley & Sons.
- Mérino, D. [et al.] (2006) **Differential Inhibition of TRAIL-Mediated DR5-DISC Formation by Decoy Receptors 1 and 2**. *Molecular and Cellular Biology* 26: 7046-7055.
- Minotti, G. [et al.] (2004) **Antracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity**. *Pharmacological Reviews* 56: 185-229.
- Minowada, J. [et al.] (1972) **Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes**. *Journal National Cancer Institute* 49: 891-895.
- Myatt, S. & Lam, E. (2007) **Promiscuous and lineage-specific roles of cell cycle regulators in hematopoiesis**. *BioMed Central Cell Division* 1-9.
- Nguyen, L. [et al.] (2012) **Cancer stem cells: an evolving concept**. *Nature Review Cancer* 12(2):133-43.
- Narayanan, S. & Shami, P. (2012) **Treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults**. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 81: 94-102.
- O'Shea, J. [et al.] (2002) **Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway**. *Cell Press* 109: S121-31.
- Orfão, A. [et al.] (1995) **Flow Cytometry: its applications in hematology**. *Haematologica* 80: 69-81.

Pandey, M. [et al.] (2007) **Gambogic acid, a novel ligand for transferring receptor, potentiates TNF-induced apoptosis through modulation of the nuclear factor- κ B signaling pathway.** *Blood* 110(10): 3517-25.

Park, S. [et al.] (2010) **Selective TRAIL-triggered apoptosis due to overexpression of TRAIL death receptor 5 (DR5) in P-glycoprotein-bearing multidrug resistant CEM/VBL1000 human leukemia cells.** *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 1(1): 90-100.

Picarda, G. [et al.] (2012) **TRAIL receptor signaling and therapeutic option in bone tumors: the trap of the bone microenvironment.** *American Journal of Cancer Research* 2(1): 45–64.

Pieters, R. & Carroll, W. (2010) **Biology treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia.** *Hematol Oncol N Am* 24: 1-18.

Poh, T. [et al.] (2007) **LY303511 amplifies TRAIL-induced apoptosis in tumor cells by enhancing DR5 oligomerization, DISC assembly, and mitochondrial permeabilization.** *Cell Death and Differentiation* 14: 1813-25.

Qin, Y. [et al.] (2007) **Gambogic acid inhibits the catalytic activity of human topoisomerase II α by binding to its ATPase domain.** *Molecular Cancer Therapeutics* 6(9): 2429-40.

Reya, T. [et al.] (2001) **Stem cells, cancer, and cancer stem cells.** *Nature Reviews* 414: 105-11.

Rezanova, M. [et al.] (2008) **Ionizing radiation sensitizes Leukemic MOLT-4 cells to TRAIL-induced apoptosis** *Acta Médica (Hradec Kralove)* 51(2):101–105.

Rossi, D. & Gaidano, G. (2003) **Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease.** *Haematologica* 88: 212-218.

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**. Bioquímica-Organização Molecular da Vida. Lidel-Edições Técnicas, Portugal.

Scaffidi, C. [et al.] (1998) **Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways**. The EMBO Journal 17(6): 1675–87.

Sgonc, R. & Gruber, J. (1998) **Apoptosis detection: An overview**. Experimental Gerontology 33(6): 525-533.

Shackleton, M. (2010) **Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different**. Seminars in Cancer Biology 20: 85-92.

Smith, C. [et al.] (2005) **Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach**. 2nd Edition, Lippincott Williams e Wilkins, a Wolters Kluwer business, Philadelphia.

Son, Y. [et al.] (2007) **Silibinin sensitizes human glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis via DR5 up-regulation and down-regulation of c-FLIP and survivin**. Cancer Research 67(17): 8274-84.

Srivastava, R. [et al.] (2001) **TRAIL/Apo2L: mechanisms and clinical applications in cancer**. Neoplasia 3(6): 535:46.

Swerdlow, S. [et al.] (2008) **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 4th Edition WHO.

Tan, W. [et al.] (2011) **Anti-cancer natural products isolated from Chinese medicinal herbs**. Chinese medicine 6: 27.

Testa, U. & Riccioni, R. (2007) **Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia**. Haematologica 92 (01) 81-94.

Tysnes, B. & Bjerkgvig, R. (2007) **Cancer initiation and progression: involvement of cancer stem cells and microenvironment**. Biochimica et Biophysica Acta 1775: 283-97.

Wang, T. [et al.] (2007) **Gambogic acid, a potent inhibitor of surviving, reverses docetaxel resistance in gastric cancer cells**. Cancer Letters 262: 214-22.

Vardiman, J. [et al.] (2009) **The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasm and acute leukemia: rationale and important changes.** Blood 111(5): 937-51.

Visvader, J. (2011) **Cells of origin in cancer.** Nature 469: 314-22.

Wuditiwai, B. [et al.] (2011) **Methoxyflavone derivatives modulate the effect of TRAIL-induced apoptosis in human leukemic cell lines.** Journal of Hematology & Oncology 4:52.

Xie, H. [et al.] (2009) **GA3, a new gambogic acid derivative, exhibits potent antitumor activities *in vitro* via apoptosis-involved mechanisms.** Acta Pharmacol Sin 30(3): 346-54.

Xu, L. [et al.] (2011) **Enhanced Anticancer Effect of the Combination of Cisplatin and TRAIL in Triple-Negative Breast Tumor Cells.** Molecular Cancer Therapeutics 10:550-557.

Yang, A. [et al.] (2010) **Proapoptotic DR4 and DR5 signalling in cancer cells: toward clinical translation.** Current Opinion in Cell Biology 22: 837-44.

Yang, L. [et al.] (2012) **Effects of gambogic acid on the activation of caspase-3 and downregulation of SIRT1 in RPMI-8226 multiple myeloma cells via the accumulation of ROS.** Oncology Letters 3: 1159-65.

Yao, J. [et al.] (2008) **Involvement of mitochondrial pathway in triptolide-induced cytotoxicity in human normal liver L-02 cells.** Biological & Pharmaceutical Bulletin. 31(4): 592-597.

Yerbs, R. [et al.] (2011) **The therapeutic potential of TRAIL receptor signalling in cancer cells.** Clin Trans Oncol 13: 839-47.

Zhai, D. [et al.] (2008) **Gambogic acid is an antagonist of anti-apoptotic Bcl-2-family proteins** Molecular Cancer Therapeutics 7(6): 1639–46.

Zhao, W. [et al.] (2011) **Gambogic acid inhibits the growth of osteosarcoma cells *in vitro* by inducing apoptosis and cell cycle arrest.** *Oncology Reports* 25: 1289-95.

Ziegler, U. & Groscurth, P. (2004) **Morphological features of cell death.** *News Physiology Sci* 19: 124-28.

