



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Potencial Terapêutico de siRNA anti-*FLT3* em Neoplasias Hematológicas

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 Sarmento Ribeiro (Universidade de Coimbra), do Professor Doutor João Nuno Moreira (Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Graça Vale (Universidade de Coimbra)

Ana Raquel Martins Figueiredo Fonseca

2011

“The consensus view now is to treat cancer as a pathology equipped with various mechanisms to avert its own destruction”
(Dass et al., 2006)

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro, ao Professor Doutor João Nuno Moreira, e à Professora Doutora Graça Vale pela orientação desta Dissertação, assistência na definição deste projecto, apoio, disponibilidade, dedicação e empenho diários ao longo do seu desenvolvimento, pelas críticas e conselhos na revisão do manuscrito e, em especial, pelo apoio incondicional, pela partilha de conhecimento e experiência científica.

À Dra. Cristina Gonçalves pela disponibilidade, dedicação e empenho ao longo do seu desenvolvimento, pelo apoio incondicional, pela partilha de conhecimento e experiência científica, pelos ensinamentos, pela amizade e confiança.

À Lígia Silva pela disponibilidade, pela partilha de conhecimento, dedicação e empenho ao longo do seu desenvolvimento.

A todos os que durante o período de realização deste trabalho foram passando pelo Laboratório de Biologia Molecular Aplicada da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra pelo companheirismo e bom ambiente que sempre proporcionaram, e em especial à Raquel Alves pela amizade e apoio que sempre demonstrou.

A todos os docentes, investigadores e funcionários, que de uma ou de outra forma permitiram que este trabalho se realizasse, em especial à Dra. Vera Alves, à Teresa Louro e ao Sr. Simões.

Aos colegas de licenciatura e mestrado, em especial à Rute e à Guida pela amizade e apoio em todos os momentos passados em Coimbra, os quais jamais serão esquecidos.

A todas (os) aqueles que pela amizade, directa ou indirectamente tiveram uma importância fundamental para este trabalho, nomeadamente, à Margarida, à João, ao Luís Santos e ao Nando pelo contributo directo, o qual foi fundamental para o desenvolvimento deste manuscrito.

À Margarida e ao Kiko pela amizade que demonstraram desde sempre.

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

Ao Nando por todo amor e paciência, ao longo deste último ano e sem o qual a realização deste trabalho não seria possível.

Finalmente, quero agradecer a toda a minha família, em especial minha mãe, aos meus avós, ao Henrique e ao meu irmão Zé, por tudo que tornam possível acontecer.

Resumo

O cancro, apesar dos progressos conseguidos na sua profilaxia e tratamento, é ainda o responsável por um número elevado de mortes, nomeadamente no mundo ocidental. É uma doença multifactorial em que os genes possuem um papel fundamental. Estes, quando modificados, estimulados ou desreprimidos conferem à célula um fenótipo particular e conduzem ao crescimento desregulado e anárquico e/ou à resistência apoptose. De facto, o desenvolvimento de tumores humanos está associado a alterações genéticas e epigenéticas que determinam um perfil anormal da expressão génica a qual influencia o crescimento, a diferenciação e a morte celular.

O receptor Flt3 ("FMS-like tyrosine kinase 3") é um exemplo de um receptor tirosina-cinase (RTK) da família dos RTK tipo III que desempenha uma função importante na sobrevivência, proliferação e diferenciação das células do sistema hematopoiético.

A activação constitutiva do receptor Flt3 tem sido descrita em neoplasias hematológicas, conferindo pior prognóstico a estas doenças. É sabido que em cerca de 30% dos casos de Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e 3 a 5% dos casos de Leucemia Mielóide Crónica (LMC), o receptor *FLT3* encontra-se mutado (mutação pontual D835 e/ou internas em tandem, ITD), levando à activação constitutiva do mesmo, o que leva à proliferação descontrolada das células, bem como à diminuição da apoptose.

O conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos nas neoplasias hematológicas tem permitido o desenvolvimento de novos fármacos dirigidos a alvos moleculares, os quais apresentam maior especificidade para a célula tumoral e portanto menor toxicidade. Entre estes é de salientar os inibidores da farnesiltransferase (IFTs), do proteasoma (IPs) e de tirosina-cinases (ITKs) como o Flt3.

Uma vez que o receptor Flt3 tem um papel preponderante na LMA e LMC, o silenciamento de genes pode também ser uma potencial abordagem terapêutica nestas neoplasias. Neste sentido, o RNA de interferência (RNAi) é frequentemente utilizado como ferramenta de pesquisa do controlo da expressão de genes específicos, possuindo também, potencialidade terapêutica em inúmeras doenças, nomeadamente em doenças oncológicas.

Este trabalho teve como objectivo analisar o potencial terapêutico de um siRNA anti-*FLT3* em neoplasias hematológicas, nomeadamente na leucemia mielóide crónica (LMC) e na leucemia mielóide aguda (LMA), em monoterapia e em associação com fármacos anticancerígenos convencionais ou com novos fármacos dirigidos a alvos

moleculares. Procurou-se também correlacionar o potencial terapêutico desta estratégia com a presença ou ausência de mutações no gene *FLT3*.

Para o efeito foram utilizadas duas linhas celulares de leucemias mielóides, as células HL-60 (Leucemia Promielocítica Aguda, um subtipo da LMA), e as células K562 (Leucemia Mielóide Crônica em crise blástica). As células foram transfectadas com um siRNA anti-*FLT3* isoladamente e em associação com um inibidor do proteasoma, MG-262, um inibidor da farnesiltransferase, L-744,832, e com os fármacos anticancerígenos convencionais, ATRA e Imatinib, nas células HL-60 e K562 respectivamente. Para aumentar a eficácia da transfecção os siRNA anti-*FLT3* foram entregues às células utilizando como veículo de transporte um agente de transfecção de base lipídica.

Os resultados obtidos mostram que as células HL-60 e K562 não apresentam qualquer tipo de mutação no receptor FLT3. No entanto, verifica-se que o siRNA anti-*FLT3* induz, nas células HL-60, diminuição da viabilidade celular, e morte celular por apoptose. Para além deste efeito citotóxico, o siRNA anti-*FLT3* induz também, efeito citostático, observando-se após o tratamento diminuição da proliferação celular a qual é acompanhada por ligeira diminuição da expressão da ciclina D1. Nas células K562 observa-se também diminuição da viabilidade celular e aumento da morte celular por apoptose e necrose após o tratamento com o siRNA anti-*FLT3*. No entanto, nestas células não se verifica qualquer diminuição da proliferação celular.

Além disso, após o tratamento com o siRNA anti-*FLT3* observou-se diminuição da expressão do receptor em ambas as linhas celulares, demonstrando a eficácia do siRNA utilizado.

Por outro lado, o siRNA anti-*FLT3* não apresenta qualquer efeito sinérgico quando em associação com o ATRA nas células HL-60. No entanto, nas células K562 o efeito do Imatinib é potenciado quando em associação com o siRNA anti-*FLT3*.

Os resultados evidenciam também que, a associação do siRNA anti-*FLT3* com o MG-262 possui efeitos sinérgicos estatisticamente significativos apenas nas células HL-60, observando-se aumento do efeito citotóxico evidenciado pelo aumento da morte celular por apoptose e necrose. Por outro lado, a associação do siRNA anti-*FLT3* com o L-744,832 nas células HL-60 e K562, não se mostrou eficaz, uma vez que não se verificou potenciação dos efeitos citotóxicos e/ou citostáticos.

Embora a presença de mutação no receptor *FLT3* seja um factor de pior prognóstico na LMA e LMC em crise blástica, este estudo sugere que a inibição do *FLT3* pelo siRNA poderá constituir uma nova abordagem terapêutica nestes doentes mesmo na ausência de qualquer tipo de mutação neste receptor. A associação desta estratégia com fármacos já utilizados na clínica, como o imatinib, ou novos inibidores proteicos específicos, como os que interferem com o proteasoma, revelou-se também promissora. Desta forma a combinação destas terapias poderá ser uma mais-valia no tratamento destas neoplasias, as quais são caracterizadas por uma complexidade de eventos intracelulares, onde múltiplas vias estão comprometidas.

O sucesso desta aplicação está também relacionado com o desenvolvimento de vectores de transporte do siRNA mais eficientes, os quais tenham aplicabilidade clínica.

Palavras-Chave: receptor Flt3, siRNA, Leucemia Mielóide Aguda, Leucemia Mielóide Crónica, Fármacos anticancerígenos convencionais, Inibidores do proteasoma, Inibidores da farnesiltransferase.

Abstract

Cancer is still responsible for a large number of deaths, particularly in the western world, despite the progress made in its prevention and treatment. It is a multifactorial disease where genes have a fundamental role. When modified, stimulated or unsuppressed, give the cell a characteristic phenotype and an anarchic and unregulated growth. In fact, the development of human tumors is associated with genetic and epigenetic changes that determine an abnormal profile of gene expression, which influences the growth, differentiation and cell death.

Flt3 receptor (FMS-like tyrosine Kinase 3) is an example of a tyrosine Kinase receptor that belongs to type III RTK family, which plays an important role in the survival, proliferation and differentiation of the hematopoietic cells.

The constitutive activation of the Flt3 receptor has been described in hematologic neoplasias, particularly in chronic myeloid leukemia (CML), in Myelodysplastic Syndromes (MDS) and acute myeloid leukemia (AML), yielding a worse prognosis of these diseases. Regarding AML and CML it is known that in about 30% and 3-5% of cases, respectively, the *FLT3* receptor is mutated (D835 point mutation and/or internal tandem duplication, ITD), leading to its permanent activation, which causes the uncontrolled proliferation and apoptosis reduction of cells.

The knowledge of molecular mechanisms involved in hematologic malignancies has allowed the development of new drugs presenting a higher specificity to the tumor cells due to increased target specificity, thus lessening their toxicity. Among these farnesyltransferase (iFTS), proteasome (IP), tyrosine kinases (ITKs) and Flt3 inhibitors are noteworthy.

Since Flt3 receptor plays an important role in AML and CML, gene silencing might also be a potential therapeutic approach in these neoplasias. Thus, the interference RNA (RNAi) is a cellular process commonly used as a research tool in the control of specific genes expression, also holding therapeutic potential in numerous oncologic diseases.

The aim of the work here presented was to analyze the therapeutic potential of an *FLT3* siRNA in hematologic neoplasias namely chronic myeloid leukemia (CML) and acute myeloid leukemia (AML). This strategy was applied alone, in combination either with conventional anticancer drugs or with new drugs acting at specific molecular targets. The establishment of a correlation between the therapeutic potential of the

developed strategy with the presence or absence of mutations in the *FLT3* gene has also been attempted.

To this end two cell lines of myeloid leukemia's were used, namely the cell line HL-60 (acute promyelocytic leukemia, a subtype of AML), and K562 (chronic myeloid leukemia in blast crisis). Cells were transfected with an anti-*FLT3* siRNA alone and in combination with a proteasome inhibitor (MG-262) and a farnesyltransferase inhibitor (L-744,832), and with conventional anticancer drugs ATRA and Imatinib in HL-60 and K562 cells, respectively. To increase the transfection efficiency, the anti-*FLT3* siRNA was delivered into cells using a lipid-based transfection agent.

The generated results showed that the HL-60 and K562 cell did not present any mutation in the *FLT3* receptor. However, the anti-*FLT3* siRNA, in HL-60 cells, has promoted a decrease in cell viability and cell death by apoptosis. In addition the *FLT3* siRNA has also induced a cytostatic effect, detected by a decrease of proliferation after treatment, which was accompanied by a slight reduction in the expression of CD1 protein. In K562 cells has also been observed a reduction in cell viability and an increase of cell death by apoptosis and necrosis after treatment with anti-*FLT3* siRNA. However, these cells have not shown any cellular proliferation reduction.

It has also been noticed that after treatment with anti-*FLT3* siRNA the expression of this receptor decreased in HL-60 and K562 cells, evidencing the efficacy of the anti-*FLT3* siRNA used.

On the other hand, the anti-*FLT3* siRNA has not shown any synergistic effect when used in combination with ATRA in HL-60 cells. However, in K562 cells the effect of Imatinib has been enhanced when combined with anti-*FLT3* siRNA.

The results have also demonstrated that the association of anti-siRNA *FLT3* with MG-262 led to synergistic effects statistically significant only in HL-60 cells, with an increase of the cytotoxic effect evidenced by the enhanced of cell death by apoptosis and necrosis. In K562 cells, however, the association of siRNA *FLT3* with the same compound has not shown any cytotoxic or cytostatic advantage. On the other hand, the association of anti-*FLT3* siRNA with L-744,832 in HL-60 and K562 cells was not effective, since there was no potentiation of cytotoxic and / or cytostatics effects.

Although the presence of mutation in the *FLT3* receptor is a factor of poor prognosis in AML and CML in blast crisis, the present study suggested that inhibition of *FLT3* by

siRNA might be a novel therapeutic approach in these patients even in the absence of any mutation. The association of this strategy with drugs in clinical use, such as imatinib, or new specific protein inhibitors, such as those that interfering with the proteasome have also proved promising results. Thus, the combination of these therapies might be an advantage in treating these cancers, which are characterized by a complexity of intracellular events, where multiple pathways are compromised.

The success of this application is also related to the development of more efficient vectors for targeting therapy, which have clinical applicability.

Keywords: Flt3 receptor, siRNA, Acute Myeloid Leukemia, Chronic Myeloid Leukemia, conventional anti-cancer drugs, proteasoma inhibitors, farnesyltransferase inhibitors.

Lista de Abreviaturas

| | |
|---------------|--|
| 4E-BP | <i>4E-binding protein</i> |
| ADA | Adenosina desaminase |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AIF | <i>Apoptosis-inducing factor</i> |
| AKT | <i>Protein Kinase B</i> |
| ALK | <i>Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase</i> |
| AP-1 | <i>Activator protein 1</i> |
| APAF-1 | <i>Apoptotic protease activating factor 1</i> |
| AR | Ácido retinóico |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| ATRA | Ácido all-trans retinóico |
| BAD | <i>Bcl-2 antagonist of cell death</i> |
| BAGSK3 | <i>Bak, Bcl-2 homologous antagonist/killer</i> |
| BAKBAK | <i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i> |
| BAX | <i>Bcl-2 associated X protein</i> |
| BCL-2 | <i>B-cell leukemia/lymphoma</i> |
| BCL-XL | <i>B-cell leukemia extra large</i> |
| BID | <i>BH3 interacting domain death agonist</i> |
| CBI | <i>Casitas B-lineage Lymphoma</i> |
| CDKs | <i>Cyclin-dependent kinases</i> |
| CEHs | Células estaminais hematopoiéticas |
| CFC-GM | Células formadoras de colónias dos macrófagos e granulócitos |
| c-JUN | ju-nana |
| C-L | <i>Caspase-like</i> |
| CLP | <i>Cell lymphoid precursor</i> |
| CMP | <i>Cell myeloide precursor</i> |
| c-MYC | <i>Cellular myelocytomatosis viral oncogene homolog</i> |
| CPM | Células progenitoras multipotentes |
| CPMs | Células progenitoras multipotentes |
| Crb2 | <i>Crumbs homolog 2</i> |
| CSCs | Células estaminais cancerígenas |
| CT-L | Chymotrypsin-like |
| DC | Domínio cinase |
| DISC | <i>Death-inducing signaling complex</i> |
| DOTAP | <i>1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propane</i> |
| dsRNA | <i>Double-stranded RNA</i> |
| E1 | Enzimas activadoras de ubiquitina |
| E2 | Enzimas transportadoras de ubiquitina |
| E3 | Enzimas ligases de ubiquitina |
| ECACC | <i>European Collection of Cell Culture</i> |
| EGF | <i>Epidermal growth factor</i> |
| ELK-1 | <i>(ETS)-like transcription factor 1</i> |
| EMA | <i>European Medicines Agency</i> |
| ERK | <i>Extracellular signal-regulated kinase</i> |

| | |
|---------------|---|
| ETS-1 | <i>Erythroblastosis viral oncogene homolog 1</i> |
| FA | Fase de aceleração |
| FADD | <i>FAS-associated death domain</i> |
| FB | Fase Blástica |
| FC | Fase Crónica |
| FC | Factor de crescimento |
| FDA | Food and Drink Administration |
| FGF | <i>Fibroblast growth factor</i> |
| FL | Ligando do Flt-3 |
| Flt3 | <i>FMS-like tyrosine kinase 3</i> |
| G0 | Gap 0 |
| G1 | Gap 1 |
| G2 | Gap 2 |
| GAS | <i>Gama Activated Sequences</i> |
| G-CSF | <i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i> |
| GDP | <i>Guanosine diphosphate</i> |
| GF | <i>Growth factor</i> |
| GM-CSF | <i>granulocyte/macrophage colony-stimulating factor</i> |
| Grb2 | <i>Growth-factor receptor bound protein 2</i> |
| GTP | <i>Guanosine triphosphate</i> |
| HBS | <i>Hepes buffered saline solution</i> |
| IAPs | <i>Inhibitor of Apoptosis Proteins</i> |
| IC50 | Concentração à qual um composto possui a capacidade de reduzir a viabilidade celular para 50% |
| IFTs | Inibidores da farnesiltrasferase |
| IGF-1 | <i>Insulin like growth factor-1</i> |
| I-kB | Inibidor do factor κB |
| IL3 | Interleucina 3 |
| IL-7 | Interleucina 7 |
| IMA | Mesilato de Imatinib |
| IPs | Inibidores do proteasoma |
| ITD | <i>Internal tandem duplication</i> |
| ITK | <i>Inhibitors of tyrosine kinase</i> |
| JAK | Just another kinase |
| JM | Justamembranar |
| LEC | Leucemia Eosinofílica crónica |
| LLA | Leucemia Linfoblástica Aguda |
| LMA | Leucemia Mielóide Aguda |
| LNC | Leucemia neutrofílica crónica |
| LPA | Leucemia Promielocítica Aguda |
| LUV | Large unilameellar vesicles |
| M | Mitóse |
| Ma | Mastocitose |
| MAPK | <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> |
| MAPKK | <i>Mitogen Activated Protein Kinase kinase</i> |
| MEC | Matriz extracelular |

| | |
|----------------------------------|--|
| MIF | Média da intensidade de fluorescência |
| miRNA | <i>microRNA</i> |
| MLV | Multi-lamellar vesicle |
| MP | Mielofibrose Primária |
| MPT | <i>Transitory permeability pore</i> |
| mRNA | <i>messenger ribonucleic acid</i> |
| MTG8 | ETO/myeloid transforming gene on chromosome 8 (MTG8) |
| mTOR | <i>Mammalian target of rapamycin</i> |
| NF-kB | <i>Nuclear factor kB</i> |
| NMI | Neoplasmas Mieloproliferativos Inclassificáveis |
| NQO1 | <i>Quinone oxidoreductase</i> |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PAZ | <i>Piwi/Argonaute/Zwille</i> |
| PBS | Tampão fosfato (do ingles phosphate buffer saline) |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PDGF | Platelet-derived growth factor |
| PDK1 | <i>Phosphoinositide-dependent kinases 1</i> |
| PDK2 | <i>Phosphoinositide-dependent kinases 2</i> |
| PEM | Progenitores eritroides e megacariócitos |
| PGM | Progenitores granulócitos e macrófagos |
| PH | <i>Pleckstrin homology</i> |
| PI3K | <i>Phosphoinositide -3-kinase</i> |
| PIAS | <i>Protein inhibitors of activated stats</i> |
| PIP3 | <i>Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate</i> |
| PML | <i>Promyelocytic leukemia protein</i> |
| pro-B | Progenitores das células B |
| pro-T | Progenitores das células T |
| PTEN | <i>Phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10</i> |
| PTPs | <i>Protein tyrosine phosphatases</i> |
| PV | <i>Policitemia vera</i> |
| RAF | <i>Ras function</i> |
| Ran | <i>RAs-related Nuclear protein</i> |
| RARα | Receptor- α do ácido retinóico |
| RAS | <i>Rat sarcoma</i> |
| raαiRNA | <i>Repeat associated small interfering RNA</i> |
| RBM | <i>RNA binding motif</i> |
| RFLP | <i>Restriction Fragment Length Polymorfisms</i> |
| Rheb | <i>Homologue enriched in the brain</i> |
| R-I | Receptores da insulina |
| RNAi | RNA de interferência |
| RSK | <i>MAPKAP-K1 ou MAPK-activated protein kinase-1</i> |
| RTK | <i>Tyrosine kinase receptor</i> |
| S | Síntese |
| S6K | <i>Ribosomal protein S6 kinase</i> |

| | |
|--------------------------------|--|
| SCF | <i>Stem cells factor</i> |
| SCID-XI | <i>Severe combined immunodeficiency</i> |
| SH2 | <i>Src-Homology 2</i> |
| Shc | <i>Src-homology collagen protein</i> |
| SHIP | <i>SH2-domain-containing inositol phosphatase</i> |
| SHP | <i>Phosphatase containing SH2</i> |
| SHP-1 | <i>SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 1</i> |
| SHP2 | <i>SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2</i> |
| shRNA | <i>short-hairpin RNA</i> |
| siRNA | <i>small interfering RNA</i> |
| smac/Diablo | <i>Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases (Smac)/Direct IAP Binding Protein with low isoelectric point (DIABLO)</i> |
| SMD | <i>Síndromes Mielodisplásicas</i> |
| SOCS | <i>Suppressors of cytokine signaling</i> |
| SOS | <i>Son of Sevenless</i> |
| STAT | <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> |
| TB | <i>Trypan blue</i> |
| TE | <i>Trombocitemia Essencial</i> |
| TGF β | <i>Transformant growth factor β</i> |
| T-L | <i>Trypsin-like</i> |
| TM | <i>Domínio transmembranar</i> |
| TNF | <i>Tumor necrosis factor</i> |
| TNF-R1 | <i>Tumor necrosis factor receptor 1</i> |
| TNF-α | <i>Tumor necrose factor alfa</i> |
| TNF-β | <i>Tumor necrose factor beta</i> |
| TRAIL | <i>TNF related apoptosis inducing ligand</i> |
| TRBP | <i>(TAR) RNA-binding protein</i> |
| TrF | <i>Transferrina</i> |
| TrFR | <i>Receptor da Transferrina</i> |
| TSC1 /2 | <i>Tuberous sclerosis complex</i> |
| Ub | <i>Ubiquitina</i> |
| UFB-E | <i>Unidades formadoras de blastos-eritróides</i> |
| UFC | <i>Unidades formadoras de colónias</i> |
| UFC- B | <i>Unidades formadoras de colónias de basófilos</i> |
| UFC- E | <i>Unidades formadoras de colónias de eritrócitos</i> |
| UFC- G | <i>Unidades formadoras de colónias de granulócitos</i> |
| UFC- M | <i>Unidades formadoras de colónias de macrófagos</i> |
| UFC- Meg | <i>Unidades formadoras de colónias de megacariocitos</i> |
| UPP | <i>Ubiquitin proteasome pathway</i> |
| UV | <i>Ultra Violeta</i> |

Índice

| | |
|--|-----------|
| <i>Resumo</i> | XI |
| <i>Abstract</i> | XVII |
| <i>Lista de Abreviaturas</i> | XXIII |
| <i>Índice</i> | XXIX |
| <i>Índice de Figuras</i> | XXXIII |
| <i>Índice de Tabelas</i> | XXXVII |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. O Cancro e a sua origem | 3 |
| 1.2. Hematopoiese | 6 |
| 1.3. Vias de Sinalização..... | 8 |
| 1.3.1. Sinalização envolvida na proliferação e regulação do ciclo celular | 9 |
| 1.3.2. Sinalização envolvida na morte celular e degradação de proteínas..... | 20 |
| 1.4. Neoplasias hematológicas..... | 27 |
| 1.4.1. Leucemia Mielóide Aguda | 27 |
| 1.4.2. Leucemia Mielóide Crónica | 31 |
| 1.5. FLT3 e Neoplasias hematológicas | 34 |
| 1.6. Silenciamento de Genes | 38 |
| 1.6.1. RNA de interferência (RNAi)..... | 39 |
| 1.6.2. Small Interfering RNA (siRNA) | 42 |
| 1.6.3. siRNA e FLT3 | 43 |
| 1.7. Fármacos anti-cancerígenos convencionais e Inibidores específicos da sinalização celular..... | 44 |
| 1.8. Objectivos | 48 |
| 2. Materiais e Métodos | 49 |
| 2.1. Reagentes..... | 51 |
| 2.2. Cultura das linhas celulares..... | 51 |
| 2.2.1. Linha celular de Leucemia Mielóide Crónica | 52 |
| 2.2.2. Linha celular de Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) | 53 |
| 2.3. Extracção de ADN recorrendo ao Kit Illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare)..... | 53 |
| 2.4. Detecção de Mutações no gene FLT3 | 54 |
| 2.4.1. Detecção das duplicações internas em tandem (ITD)..... | 55 |
| 2.5. Transfecção dos lipoplexos nas linhas celulares | 56 |
| 2.5.1. Preparação dos Lipossomas Catiónicos por Hidratação/Extrusão | 56 |
| 2.5.2. Quantificação do teor lipídico dos lipossomas | 56 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 2.5.3. | Preparação dos lipoplexos (complexos lipossomas catiónicos-ADN) | 57 |
| 2.5.4. | Transfecção de linhas celulares | 58 |
| 2.6. | Incubação das linhas celulares com os fármacos | 58 |
| 2.7. | Análise da morfologia celular..... | 61 |
| 2.8. | Análise da Expressão de FLT3..... | 62 |
| 2.9. | Análise da proliferação e viabilidade celulares | 63 |
| 2.9.1. | Método de Exclusão de Azul de Tripano e Ensaio Metabólico com Resazurina . | 63 |
| 2.9.2. | Análise da morte celular por Citometria de Fluxo | 65 |
| 2.10. | Análise da expressão de ciclina D1 | 67 |
| 2.11. | Análise Estatística | 67 |
| 3. | <i>Resultados</i> | 69 |
| 3.1. | Caracterização das linhas celulares | 71 |
| 3.2. | Análise do Efeito Citotóxico e Citostático do siRNA anti- <i>FLT3</i> nas células HL-60 e K562..... | 72 |
| 3.3. | Análise do Efeito Citotóxico de Fármacos Anticancerígenos Convencionais e de novos fármacos dirigidos a alvos moleculares | 74 |
| 3.4. | Avaliação dos efeitos citotóxico e citostático do siRNA anti- <i>FLT3</i> em associação com os fármacos convencionais e os inibidores da sinalização celular nas células HL-60 e K562.. | 76 |
| 3.4.1. | Avaliação dos efeitos citotóxico e citostático do siRNA anti- <i>FLT3</i> em associação com fármacos convencionais nas células HL-60 e K562..... | 77 |
| 3.4.2. | Avaliação dos efeitos citotóxico e citostático do siRNA anti- <i>FLT3</i> em associação com o inibidor do proteasoma, MG-262, nas células HL-60 e K562 | 80 |
| 3.4.3. | Avaliação dos efeitos citotóxico e citostático do siRNA anti- <i>FLT3</i> em associação com o inibidor da farnesiltransferase, L-744,832, nas células HL-60 e K562 | 82 |
| 3.5. | Avaliação do tipo de morte celular..... | 84 |
| 3.5.1. | Análise da morte celular por microscopia óptica | 84 |
| 3.5.2. | Análise da Morte Celular por Citometria de Fluxo recorrendo à dupla marcação por Anexina V e Iodeto de propídio | 85 |
| 3.6. | Análise da expressão do receptor Flt3 por citometria de fluxo nas linhas celulares HL-60 e K562 | 89 |
| 3.7. | Análise da expressão da ciclina D1 por citometria de fluxo nas linhas celulares HL-60 e K562 | 91 |
| 4. | <i>Discussão</i> | 95 |
| 5. | <i>Conclusão</i> | 107 |
| 6. | <i>Referências Bibliograficas</i> | 111 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. 1. Representação esquemática de modelos hipotéticos explicativos da heterogeneidade intratumoral e da sua evolução. | 5 |
| Figura 1. 2. Representação Esquemática da Hematopoiese. | 7 |
| Figura 1. 3. Estrutura e activação dos receptores de tirosina-cinase. | 10 |
| Figura 1. 4. Transdução de sinal pela via das proteínas cinases activadoras da mitose - Via das MAPK..... | 11 |
| Figura 1. 5. Representação esquemática das vias de sinalização MAPcinase e JAK-STAT..... | 13 |
| Figura 1. 6. Representação esquemática da via de sinalização PI3K-AKT..... | 14 |
| Figura 1. 7. Estrutura do receptor Flt3..... | 16 |
| Figura 1. 8. Vias de sinalização intracelulares activadas pelo receptor Flt3. | 18 |
| Figura 1. 9. Representação esquemática do ciclo celular. | 20 |
| Figura 1. 10. Representação esquemática das vias de sinalização apoptóticas. | 23 |
| Figura 1. 11. Representação esquemática da via de sinalização ubiquitina-proteasoma. | 26 |
| Figura 1. 12. Activação do receptor Flt3 normal e mutado..... | 36 |
| Figura 1. 13. Mecanismos envolvidos na leucemogénese induzida pelo <i>FLT3</i> -ITD. | 37 |
| Figura 1. 14. Biogénese dos pequenos RNAs siRNA e miRNA. | 41 |
| Figura 1. 15. Modo de acção do inibidor da tirosina cinase, Mesilato Imatinib na proteína de fusão de tirosina-cinase BCR-ABL. | 45 |
| Figura 1. 16. Imagem representativa do modo de Inibição dos inibidores da proteína farnesil-transferase..... | 46 |
| Figura 1. 17. Acção dos Inibidores do Proteasoma (IPs) mediada pelo I κ B/NF- κ B..... | 47 |
| Figura 2. 1. Esquema representativo da elaboração de um esfregaço | 62 |
| Figura 2. 2. Esquema representativo de um hemacitómetro (Câmara de Neubauer). | 65 |
| Figura 3. 1. Curva de crescimento das células HL-60 (A) e K562 (B). | 71 |
| Figura 3. 2. Avaliação do efeito citotóxico e citostático de 48 horas de exposição a 100 η M de siRNA anti- <i>FLT3</i> nas células HL-60 e K562. | 73 |
| Figura 3. 3. Curvas dose resposta das células HL-60 e K562 tratadas com os fármacos convencionais ATRA (A) e Imatinib (B) e os inibidores MG-262 (C e D) e L-744,832 (E e F). | 76 |

| | |
|--|----|
| Figura 3. 4. Avaliação do efeito citotóxico e citostático de 48 horas de exposição a 100 η M de siRNA anti- <i>FLT3</i> em associação com ATRA e Imatinib nas células HL-60 e K562, respectivamente. | 79 |
| Figura 3. 5. Avaliação do efeito citotóxico e citostático do siRNA anti- <i>FLT3</i> em associação com o inibidor do proteasoma, MG-262, nas células HL-60 e K562. | 82 |
| Figura 3. 6. Avaliação do efeito citotóxico e citostático da terapêutica combinada de 100 η M de siRNA anti- <i>FLT3</i> com o inibidor da farnesiltransferase, L-744,832, nas células HL-60 e K562. | 83 |
| Figura 3. 7. Aspectos morfológicos das células HL-60 e K562 na ausência e após tratamento com o siRNA anti- <i>FLT3</i> | 85 |
| Figura 3. 8. Avaliação do tipo de morte celular por citometria de fluxo nas células HL-60 e K562 tratadas com siRNA anti- <i>FLT3</i> | 86 |
| Figura 3. 9. Avaliação do tipo de morte celular por citometria de fluxo nas células HL-60 e K562 tratadas com o siRNA anti- <i>FLT3</i> em associação com o inibidor do proteasoma, MG-262, e com o inibidor tirosina-cinase, Imatinib. | 88 |
| Figura 3. 10. Avaliação da percentagem de células que expressa o receptor Flt3 por citometria de fluxo, após tratamento das células HL-60 (A) e K-562 (B) com siRNA anti- <i>FLT3</i> | 90 |
| Figura 3. 11. Avaliação da expressão do receptor Flt3 por citometria de fluxo, após tratamento das células HL-60 (A) e K-562 (B) com siRNA anti- <i>FLT3</i> | 91 |
| Figura 3. 12. Avaliação da expressão da proteína ciclina D1 (CD1) por citometria de fluxo, após tratamento das células K-562 com siRNA anti- <i>FLT3</i> (A) em associação com MG-262 (B) e Imatinib (C). | 92 |
| Figura 3. 13. Avaliação da expressão da proteína ciclina D1 (CD1) por citometria de fluxo, após tratamento das células HL-60 com siRNA anti- <i>FLT3</i> (A) em associação com MG-262 (B) e Imatinib (C). | 93 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. 1. Classificação das leucemias miéloide agudas (LMA), OMS 2008 | 29 |
| Tabela 1. 2. Classificação dos Neoplasmas Mieloproliferativos, 2008 da OMS | 31 |
| Tabela 1. 3. Caracterização da evolução da leucemia miéloide crónica | 33 |
| Tabela 2. 1. Sequência do ADN alvo do <i>siRNA anti-FLT3</i> e cadeia sense e antisense do seu mRNA. 58 | |
| Tabela 2. 2. Condições da cultura das linhas celulares HL-60 e K562 com <i>siRNA anti-FLT3</i> em monoterapia e e em associação com os fármacos ATRA, Imatinib, MG-262 e L-744,832,..... | 59 |
| Tabela 2. 3. Condições de incubação das células K562 e HL-60 com o inibidor da Farnesil Transferase, L-744,832..... | 59 |
| Tabela 2. 4. Condições de incubação das células K562 e HL-60 com o inibidor do Proteasoma, MG-262. | 60 |
| Tabela 2. 5. Condições de incubação das células K562 e HL-60 com o inibidor de tirosina cinase, Imatinib e o ácido all-transretinóico (ATRA), respectivamente. | 60 |
| Tabela 2. 6. Descrição das condições de preparação e armazenamento dos compostos utilizados. | 61 |

1. Introdução

1.1. O Cancro e a sua origem

O cancro, apesar dos progressos conseguidos na sua profilaxia e tratamento, é ainda responsável por um número elevado de mortes, nomeadamente no mundo ocidental. É uma doença multifactorial resultante da acumulação de alterações genéticas e/ou epigenéticas, das quais resultam alterações no ADN e/ou na expressão de genes, respectivamente, com consequente imortalização e transformação de uma célula normal numa célula maligna. Deste modo, o cancro é essencialmente uma doença de genes que quando modificados, estimulados ou desreprimidos, conferem à célula um fenótipo particular, conduzindo ao crescimento desregulado e anárquico, ao bloqueio da diferenciação e à resistência à morte celular por apoptose (Sarmiento Ribeiro AB, 2000; Gonçalves AC, 2008).

As alterações genéticas, tais como amplificações, deleções, translocações cromossómicas e mutações pontuais, resultam em activação de oncogenes/protooncogenes ou inibição de genes supressores tumorais. Por outro lado, a hiper ou hipometilação das regiões promotoras dos genes e a desacetilação/acetilação das histonas constituem modificações epigenéticas, responsáveis pela alteração dos níveis de expressão génica. Ao contrário das mutações, as alterações epigenéticas são potencialmente reversíveis, criando novas hipóteses de intervenção médica (Hanahan *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2003; Lodish *et al.*, 2004).

Como referido anteriormente, o cancro é uma doença multifactorial resultando da intervenção de vários factores, nomeadamente o ambiente, a predisposição genética, o estilo de vida, a exposição a agentes químicos e/ou radiação, entre outros. Estes factores contribuem para o aparecimento de mutações em genes fundamentais ao correcto funcionamento do organismo. Assim, os genes mais frequentemente alterados são os proto-oncogenes, que estão envolvidos na proliferação celular; os genes supressores tumorais, cuja função é suprimir a proliferação caso ocorram anomalias e que são expressos em menor quantidade nas células cancerígenas; os genes que regulam a apoptose, quer por diminuição dos genes pró-apoptóticos, quer por aumento dos anti-apoptóticos; e os genes envolvidos na reparação do ADN que

deixam de executar correctamente a sua função (Hanahan *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2003; Lodish *et al.*, 2004).

Sabe-se que os tumores têm uma natureza heterogénea, baseada na sua histopatologia e função das células que os compõem, bem como, na sua capacidade de resposta ao tratamento clínico. Essa heterogeneidade levou a que recentemente os investigadores colocassem uma nova hipótese para o aparecimento e progressão tumoral, baseada na existência de uma associação entre as células estaminais e o desenvolvimento de neoplasias (Curley *et al.*, 2011). Esta nova hipótese sugere que uma única população de células estaminais cancerígenas (CSCs) seja responsável pela iniciação, progressão, metastização e recidivas tumorais. Segundo esta teoria, os tumores têm populações fenotipicamente distintas das células estaminais normais, com capacidade de auto-renovação e potencial para reconstruir toda a sua heterogeneidade celular (Subramaniam *et al.*, 2010; Curley *et al.*, 2011). Assim, as células estaminais cancerígenas mantêm a capacidade de auto-renovação, tal como as células estaminais normais, levando ao crescimento desregulado e desenvolvimento do processo tumoral (Subramaniam *et al.*, 2010, Curley *et al.*, 2011). A origem destas células não está completamente esclarecida, no entanto pensa-se que: (1) poderão surgir de células estaminais normais que sofreram mutação, uma vez que as células estaminais mais primitivas, ou seja, as que sofrem auto-renovação mais vezes, têm maior susceptibilidade à mutação, perdendo a sua capacidade de auto-regulação mas mantendo a de auto-renovação (Lobo *et al.*, 2007); (2) o seu aparecimento resulta de mutações em células-filhas que sofrem desdiferenciação e, deste modo, adquirem capacidade de auto-renovação (Subramaniam *et al.*, 2010).

São consideradas assim, duas hipóteses para a evolução e progressão do cancro: o modelo que defende a existência de evolução clonal e outro que considera as células estaminais cancerígenas. No entanto, alguns autores consideram que a evolução e progressão tumoral resultam de ambos os mecanismos (Figura 1.1) (Polyak K., 2007).

Embora os dois modelos considerem que a origem tumoral reside num precursor estaminal comum que adquire múltiplas mutações e apresenta capacidade proliferativa ilimitada, existem também diferenças entre ambos. Os dois modelos explicam vários mecanismos de diferentes maneiras, como por exemplo: (1) os mecanismos conducentes à heterogeneidade tumoral, que no modelo clonal aparecem

como uma competição entre as células tumorais com diferentes fenótipos, enquanto, no modelo das CSCs, a heterogeneidade surge como um programa aberrante de diferenciação; (2) as células alvo, responsáveis pela iniciação da transformação tumoral que, enquanto no modelo clonal não existe uma célula normal específica para a iniciação tumoral, no modelo das CSCs existe uma célula estaminal normal responsável pelo evento; (3) as subpopulações de células tumorais condutoras da progressão tumoral onde, no modelo clonal, não existe nenhuma célula com vantagem selectiva e, no modelo das CSCs, existe uma pequena população de células, as células cancerígenas estaminais; (4) a resistência a fármacos que o modelo clonal postula que a própria terapia selecciona clones resistentes, enquanto que o modelo das CSCs defende que estas apresentam uma resistência intrínseca a fármacos (Adaptado de Polyak, K., 2007).

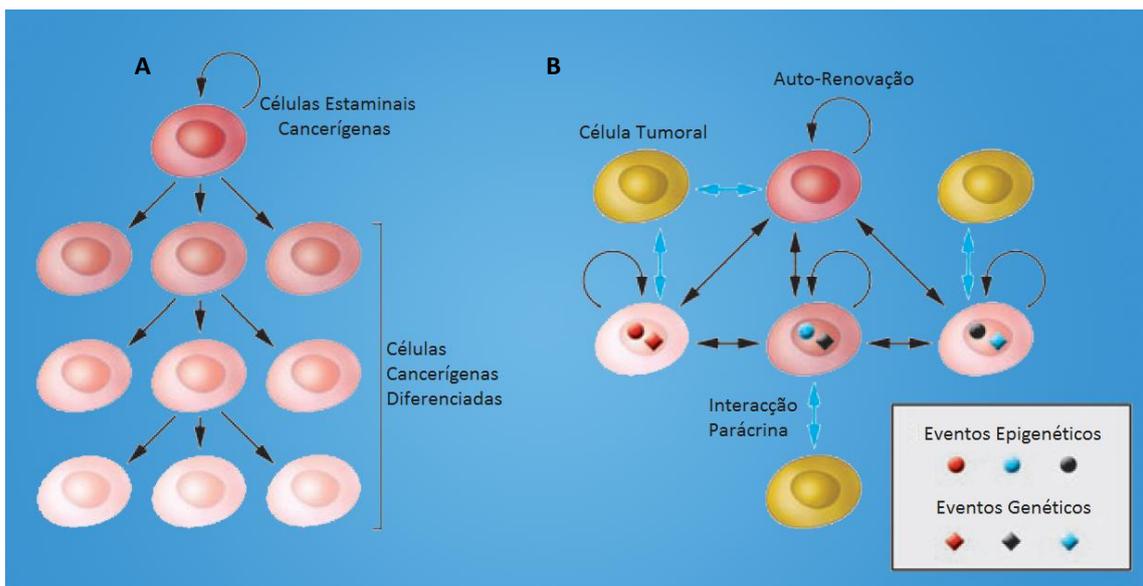


Figura 1. 1. Representação esquemática de modelos hipotéticos explicativos da heterogeneidade intratumoral e da sua evolução.

(A) Modelo das Células Estaminais Cancerígenas (CSCs): as células cancerígenas diferenciadas resultantes da diferenciação das células CSCs não apresentam capacidade de auto-renovação. Deste modo, apenas as CSCs podem acumular alterações genéticas e/ou epigenéticas adicionais que levam à progressão tumoral e resistência a fármacos.

(B) Modelo de evolução clonal: o fenótipo tumoral é determinado pela combinação do tipo de origem celular da célula iniciadora que adquire alterações genéticas e/ou epigenéticas, e sinais parácrinos vindos das células vizinhas. Os fenótipos celulares não são estáveis e podem alterar-se com a progressão

tumoral. Todas as células tumorais apresentam capacidade de auto-renovação, sendo assim, todas elas poderão contribuir para a progressão tumoral e resistência a fármacos (Adaptado de Polyak, K., 2007).

O modelo das células estaminais cancerígenas e o modelo da evolução clonal não têm, no entanto, de ser considerados individualmente sendo a combinação dos dois também plausível. Para que esta correlação seja considerada, é necessário determinar o modelo que melhor define o comportamento clínico dos doentes. É assim essencial, identificar e caracterizar moduladores de células estaminais e de células de linhagens mais diferenciadas. Deste modo, novas abordagens terapêuticas mais específicas, eficazes e de menor toxicidade, poderão ser desenvolvidas (Adaptado de Polyak, K., 2007).

1.2. Hematopoiese

A Hematopoiese é o processo de formação, desenvolvimento, diferenciação e maturação das células sanguíneas a partir de um precursor celular comum e indiferenciado: as células estaminais hematopoiéticas (CEHs) pluripotentes, também designadas como “*Stem Cell*” ou célula tronco. Estas são mantidas, dentro de condições normais, como uma população quiescente altamente regulada (Warr *et al.*, 2011).

As CEHs originam as células progenitoras de linhagem hematopoiética (CPMs), células multipotentes, que têm capacidade de se diferenciar noutros tipos de células mais diferenciadas dando origem a células sanguíneas maduras, altamente especializadas e reguladas, como os proeritoblastos, que vão dar origem aos glóbulos vermelhos; os mieloblastos, que originam os basófilos, eosinófilos e neutrófilos; os linfoblastos, que originam os linfócitos; os monoblastos, precursores dos monócitos; e os megacarioblastos que dão origem às plaquetas (Figura 1.2) (Lodish *et al.*, 2004; Hoffbrand *et al.*, 2011).

No adulto, as células estaminais são mantidas num microambiente especializado, composto por uma rede microvascular e uma variedade de células do estroma que

produzem substâncias essenciais ao crescimento, diferenciação, maturação e morte das células hematopoiéticas (Gonçalves, AC., 2008).

As CEHs têm, deste modo, uma íntima associação com as células do estroma da medula óssea, as quais libertam mediadores químicos como citocinas e quimiocinas, que vão regular todo o processo hematopoiético. Alguns dos reguladores moleculares mais importantes incluem: N-caderina, Notch, Wnt, Hedgehog, o Factor de Crescimento transformante β (TGF β) e o Factor de Crescimento dos Fibroblastos (FGF) (Hoffbrand *et al.*, 2011). Estes reguladores estão implicados numa variedade de processos celulares tais como manutenção, diferenciação e auto-renovação das CEHs (Hoffbrand *et al.*, 2011).

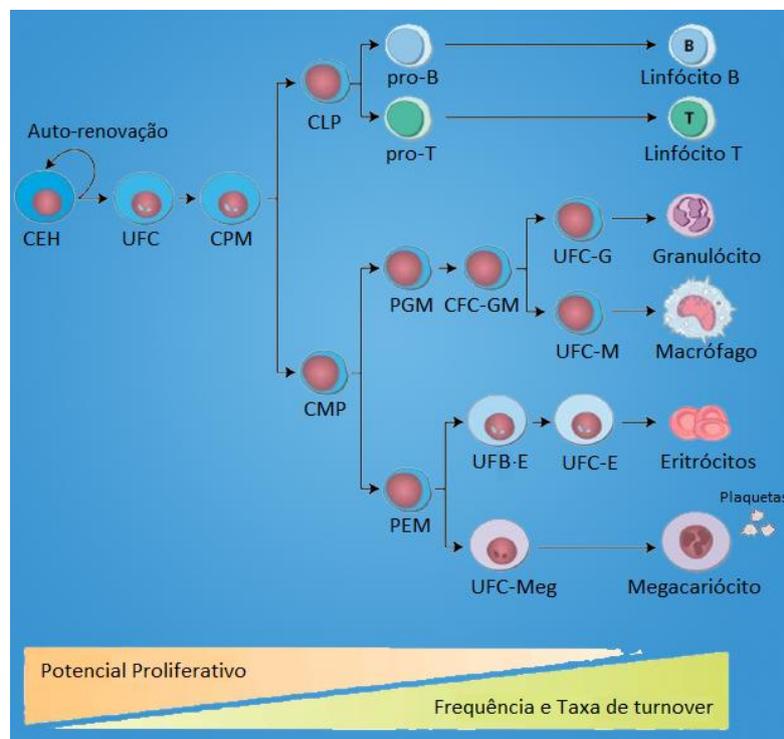


Figura 1. 2. Representação Esquemática da Hematopoiese.

As células progenitoras hematopoiéticas (ou células estaminais pluripotentes - CEH) podem auto-renovar-se ou originar as unidades formadoras de colônias (UFC) que por sua vez podem diferenciar-se nas células progenitoras multipotentes (CPM). Estas originam os precursores das linhagens linfóide e mieloide (CLP e CMP), que pela acção de Factores de Crescimento e posterior diferenciação celular dão origem aos progenitores das diferentes células maduras do sangue: linfócitos B e linfócitos T, granulócitos, macrófagos, eritrócitos, plaquetas e megacariócitos. Na figura estão representados os progenitores das células B e T (pro-B e pro-T), dos granulócitos e macrófagos (PGM) e dos eritrócitos e megacariócitos (PEM), as células formadoras de colônias dos macrófagos e granulócitos (CFC-GM), as

unidades formadoras de blastos-eritróides (UFB-E), as unidades formadoras de colónias (UFC) de megacariocitos (Meg), de eritrócitos (E), de macrófagos (M) e de granulócitos (G). (Adaptado de Hoffbrand *et al.*, 2011).

1.3. Vias de Sinalização

Para a manutenção da homeostasia celular, todas as células num organismo multicelular necessitam de possuir um comportamento altamente coordenado e regulado (Pelengaris *et al.*, 2006). Esta coordenação e regulação, apenas se tornam possíveis devido a uma comunicação intra e intercelular que permite a interpretação de diversas mensagens que levam à execução de respostas apropriadas. Nestas, intervêm moléculas sinalizadoras que integram e coordenam processos celulares, como o metabolismo, a proliferação, a diferenciação, a sobrevivência e a morte celular (Gonçalves AC., 2008).

Os sinais, estimulatórios e/ou inibitórios, são reconhecidos por receptores, os quais permitem a activação de várias vias de sinalização, levando a uma resposta intracelular que regula a actividade de factores de transcrição nucleares, responsáveis pelo controlo da expressão génica (Gonçalves AC., 2008).

A perda ou a ineficácia destes sistemas de regulação celular encontra-se muitas vezes associada à origem de neoplasias. Neste sentido, as células cancerígenas têm um elevado grau de autonomia, o que as torna menos susceptíveis a sinais externos, comparativamente às células normais. Esta autonomia é reflectida numa menor necessidade de sinais estimulatórios de crescimento (ex. Factores de crescimento) fornecidos por células adjacentes e pela matriz extracelular (MEC). A actividade transcricional uma vez alterada fornece também vantagem de crescimento sobre as células adjacentes, permitindo a libertação de sinais intracelulares, levando assim, à proliferação desregulada (Pelengaris *et al.*, 2006).

Deste modo, o conhecimento das vias de sinalização que controlam toda a homeostase celular revela-se importante para o conhecimento do processo

carcinogénico e das vias moleculares afectadas, permitindo o reconhecimento de novos alvos moleculares e novas terapêuticas (Pelengaris *et al.*, 2006).

1.3.1. Sinalização envolvida na proliferação e regulação do ciclo celular

As vias de sinalização conducentes à proliferação celular iniciam-se geralmente pela ligação de factores de crescimento a um receptor membranar, a maioria dos quais com função de tirosina-cinase (GonçalvesA.C., 2008; Sarmiento Ribeiro AB *et al.*, 2008). O genoma humano codifica 59 receptores tirosina-cinases (RTKs), que mediante activação proporcionam locais de ligação para proteínas efectoras específicas que possuem o domínio SH2 (local de homologia Src 2) e PTB (local de ligação de fosfotirosina).

Os receptores de tirosina cinases são proteínas transmembranares, que apresentam frequentemente três domínios principais: um domínio extracelular de ligação do ligando (factor de crescimento), um domínio justamembranar e um domínio citoplasmático, com actividade catalítica. De uma maneira geral, após ligação do ligando específico, ocorre a dimerização do receptor; fosforilação dos resíduos de tirosina no domínio catalítico, no citoplasma, com consequente activação do receptor. Daqui resulta uma cascata de sinais intracelulares que culmina na transcrição de genes reguladores da proliferação, diferenciação e progressão do ciclo celular (Figura 1.3) (Sarmiento Ribeiro AB *et al.*, 2008; Shami *et al.*, 2008).

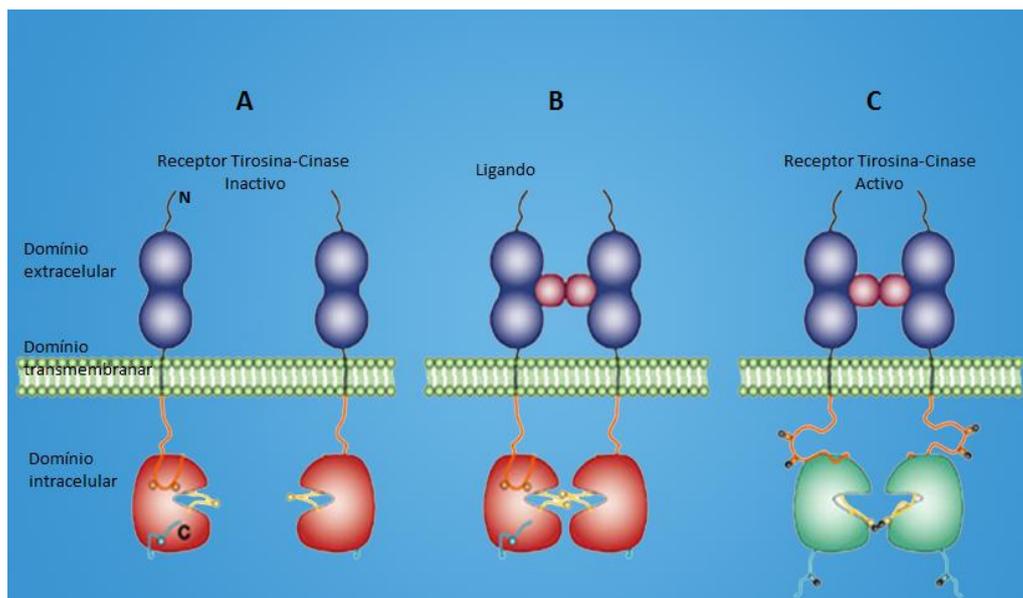


Figura 1. 3. Estrutura e ativação dos receptores de tirosina-cinase.

A) Os receptores de tirosina cinase são monómeros constituídos por um domínio extracelular de interação com o ligando, um domínio transmembranar e um domínio citosólico compreendendo o local com actividade de tirosina cinase (a amarelo); B) A interacção com o ligando promove a dimerização e autofosforilação do receptor; C) Uma mudança conformacional subsequente permite a ligação de ATP, transfosforilações secundárias noutros resíduos de tirosina-cinase no domínio citosólico e a ligação a proteínas efectoras. (Adaptado de Lodish et al., 2004; Cooper & Hausman, 2007).

Várias vias de sinalização celular estão envolvidas na proliferação e diferenciação celular no sistema hematopoiético, através da activação de receptores específicos por factores de crescimento (FC). Entre estas salientamos a via das MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), a via JAK-STAT (*Just Another Kinase – Signal Transducer and Activator of Transcription*) e a via do PI3K/AKT (Phosphatidylinositol 3-kinase/Protein Kinase B) (Lodish et al., 2004; Cooper & Hausman, 2007).

A via das proteínas cinases activadora da mitose, a via MAPK, é uma cascata de proteínas cinases altamente conservada que actuam a partir da activação das proteínas RAS. Os receptores dos factores de crescimento com actividade de tirosina cinase incluem os receptores da insulina (R-I) e os receptores para factores de crescimento, como por exemplo o factor de crescimento derivado da plaqueta (PDGF) e das células estaminais (SCF). São activados pela ligação do respectivo FC que induz a sua dimerização, e consequente activação do domínio intracelular de tirosina-cinase, o

que promove a auto-fosforilação do mesmo em resíduos de tirosina. A activação destes receptores culmina na activação de proteínas com domínio SH2 (Src-Homology 2), por fosforilação em resíduos de tirosina, permitindo a transdução de sinal. Assim, proteínas que possuam este domínio, como a proteína RAS são activadas também em resíduos de tirosina e, sendo cinases, podem fosforilar outras proteínas através de uma cascata de fosforilações sucessivas em resíduos de serina e treonina (Sarmiento Ribeiro AB *et al.*, 2007; Gonçalves AC., 2008; Coelho AS., 2009).

Uma vez activada, a proteína RAS activa a proteína RAF e recruta o complexo MAP cinase, o qual consiste em duas classes de cinases: a cinase extracelular reguladora-sinal (ERK) e a MAPK/ERK (MEK). A cascata MAPK inicia-se com a fosforilação e activação da MEK pela RAF e subsequente activação da ERK pela MEK. Depois de activada, a ERK dissocia-se do complexo RAS/RAF/MEK/ERK e vai fosforilar proteínas do citoesqueleto, cinases, e factores de transcrição, como o factor NF-kB, AP-1, ETS-1, c-JUN e c-MYC. As consequências destas fosforilações de substratos pela ERK incluem mudanças na mobilidade celular e na expressão de genes que promovem a proliferação, a diferenciação, a sobrevivência celular, a imortalização e a angiogénese (Figura 1.4) (Wong K., 2009).

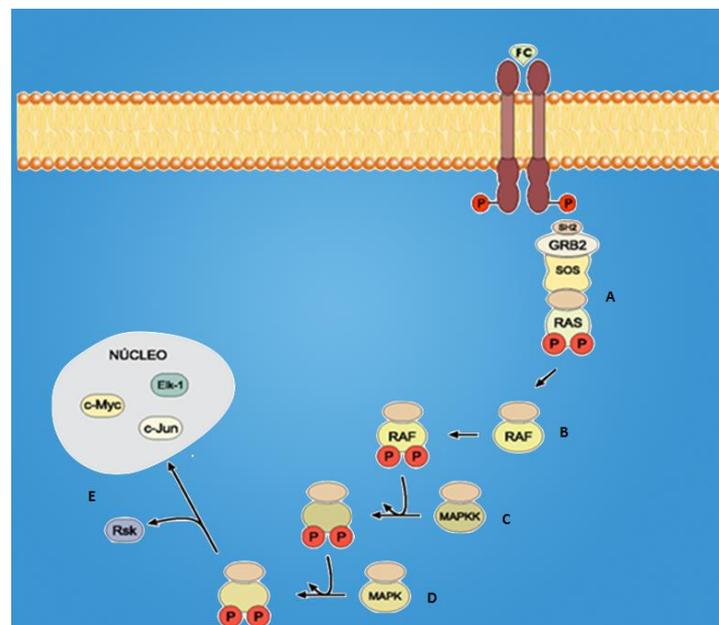


Figura 1. 4. Transdução de sinal pela via das proteínas cinases activadoras da mitose - Via das MAPK.

A ligação do ligando, normalmente um factor de crescimento (FC) como por exemplo PDGF, EGF, induz a activação da cinase, que vai fosforilar, em resíduos de tirosina, proteínas alvo com resíduos SH2 (Src-

Homology 2), como por exemplo, a proteína adaptadora GRB2. Assim, permite a recolocação da proteína que efectua a troca de GTP, a proteína SOS na membrana, levando à activação da proteína RAS (A). A proteína RAS, uma vez activada, actua como serina treonina cinase interagindo com a proteína RAF, fosforilando-a em resíduos de serina e de treonina (B). A proteína RAF induz uma cascata de sucessivas fosforilações em proteínas, primeiro em resíduos de serina e treonina na proteína MAPKK, activando a actividade de tirosina treonina cinase desta proteína (C). A MAPKK vai então fosforilar em resíduos de tirosina e treonina a proteína MAPK (D) 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 (E) (Adaptado de Sarmiento-Ribeiro *et al.*, 2007).

A via das JAK-STAT é activada por citocinas, substâncias que desempenham várias funções celulares nomeadamente no controlo do crescimento, na diferenciação e na sobrevivência das células, em particular do sistema hematopoiético. A activação intracelular ocorre quando estas citocinas induzem a dimerização do receptor, levando à activação de tirosina cinases citoplasmáticas, as cinases Janus ou JAKs (Rawlings *et al.*, 2004; Sarmiento Ribeiro AB *et al.*, 2007; Gonçalves AC., 2008). As JAKs, subsequentemente, fosforilam alvos adicionais, incluindo os STATs. Estes são factores de transcrição que se encontram latentes no citoplasma até serem activados. Deste modo, as fosfotirosinas JAKs permitem a dimerização dos STATs através da interacção com o domínio conservado SH2. Depois de fosforilados os STATs entram no núcleo através de um mecanismo dependente da importina A-5 e da via de importação nuclear da proteína RAN (Rawlings *et al.*, 2004).

Uma vez no núcleo, os STATs ligam-se a sequências reguladoras específicas, as GAS (Gamma Activated Sequences), activando ou reprimindo a transcrição de genes alvo. A cascata de sinalização JAK/STAT traduz directamente um sinal celular numa resposta transcricional. Esta via de sinalização é regulada por vários mecanismos que incluem a degradação endossómica dos complexos JAK/receptor, através de endocitose mediada por receptores, e a acção de variantes de STATs com acção predominantemente negativa (Figura 1.5) (Sarmiento-Ribeiro, 2000, Rawlings *et al.*, 2004; Sarmiento-Ribeiro *et al.*, 2007, Gonçalves AC., 2008;). Existem três classes principais de reguladores negativos: os SOCS (*suppressors of cytokine signaling*) que se ligam a proteínas JAKs fosforiladas, inibindo a sua via de sinalização; as PIAS (*protein inhibitors of activated*

stats) que se ligam a STATs activadas e previnem a sua ligação ao ADN; e as PTPs (*protein tyrosine phosphatases*), como a proteína SHP-1 (Phosphatase containing SH2) que se liga quer a JAKs fosforiladas, desfosforilando-as, quer a receptores que facilitem a sua desfosforilação (Rawlings *et al.*, 2004). No entanto, algumas citocinas, como as interleucinas 2 a 6 e o factor de crescimento das colónias dos macrófagos e granulócitos (GM-CSF), utilizam também a cascata RAS-RAF-MAPK (Sarmiento-Ribeiro, 2000; Gonçalves AC., 2008).

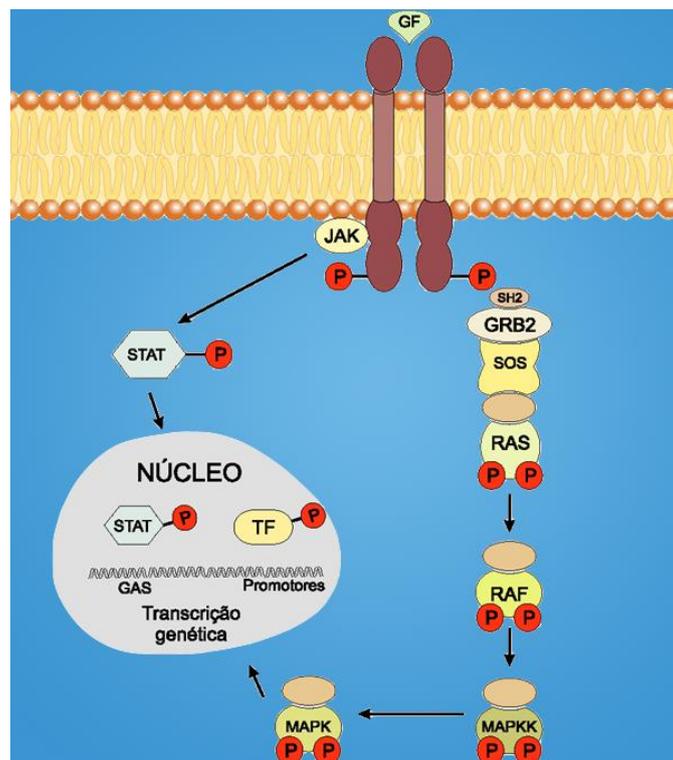


Figura 1. 5. Representação esquemática das vias de sinalização MAPcinase e JAK-STAT.

A ligação da citocina (GF) ao seu receptor conduz à activação da respectiva JAK (*just another kinase*) por fosforilação em resíduos de tirosina. Este processo leva, por sua vez, à activação de FT citoplasmáticos, os STATs (*signal transducers and activators of transcription*), que vão para o núcleo, e ligam-se a sequências de ADN específicas, as GAS, e activam outros componentes da sinalização, incluindo FT (Adaptado de Sarmiento-Ribeiro *et al.*, 2007).

A via JAK/STAT, uma via altamente regulada, culmina na transcrição de genes envolvidos na proliferação, diferenciação e regulação do ciclo celular. No núcleo,

proteínas conhecidas como factores de transcrição, activam genes que conduzem a célula através das diferentes fases do ciclo celular (Gonçalves AC., 2008).

A via Fosfatidil Inositol-3-Cinase (PI3K) é uma via de sinalização que também controla a proliferação, o crescimento e a sobrevivência celular (Warr *et al.*, 2011).

Um elevado número de receptores da membrana plasmática, nomeadamente os que têm actividade de tirosina cinase (ex: IGF-1 (*insulin like growth factor-1*)) e citocinas podem activar a via de sinalização PI3K. Uma vez activa, a PI3K é recrutada para a membrana plasmática, através de uma molécula adaptadora, onde permanece activa e fosforila lípidos de fosfoinositol na posição D3 no anel do inositol. Estes, por sua vez, recrutam os domínios PH (*pleckstrin homology*) de proteínas como a cinase serina-treonina, AKT, e PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) para a membrana plasmática. A cinase AKT uma vez na membrana é fosforilada pela PDK1 ficando activa e, subsequentemente activa múltiplas proteínas nos seus resíduos serina e treonina (Meier *et al.*, 2005). Assim, a AKT através da fosforilação de vários alvos moleculares, torna-se numa peça fulcral numa variedade de funções celulares incluindo, a proliferação e sobrevivência celulares (Figura 1.6) (PAEZ *et al.*, 2002; Meier *et al.*, 2005).

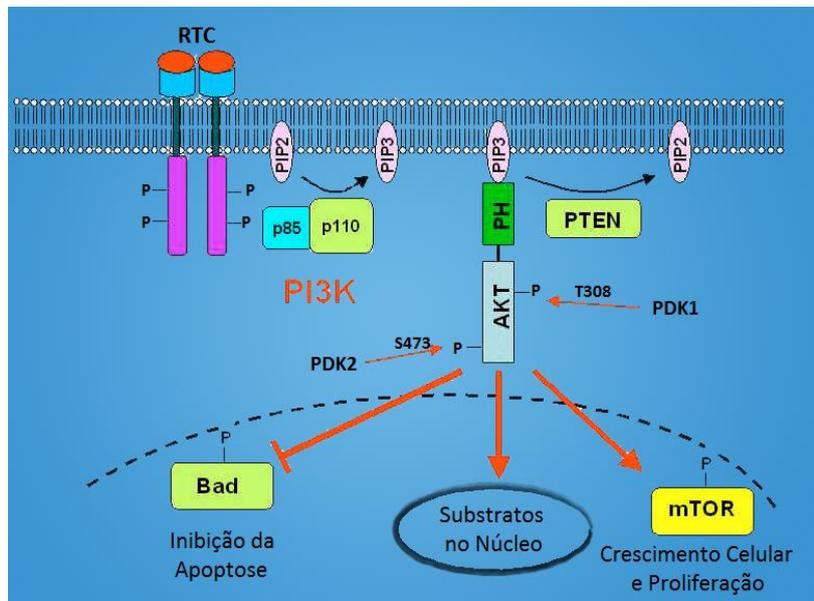


Figura 1. 6. Representação esquemática da via de sinalização PI3K-AKT.

Um factor extracelular, como um factor de crescimento, activa o seu receptor tirosina cinase (RTC) resultando na autofosforilação do mesmo. A proteína PI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase) constituída

pela subunidade adaptadora p85 e a subunidade catalítica p110 é translocada para a membrana plasmática ligando-se a resíduos de fosfotirosina da proteína RTC através da sua subunidade adaptadora, resultando numa activação alostérica da subunidade catalítica, p110, levando posteriormente à produção de PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate). Este último, recruta proteínas com o domínio PH (pleckstrin homology), como a AKT para a membrana celular. A proteína PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10) é uma fosfatase da PIP3, regulando negativamente a via de sinalização PI3K-AKT. Da interacção da proteína PIP3 com o domínio PH de AKT, surgem mudanças conformacionais na AKT, expondo os seus dois resíduos de fosforilação T308 a S473, levando posteriormente à fosforilação dos mesmos através das proteínas cinases de serina e treonina PDK1 e PDK2 (3'-phosphoinositide-dependent kinases 1 e 2). A AKT activa é posteriormente translocada para o núcleo, onde medeia a activação e inibição de genes alvo resultando na sobrevivência, diferenciação e proliferação celulares (Adaptado de Meier *et al.*, 2005).

O receptor Flt3 (FMS-like tyrosine kinase 3) é um exemplo de receptor tirosina-cinase da família dos RTK tipo III, onde se incluem também os receptores c-KIT, c-FMS, (colony-stimulating factor-1 receptor) e PDGFR (Platelet-Derived Growth Factors). O gene humano que codifica este receptor, originalmente clonado a partir de células estaminais hematopoiéticas CD34⁺, localiza-se no cromossoma 13 (13q12), e codifica uma proteína com 993 resíduos de aminoácidos. Esta proteína é constituída por um domínio extracelular, formado por cinco domínios do tipo das imunoglobulinas, uma região transmembranar, uma região justamembranar (JM) e dois domínios citoplasmáticos de tirosina-cinase ligados por um local de inserção de cinases (Figura 1.10). O domínio JM encontra-se conformacionalmente disposto de forma a ocorrer uma auto-inibição do receptor na ausência do ligando do Flt3. Porém, quando o ligando interage com o receptor, esta conformação altera-se, ocorrendo um processo de transfosforilação, provavelmente nos resíduos de Tirosina-589 e Tirosina-591, seguido de autofosforilação do receptor (Shami K *et al.*, 2008).

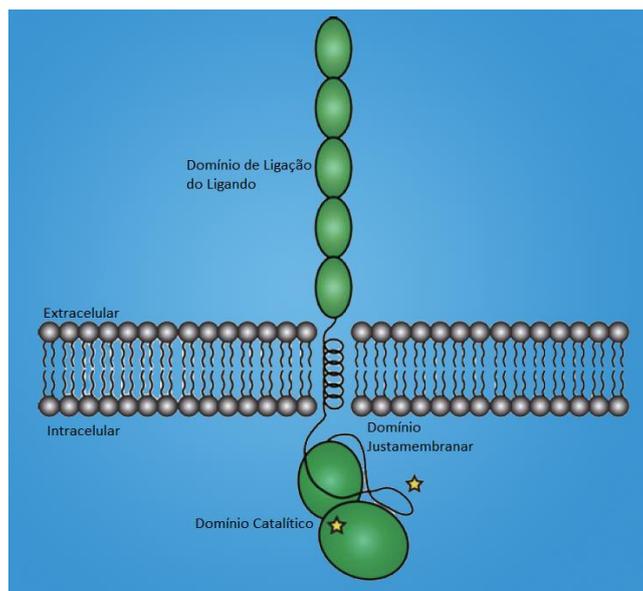


Figura 1. 7. Estrutura do receptor Flt3.

O receptor Flt3 apresenta uma região extracelular com um domínio de ligação do ligando, formado por cinco domínios do tipo das imunoglobulinas, um domínio transmembranar e um citoplasmático. Este último é constituído por um domínio justamembranar e pelos domínios catalíticos com actividade de tirosina cinase (Adaptado de Chan PM., 2011).

O ligando, FL, do receptor de Flt3, é uma proteína transmembranar do tipo I, expressa em células hematopoiéticas e células do estroma medular (células estaminais hematopoiéticas e fibroblastos) que pode ser libertada como uma proteína homodimérica solúvel. Ambas as formas, solúvel e membranar, têm a capacidade de activar tirosina-cinases, potenciando uma cadeia de sinais que podem levar à proliferação e crescimento das células progenitoras na medula e no sangue, bem como à inibição de sinais apoptóticos. Esta activação das tirosina-cinases surge por ligação do FL ao receptor Flt3, a qual induz, neste último, alterações conformacionais que levam à sua dimerização e activação por autofosforilação dos resíduos de tirosina (Gilliland *et al.*, 2002; Shami *et al.*, 2008).

O receptor Flt3 ao contrário do seu ligando FL, que parece ser ubiquamente expresso, apresenta um padrão de expressão muito restrito, estando localizado apenas em tecidos hematopoiéticos e neuronais, sendo que na medula óssea normal, existe em linhas celulares menos diferenciadas (ex. células estaminais CD34⁺). Este receptor desempenha um papel importante no desenvolvimento de células estaminais

multipotentes e das células B, podendo actuar de maneira sinérgica com outras vias de sinalização promovendo a expansão de precursores hematopoiéticos. Particularmente, o receptor Flt3, aliado à IL-7, tem um efeito sinérgico, induzindo a proliferação tanto de células B progenitoras como de células pró-B. Existem outras citocinas (ex. IL-3), que em situação de stresse têm também um efeito sinérgico com o receptor, acelerando o desenvolvimento de células B. No entanto, este receptor pode ser regulado negativamente por acção de determinadas citocinas, como o TNF-Alpha e TGF-Beta, bloqueando a sua actividade na indução da hematopoiese (Shami *et al.*, 2008).

Como referido, a activação do receptor Flt3 potencia uma cascata de sinais intracelulares que levam à proliferação celular e inibição da apoptose. O domínio citoplasmático do Flt3 associa-se fisicamente com a subunidade p85 da proteína PI3K, com a RAS GTPase, com a fosfolipase C- γ , Shc, a proteína 2 ligada ao factor de crescimento (GRB2) e com a família das tirosina cinase SRC, fosforilando-as (Takahashi S., 2001).

Assim, o receptor Flt3 activo recruta proteínas citoplasmáticas, as quais interagem através de complexos proteína-proteína no domínio intracelular. As proteínas SHC, GRB2, e o ligando 2 associado a GRB2 (GAB2), SHIP, CBL, e CBLB são algumas das proteínas adaptadoras que interagem com o receptor Flt3 activo. Assim que estas proteínas se ligam formando um complexo, é activada uma cascata de sinalização intracelular subsequente, a qual resulta numa cascata de reacções de fosforilação, que culmina na activação de vias de sinalização como as MAPK, STAT e AKT/PI3 cinase, descritas anteriormente. Os mediadores transcricionais activam uma série de eventos que culminam na regulação da diferenciação, proliferação, apoptose e sobrevivência celular (figura 1.8) (Doepfner *et al.*, 2007; Mechinchi *et al.*, 2009).

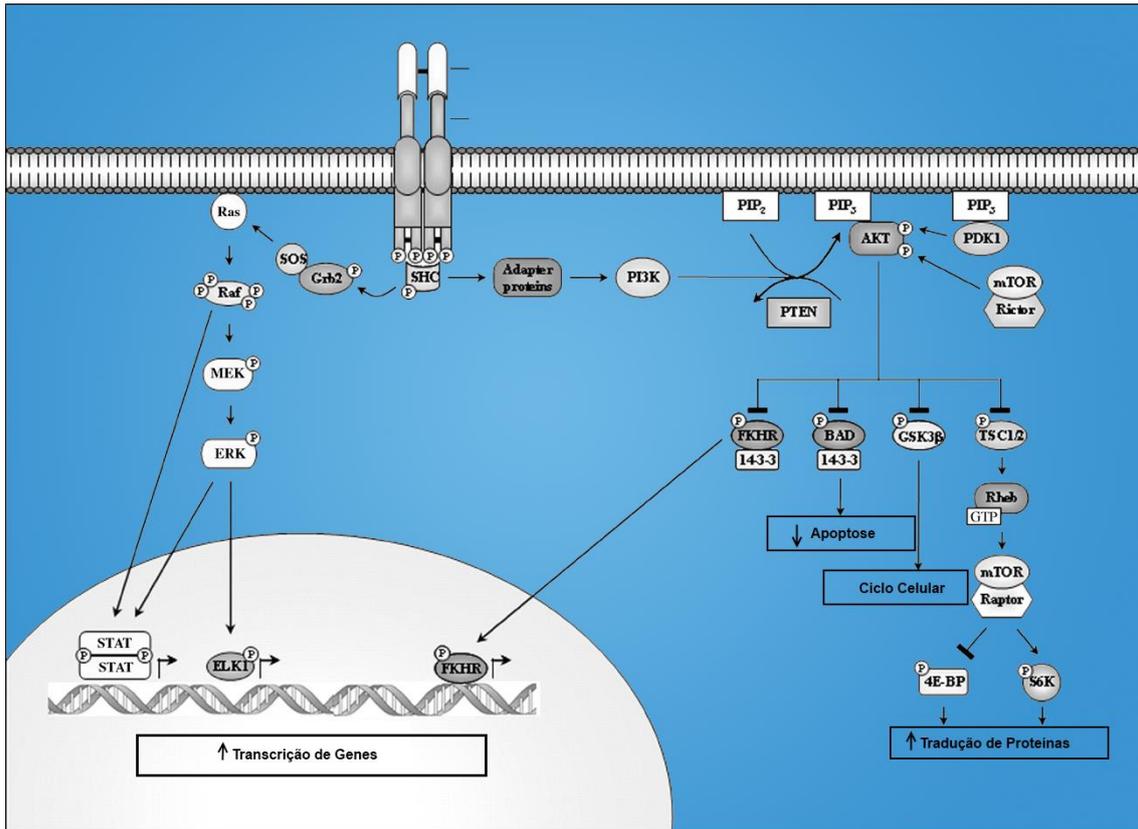


Figura 1. 8. Vias de sinalização intracelulares activadas pelo receptor Flt3.

Após a ligação do ligando ao receptor Flt3 (FLT3L), o receptor transmembranar é activado por auto-fosforilação, criando locais de ligação para a proteína SHC (Src-homology collagen protein). Os sinais são traduzidos pelas vias de sinalização MAPK e PI3K. Os principais reguladores que antecedem a sinalização de MAPK incluem o receptor de GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2), SOS (Son of Sevenless), RAS, RAF, MAPK/ERK-cinase (MEK), ERK (extracellular signal-regulated kinase). Os alvos a jusante incluem os transdutores de sinais e ativadores da transcrição (STAT) e ELK1. A activação da via PI3K é iniciada pelo recrutamento do complexo PI3K para o receptor fosforilado através de interacções com uma série de proteínas, incluindo CBL, a proteína SHIP (SH2-domain-containing inositol phosphatase) ou SHP2 (SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2). Os sinais a jusante são traduzidos via PDK1 (phosphoinositide dependent kinase 1), mTOR (the mammalian target of rapamycin), pelo complexo Rictor, a proteína cinase B/AKT (AKT), FKHR (forkhead), BAGSK3 (glycogen synthase kinase-3), o complexo TSC1 /2 (tuberous sclerosis complex), Rheb (homologue enriched in the brain), o complexo de mTOR-Raptor, 4E-BP (4E-binding protein) e da proteína S6K (ribosomal protein S6 kinase). Os sinais intracelulares medeiam as funções celulares vitais como o crescimento celular, diferenciação, apoptose, reparação do ADN e proliferação (Doepfner *et al.*, 2007).

O ciclo celular caracteriza-se por uma série de eventos que preparam a célula para a mitose. Engloba quatro etapas principais: a fase S (síntese) onde ocorre a replicação

dos cromossomas e do seu ADN (ácido desoxirribonucleico); a fase M (mitótica) na qual, os cromossomas replicados são separados, recebendo cada uma das células filhas uma cópia de cada um dos cromossomas; a fase G_1 que precede a fase S, e onde as células se preparam para a síntese de ADN; e a fase G_2 durante a qual a célula se prepara para a mitose. A fase G_1 e a fase G_2 , intercalam assim, a fase S e a fase M, nas quais os mRNAs (ácido ribonucleico mensageiro) e proteínas são produzidos. As células em G_1 antes de se prepararem para a síntese do ADN podem entrar num estado de repouso, a fase G_0 , onde as células não sofrem crescimento nem proliferação (Figura 1.9) (Vermeulen *et al.*, 2003, Lodish *et al.*, 2005).

Este processo de divisão celular é controlado por numerosos mecanismos, os quais asseguram a correcta divisão da célula. As cinases dependentes de ciclinas (CDKs - *Cyclin-dependent kinases*) são um dos maiores componentes deste sistema de controlo celular. Pertencem à família das proteínas cinases serina/treonina, são activadas por ciclinas, em pontos específicos do ciclo celular, e actuam por fosforilação em proteínas alvo. Outras proteínas supressoras tumorais como a pRB, p53, p16, p15, desempenham um papel importante nos pontos de restrição ou “checkpoints”, regulando também o ciclo celular (Vermeulen *et al.*, 2003).

No cancro existem alterações genéticas e/ou epigenéticas destes mecanismos de controlo do ciclo celular, levando à proliferação desregulada e anárquica.

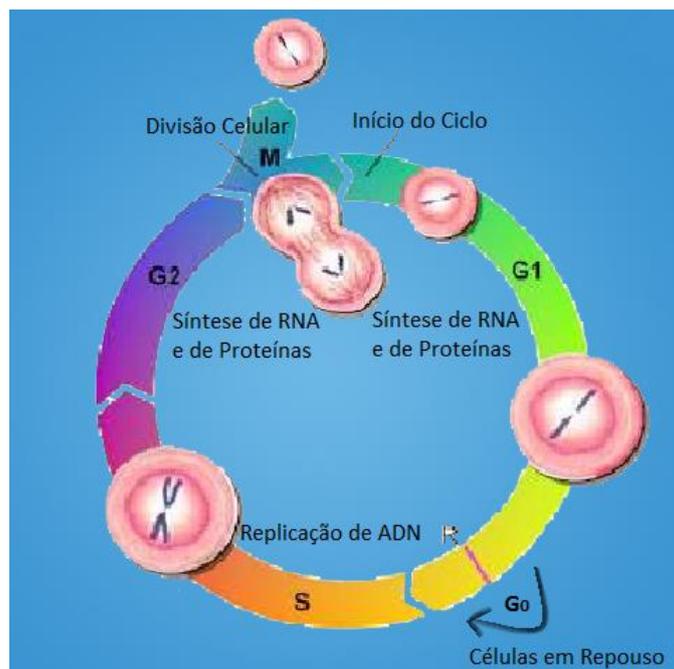


Figura 1. 9. Representação esquemática do ciclo celular.

O ciclo celular eucariótico é, geralmente, representado por 4 fases. Durante a interfase, que consiste nas fases G_1 , S e G_2 , a célula praticamente duplica a sua massa. A replicação de ADN durante a fase S faz com que a célula fique com quatro cópias de cada tipo de cromossoma. Na fase mitótica (M), os cromossomas são igualmente divididos entre as células-filhas e, na maioria dos casos, o citoplasma divide-se praticamente a meio. Sob determinadas condições, as células interrompem o ciclo e permanecem num estado de repouso denominado de G_0 . A maioria das células em G_0 pode retomar o ciclo se as condições se alterarem (Adaptado de *The Encyclopedia of Science s.d*).

1.3.2. Sinalização envolvida na morte celular e degradação de proteínas

A apoptose, também referida como morte celular programada, é um processo altamente regulado, evolutivamente conservado, e bioquimicamente com grande relevância para o tratamento do cancro. Num organismo adulto, este processo ocorre de forma a eliminar células danificadas (ex: lesão no ADN, hipóxia, escassez de nutrientes) que tenham saído do seu ambiente normal. A apoptose é assim responsável, pela manutenção de um número de células constante durante a renovação celular de tecidos, promovendo a homeostasia tecidular. No caso do sistema hematopoiético, cerca de 5×10^{11} precursores de células sanguíneas são diariamente eliminados por apoptose, compensando deste modo a produção contínua das mesmas na medula óssea (Elmore S., 2007).

O processo apoptótico leva a grandes modificações morfológicas. Nos estádios iniciais observa-se condensação da cromatina, fragmentação do ADN, retracção celular, e dilatação do reticulo endoplasmático. No entanto, os organelos citoplasmáticos como as mitocôndrias, os lisossomas e a membrana celular permanecem intactos. Em estádios mais tardios a membrana celular encapsula os componentes celulares dentro de vesículas denominadas corpos apoptóticos, os quais são posteriormente fagocitados por macrófagos e pelas células vizinhas, evitando uma resposta inflamatória. Desta forma, a apoptose através de estímulos externos, afecta células isoladas que estão disfuncionais, danificadas ou envelhecidas (Elmore S., 2007).

Existem duas vias que podem activar o processo apoptótico, a via extrínseca e a via intrínseca. A via extrínseca é activada através de receptores que se encontram na membrana celular. Por outro lado, a via intrínseca envolve a libertação de proteínas mitocondriais. Ambas as vias levam à activação de caspases, as quais são responsáveis pela destruição da célula (Figura 1.10) (Elmore S., 2007).

A via extrínseca ou via dos receptores de membrana é desencadeada pela ligação de ligandos específicos a um grupo de receptores membranares da superfamília do receptor do factor de necrose tumoral (TNF), nomeadamente o TNF-R1, o FAS e os receptores pró-apoptóticos TRAIL, DR4 e DR5 (TRAIL R1 e R2). A ligação dos ligandos aos seus receptores vai recrutar a proteína adaptadora FADD (FAS-associated death domain) a qual vai formar o complexo de sinalização indutor de morte DISC (death-inducing signaling complex). O complexo DISC, por sua vez, recruta e activa o iniciador da procaspase-8, promovendo uma cascata de sinalização de caspases, que culmina com a activação das caspases efectoras, como a caspase-3 e a caspase-7, provocando a morte da célula (Elmore S., 2007).

A via intrínseca envolve uma série de estímulos iniciados na mitocôndria, não mediados por receptores, os quais produzem sinais intracelulares que actuam directamente na célula, regulando o processo apoptótico positiva ou negativamente (Elmore S., 2007).

Os estímulos negativos envolvem a ausência de certos factores de crescimento, hormonas e citocinas, que podem levar à inibição da apoptose. Os positivos incluem radiação, toxinas, infecções virais, radicais livres, entre outros. Todos estes estímulos causam mudanças na membrana mitocondrial resultando na abertura do poro de

permeabilidade transitória (MPT), diminuição do potencial transmembranar mitocondrial e libertação de dois grupos principais de proteínas pró-apoptóticas do espaço intermembranar para o citosol (Elmore S., 2007).

O primeiro grupo dessas proteínas consiste no citocromo c, Smac/DIABLO, e na protease serina HtrA2/Omi. Estas proteínas levam à activação da via mitocondrial dependente de caspases. O citocromo c liga-se e activa a proteína Apaf-1, bem como a procaspase 9, formando o apoptosoma, levando posteriormente à activação da caspase-9 e 3. As proteínas Smac/DIABLO e HtrA2/Omi promovem a apoptose através da inibição das proteínas inibidoras da apoptose, IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) (Elmore S., 2007).

O segundo grupo de proteínas pró-apoptóticas engloba as AIF, as endonuclease G e as CAD, as quais são libertadas da membrana durante a apoptose, levando à fragmentação do ADN, através da intervenção de caspases, como a caspase-3. Este evento só ocorre quando a célula já está comprometida com o processo celular apoptótico (Elmore S., 2007).

O controlo e regulação destes eventos mitocondriais são mediados por membros da família de proteínas BCL-2. Estas regulam a permeabilidade membranar mitocondrial e podem comportar-se tanto como pro-apoptóticas (ex: BAX, BAK, BID), como anti-apoptóticas (ex: Bcl 2 e Bcl-XL, Bcl-x). Desta forma, a homeostase é mantida pelo equilíbrio entre a quantidade de proteínas pró e anti-apoptóticas (Elmore S., 2007).

Por outro lado, a apoptose é ainda controlada por outro grupo de proteínas, as IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Protein*), que através da inibição da actividade das caspases efectoras -3 e -7, da caspase iniciadora -9 e da modulação do factor de transcrição NF- κ B, controlam a morte celular por apoptose (Hengartner *et al.*, 2000; Reed, 2000; Mita *et al.*, 2006; Gonçalves AC., 2008).

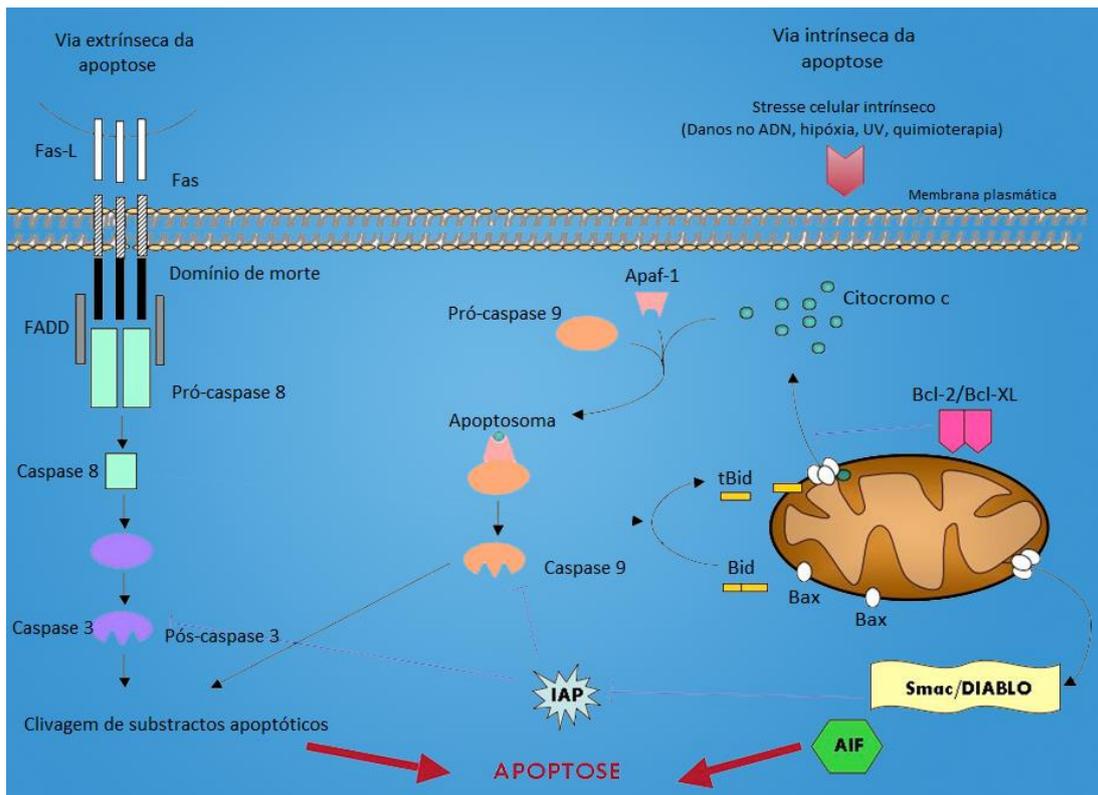


Figura 1. 10. Representação esquemática das vias de sinalização apoptóticas.

A apoptose pode ser iniciada por duas vias principais, a via extrínseca ou via dos receptores membranares, e a via intrínseca ou via mitocondrial. A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligandos específicos a um grupo de receptores membranares da superfamília do receptor do factor de necrose tumoral (TNF) como por exemplo o receptor Fas pelo seu ligando Fas-L. A ligação do ligando ao respectivo receptor induz a trimerização do mesmo, recrutando a molécula adaptadora FADD (FAS-associated death domain) a qual vai formar o complexo de sinalização indutor de morte DISC (death-inducing signaling complex). O complexo DISC por sua vez, recruta e activa o iniciador da pró-caspase-8. A pró-caspase-8 é então activada por clivagem proteolítica originando a caspase-8 activa, a qual, por sua vez, activa as caspases efectoras, caspases-3, -6, -7, que vão executar a apoptose (Adaptado de www.bioscience.org; Adaptado de Coelho AS., 2009).

A via intrínseca é activada por estímulos apoptóticos (lesão do ADN, radiação ultra-violeta (UV), hipóxia, quimioterapia) que induzem alteração na membrana mitocondrial e a dissociação de heterodímeros BCL-2/XL, que normalmente impedem a apoptose (Martinez *et al.*, 2003; Lodish *et al.*, 2004; Coelho AS., 2009). Desta forma, ocorre a libertação de citocromo c e da protease apoptótica 1 (APAF-1 – *apoptotic protease activating factor 1*) da mitocôndria que em conjunto com a caspase-9 e ATP

vão formar o apoptosoma. Este leva à activação da caspase-9, culminando na activação da caspase-3 que executará a apoptose. O complexo Smac/DIABLO também é libertado durante o processo apoptótico, inibindo a acção da proteína IAP. Esta via também pode ser activada por receptores de morte que activam a caspase-8, através da clivagem da proteína BID. Esta, na sua forma truncada liga-se à proteína BAX, permitindo a libertação de citocromo c e execução da apoptose. A apoptose é inibida pelos complexos BCL-2/BCL-XL e pelas IAPs (proteínas inibidoras da apoptose). Estas são inibidas pelo complexo Smac/DIABLO (Gewies, 2003; Ghobrial *et al*, 2005; Coelho AS., 2009).

No entanto, a apoptose não é o único processo de morte celular, podendo esta ocorrer também por necrose ou autofagia. A necrose afecta grupos de células, devido a estímulos externos, como trauma, isquémia ou altas doses de radiação, sendo por isso, um processo independente de energia. Neste tipo de morte observa-se a perda de função mitocondrial e do reticulo endoplasmático, resultando na diminuição dramática do suplemento energético, levando ao *swelling* celular e por último à ruptura da membrana celular. Este último evento permite a libertação de enzimas lisossomais, as quais, afectam as células vizinhas desencadeando uma resposta inflamatória (Pelengaris *et al.*, 2006).

A autofagia é um programa de morte celular alternativo à apoptose, a qual envolve a degradação de componentes celulares através da maquinaria lisossomal. Esta é caracterizada pelo sequestro de citoplasma e organelos celulares por vesículas multilamelares, as quais se fundem com os lisossomas e são posteriormente degradadas e/ou recicladas. A autofagia é um processo catabólico, necessitando por isso, do contínuo fornecimento de ATP. Para além do papel importante na degradação de organelos e proteínas, a autofagia tem um papel fulcral na sobrevivência celular através do fornecimento de energia durante períodos críticos, como por exemplo, a falta de nutrientes. Em condições de stresse este processo torna-se uma via de sinalização “suicida”, ocorrendo a digestão de proteínas e estruturas essenciais. Assim, o processo de autofagia pode ser considerado como um mecanismo de sobrevivência celular durante períodos críticos ou uma via de sinalização de morte, quando outros mecanismos, como a apoptose, estão alterados (Elmore, S., 2007; Moretti *et al.*, 2007).

A degradação de proteínas celulares é um processo altamente complexo e regulado, o qual desempenha um papel central na regulação da função celular e manutenção da sua homeostasia (Adaptado de Crawford *et al.*, 2011).

A Via da ubiquitina-proteasoma (UPP- ubiquitin proteasome pathway) é a principal via de degradação das proteínas intracelulares. Mais de 80% das proteínas celulares são degradadas por este processo, incluindo as envolvidas em processos celulares tais como o ciclo celular, apoptose, transcrição, reparação do ADN, entre outros. Têm aumentado as evidências que anomalias nesta via estão associadas com um número elevado de doenças, como é o caso do cancro (Adaptado de Crawford *et al.*, 2011).

As proteínas destinadas ao processo proteolítico são inicialmente marcadas por cadeias de poli-ubiquitina, as quais se ligam às proteínas alvo através de ligações covalentes. (Adaptado de Crawford *et al.*, 2011) Neste processo há a intervenção de três enzimas principais: E1 (enzima activadora de ubiquitina), E2 (enzima transportadora de ubiquitina) e a E3 (enzima ligase de ubiquitina). O processo inicia-se pela activação da ubiquitina através da sua ligação à enzima E1 no resíduo glicina-76 do terminal carboxílico, onde o ATP é essencial para a sua activação. A ubiquitina activa, através da acção da enzima E2, a qual promove directamente ou com auxílio da enzima E3, liga-se à proteína alvo num resíduo de lisina. A sucessiva conjugação de ubiquitinas permite a formação de cadeias de poli-ubiquitina, as quais actuam como sinais, para a degradação da proteína alvo pelo proteasoma 26S (Figura 1.11) (Oliveira AC., 2008; Adaptado de Crawford *et al.*, 2011).

O proteasoma 26S encontra-se no núcleo e citoplasma de todas as células eucarióticas. Este é composto por um 'core' cilíndrico com capacidade catalítica, a subunidade 20S, disposto entre duas subunidades reguladoras 19S nos topos (*Cap*). A subunidade 20S é composta por 28 subunidades, dispostas em 4 anéis. Os dois anéis das extremidades são formados por sete polipeptídeos denominados de subunidades α , que possuem uma função estrutural. Os anéis internos são constituídos por sete subunidades β e formam uma "câmara" central, que confere actividade catalítica ao proteasoma (Oliveira AC., 2008; Adaptado de Crawford *et al.*, 2011).

Nas subunidades β (subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$) encontram-se três locais catalíticos, que demonstram actividade semelhante à da quimotripsina (preferência por resíduos de tirosina e fenilalanina), à de tripsina (preferência para a arginina e lisina) e às caspases

(clivagem hidrolítica em resíduos peptidil-glutamil, ou seja, em resíduos de aspartato, glutamato ou outros resíduos ácidos). O complexo regulatório 19S, localizado na base, possui capacidade de degradação de proteínas não ubiquitinadas. Por outro lado, a subunidade 19S da cobertura é responsável pelo reconhecimento, desubiquitinação e alteração conformacional da proteína alvo antes de esta atingir a zona catalítica específica no interior do proteasoma (Oliveira AC., 2008; Adaptado de Crawford *et al.*, 2011).

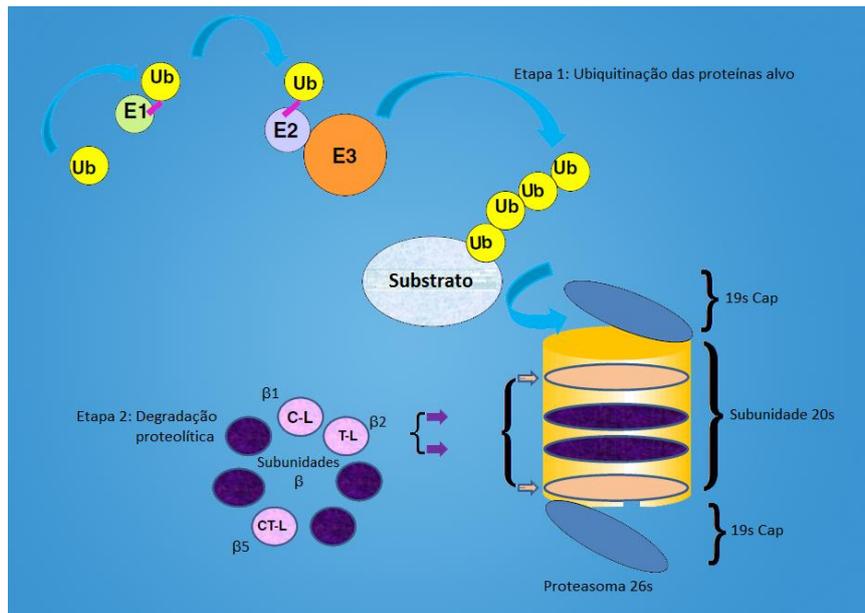


Figura 1. 11. Representação esquemática da via de sinalização ubiquitina-proteasoma.

Existem duas etapas principais nesta via de sinalização. Na etapa 1 ocorre a marcação das proteínas alvo através do processo de ubiquitinação. A enzima E1 (enzima ativadora de ubiquitina) liga-se à ubiquitina (Ub), a qual é depois transferida pela enzima transportadora de ubiquitina, E2. A enzima ubiquitina ligase, E3 recruta, subsequentemente, a proteína alvo e medeia a transferência de ubiquitina para a proteína. Na etapa 2 ocorre a degradação proteolítica, onde as cadeias de poli-ubiquitina marcam a proteína alvo para degradação pelo proteassoma 26S. As moléculas de ubiquitina são removidas e a proteína é clivada em pequenos peptídeos na subunidade catalítica 20S do proteassoma, utilizando os três locais catalíticos principais das suas subunidades β que têm actividade semelhante à da quimotripsina (CT-L, *chymotrypsin-like*), da tripsina (T-L, *trypsin-like*) e das caspases (C-L, *caspase-like*) (Oliveira AC., 2008; Adaptado de Crawford *et al.*, 2011).

1.4. Neoplasias hematológicas

As leucemias representam um grupo de neoplasias hematológicas caracterizadas pela expansão clonal de células hematopoiéticas, desregulação da proliferação, diminuição da apoptose e/ou bloqueio da diferenciação celular. De acordo com a linhagem hematopoiética afectada e a progressão da doença, a leucemia pode ser classificada em linfóide ou mielóide e cada uma destas em crónica ou aguda. De acordo com o estágio em que ocorre o bloqueio da diferenciação ao longo de cada linhagem celular existem vários subtipos de leucemias (Coelho, AS., 2009).

Apesar das causas que conduzem ao aparecimento deste tipo de patologias não serem totalmente conhecidas, vários factores podem contribuir para a sua etiopatogenia, nomeadamente factores genéticos, alterações cromossómicas, doenças hereditárias, radiação ionizante ou não ionizante, exposição ocupacional a substâncias químicas e vírus (Hoffbrand *et al.*, 2006).

1.4.1. Leucemia Mielóide Aguda

A Leucemia mielóide aguda (LMA) é um dos tipos mais comuns entre as neoplasias hematológicas, afectando indivíduos de todas as idades. São caracterizadas pela proliferação e acumulação de células hematopoiéticas imaturas (blastos) da linha mielóide (mieloblastos), na medula óssea e sangue periférico. O bloqueio na diferenciação celular provoca redução abrupta na produção de células sanguíneas normais, e por outro lado, a rápida proliferação aliada à redução de morte celular programada (apoptose), resulta na acumulação destas células na medula óssea. O mecanismo deste bloqueio na diferenciação ainda não é totalmente conhecido, embora em muitos dos casos exista alteração de genes em resultado de translocações cromossómicas, inversões ou deleções (Seiter *et al.*, 2011).

O bloqueio da diferenciação é reflectido numa elevada heterogeneidade morfológica, fenotípica, citogenética, molecular e de expressão génica, presente entre os vários casos individuais de LMA, e assim, na diversidade de respostas ao tratamento (Seiter *et al.*, 2011).

Inúmeros factores estão implicados na origem da LMA, incluindo antecedentes de distúrbios hematológicas, na maioria dos quais os síndromes mielodisplásicos (SMD), síndromes familiares e exposição a factores ambientais tóxicos e a fármacos. Outros distúrbios que contribuem para a origem destas doenças são a anemia aplástica, a mielofibrose, a hemoglobinúria paroxística nocturna, entre outras. Também algumas doenças congénitas como a Síndrome de Down e a Síndrome de Bloom, síndromes familiares como as mutações no gene *AML1* (*RUNX1*, *CBFA2*) que ocorrem no distúrbio de plaqueta familiar, e variações genéticas como polimorfismos em enzimas cruciais no metabolismo de produtos tóxicos, como polimorfismos na enzima que metaboliza derivados de benzeno, a *NQO1* (*quinone oxidoreductase*), podem aumentar a susceptibilidade para o desenvolvimento de LMA (Seiter *et al.*, 2011). A exposição a factores ambientais tóxicos, como altas doses de radiação, inalação crónica de tabaco, a exposição a benzeno, entre outros, aumenta o risco para o desenvolvimento de LMA. A exposição prévia a agentes quimioterapêuticos, como a exposição a agentes alquilantes e a inibidores da topoisomerase II, é também um factor de risco para a LMA (Lichtman *et al.*, 2007; Hoffbrand *et al.*, 2011; Seiter *et al.*, 2011). No entanto, a maioria dos doentes com LMA *de novo* não têm nenhum factor de risco identificado (Seiter *et al.*, 2011).

A LMA resulta de uma série de mutações somáticas nas células hematopoiéticas multipotentes e ocasionalmente nas células progenitoras de linhagens mais diferenciadas, na maioria dos casos translocações cromossómicas (Lichtman *et al.*, 2007). Mutações adicionais, como por exemplo em receptores com função de tirosina cinase como o *FLT3* e *c-KIT*, e nas proteínas citoplasmáticas, *N-RAS* e *K-RAS*, ou mutações que levam à perda de função de factores de transcrição, como as que ocorrem no gene *AML1*, são necessárias para induzir vantagem proliferativa nas células primitivas afectadas (Lichtman *et al.*, 2007).

Assim, a maior parte das neoplasias, incluindo as LMAs, resultam de múltiplas alterações moleculares, tanto a nível proliferativo, bem como, no bloqueio da diferenciação das células hematopoiéticas, sendo que uma única alteração não é suficiente para causar o fenótipo maligno completo. (Hoffbrand *et al.*, 2011).

A classificação das LMAs tem evoluído ao longo destes últimos anos, tendo passado de uma classificação baseada em características morfológicas e citológicas, como as

incluídas na proposta FAB (*French-American-British*), para sistemas que incorporam as anomalias imunofenotípicas e citogenéticas, como a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) (tabela 1.1) (Weinberg *et al.*, 2009).

Tabela 1. 1. Classificação das leucemias miéloide agudas (LMA), OMS 2008

| |
|--|
| LMA com alterações genéticas recorrentes |
| LMA com t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> |
| LMA com inv(16)(p13;1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> |
| Leucemia Promielocítica aguda com t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i> |
| LMA com t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i> |
| LMA com t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> |
| LMA com inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i> |
| LMA (megacarioblástica) com iv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>RBM-MKL1</i> |
| LMA com mutação em <i>NPM1</i> |
| LMA com mutação em <i>CEBPA</i> |
| LMA com alterações relacionadas com displasia multi-linhagem |
| LMA com alterações relacionadas com exposição anterior a quimioterapia e radioterapia |
| LMA sem outra especificação |
| LMA indiferenciada (M0) |
| LMA com maturação mínima (M1) |
| LMA com maturação (M2) |
| Leucemia mielomonocítica aguda (M4) |
| Leucemia monocítica aguda (M5) |
| Leucemia eritroblástica aguda (M6) |
| Leucemia megacarioblástica aguda (M7) |
| Leucemia basofílica aguda |
| Panmielose aguda com mielofibrose (M0) |
| Sarcoma Mielóide |

(Adaptado de Swerdlow *S et al.*, 2008, O'Donnell *et al.*, 2011, Hoffbrand *et al.*, 2011)

Um dos alvos de estudo do presente trabalho foi a Leucemia Promielocítica Aguda (LPA), um subtipo de LMA (tabela 1.1.) que representa aproximadamente 5 a 8% deste tipo de Leucemia aguda. Apesar da rápida progressão natural e das severas complicações, o tratamento com ATRA tem tido bons resultados (Swerdlow *S et al.*, 2008; Coelho, AS., 2009). No entanto as recidivas existem, e o papel das mutações

internas em tandem (ITD) do receptor Flt3 no prognóstico continua por clarificar (Swerdlow S *et al.*, 2008).

A LPA resulta do bloqueio da diferenciação dos mieloblastos, conduzindo à acumulação na medula óssea de promielócitos. Esta leucemia está normalmente relacionada com a translocação cromossômica entre o braço longo do cromossoma 15 e do cromossoma 17, a t(15;17)(q22,q21), presente em 98% dos doentes com APL (Zhou *et al.*, 2007; Coelho, AS., 2009). Esta translocação conduz à fusão do gene promielocítico, *PML* do cromossoma 15, com o gene do receptor- α do ácido retinóico, *RAR α* do cromossoma 17, resultando no gene de fusão *PML-RAR α* , que afecta várias vias de sinalização celular fundamentais para a diferenciação dos promielócitos (Lo-Coco *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007; Coelho, AS., 2009).

A proteína PML (*Promyelocytic leukemia protein*) está envolvida na supressão tumoral e no controlo da estabilidade genética, controlando a proteína p53. Desta forma, induz a apoptose, a supressão tumoral e a senescência celular em resposta à radiação ionizante e à transformação oncogénica (Sohal., 2003; Coelho, AS., 2009;). Por outro lado, a proteína RAR α é um membro da família dos receptores do AR (*ácido retinóico*), actuando como ligando indutor de factores de transcrição pela ligação a elementos de resposta específicos, os *RARE*, na região promotora dos genes alvo, através da formação de heterodímeros RAR/RXR (Lo-Coco *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007; Coelho, AS., 2009).

A proteína de fusão PML-RAR α , resultante da referida translocação cromossômica, inibe a função da proteína PML, contribuindo assim, para a sobrevivência e crescimento celular desregulado. Por outro lado, esta translocação interfere também com a transcrição de certos genes, promovendo por exemplo, a repressão dos genes alvo do receptor RAR α (Sohal., 2003). Assim, a proteína de fusão afecta várias funções nomeadamente, a supressão do crescimento, a repressão da transcrição e o controlo do desenvolvimento e diferenciação celular (Lo-Coco *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007; Coelho, AS., 2009).

1.4.2. Leucemia Mielóide Crónica

A leucemia mielóide crónica (LMC) é uma neoplasia clonal que resulta de alterações genéticas adquiridas nas células hematopoiéticas pluripotentes. Estas células estaminais alteradas proliferam e originam uma população de células mielóides em vários estádios de maturação (Hoffbrand *et al.*, 2008).

É uma neoplasia mieloproliferativa definida pela OMS (Tabela 1.2), que tem uma incidência homogénea em todo o mundo, ocorrendo principalmente em indivíduos com idade média entre os 50 e os 60 anos, sendo um pouco maior nos homens do que nas mulheres (Swerdlow *S et al.*, 2008, Hoffbrand *et al.*, 2011).

Este tipo de leucemia, evolui normalmente através de várias fases, uma fase crónica, uma fase de aceleração, onde as células progenitoras são mais frequentes que as células mais diferenciadas, e uma fase blástica de leucemia aguda fatal, onde as células diferenciadas são inexistentes (Tabela 1.3) (Vardiman *et al.*, 2002; Oliveira, A.S., 2008; Tefferi *et al.*, 2009). Esta doença mieloproliferativa está associada a uma anomalia genética, a translocação cromossómica recíproca entre o cromossoma 9 e 22, a t(9;22)(q34;q11), referido como o cromossoma de Filadélfia (*cr Ph*) (Vardiman *et al.*, 2002; Oliveira, A.S., 2008; Swerdlow *S et al.*, 2008; Tefferi *et al.*, 2009). Esta translocação une o gene que codifica a proteína BCR (*cr 22*) e o gene que codifica a proteína ABL (*cr 9*), originando a expressão de uma proteína de fusão com actividade de tirosina cinase aumentada, a proteína oncogénica BCR-ABL responsável pelo aparecimento desta patologia (Oliveira AC., 2008; Swerdlow *S et al.*, 2008).

Tabela 1. 2. Classificação dos Neoplasmas Mieloproliferativos, 2008 da OMS

Neoplasias mieloproliferativas

Leucemia mielóide crónica, BCR-ABL1 positiva (LMC)

Leucemia neutrofílica crónica (LNC)

Policitemia vera (PV)

Mielofibrose Primária (MP)

Trombocitemia Essencial (TE)

Leucemia eosinofílica crónica (LEC)

Mastocitose (Ma)

Neoplasias Mieloproliferativas inclassificáveis (NMI)

(Swerdlow *S et al.*, 2008; Hoffbrand *et al.*, 2011)

O risco de desenvolver LMC aumenta com a exposição a altas doses de radiação ionizante e com a existência de neoplasias anteriores. No entanto, em geral não existe uma causa específica, ocorrendo esporadicamente. Particularmente, não existe uma pré-disposição familiar, nem a contribuição de qualquer agente infeccioso, nem a exposição a agentes químicos como o benzeno ou agentes alquilantes (Lichtman *et al.*, 2007; Hoffbrand *et al.*, 2011).

A proliferação aparentemente autónoma dos progenitores mielóides pode ser consequência do aumento da resposta a um ou mais estimuladores fisiológicos da hematopoiese ou à perda de sensibilidade a um inibidor normal. Como consequência muitos estudos têm sido direccionados para avaliar a resposta de progenitores da LMC aos factores de crescimento hematopoiéticos, nomeadamente o factor estimulante de colónias de granulócitos (G-CSF), o factor estimulante de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), a interleucina 3 (IL3), o factor de células estaminais e da eritropoietina, entre outros, e a sua influência no desenvolvimento da LMC. O aumento da produção de elastase pelas células leucémicas poderá ser também um mecanismo associado à LMC, uma vez que este inibe a resposta das células normais ao G-CSF, mas não a das células leucémicas. Assim, é possível que a excessiva proliferação de progenitores de LMC possa resultar, em parte, da fuga prematura da influência fisiológica inibitória do nicho das células estaminais (Hoffbrand *et al.*, 2011).

Como referido, as mutações do gene *ABL* no cromossoma 9, e do gene *BCR* no cromossoma 22, são centrais para o desenvolvimento da LMC (Lichtman *et al.*, 2007). Na LMC o cromossoma de Filadélfia está presente em todas as linhagens mielóides, em algumas células B e numa pequena população de células T (Hoffbrand, *et al.*, 2011).

Nas células normais, a proteína ABL está envolvida na regulação do ciclo celular, na resposta celular ao stresse genotóxico e na transmissão de informação do ambiente celular, através da activação de vias de transdução do sinal envolvidas na proliferação e apoptose celular. O proto-oncogene *ABL* codifica uma tirosina cinase que é traduzida apenas em pequenas quantidades e não tem qualquer actividade de cinase *in vitro* (Lichtman *et al.*, 2007; Coelho A.S., 2009). Por outro lado, a proteína BCR está envolvida na sobrevivência da célula, pela activação do factor de transcrição NF- κ B, na fagocitose e na fosforilação de vários resíduos de tirosina, embora estas vias ainda permaneçam em investigação (Coelho A.S., 2009). No entanto, o produto de fusão expresso pelo

gene *BCR-ABL*, apresenta capacidade fosforilativa, podendo deste modo, levar à transformação maligna (Lichtman *et al.*, 2007).

O mecanismo pelo qual a onco-proteína BCR-ABL altera a cinética das células estaminais continua por definir. Sabe-se que existe auto-fosforilação aberrante e activação da fosforilação numa ampla gama de proteínas intracelulares, as quais normalmente não são fosforiladas, incluindo, MEK1/2, RAC e a JNK (Hoffbrand *et al.*, 2011). Pode também promover a activação de vias de transdução de sinal intracelulares, as quais promovem a proliferação, a instabilidade genética, a supressão da apoptose e a adesão celular. Assim, vias de sinalização celular como a RAS/MAP cinase, a via de NF-kB e a via JAK-STAT, entre outras, são activadas, embora ainda não esteja totalmente esclarecida a sua função na LMC. A grande quantidade de vias afectadas leva ao aumento da proliferação ou diminuição da apoptose nas células progenitoras, conduzindo ao aumento de células mielóides imaturas que atingem a circulação periférica (Coelho AS., 2009).

Tabela 1. 3. Caracterização da evolução da leucemia miéloide crónica

| Fases da LMC | Critérios de diagnóstico |
|--------------------------------|---|
| Fase Crónica (FC) | Geralmente Assintomática; leucocitose no sangue periférico de 12 a $1000 \times 10^9/L$; (média de $100 \times 10^9/L$); blastos $< 2\%$; |
| Fase de aceleração (FA) | Leucocitose persistente ($> 10 \times 10^9/L$); 10% a 19% de mieloblastos no sangue periférico ou medula óssea vermelha; Proliferação extramedular de blastos; pelo menos 20% de basófilos no sangue periférico; Trombocitopenia persistente sem resposta terapêutica ou trombocitose persistente sem resposta terapêutica; Aumento do tamanho do baço; Evidência citogenética de evolução clonal; |
| Fase blástica (FB) | $\geq 20\%$ de blastos no sangue periférico e medula óssea vermelha; Proliferação extramedular de blastos; Aglomerados de blastos na biópsia da medula óssea; |

(Vardiman *et al.*, 2002; Swerdlow S *et al.*, 2008; Tefferi *et al.*, 2009)

1.5. Flt3 e Neoplasias hematológicas

O receptor Flt3 desempenha uma função bem conhecida na sobrevivência, proliferação e diferenciação das células do sistema hematopoiético, sendo expresso normalmente em células progenitoras hematopoiéticas, e não nas células hematopoiéticas diferenciadas, tal como referido anteriormente em 1.3.1. Por outro lado, as células B, as leucemias mielóides agudas (LMA), leucemia mielóide crónica (LMC), as síndromes mielodisplásicas e certos casos de leucemia linfocítica aguda (LLA), apresentam sobre-expressão da proteína Flt3 (Kim *et al.*, 2009).

O gene *FLT3* é o segundo gene que se encontra sobre-expresso na leucemia mielóide crónica em crise blástica, e vários estudos sugerem que essa expressão desregulada pode contribuir para a progressão da LMC. Assim, a avaliação da expressão deste gene neste tipo de patologias é um factor prognóstico, podendo ajudar a identificar a fase de transformação blástica da LMC. Esta activação constitutiva é provocada por vários mecanismos, incluindo translocações cromossomais e várias mutações, resultando num pior prognóstico para o doente (Kim *et al.*, 2009).

Cerca de 30% dos doentes com LMA apresentam mutações no gene *FLT3*, com carácter somático, ou seja, as mutações podem ocorrer em subclones das células progenitoras hematopoiéticas. Tal facto origina células leucémicas sem mutação e com alelos *FLT3* mutados em diferentes proporções, conforme o grau de maturação do subclone onde tenha(m) sido originada(s) a(s) mutação(s) no gene *FLT3* (Vanessa Oliveira *et al.*, 2008). Dos genes que codificam receptores membranares, o gene *FLT3* é também o mais frequentemente mutado na Síndrome Mielodisplásica, com uma incidência de cerca de 3 a 5% dos casos de SMD (Morgan & Reuter, 2006; Small, 2006; Parcels *et al.*, 2007;).

Existem dois tipos principais de mutações no gene *FLT3*, são as duplicações internas em tandem (ITD) e a mutação pontual D835. Ambas resultam na ativação constitutiva do receptor tirosina cinase mesmo na ausência do ligando, o que contribui para o aumento da proliferação celular e redução da apoptose e, conseqüentemente, maior taxa de recaídas e menor sobrevivência do doente (Vanessa Oliveira *et al.*, 2008).

As duplicações-internas em tandem no gene *FLT3* resultam de uma duplicação num segmento de um fragmento da região codificante (codificada pelos exões 14 e 15) no domínio justamembranar da proteína. Estas são as mutações mais comuns em

neoplasias hematológicas, ocorrendo em doentes com LMC (5 a 10%), com SMD (5-10%) e com LMA (15-35%). A prevalência desta mutação é dependente da idade, sendo rara em crianças com LMA, aumentando gradualmente com a idade (idade adulta >35%) (Mechinchi *et al.*, 2009).

O mecanismo preciso através do qual o *FLT3/ITD* leva à auto-dimerização do receptor é desconhecida, mas pensa-se que resulta provavelmente de uma falha no mecanismo de reparação do ADN durante a replicação (Parcells *et al.*, 2007; Oliveira A.C., 2009). Alguns autores propõem que na presença desta mutação ocorre a alteração conformacional na zona justamembranar do receptor e, conseqüentemente, da posição do domínio com capacidade reguladora negativa. Daqui resulta a ausência da inibição da actividade catalítica do domínio cinase, possibilitando o processo de autofosforilação e conseqüente activação do receptor, como se encontra representado na Figura 1.12 (Adaptado de Stirewalt & Radich, 2003; Oliveira AC., 2009). Vários estudos mostram que esta mutação confere pior prognóstico ao doente, com maiores taxas de recidivas e menor sobrevivência do doente (Mechinchi *et al.*, 2009).

As mutações pontuais, também referidas como mutações no domínio tirosina cinase (*FLT3/TKD*), são o segundo tipo de mutações no receptor Flt3. Estas são raramente encontradas em doentes com CML (1%) e Leucemia linfocítica aguda - LLA (1-3%), e mais frequentes em doentes com SMD (2-5%) e AML (25-45%). Ao contrário do que acontece na mutação ITD, a prevalência deste tipo de mutações não aumenta com a idade. A mutação pontual mais frequente ocorre no codão D835, e também nos codões da sua vizinhança. (Mechinchi *et al.*, 2009). Ao contrário das mutações ITD, a presença da mutação no domínio tirosina cinase está associada a prognóstico mais favorável (Parcells *et al.*, 2007; Oliveira A.C., 2009).

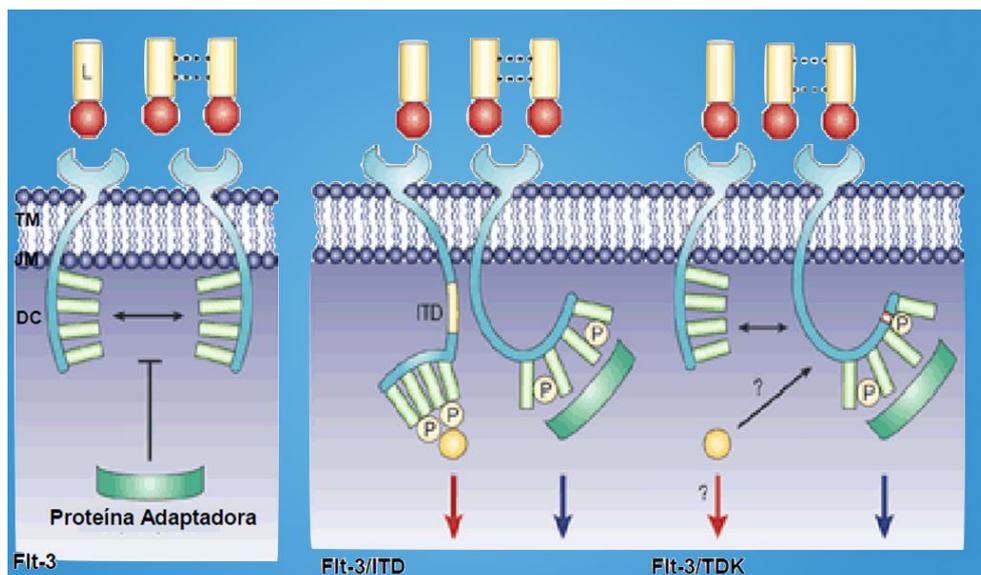


Figura 1. 12. Activação do receptor Flt3 normal e mutado.

Em **A**) está representado o receptor Flt3 normal. A ligação de uma proteína adaptadora (a verde) bloqueia a activação do receptor. Em **B**) a presença de ITD e da mutação no domínio tirosina-cinase permite a autofosforilação dos receptores, ficando o receptor constitutivamente activado. DC – domínio cinase. JM – domínio justamembranar. TM – domínio transmembranar. L – ligando do Flt3. ITD – Duplicações Internas em Tandem (Adaptado de Stirewalt & Radich, 2003; Oliveira A.C., 2009).

Apesar de ambas as mutações, provocarem activação constitutiva do receptor, a via de sinalização, é diferente do receptor Flt3 selvagem, e entre ambas as mutações também existem algumas diferenças. De facto, estas mutações promovem diferentes proteínas efectoras e têm diferentes respostas biológicas. (Choudary *et al.*, 2005; Mechinchi *et al.*, 2009). Assim, na presença de mutação, a via de sinalização *FLT3*-ITD, activa primariamente os factores de transcrição STAT5 e FOXO (Figura 1.13), para além das vias activadas pelo receptor selvagem, RAS/MAPK cinase, MEK/ERK e PI3K/AKT (Shami *et al.*, 2008; Takahashi S., 2011). No entanto, ao contrário da mutação ITD, e idêntica ao receptor Flt3 selvagem, a mutação pontual não induz a via mediada pela STAT5 (Takahashi S., 2011).

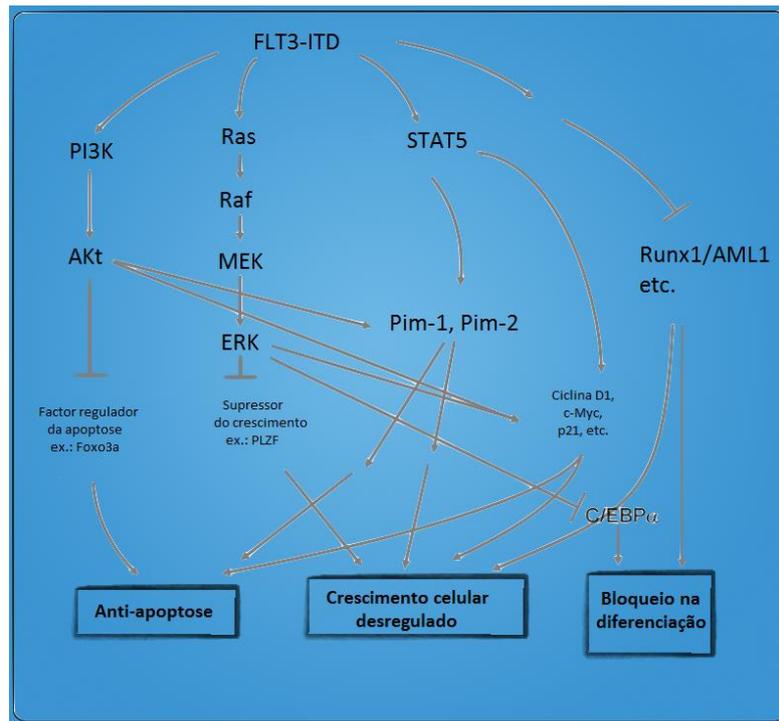


Figura 1. 13. Mecanismos envolvidos na leucemogênese induzida pelo FLT3-ITD.

A activação do FIt3 com mutação ITD, para além de activar as vias de sinalização intracelulares do receptor normal, como PI3K/AKT, e a MAPK, activa também constitutivamente a sinalização intracelular mediada pela proteína STAT5. A proteína STAT5 activa os seus alvos, como as cinases de treonina serina, PIM-1 e PIM-2, a ciclina D1, *c-MYC* e o gene apoptótico *p21*, os quais são importantes para o crescimento celular. Por outro lado, esta medeia também a inibição da expressão de alguns factores de transcrição mielóides, tais como o C/EBP α e a família dos factores de transcrição RUNT (RUNX1/AML1). Assim, esta activação promove o bloqueio na apoptose e na diferenciação, e o crescimento celular desregulado, promovendo desta forma o processo carcinogénico (Adaptado de Takahashi S., 2011).

Os tratamentos convencionais para a LMA e LMC, como a quimioterapia citotóxica apenas curam uma pequena percentagem de doentes (diminuindo esta percentagem quando estes são considerados de alto risco), além de que as recaídas são frequentes. Assim, novas abordagens terapêuticas dirigidas e mais seguras necessitam de ser encontradas.

Como o receptor *FLT3* aparece mutado em cerca de 30% dos doentes com LMA e em 3 a 5% dos doentes com SMD e LMC existe um interesse cada vez maior em desenvolver novas estratégias terapêuticas que bloqueiem especificamente o gene que codifica este receptor alterado.

A neutralização de ligandos antes que estes possam associar-se com os seus receptores, a directa inibição dos receptores através de anticorpos monoclonais ou através da utilização de pequenas moléculas inibidoras e a inibição de segundos mensageiros, constituem potenciais terapias que estão a ser desenvolvidas para reprimir a acção alterada do receptor Flt3 mutado (Gilliland *et al.*, 2002; Shami *et al.*, 2008).

1.6. Silenciamento de Genes

Muitas das doenças, como é o caso do cancro, são devidas a anomalias na maquinaria genética. A terapia génica vem assim ao encontro destas alterações, na tentativa de restaurar, modificar ou potenciar funções celulares, através da introdução de genes funcionais nas células alvo. De uma maneira geral, a terapia génica pode ser usada, então, para induzir uma reacção antitumoral imunológica, para corrigir um defeito genético nas células tumorais, para tornar a doença oncológica mais susceptível ao tratamento ou as células hospedeiras normais mais resistentes às terapêuticas convencionais (ex. quimioterapia), ou ainda para marcação celular (Wolf G., 2003).

Vários sistemas de entrega do material genético têm vindo a ser desenvolvidos, ambos apresentando vantagens e desvantagens. Dentro destes sistemas temos dois tipos principais: os vectores virais (adenovírus, retrovírus, vírus adeno-associados e lentivírus) e os não virais (polímeros catiónicos e lipossomas). No entanto, continuam a ser desenvolvidos novos sistemas de entrega, como as nanopartículas (Grimm *et al.*, 2007).

Os primeiros resultados deste tipo de terapêutica, não foram porém satisfatórios, por várias razões: inadequados sistemas de entrega genética (vectores) às células alvo, expressão reduzida dos genes recombinantes e indução de respostas imunitárias contra os genes modificados (Nathwani *et al.*, 2004).

Em 1999, um doente com deficiência de ornitina transcarbamilase (DOT) submetido a terapia génica, não sobreviveu devido a reacção imunológica. No entanto, 11 crianças com imunodeficiência combinada severa ligada ao cromossoma XI (SCID-XI- severe combined immune deficiency), e outras crianças com SCID, por deficiência de adenosina desaminase (ADA), foram tratadas com terapia génica com sucesso.

Contudo, duas das crianças tratadas com terapia gênica para SCID-XI desenvolveram posteriormente proliferação incontrolada de células T (síndrome leucêmica ou leukemia-like syndrome), o que mostra as consequências e perigos da manipulação genética (Nathwani *et al.*, 2004).

Assim, e embora os dois casos referidos tenham sido tratados com sucesso, é necessário o desenvolvimento de estratégias mais seguras sem comprometer a sua eficácia.

Nas doenças hematológicas, em particular nas neoplásicas, a terapia gênica é um tratamento promissor, pois em muitas destas doenças a origem molecular é já conhecida (Wolf G., 2003). Neste sentido, estudos com RNA de interferência, RNAi, têm sido cada vez mais efectuados, no sentido de utilizar todas as suas propriedades no silenciamento de genes envolvidos nas neoplasias hematológicas (Meade, B., 2009).

1.6.1. RNA de interferência (RNAi)

O termo RNA de interferência (RNAi) foi pela primeira vez utilizado em experiências com a *Caenorhabditis elegans*, que envolveram a supressão de genes por dsRNA (*double stranded RNA*) (agora denominado RNAi). Este tipo de RNA, responsável pela diminuição do mRNA citoplasmático, está relacionado com o silenciamento genético pós-transcricional (PTGS- posttranscriptional gene silencing). (Venturini *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2007).

O RNAi é um pequeno RNA (com um tamanho entre 21 a 23 nucleótidos), derivado do processamento de dsRNA, que servem como moléculas efectoras. Dependendo da sua origem, estes pequenos RNAs podem ser divididos em três tipos moleculares: o *small interfering RNA* (siRNA) e os microRNA (miRNA) com origem endógena e *short-hairpin RNA* (shRNA), com origem exógena (Venturini *et al.*, 2006; Pfeifer *et al.*, 2010).

Todos os pequenos RNAs podem induzir silenciamento pós-transcricional através da clivagem do mRNA complementar (mais frequente) ou pela inibição da tradução do mRNA. Deste modo, podem regular a expressão de genes durante o desenvolvimento, diferenciação e apoptose, podendo constituir uma abordagem terapêutica em diversas neoplasias (Venturini *et al.*, 2006; Pfeifer *et al.*, 2010).

Neste sentido, inúmeros estudos têm sido efectuados para testar sistemas de entrega de material genético para silenciamento de genes específicos por RNAi no sistema hematopoiético, de modo a constituírem um alvo terapêutico eficaz em patologias deste sistema (Meade, B., 2009).

O dsRNA pode ser experimentalmente introduzido nas células, produzido como um intermediário durante uma infecção viral, ou como produto de repetições invertidas em Tandem ou de transposões (Venturini *et al.*, 2006).

De uma maneira geral este é processado no citoplasma por uma ribonuclease (RNase III), denominada DICER, podendo dar origem aos miRNA ou siRNA. A cadeia complementar dos si/miRNAs maduros é depois retida nos complexos efectores da ribonucleoproteína activa (RISC ou miRNP) actuando como guia para o mRNA homólogo. Os miRNAs podem ter também origem nuclear, sendo transcritos através de genes endógenos pela polimerase II, formando transcriptos primários (pri-miRNA). Ainda no núcleo, a RNase III, Drosha, forma o precursor do miRNA (pré-miRNA), o qual é transportado para o citoplasma pela exportina-5, onde é processado pela DICER para formar o miRNA maduro (Figura 1.14) (Venturini *et al.*, 2006).

Existem ainda estruturas denominadas rasiRNA (*repeat-associated siRNA*), formadas ao nível dos complexos RISC (Figura 1.14), que possivelmente estão envolvidas na repressão de genes a nível transcripcional, através da ligação a certos *loci* homólogos, mas este mecanismo ainda não está completamente compreendido (Venturini *et al.*, 2006).

Vários estudos têm vindo a ser realizados nesta perspectiva do silenciamento genético, tirando partido das possíveis potencialidades terapêuticas dos RNAs de interferência (RNAi) (Venturini *et al.*, 2006).

Os oncogenes de fusão *BCR-ABL*, *AML1-MTG8*, *TEL-PDGFB*, *MLL-AF4* e *NPM1-ALK*, são alguns dos exemplos em que a estratégia da utilização dos pequenos RNAs já foi aplicada, com resultados promissores no que diz respeito ao seu silenciamento (Venturini *et al.*, 2006). Em particular, o oncogene *BCR-ABL* já referido anteriormente, induz e promove a transformação celular característica da leucemia mielóide crónica, sendo por isso, alvo de inúmeras investigações. Vários estudos utilizando como estratégia o RNAi têm tido como objectivo inibir a tradução deste oncogene, sem afectar a expressão da forma selvagem *c-ABL* ou *c-BCR*. Através da entrega de siRNAs,

em células hematopoiéticas contendo a translocação BCR-ABL, foi já possível observar inibição da proliferação celular, bem como aumento da apoptose, e diminuição da sobrevivência celular (Mendonça, L.S., 2010).

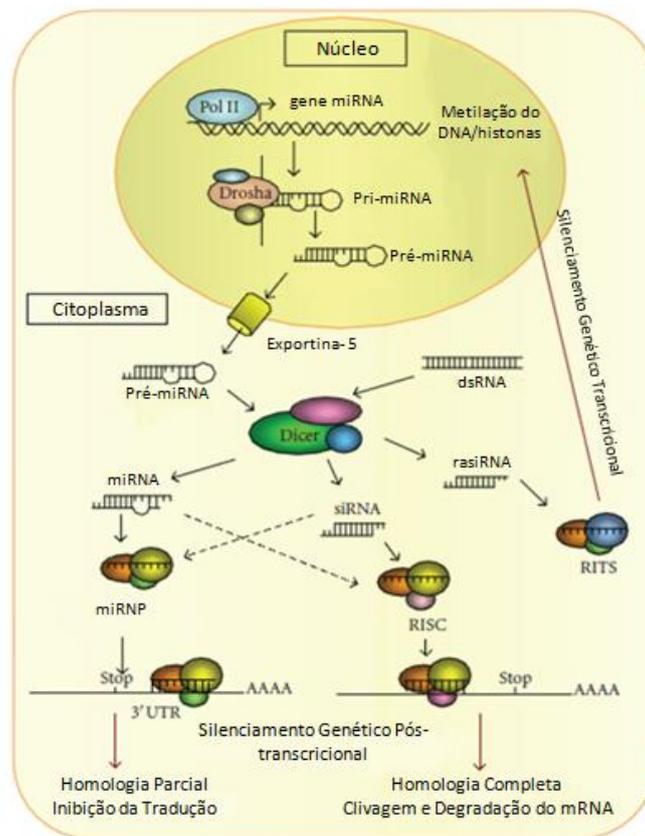


Figura 1. 14. Biogénese dos pequenos RNAs siRNA e miRNA.

Os miRNAs são inicialmente transcritos, pela RNA polimerase II, como miRNAs primários, e incluem 5' cap e cauda 3' poli (A), os pri-miRNA; 2- os pri-miRNAs apresentam uma estrutura em *hairpin* que é clivada, ainda no núcleo, através da actuação da Rnase III, Drosha, dando origem a uma molécula precursora madura denominada pré-miRNA, com cerca de 70 nucleotídeos; 3- O pré-miRNA é então transportado pela Exportina-5 para o citoplasma; 4- o pré-miRNA é processado por uma segunda Rnase III, a Dicer, gerando três pequenos RNAs de cadeia dupla com, aproximadamente, 20-25 nucleotídeos de comprimento, um miRNA, uma siRNA e um rasiRNA. Uma das cadeias do miRNA/siRNA maduro é, então, incorporada num complexo multimérico denominado RISC; 5- O complexo funcional miRISC liga-se ao mRNA alvo e bloqueia a tradução ou cliva-o e degrada-o. Normalmente os siRNAs são completamente complementares e induzem a clivagem e degradação do mRNA alvo. Por outro lado, os miRNA usualmente ligam-se apenas com complementaridade parcial ao seu mRNA alvo, potenciando a inibição da tradução. Ambas as formas podem induzir a degradação ou inibição da tradução, dependendo do contexto celular (Adaptado de Venturini *et al.*, 2006).

1.6.2. Small Interfering RNA (siRNA)

Como mencionado, os siRNAs são pequenos RNAs com um comprimento entre 21 a 25 nucleótidos, constituídos por dois nucleótidos livres no terminal 3', terminando este com um grupo hidroxilo, e o terminal 5' com um grupo fosfato no final da cadeia (Mendonça, L.S., 2010).

A proteína Dicer, que faz a digestão dos dsRNA formando os siRNAs, pertence à família das RNase tipo III. Esta é constituída por seis domínios principais: um domínio DExH/DEAH de RNA helicase/ATPase, um domínio PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille), dois domínios RNase III-like, um domínio de ligação ao dsRNA e por último um domínio DUF283, com função desconhecida (Thomas *et al.*, 2007).

Apenas uma das cadeias do siRNA se liga ao complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*), via DICER e TRBP (*human immunodeficiency vírus trasactivating response RNA-binding protein*), enquanto a outra é degradada. A formação deste complexo permite a ligação a locais complementares do mRNA alvo, potenciando a sua degradação ou inibindo o processo de tradução (Thomas *et al.*, 2007).

As moléculas de siRNA podem também ser introduzidas no citoplasma exogenamente. Assim estes podem ser sintetizados quimicamente, enzimaticamente através de transcrição *in vitro* por uma polimerase, ou por digestão por endonucleases (Venturini *et al.*, 2006). Estes siRNA sintéticos são estabelecidos de forma a mimetizarem os produtos da proteína Dicer, permitindo a sua entrada na maquinaria do RNAi (Mendonça, L.S., 2010).

Em células de mamíferos, quando os siRNA são entregues directamente (ex. por electroporação), apenas conseguem induzir uma resposta transitória, devido ao seu tempo de meia-vida curto ou a diluição durante a divisão celular (Venturini *et al.*, 2006). Devido à sua carga negativa, tamanho e rigidez, os siRNA não conseguem ultrapassar a membrana plasmática facilmente (Meade, B., 2009). São por isso desenvolvidos cada vez mais, sistemas de entrega eficazes e seguros que permitam uma resposta eficiente do siRNA nas células hematopoiéticas sem danos colaterais. Além dos sistemas de entrega, a eficiência e especificidade do siRNA é fundamental para o sucesso da sua utilização sob o ponto de vista terapêutico.

1.6.3. siRNA e *FLT3*

Como mencionado anteriormente, o receptor *FLT3* aparece mutado em cerca de 30% dos doentes com LMA e em 3 a 5% dos doentes com SMD e LMC. Deste modo, têm sido desenvolvidas estratégias terapêuticas que bloqueiem o gene que codifica o receptor alterado.

Diferentes estudos já utilizaram RNAi para inibir a expressão do gene *FLT3*. Num estudo realizado por LU *et al* (2008) foi utilizado um short hairpin RNA (shRNA) para inibir a expressão do gene *FLT3* numa linha celular de LMA, as células THP-1. Este trabalho teve com o objectivo analisar nestas células a relação entre o Flt3 e as proteínas da família de NF- κ B, bem como a diminuição da proliferação celular. Os autores verificaram que o shRNA-*FLT3* suprimia a expressão da proteína Flt3 nas células THP-1; inibia a proliferação celular, sem alterar as proteínas envolvidas na via NF- κ B, a proteína P65 citoplasmática e a I κ B; e provocava diminuição da expressão da proteína nuclear P65. Esta última proteína está associada a uma outra, a I κ B, que em resposta a certos estímulos como citocinas, sinais de stresse ou outros, fica activa, sendo a proteína P65 transportada rapidamente para o núcleo estimulando uma série de eventos transcricionais. Assim sendo, a via do NF- κ B poderá estar envolvida na sinalização do Flt3 e, conseqüentemente, na proliferação celular (Adaptado de Lu *et al.*, 2008).

Outro estudo de Walters *et al* (2005) mostra também diminuição significativa da expressão de *FLT3*-ITD nas linhas celulares BA/F3 *FLT3*-ITD e Molm-14 (*FLT3*-ITD+), usando siRNAs funcionais direccionados para locais distintos do gene *FLT3* (4 locais diferentes), transfectados por electroporação. A diminuição deste receptor associa-se a diminuição da fosforilação e activação das cinases STAT5, MAP cinase e AKT, diminuindo, desta forma, a viabilidade e proliferação celular. Estes autores utilizaram também um inibidor do receptor Flt3, o MLN518, e demonstraram que este tinha acção sinérgica com o siRNA. Este estudo mostra, que o siRNA pode constituir uma arma terapêutica promissora na inibição do *FLT3*, quer em monoterapia quer em associação com outros fármacos (Walters *et al.*, 2005).

No entanto, além dos sistemas de entrega, a eficiência e especificidade do siRNA é fundamental para o sucesso da sua utilização sob o ponto de vista terapêutico em neoplasias hematológicas.

1.7. Fármacos anti-cancerígenos convencionais e Inibidores específicos da sinalização celular

Apesar da estreita margem entre o benefício e os efeitos secundários, a quimioterapia é ainda muito utilizada em doentes oncológicos, especialmente naqueles que se encontram em estádios mais avançados da doença. Neste sentido, o uso da quimioterapia combinada é muito frequente, pois permite actuar em vários alvos moleculares e, deste modo, diminuir a toxicidade, visto as concentrações necessárias serem mais baixas (Weisberg *et al.*, 2009).

O ácido all-trans retinóico (ATRA), derivado da vitamina A, é o tratamento standard da LMA. Este fármaco inibe a proteína de fusão PML-RAR α presente na LPA, como descrito anteriormente na secção 1.4.1. O tratamento com ATRA promove a restauração da estrutura normal da proteína PML e a degradação da proteína de fusão PML-RAR α , via clivagem mediada por caspases e degradação proteasómica. O ATRA promove também alteração da função supressora da proteína de fusão, para uma função estimulatória, promovendo a diferenciação celular. Quando administrado em maiores concentrações induz apoptose celular das células leucémicas. No entanto, apesar do seu efeito anti-cancerígeno na LPA, a resistência a este fármaco pode desenvolver-se (Wang, Z.Y., 2002).

A combinação da quimioterapia convencional com outras terapias em desenvolvimento, como é o caso dos RNAs de interferência e inibidores proteicos específicos, poderá deste modo potenciar toda a terapêutica, devido ao sinergismo que as diferentes terapias podem ter, diminuindo também, a sua toxicidade (Weisberg *et al.*, 2009).

A utilização de inibidores específicos de proteínas relacionadas com a via de sinalização a jusante do receptor Flt3 poderá contribuir para a potenciação do efeito da terapia com os siRNAs anti-FLT3, visto a terapia combinada ser uma mais-valia no

tratamento de doenças oncológicas, em que inúmeras vias de sinalização estão afectadas (Weisberg *et al.*, 2009).

O valor terapêutico dos inibidores da tirosina cinase (ITK) no tratamento do cancro foi inicialmente evidenciado pela acção do Mesilato Imatinib na leucemia mielóide crónica (LMC) (Small, D., 2006; Oliveira AC., 2008).

O fármaco Imatinib é um inibidor específico de RTKs, PDGF-R, c-KIT, e proteína de fusão BCR-ABL. Este actua através da inibição competitiva pelos locais de ligação do ATP no domínio cinase das proteínas tirosina- cinase, não permitindo a fosforilação das proteínas efectoras a jusante na via de sinalização (Figura 1.15). Deste modo, diminui a proliferação celular e induz a apoptose das células neoplásicas, não interferindo significativamente com as células normais (Madhusudan, *et al.*, 2004; Small, 2006; Oliveira, AC., 2008).

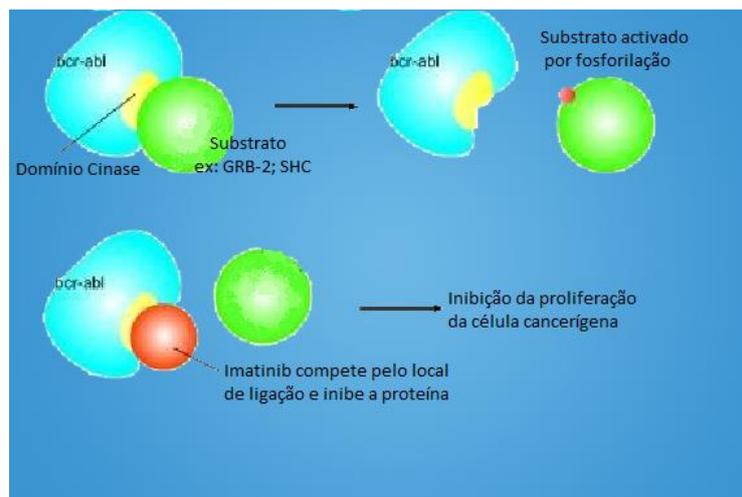


Figura 1. 15. Modo de acção do inibidor da tirosina cinase, Mesilato Imatinib na proteína de fusão de tirosina-cinase BCR-ABL.

Na ausência do fármaco a proteína BCR-ABL fosforila os seus substratos através do domínio cinase, encontrando-se constitutivamente activa, contribuindo assim para o fenótipo maligno. Na presença do fármaco, esta fosforilação é impedida, levando à inibição da proliferação das células neoplásicas (Adaptado de *The Chemistry Encyclopedia*, s.d).

Os inibidores da farnesiltransferase (IFTs) actuam de modo a impedir a adição de grupos farnesil à proteína RAS, os quais, são necessários para que esta se possa ancorar à membrana celular ficando activa. Deste modo, são activadas uma cascata de

sinais intracelulares que levam à proliferação e sobrevivência celular. Assim os IFTs interferem, com o processo de farnesilação da proteína RAS, que muitas vezes se encontra mutada em diversas neoplasias (Figura 1.16) (Mangues *et al.*, 1998).

O inibidor L-744,832 é um composto peptidomimético da zona CAAX, presente na proteína RAS. Para que esta proteína tenha a capacidade de transformação, a CAAX do seu terminal COOH, tem de ser farnesilado pela farnesiltransferase. O inibidor vai deste modo, exercer a sua função por competição de substratos, levando à diminuição da proliferação e sobrevivência celulares (Mangues *et al.*, 1998; Oliveira, AC., 2008).

Os inibidores da FT, Tipifarnib e Lonafarnib, encontram-se em fase de ensaios clínicos mostrando resultados favoráveis. São compostos não peptidomiméticos que competem com a farnesiltransferase por proteínas contendo o terminal CAAX (Adaptado de Oliveira, AC., 2008; Chu *et al.*, 2009).

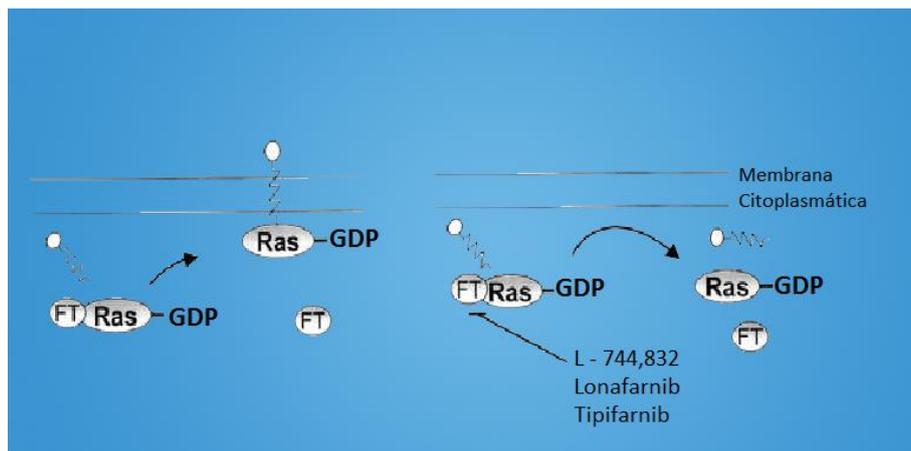


Figura 1. 16. Imagem representativa do modo de Inibição dos inibidores da proteína farnesil-transferase.

Os inibidores da farnesiltransferase (IFTs) como o L-744,832, Lonafarnib, e Tipifarnib, actuam de modo a impedir a adição de grupos farnesil à proteína RAS, inibindo a sua ligação à membrana celular e assim a sua activação (Adaptado de Mancilia *et al.*, 2006; Chu *et al.*, 2009).

Como as células neoplásicas têm uma taxa de crescimento superior à das células normais são também mais propensas à acumulação de proteínas anómalas. A inibição do proteasoma é, neste sentido, uma estratégia eficaz, levando à acumulação excessiva de proteínas anómalas, fazendo com que as células desencadeiem

mecanismos que levem à apoptose, sendo as células malignas mais sensíveis a essa inibição (Adams, 2004; Oliveira, AC., 2008).

O Bortezomib foi o primeiro inibidor de proteasoma a ser utilizado em terapias anti-cancerígenas. Trata-se de um derivado do ácido borónico, aprovado pela FDA e pela MEA, para o tratamento do Mieloma Múltiplo (Adams, 2004; Gilliland *et al.*, 2004 Oliveira, AC., 2008).

O MG-262, um inibidor do proteasoma análogo do Bortezomib, actua bloqueando directamente a subunidade 20S do proteasoma, inibindo assim o processo de degradação de certas proteínas, as quais se vão acumular nas células, desencadeando a apoptose (Myung *et al.*, 2001; Delcros *et al.*, 2003; Adams, 2004; Oliveira, AC., 2008).

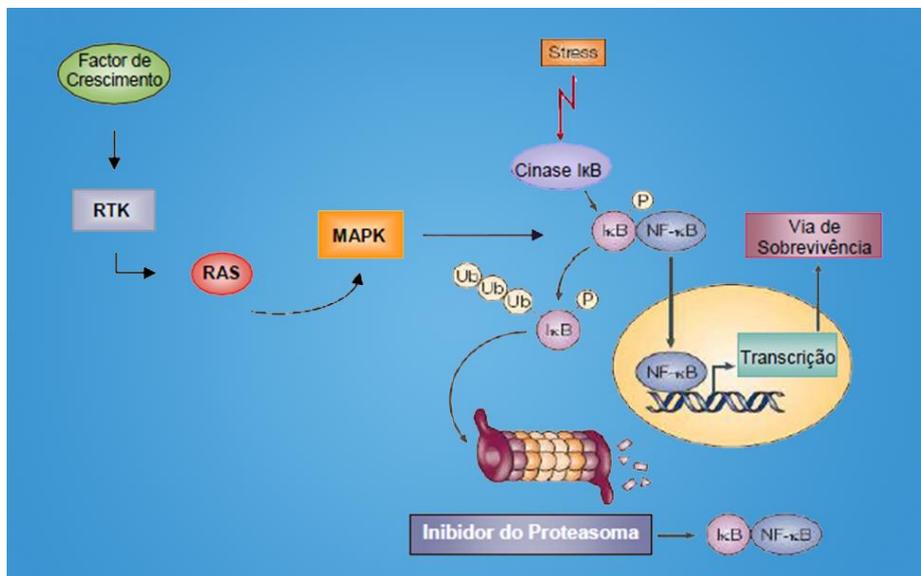


Figura 1. 17. Acção dos Inibidores do Proteasoma (IPs) mediada pelo IκB/NF-κB.

O factor de transcrição NF-κB encontram-se inactivo no citoplasma por ligação com a proteína IκB. Quando a célula é sujeita a factores de crescimento ou outros tipos de stresse, o IκB sofre fosforilação, ubiquitinação e subsequente degradação no proteasoma 26S. O NF-κB é então libertado e translocado para o núcleo, accionando a transcrição de genes que codificam factores de crescimento, moléculas relacionadas com a adesão celular, factores angiogénicos e factores antiapoptóticos como as IAP (por exemplo a survivina) e a Bcl2. Os IPs (Bortezomib, MG-262) estabilizam o IκB, que permanece ligado ao NF-κB, retendo-o no citoplasma. Deste modo, inibem a proliferação, a diferenciação celular, o desenvolvimento de mecanismos de resistência à radioterapia e quimioterapia, promovendo a apoptose. RTK – receptor tirosina cinase. MAPK – Mitogen Activated Protein Kinase (Adaptado de Karin *et al.*, 2002; Delcros *et al.*, 2003; Adams, 2004; Oliveira AC., 2008)

1.8. Objectivos

O objectivo deste trabalho foi analisar o potencial terapêutico de um siRNA anti-*FLT3* em neoplasias hematológicas nomeadamente na leucemia mielóide crónica (LMC) e na leucemia miélode aguda (LMA), em monoterapia e em associação com fármacos anticancerígenos convencionais (Mesilato Imatinib e ácido all-transretinóico (ATRA)) e novos fármacos dirigidos a alvos moleculares específicos (o inibidor da Farnesiltransferase (L-744,832) e o inibidor do Proteasoma (MG-262)). Por outro lado, pretendeu-se também correlacionar o potencial terapêutico com a presença ou ausência de mutações no gene *FLT3*.

Desta forma, esperamos com este trabalho contribuir para a elucidação de alguns dos mecanismos moleculares envolvidos nestas neoplasias hematológicas e identificar novos alvos moleculares para novas abordagens terapêuticas, mais eficazes e de menor toxicidade, para o tratamento dos doentes com estas patologias.

2. *Materiais e Métodos*

2.1. Reagentes

Na realização do estudo utilizaram-se duas linhas celulares: uma linha celular de Leucemia Melóide Crónica em fase blástica (Eritroleucemia humana), as células K562, e uma linha celular de Leucemia Promielocítica Humana, as células HL-60, as quais foram obtidas na *European Collection of Cell Culture* (ECACC); meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen), penicilina (Gibco, Invitrogen), streptomina (Gibco, Invitrogen) e soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen); FlexiTube siRNA anti-*FLT3* (Qiagen), AllStars Negative Controlo siRNA (Qiagen), ácido all-transretinóico (ATRA) (Sigma), Mesilato de Imatinib (Novartis Pharma), L-744,832 (Calbiochem, Merck KGaA), MG-262 (Calbiochem, Merck KGaA), azul de tripano a 0,4% (Sigma), resazurina (Sigma), demilsulfóxido (Sigma), tetrahidrofurano (Sigma), metanol (Sigma), glicerol (Sigma), meio salino de fosfato (Gibco, Invitrogen), soluto de May-Grünwald e soluto de Giemsa (Sigma-Aldrich); kit de detecção de apoptose (Immunotech); kit de extracção de ADN Illustra™ Blood genomicPrep Mini Spin e marcador de pesos moleculares de 100 pares de bases (GE Healthcare); tampão Tris Acetato EDTA (BioRad), agarose (BioRad) e brometo de etídeo (BioRad); HotStart polymerase (Quiagen); enzima de restrição *EcoRV* (New England Biolabs); DOTAP e Colesterol (Avanti Polar Lipids, Inc.); *Infinity™ Cholesterol Liquid Stable Reagent Kit* (Thermo Electron Corporation); HBS (*Hepes buffered saline solution*); Hepes (*-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*); NaCl (Cloreto de sódio);

2.2. Cultura das linhas celulares

A manutenção das culturas celulares foi conseguida através da renovação do meio de cultura a cada dois ou três dias, para um máximo de 30 a 35 passagens. Para controlar a densidade da cultura a cada passagem, recorreu-se à sua avaliação, através do Método de Exclusão com Azul de Tripano (TB). Este último, é um corante vital que permite a distinção entre células vivas e células mortas, visto apenas incorporar-se naquelas onde a membrana plasmática se encontra parcial ou totalmente destruída. Deste modo, as células viáveis apresentam a membrana plasmática intacta e por isso impermeável ao Azul de Tripano que não entra para o citoplasma. Nas células não

viáveis, por outro lado, a membrana não estando intacta permite a entrada do corante para o citoplasma, adquirindo este último, uma cor azul. Posteriormente procedeu-se à contagem das células, com auxílio de um microscópio óptico de luz invertida, através de um hemocitómero (Câmara de Neubauer). Para a manutenção das culturas celulares, e sempre que necessário, procedeu-se à centrifugação das células a 100 xg durante cinco minutos, de modo a remover o meio, ressuspensando-as num volume de meio ótimo ao seu crescimento. Este procedimento aliado à análise, também frequente, da morfologia, cor do meio e padrão de crescimento, permitiram otimizar as condições de crescimento celular (Durkin *et al.*, 1979).

2.2.1. Linha celular de Leucemia Mielóide Crónica

A linha celular de Leucemia Mielóide Crónica, as células K562, foi estabelecida por Lozzio & Lozzio (1975) a partir de uma doente do sexo feminino com 53 anos, à qual lhe foi diagnosticada Leucemia Mielóide Crónica (LMC) em crise blástica (Koeffler *et al.*, 1980).

Em termos morfológicos e histológicos, as células K562, apresentam um diâmetro de cerca de 20 µm, o citoplasma dos basófilos não apresenta grânulos e existem dois ou mais nucléolos proeminentes (Koeffler *et al.*, 1980).

As células possuem características de células multipotentes, deste modo, têm capacidade de se diferenciar em progenitores de eritrócitos, granulócitos e monócitos. A característica citogenética principal destas células é o cromossoma de Philadelphia, que resulta da translocação t(9; 22)(q34; q11), a qual reflecte um rearranjo entre os genes *ABL* e *BCR* (Naumann *et al.*, 2001).

As células não possuem complexo major de histocompatibilidade (CMH), o qual é necessário para inibir a actividade das células Natural Killer (NK), daí que sejam sensíveis à actividade destas últimas. Não possuem também, qualquer vestígio do Vírus *Epstein-Barr* nem de outros tipos de vírus do herpes.

As células K562, foram mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma) a pH 7,4, contendo 2 mM de L-glutamina, 20mM de HEPES-Na, 1,5 g/L de NaHCO₃, 100 U/mL de penicilina (Gibco), 100 µg/mL estreptomicina (Gibco) e enriquecido com soro fetal bovino (Gibco) a 10%. Durante o tempo de incubação estas células são mantidas em cultura, em

suspensão, no meio apropriado a uma temperatura de 37°C e numa atmosfera humedecida contendo 5% de CO₂, sendo a cultura iniciada a uma densidade entre 0.3 e 0,5 milhões de células por mL.

2.2.2. Linha celular de Leucemia Promielocítica Aguda (LPA)

A linha celular de Leucemia Mielóide aguda, as células HL-60, foi estabelecida a partir de uma doente com Leucemia Promielocítica Aguda (LPA), um subtipo da Leucemia Mielóide Aguda (LMA). Grande parte das células assemelham-se a promielócitos (granulócitos imaturos), contendo o proto-oncogene *c-myc*, mas *in vitro* podem ser induzidas a diferenciar-se, completando a maturação e perdendo a expressão do proto-oncogene. Para a manutenção em cultura, estas células necessitam de insulina e transferrina, cujos receptores são expressos à superfície celular destas células. Esta linha celular constitui um modelo atractivo para estudos da diferenciação celular mielóide em humanos (Birnie, G.D., 1988).

A linha celular HL-60 foi mantida em cultura nas mesmas condições das células K562, referidas anteriormente em 2.2.1.

2.3. Extracção de ADN recorrendo ao Kit Illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare)

O ADN das células HL-60 e K562 foi extraído de acordo com os procedimentos mencionados no kit utilizado. Assim, as células foram sujeitas a uma centrifugação durante 10 minutos a 500 xg e ressuspensas em 400 µL de tampão de lise (kit Illustra™). A mistura assim obtida foi posteriormente agitada no vórtex durante 15 segundos e incubada durante 10 minutos. Montou-se uma coluna contendo uma malha de sílica-gel num tubo de recolha. Ressuspendeu-se cuidadosamente as células lisadas com uma micropipeta e transferiu-se de seguida a mistura para a superfície da malha da coluna. Centrifugou-se a 11.000 xg durante um minuto para que o ADN fosse adsorvido na malha, removeu-se o sobrenadante do tubo colector e adicionou-se novamente 500 µL de tampão de lise. Repetiu-se o passo anterior, de modo a proceder à lise completa e desnaturação de eventuais proteínas residuais. Em seguida,

adicionaram-se 500 µL de tampão de lavagem (diluído previamente com etanol) e centrifugou-se a 11.000 xg durante 3 minutos. Retirou-se o sobrenadante e efectuou-se nova centrifugação a 11.000 g durante 1 minuto, de modo a remover todo o etanol eventualmente retido. A coluna foi posteriormente transferida para um *ependorf* estéril. Adicionou-se directamente na malha 200 µL de tampão de eluição, previamente incubado a 70 °C durante 1 minuto. Posteriormente procedeu-se a uma centrifugação a 11.000 xg, recolhendo-se o eluído contendo o ADN.

De seguida, a quantidade de ADN nas amostras foi determinada por espectrofotometria. Para tal, utilizou-se um tubo branco contendo 500 µL água e outro tubo contendo 10 µL de amostra + 490 µL de água (diluição 1:50). A concentração do ADN na amostra foi calculada pela fórmula seguinte:

$$\text{Amostra} = 50 \mu\text{g/mL} \times A_{260} \times \text{Factor de Diluição} \quad (\text{Equação 2.1})$$

sendo que se considerou que a cada unidade de absorvância a 260 nm correspondem 50 µg/mL, e o factor de diluição foi de 50x (Oliveira AC., 2008).

O grau de pureza da amostra foi obtido pela razão entre as densidades ópticas (DO) avaliadas no comprimento de onda (λ) de 260 nm e de 280 nm, de acordo com a expressão:

$$\text{DO } 260_{\text{amostra}} / \text{DO } 280_{\text{amostra}} \quad (\text{Equação 2.2})$$

As amostras foram consideradas puras para a razão igual a 1,8

2.4. Detecção de Mutações no gene FLT3

A detecção de mutações no gene *FLT3*, duplicações internas em tandem (ITD) e a mutação pontual D835, foi efectuada no ADN extraído das linhas celulares HL-60 e K562, anteriormente descrito (kiyoi *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 2001).

A mutação pontual D835 foi detectada por PCR-RFLP (*Polymerase Chain reaction* ou Reacção de polimerização em cadeia-*Restriction Fragment Length Polymorfisms* ou análise de polimorfismos pelo comprimento de fragmentos de restrição) (Yamamoto *et al.*, 2001). A análise RFLP baseia-se na presença ou ausência de locais de reconhecimento de enzimas de restrição específicas. Assim, após a amplificação do ADN por PCR, este pode ser fragmentado por estas enzimas, as quais reconhecem e cortam sequências específicas do ADN (Griffiths *et al.*, 2005). Nos codões D835 e I836 a

sequência GATATC, contém o local de restrição da endonuclease de restrição do tipo II, *Eco RV* (Yamamoto *et al.*, 2001).

Assim, 100 ng de ADN genómico foram utilizados para amplificar o exão 17 do gene *FLT3* utilizando um *primer* directo e um *primer* inverso (5'-CCGCCAGGAACGTGCTTG-3' e 5'-GCAGCCTCACATTGCCCC-3', respectivamente) na concentração de 300 nM, dNT's (desoxinucleótidos trifosfatados de adenina, guanina, citosina e timina) a 200 µM, cloreto de magnésio a 1,5 mM e 2,5 U de *HotStart polymerase* (Quiagen). O *PCR* seguiu os seguintes parâmetros: uma fase de desnaturação inicial à temperatura de 95 °C durante 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação (95 °C durante 1 minuto), emparelhamento (57 °C durante 30 segundos), extensão (72 °C durante 45 segundos) e um período de extensão final a 72 °C durante 10 minutos, utilizando o termociclador My Cycler (BioRad). Após amplificação procedeu-se à digestão enzimática do fragmento obtido com a endonuclease de restrição do tipo II, *Eco RV* (New England BioLabs) durante 2 horas a 37 °C. Os produtos digeridos foram visualizados, simultaneamente com um marcador de pesos moleculares de 100 pb (GE HealthCare), em gel de agarose a 4% corado com brometo de etídio, fotografados e identificados.

2.4.1. Detecção das duplicações internas em tandem (ITD)

Como a localização da mutação *FLT3/ITD* é restrita aos exões 11 e 12, tal como descrito por kiyoi *et al* (1997) , foi efectuada uma amplificação por *PCR* utilizando *primer* directo e um *primer* inverso (11F, 5'-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3' e 12 R, 5'-CTTTCAGCATTTTGAGGGAACC-3', respectivamente). Assim 500 ng de ADN genómico 50 pmol de ambos os primers, 0,2 mM de cada dNT's (desoxinucleótidos trifosfatados de adenina, guanina, citosina e timina), cloreto de magnésio a 1,5 mM e 2,5 U de *HotStart polymerase* (Quiagen) (kiyoi *et al.*, 1997).

O *PCR* seguiu os seguintes parâmetros: uma fase de desnaturação inicial à temperatura de 95 °C durante 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação (95 °C durante 30 segundos), emparelhamento (56 °C durante 60 segundos), extensão (72 °C durante 120 segundos) e um período de extensão final a 72 °C durante 10 minutos, utilizando o termociclador My Cycler (BioRad). Os produtos amplificados foram

visualizados, em gel de agarose a 4% corado com brometo de etídio, fotografados e identificados.

2.5. Transfecção dos lipoplexos nas linhas celulares

2.5.1. Preparação dos Lipossomas Catiônicos por Hidratação/Extrusão

Os lipossomas catiônicos foram preparados com o lípido catiônico *1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propane* (DOTAP) e o lípido neutro Colesterol (Avanti Polar Lipids, Inc.), obtidos a partir de soluções stock de lípidos preparadas previamente em etanol, com uma concentração de 0,04 M. Os lípidos foram misturados nas proporções adequadas (lípido catiônico/lípido neutro) de modo a obter a razão molar pretendida (1:1), e a concentração final de 400 η M.

Procedeu-se depois, à remoção do etanol da solução lipídica por evaporação, sob fluxo de azoto, de modo a remover qualquer resíduo orgânico deste solvente, obtendo desta forma um filme lipídico.

A fim de se obterem vesículas multilamelares (MLV), o filme lipídico obtido foi hidratado com 1 mL de água desionizada e bi-destilada (aparelho Millipore MilliQ). As vesículas foram sujeitas posteriormente a três ciclos alternados de vortex a alta rotação seguidos de aquecimento a 60° C num banho de água. Posteriormente, procedeu-se a sonicação (Sonorex RK100, Bandelin, Berlin, Germany) durante 1-3 minutos. Seguidamente, o filme lipídico foi extrudido 21 vezes através de membranas de policarbonato com poros de 50 η m de diâmetro utilizando um dispositivo de dupla seringa (extrusor Lipofast, da Avestim, Toronto, Canadá). Deste modo, obteve-se uma suspensão lipossômica composta por lipossomas unilamelares pequenos (SUVs).

Os lipossomas são depois esterilizados com auxílio de um filtro com poros de 0,22 μ M e conservados no frigorífico a 4 °C por um período máximo de 20 dias.

2.5.2. Quantificação do teor lipídico dos lipossomas

A medição da quantidade total de lípido presente na solução de lipossomas foi determinada a partir da quantificação do colesterol total. Esta foi feita utilizando o *InfinityTM Cholesterol Liquid Stable Reagent Kit* (Thermo Electron Corporation).

Este método baseia-se na hidrólise enzimática dos ésteres do colesterol pela enzima colesterol esterase, com formação de colesterol e ácidos gordos livres. O colesterol livre é então oxidado pela enzima colesterol oxidase, dando origem aos produtos colest-4-n-3-ona e peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio combina-se com o ácido hidróxibenzóico e 4-aminoantipirina originando um cromóforo (corante quinonaimina) o qual pode ser quantificado espectrofotometricamente a 500 nm (Mendonça, L.S., 2010).

Para a determinação do colesterol total dos lipossomas, foram preparados padrões com 0,162, 0,323, 0,646 e 1,292 mmol de colesterol e 15 µl da solução de lipossomas. Assim, numa placa de 96 poços foram pipetados 20 µl de cada um dos padrões fazendo sucessivas diluições, 3 amostras da nossa solução, cada uma com 5 µl perfazendo o volume com água desionizada e bi-destilada, obtendo um volume final de 20 µl e 20 µl de água desionizada e bi-destilada, servindo este último como branco. Posteriormente, adicionou-se 30 µl de etanol a cada uma das amostras (padrões, amostra de lipossomas e branco) e 150 µl do reagente *Infinity Cholesterol*. Incubaram-se as amostras durante 7 minutos a 37 °C e arrefeceram-se posteriormente à temperatura ambiente, lendo-se de seguida a absorvância a 500 nm.

Com os valores obtidos para os padrões traçou-se uma curva de calibração (mmoles de colesterol vs Abs.) e, por regressão linear, calculou-se a quantidade de colesterol existente no volume de amostra analisado, comparando com uma curva standard de colesterol com valores compreendidos entre os 0 e os 13 mM.

De acordo com as proporções existentes entre o EPOPC e o colesterol (1:1) foi calculada a concentração total de lípido existente na amostra.

2.5.3. Preparação dos lipoplexos (complexos lipossomas catiónicos-ADN)

A preparação dos complexos é efectuada em condições assépticas, imediatamente antes da adição às células.

Os lipoplexos com transferrina associada (lipoplexos ternários) são preparados em tampão de HBS (*Hepes buffered saline solution*), o qual contém 20 mM de Hepes, 100 mM de NaCl a pH 7,4. Os lipossomas (cujo volume é dependente da concentração de siRNA, de modo a obter uma razão de carga final de 2:1 (+/-)) e 32 µg de transferrina

por µg de ácidos nucleicos, servindo esta última para aumentar a eficiência da transfecção, são sequencialmente adicionados ao HBS. A mistura é submetida a um vortex rápido seguido de incubação durante 15 minutos à temperatura ambiente. De seguida, os siRNA anti-*FLT3* cuja sequência alvo está representada na tabela 2.1, e os siRNA controlo (controlo negativo), foram adicionados, voltou-se a incubar a mistura durante 20 minutos e por fim o material foi entregue às células (Simões *et al.*, 1999).

2.5.4. Transfecção de linhas celulares

As células foram primariamente colocadas em placas de cultura, a uma densidade celular inicial de 1,5 milhões de células/mL (10^6 cel/mL) (HL-60, K562), em meio de cultura a 37 °C, desprovido de soro e antibióticos, adicionando-se 100 µL de células a cada poço. Seguidamente, foi adicionado a cada poço 50 µL de lipoplexos correspondente a 100 ηM de ADN (preparados como descrito em 2.5.2). Incubou-se posteriormente a placa durante 4 horas na estufa a 37 °C em atmosfera húmida com 5% de CO₂. Após a incubação adicionou-se 150 µL de meio de cultura completo (com 20% de soro e antibióticos), perfazendo deste modo um volume final de 300 µL por poço, mantendo as células a uma densidade celular final de 0,5 milhões de células/mL (Seca *et al.*, 2011). As células foram incubadas por um período de 72 horas a 37 °C em atmosfera húmida com 5% de CO₂.

Tabela 2. 1. Sequência do ADN alvo do siRNA anti-*FLT3* e cadeia sense e antisense do seu mRNA.

| | |
|---------------------------------|------------------------------|
| Sequência de ADN alvo | 5`-TACGTTGATTTTCAGAGAATAT-3` |
| Cadeia sense do mRNA | 5`-CGUUGAUUUCAGAGAAUAUTT-3` |
| Cadeia antisense do mRNA | 5`-AUACUCUGAAAUCAACGTA-3` |

A-adenina; C-citosina, G-guanina, U-uracilo

2.6. Incubação das linhas celulares com os fármacos

Após tratamento com os siRNA, as linhas celulares de Leucemia Mielóide Crónica (K562) e a linha celular de Leucemia Mielóide Aguda (HL-60), foram mantidas na ausência e na presença do inibidor da Farnesil Transferase, L-744,832, do inibidor do Proteasoma, MG-262, e do fármaco convencional correspondente, Imatinib e ácido all-

trans retinóico (ATRA), respectivamente. Estes foram administrados individualmente e em associação de acordo com o descrito na Tabela 2.2.

Tabela 2. 2. Condições da cultura das linhas celulares HL-60 e K562 com siRNA anti-*FLT3* em monoterapia e e em associação com os fármacos ATRA, Imatinib, MG-262 e L-744,832,

| HL-60 | K5662 |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| siRNA anti- <i>FLT3</i> (100nM) | siRNA anti- <i>FLT3</i> (100nM) |
| siRNA controlo (100nM) | siRNA controlo (100nM) |
| siRNA anti- <i>FLT3</i> +MG-262 | siRNA anti- <i>FLT3</i> +MG-262 |
| siRNA anti- <i>FLT3</i> + L-744,832 | siRNA anti- <i>FLT3</i> +L-744,832 |
| siRNA anti- <i>FLT3</i> + ATRA | siRNA anti- <i>FLT3</i> + Imatinib |
| siRNA controlo+MG-262 | siRNA controlo+MG-262 |
| siRNA controlo +L-744,832 | siRNA controlo + L-744,832 |
| siRNA controlo +ATRA | siRNA controlo +ATRA |
| ATRA (25 µM) | Imatinib (10 ηM) |
| MG-262 (5 ηM) | MG-262 (0,1 ηM) |
| L-744,832 (0,1 µM) | L-744,832 (0,5 µM) |

siRNA controlo (controlo negativo)

As células K562 e HL-60 foram mantidas em cultura por um período de 72 horas a uma densidade celular inicial de 0,5 milhões de células/mL, nas condições referidas na secção 2.2, em frascos ou em placas de cultura, dependendo da quantidade necessária aos estudos referidos anteriormente, na ausência e na presença do L-744,832 (tabela 2.3), do MG-262 (tabela 2.4), e do Imatinib e/ou do ATRA (tabela 2.5).

Tabela 2. 3. Condições de incubação das células K562 e HL-60 com o inibidor da Farnesil Transferase, L-744,832

| Concentração (µM) | K562 | HL-60 |
|-------------------|------|-------|
| 0,1 | | √ |
| 0,5 | √ | |
| 5 | √ | √ |
| 12,5 | √ | √ |
| 25 | √ | √ |

Potencial Terapêutico de siRNA anti-FLT3 em Neoplasias Hematológicas

| | | |
|----|---|---|
| 50 | √ | √ |
| 75 | √ | |

Tabela 2. 4. Condições de incubação das células K562 e HL-60 com o inibidor do Proteasoma, MG-262.

| Concentração (nM) | K562 | HL-60 |
|-------------------|------|-------|
| 0,1 | | √ |
| 1 | | √ |
| 5 | √ | √ |
| 10 | √ | √ |
| 25 | √ | √ |
| 50 | √ | |
| 75 | √ | |

Tabela 2. 5. Condições de incubação das células K562 e HL-60 com o inibidor de tirosina cinase, Imatinib e o ácido all-transretinóico (ATRA), respectivamente.

| Concentração (µM) | K562 | HL-60 |
|-------------------|------|-------|
| 0,01 | √ | |
| 0,25 | √ | |
| 0,75 | √ | |
| 1 | √ | |
| 2,5 | √ | |
| 25 | | √ |
| 50 | | √ |
| 100 | | √ |
| 150 | | √ |

Para estes estudos prepararam-se soluções concentradas dos vários compostos segundo as condições descritas na tabela 2.6. As linhas celulares foram incubadas com volumes pequenos destas soluções concentradas de modo a obter as concentrações finais desejadas.

Tabela 2. 6. Descrição das condições de preparação e armazenamento dos compostos utilizados.

| Composto | Concentração stock (mM) | Solvente | Armazenamento (°C) | Vendedor |
|-----------------------|-------------------------|-----------------|--------------------|------------|
| Flexitube siRNA-FLT3 | 0.02 | Água RNase-free | -20 | Qiagen |
| AllStars Neg. Control | 0.02 | Água RNase-free | -20 | Qiagen |
| Mesilato Imatinib | 85 | DMSO | -20 | Calbiochem |
| ATRA | 100 | DMSO | -20 | Sigma |
| L-744,832 | 23 | Água | -20 | Calbiochem |
| MG-262 | 0.5 | DMSO | -20 | Calbiochem |

2.7. Análise da morfologia celular

Nas linhas celulares, K562 e HL-60, incubadas na ausência e na presença dos vários fármacos em estudo, foi analisada a morfologia celular por microscopia óptica após realização de esfregaços de células e coloração dos mesmos com corante de May-Grünwald-Giemsa. Para o efeito utilizou-se um microscópio óptico Nikon Eclipse 80i acoplado a uma câmara digital Nikon Digital Camera DXm 1200F, tendo-se adquirido as imagens recorrendo ao programa Nikon ACT-1.

Os esfregaços de células foram preparados a partir da recolha de células previamente incubadas, durante um período de 48h, na ausência e na presença dos compostos em estudo nas condições referidas anteriormente. Assim, foram recolhidas 50 mil células e centrifugadas durante 5 minutos a 300 xg e lavadas, por centrifugação, com tampão fosfato (PBS). As células obtidas foram ressuspensas num pequeno volume de soro bovino fetal para realização dos esfregaços e posteriormente corados com solução May-Grünwald-Giemsa (Gonçalves, AC; 2008; Oliveira, A.C., 2008).

Os esfregaços obtidos foram posteriormente corados durante 3 minutos com solução de May Grünwald, sendo esta preparada em 0,3% de metanol e diluída de 1:1 com água destilada na altura da utilização. Seguidamente, foi utilizada solução de Giemsa, durante 15 minutos, sendo esta última, composta por 1 gr de corante de Giemsa dissolvido em 66 mL de glicerol e 66 mL de metanol e seguidamente diluída de 1:8 com água. Por último, os esfregaços foram lavados com água destilada e, após secagem, a

morfologia das células foi analisada por microscopia óptica e posteriormente fotografada.

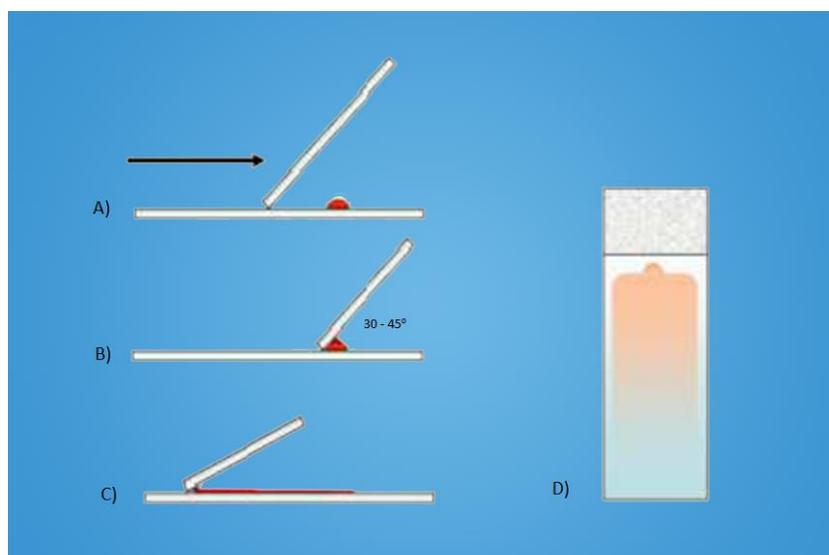


Figura 2. 1. Esquema representativo da elaboração de um esfregaço

A) A técnica inicia-se com a colocação de uma gota da suspensão de células numa lâmina, B) onde uma segunda lâmina é depois posicionada com uma inclinação entre 30-45° relativamente à primeira. C) A gota é arrastada sobre a lâmina, de modo a obter-se D) uma fina película contendo as células numa só camada (Adaptado de <http://www.depts.ttu.edu>; Oliveira, AC., 2008).

2.8. Análise da Expressão de FLT3

A Citometria de Fluxo é uma técnica que permite analisar, quantificar e classificar vários parâmetros de partículas (células por ex.) microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo laminar, baseada nas propriedades ópticas (dispersão de luz e fluorescência) dessas mesmas partículas (Oliveira, A.C., 2008). O citómetro de fluxo permite assim, a análise individual das células, que ao passarem uma a uma num fluxo laminar, são intersectadas por um feixe de luz, que provoca a dispersão da luz, em função do tamanho e complexidade das partículas/células em análise. Além da análise qualitativa, esta técnica permite ainda avaliar a expressão de várias moléculas, recorrendo à sua marcação com anticorpos específicos conjugados com fluocromos apropriados (Oliveira, AC., 2008).

Para verificar se existiria diminuição da expressão de *FLT3* após o tratamento com o siRNA anti-*FLT3*, as células HL-60 e K562 incubadas na ausência e na presença do siRNA

anti-*FLT3* e do seu respectivo controlo, por um período de durante 48 horas, segundo o procedimento descrito em 2.5.4, foi avaliada por CF a expressão de *Flt3*, recorrendo a um anticorpo monoclonal marcado com sonda fluorescente.

Deste modo, recolheu-se 1 mL de suspensão celular contendo 0,5 milhões de células e lavou-se com 2 mL de Facs Flow por centrifugação durante 5 minutos a 1000 xg. Seguidamente, adicionou-se 10 μ L do anticorpo anti-CD135 (*R&D Systems*), e incubaram-se as células com o anticorpo durante 15 minutos ao abrigo da luz. Posteriormente, adicionou-se 2 mL de Facs Flow, e a suspensão foi centrifugada durante 5 minutos a 1000 xg. Depois de decantar o sobrenadante, ao sedimento adicionou-se 300 μ L de FacsFlow e procedeu-se à análise num citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson).

Foram adquiridas 10.000 células através do programa CellQuestTM e os dados obtidos foram analisados e quantificados usando o programa Paint-a-Gate 3.02. Os resultados são expressos em média da intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média de expressão do receptor *Flt3* nas células HL-60 e K562.

2.9. Análise da proliferação e viabilidade celulares

2.9.1. Método de Exclusão de Azul de Tripano e Ensaio Metabólico com Resazurina

A análise da proliferação e morte celular foi efectuada através de estudos de densidade e viabilidade celular. Estes permitem avaliar os efeitos citostáticos e citotóxicos, respectivamente, exercidos pelos vários tratamentos anteriormente descritos (2.6) nas linhas celulares utilizadas (K562 e HL-60). Para tal, recorreu-se ao método de exclusão com azul de tripano, já supracitado, e ao ensaio metabólico com resazurina.

O ensaio metabólico com resazurina envolve a adição de um indicador redox fluorogénico à cultura celular. Assim, a resazurina adicionada às células entra no citosol e através de enzimas mitocondriais é reduzida a resorufina, sendo esta reacção acompanhada de alteração de cor, passando de azul índigo não fluorescente, para rosa fluorescente. A alteração de cor é posteriormente medida por espectrofotometria ou por espectrofluorimetria (Gonçalves, AC., 2008).

Deste modo, avaliou-se o efeito citotóxico do L-744,832, do MG-262 e dos fármacos convencionais utilizados (Imatinib e ATRA), em cada uma das linhas celulares, através do ensaio metabólico com resazurina. Assim, as células K562 e HL-60 foram incubadas na presença e na ausência dos fármacos nas condições referidas nas tabelas 2.3 e 2.4 e 2.5, numa densidade celular de $0,5 \times 10^6$ células/mL, durante 72 horas. Após cada período de 24h de incubação adicionou-se às células 10% de resazurina. A leitura da absorvância nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm foi efectuada num espectrofotómetro leitor de placas (Synergy™ HT Multi-Mode MicroplateReader, BioTek Instruments). Os resultados de cada ensaio representam a média das 3 leituras efectuadas, tendo-se realizado 5 ensaios independentes.

O efeito na viabilidade foi depois calculado através da fórmula:

$$\frac{[(A570-A600)_{amostra}] - [(A570-A600)_{branco}]}{[(A570-A600)_{controlo}] - [(A570-A600)_{branco}]} \times 100 \quad (\text{Equação 2.3})$$

onde A570 corresponde à absorvância no comprimento de onda de 570 nm e A600 a do comprimento de onda de 600 nm.

Nos ensaios em que se utilizou os siRNA, avaliou-se o efeito anti-proliferativo e citotóxico dos compostos em estudo através do método de exclusão com azul de tripano. Assim, as células foram incubadas na presença e na ausência dos fármacos nas condições referidas na tabela 2.2 numa densidade celular de $0,5 \times 10^6$ células/mL (K562 e HL-60), durante 72 horas. A cada período de 24 horas retirou-se uma amostra de 20 µL de cada uma das condições, diluindo-a posteriormente numa razão de 1:1 com Azul de Tripano (solução 1:5). Seguidamente, procedeu-se à contagem das células num hemocitómero (Câmara de Neubauer), com auxílio de um microscópio óptico de luz invertida. Os resultados representam a média de 3 a 6 ensaios independentes.

A Viabilidade celular (efeito citotóxico) foi calculada através da fórmula:

$$\frac{\text{Número de células Vivas}}{\text{Número de células Vivas} + \text{Número de células Mortas}} \times 100 \quad (\text{Equação 2.4})$$

A Densidade celular (efeito citostático) foi calculada através da fórmula:

$$\frac{\text{Média de células vivas} \times \text{Factor de Diluição}}{1 \times 10^{-4}} \quad (\text{Equação 2.5}),$$

sendo que 1×10^{-4} representa o volume do hemocitómetro (figura 2.2) e o factor de diluição foi de 2x

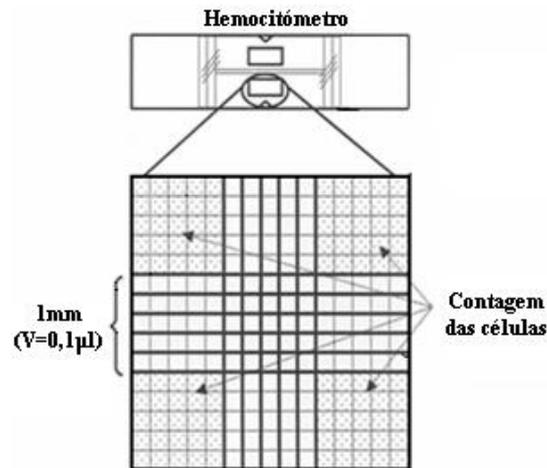


Figura 2. 2. Esquema representativo de um hemocitómetro (Câmara de Neubauer).

As setas indicam os locais de contagem das células sendo o volume da câmara de $0,1 \mu\text{L}$ (10^{-4}mL). Após contagem, calcula-se a média, multiplica-se pelo factor de diluição (x2) e divide-se por $1,0 \times 10^{-4}$. Deste modo, obtém-se o número de células por mililitro (Adaptado de www.who.int; Coelho, AS., 2009).

2.9.2. Análise da morte celular por Citometria de Fluxo

No trabalho experimental a citometria de fluxo foi também utilizada para analisar a morte celular, recorrendo à dupla marcação com Anexina V (ligada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína – anexina V-FTIC) e Iodeto de propídeo. Esta técnica permitiu distinguir as células viáveis das células mortas e dentro destas qual o mecanismo que desencadeou a morte celular, ou seja, se esta ocorreu por apoptose ou por necrose (Sgonc *et al.*, 1998; Gonçalves, A.C., 2008).

Uma das características das células em apoptose é a alteração da distribuição dos fosfolípidos da bicamada lípida que constitui a membrana celular. Assim, quando se inicia a morte celular por apoptose ocorre translocação da fosfatidilserina, um

fosfolípido de carga negativa, do folheto interno para o folheto externo da membrana celular (Sgonc *et al.*, 1998; Gonçalves, A.C., 2008).

A Anexina V é uma proteína que se liga fortemente a moléculas de carga negativa, como a fosfatidilserina, exteriorizada para o folheto externo da membrana celular durante o processo apoptótico, daí ser um bom marcador deste processo, quando se encontra em fases iniciais (Sgonc *et al.*, 1998; Oliveira, A.C., 2008).

O Iodeto de propídeo é um composto fluorescente que se liga ao ADN, intercalando-se inespecificamente entre as suas bases. Normalmente não atravessa a membrana celular (pouco lipossolúvel), quando isso acontece é porque há perda da viabilidade. Este composto é, assim, um marcador tanto da morte celular por necrose, em que há perda da integridade membranar, como da fase tardia/final da apoptose onde se verifica ruptura da membrana celular (Sgonc *et al.*, 1998; Oliveira, AC., 2008).

Quando as células são expostas simultaneamente à anexina V e IP é possível distinguir as células viáveis (que não marcam com anexina V e IP), as células em apoptose inicial (marcadas com anexina V), as células em apoptose tardia/necrose (marcadas simultaneamente com anexina V e IP) e as células em necrose (marcadas com IP) (Gorman *et al.*, 1997; Aubry *et al.*, 1999; Gonçalves A.C., 2008).

Assim, nas células HL-60 e K562 incubadas durante 48 horas, na ausência e na presença dos vários compostos em estudo, foi avaliada a viabilidade e o tipo de morte celular. Deste modo, recolheu-se 1 mL de suspensão celular contendo 1 milhão de células e lavou-se com tampão fosfato (PBS) por centrifugação durante 5 minutos a 1.000 xg. O sedimento obtido foi processado posteriormente, de acordo com as instruções do kit de detecção de morte celular. Deste modo, foi colocado em gelo e ressuspenso em 100 µL de tampão de ligação frio e incubado com 1 µL de anexina V-FITC e 5 µL de IP, durante 15 minutos ao abrigo da luz. Adicionou-se mais 400 µL de tampão de ligação e procedeu-se à análise num citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) equipado com um laser de argón utilizando os comprimentos de onda de excitação de 525 nm e de 640 nm, respectivamente para a anexina V-FITC e para o IP.

Foram adquiridas 10.000 células através do programa CellQuest™ e os dados obtidos foram analisados usando o programa Paint-a-Gate 3.02. Os resultados são expressos

em percentagem de células de cada uma das subpopulações identificadas com base na positividade e/ou negatividade de marcação para anexina V e para o IP.

2.10. Análise da expressão de ciclina D1

Para analisar alguns dos mecanismos moleculares envolvidos no efeito antiproliferativo dos siRNA anti-*FLT3*, foi avaliada a expressão da molécula reguladora do ciclo celular, a Ciclina D1, recorrendo-se um anticorpo anti-Ciclina D1. A ciclina D1 é uma proteína envolvida na proliferação celular, promovendo a progressão do ciclo celular da fase G1 para S (Fu *et al.*, 2004).

Para este efeito foram efectuadas incubações das células HL-60 e K562 com uma densidade $0,5 \times 10^6$ células/mL, durante 48 horas, na presença de 100 nM de siRNA anti-*FLT3* e do seu controlo, tal como descrito em 2.6.

A $0,5 \times 10^6$ de células em suspensão adicionou-se 100 mL de solução A (solução fixante) num tubo de citómetro, e incubou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Adicionou-se 1 mL de PBS e centrifugou-se a 1.000 xg durante 5 minutos.

Seguidamente adicionou-se 1 µg de anticorpo anti-Ciclina D1 ligado a FITC e 100 mL de solução B (solução permeabilizante), e incubou-se no escuro, à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Efectuaram-se duas lavagens consecutivas, por adição de 1 mL de PBS e centrifugação a 1.000 xg durante 5 minutos, desprezando o sobrenadante. O sedimento foi então ressuspenso em 500 mL de PBS, ficando pronto para a leitura no citómetro de fluxo.

Foram adquiridas 10.000 células através do programa CellQuest™ e os dados obtidos foram analisados e quantificados usando o programa Paint-a-Gate 3.02. Os resultados são expressos em média da intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média de expressão da ciclina D1 nas células HL-60 e K562.

2.11. Análise Estatística

O tratamento estatístico dos resultados foi efectuado utilizando o programa GraphPad, versão 5.

Assim na análise dos dados recorreu-se ao teste de ANOVA de medidas repetidas e aos testes post-hoc de Tukey para os resultados dos siRNA anti-*FLT3* e Dunnet para as curvas dose-resposta.

Em todos os testes utilizados considerou-se um nível de significância estatística a 95% ($p < 0.05$).

3. Resultados

3.1. Caracterização das linhas celulares

Neste trabalho foi utilizada a linha celular HL-60, estabelecida a partir de uma doente com Leucemia Promielocítica Aguda (LPA), um subtipo da Leucemia Mielóide Aguda (LMA) (Birnie, G.D., 1988) e a linha celular K562, estabelecida por Lozzio & Lozzio (1975) a partir de uma doente do sexo feminino, à qual lhe foi diagnosticada Leucemia Mielóide Crónica (LMC) em crise blástica (Koeffler *et al.*, 1980). De modo a conhecer o ritmo de crescimento destas células, foi elaborada a curva de crescimento de cada uma das linhas celulares. Assim, a densidade celular foi analisada a cada 24 horas durante 96 horas, pelo teste de exclusão de azul de tripano, partindo de uma densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ células/mL (figura 3.1).

As células HL-60 e K-562 crescem em suspensão, quando mantidas em cultura num meio apropriado, de acordo com o perfil apresentado na figura 3.1. verificando-se um crescimento exponencial até às 72 horas com duplicação entre as 24 e 48 horas. A partir das 72 horas de incubação, as células começam a entrar numa fase estacionária. A densidade celular durante este período duplica até a um máximo aproximado de $1,60 \times 10^6$ células/mL para as células HL-60 e de $1,90 \times 10^6$ células/mL para as K562.

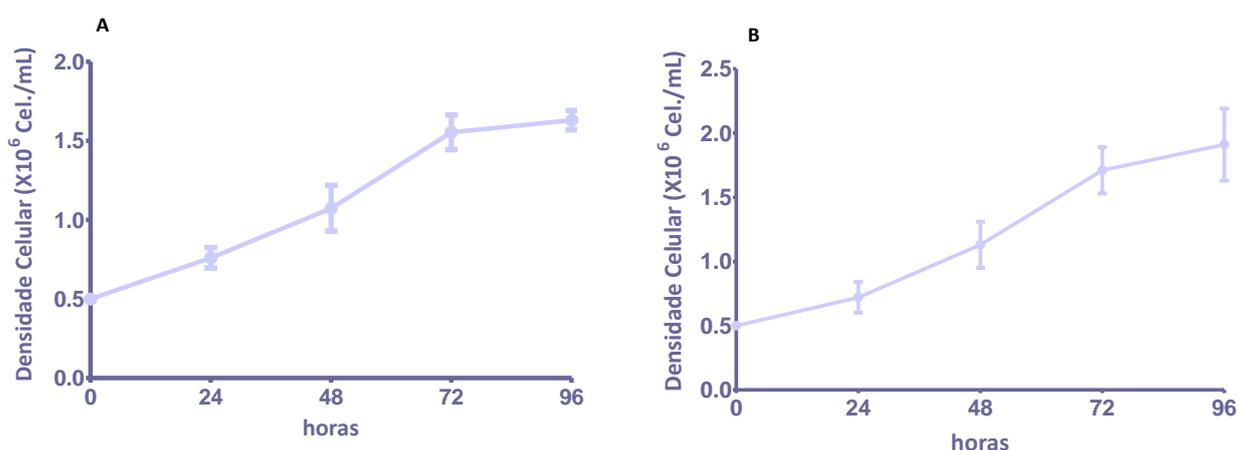


Figura 3. 1. Curva de crescimento das células HL-60 (A) e K562 (B).

As células foram incubadas em meio RPMI 1640 e soro fetal bovino a 10% numa densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ células/mL durante 96h. Após cada 24h de incubação recolheu-se amostras da suspensão celular e as células foram coradas com azul de tripano e contadas num hemocitómetro. A densidade celular foi calculada pelo número de células vivas por mL, de acordo o descrito na secção material e métodos. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes.

As células K562 e HL-60 em estudo foram também caracterizadas quando à presença de mutações pontuais e ITD no gene do receptor do *FLT3*. No entanto, não se observou nenhum tipo de mutação neste gene em nenhuma das linhas celulares.

3.2. Análise do Efeito Citotóxico e Citostático do siRNA anti-*FLT3* nas células HL-60 e K562

De modo a determinar os efeitos citotóxico e citostático do siRNA dirigido especificamente ao mRNA que codifica o receptor Flt3, nas células HL-60 e K562, em monoterapia, recorreu-se ao método de exclusão com azul de tripano, tal como descrito na secção de materiais e métodos, utilizando como controlo um siRNA que não tem um alvo específico (controlo negativo).

As células HL-60 (figura 3.2 (A) e (B)) e as células K562 (figura 3.2 (C) e (D)) foram tratadas durante 48 horas com um siRNA anti-*FLT3* na concentração de 100 nM. O siRNA foi entregue às células utilizando como veículo de transporte lipossomas catiónicos, como descrito na secção de materiais e métodos. Após o tempo de incubação o efeito citotóxico e citostático do siRNA anti-*FLT3* foi avaliado nos dois tipos de células, e comparado com os efeitos não específicos de um siRNA controlo, na mesma concentração, e dos lipossomas administrados às células (controlo).

Como podemos verificar na Figura 3.2, o siRNA anti-*FLT3* induz diminuição da proliferação e viabilidade celulares de modo dependente da linha celular utilizada. De facto, como podemos observar na Figura 3.2-A, nas células HL-60, o siRNA anti-*FLT3* na concentração de 100 nM apresenta um efeito citotóxico, o qual se traduz na diminuição de aproximadamente 38% da viabilidade celular, quando comparado com o controlo, e de aproximadamente 28% comparativamente ao siRNA controlo. Assim, a diminuição da viabilidade celular é de aproximadamente 10% quando comparado com o controlo, embora sem significado estatístico (figura 3.2 (A)). Por outro lado, para além do efeito citotóxico, o siRNA anti-*FLT3*, possui também efeito citostático, verificando-se decréscimo da densidade celular para $0,8 \times 10^6$ cél/mL, cerca de 2 vezes inferior à do controlo e 1,75 vezes inferior à do siRNA controlo (figura 3.4 (B)).

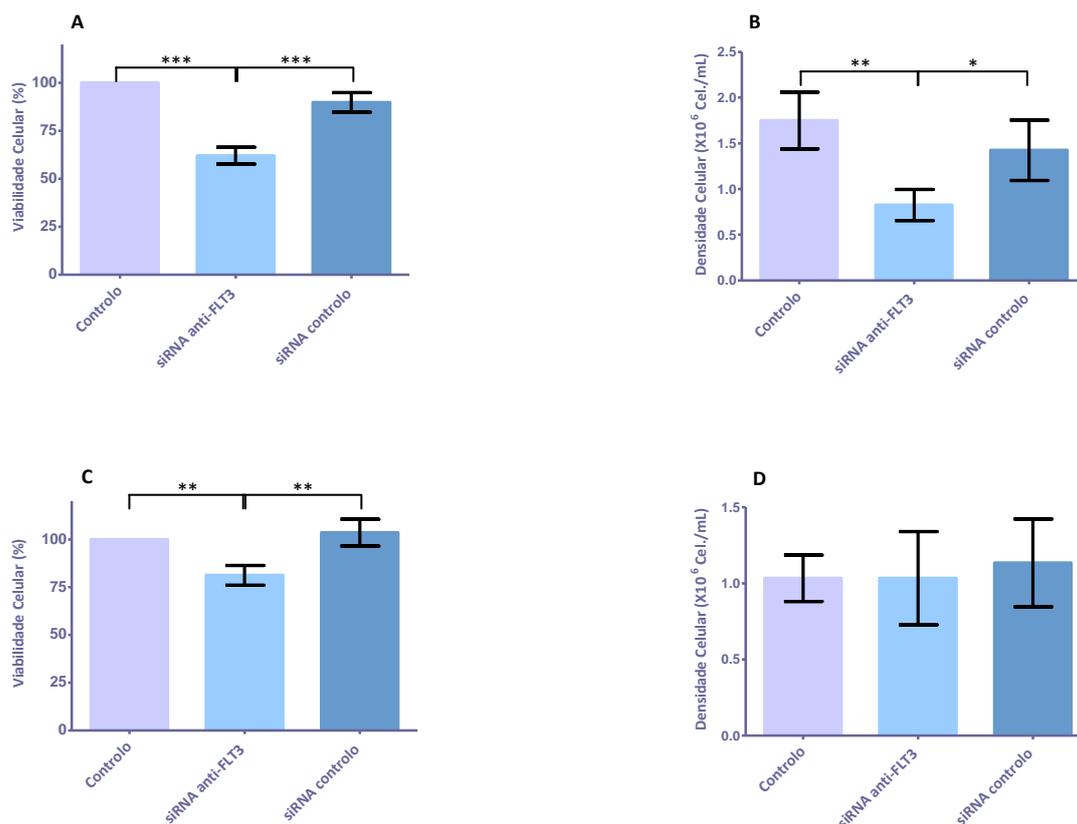


Figura 3. 2. Avaliação do efeito citotóxico e citostático de 48 horas de exposição a 100 η M de siRNA anti-*FLT3* nas células HL-60 e K562.

Em (A) e (B) estão representados o efeito na viabilidade e densidade celular de 100 η M de siRNA anti-*FLT3* nas células HL-60, respectivamente, em (C) e em (D) estão representados o efeito na viabilidade celular e densidade celular de 100 η M de siRNA anti-*FLT3* nas células K562, respectivamente. Todos os resultados foram comparados, para além de um controlo onde foi apenas adicionados o veículo de transporte (lipossomas), também com um siRNA controlo, o qual não tem nenhum alvo específico. Os siRNA anti-*FLT3* foram administrados às células e o seu efeito avaliado passadas 48 horas de incubação pelo método de exclusão do azul de tripano de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos. Os resultados têm significado estatístico (* $p < 0.05$) em (B) para o siRNA anti-*FLT3*, quando comparado com siRNA controlo; (** $p < 0.01$) em (C) para o siRNA anti-*FLT3* quando comparado quer com o controlo, quer com o siRNA controlo; (** $p < 0.001$) em (A) para o siRNA anti-*FLT3* quando comparado com ambos os controlos; em (D) não existe diferenças estatísticas do siRNA anti-*FLT3*, comparativamente aos controlos (Teste de ANOVA de comparações múltiplas combinado com o teste post-hoc de Tukey). Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes.

De igual modo, nas células K562 tratadas com 100 η M de siRNA anti-*FLT3* também se verifica efeito citotóxico, o qual se traduz no decréscimo da viabilidade celular para valores de 80%, quando comparados quer com o controlo quer com o siRNA controlo, os quais não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre eles (figura 3.2 (C)). Verifica-se assim que as células K562 são ligeiramente menos sensíveis ao tratamento do siRNA anti-*FLT3* isolado, sendo que estas possuem um decréscimo da viabilidade celular de aproximadamente 20% e as células HL-60 de aproximadamente 28% quando comparadas com o siRNA controlo. No entanto, e contrariamente ao observado nas células HL-60, nas células K562, o siRNA anti-*FLT3* não possui efeito citostático (figura 3.2 (D)).

3.3. Análise do Efeito Citotóxico de Fármacos Anticancerígenos Convencionais e de novos fármacos dirigidos a alvos moleculares

O efeito citotóxico dos fármacos utilizados na clínica para o tratamento da LPA e LMC, ATRA e Imatinib, foi avaliado nas células HL-60 e K562 respectivamente, através da variação da viabilidade celular, em resposta a várias concentrações destes compostos, usando o ensaio metabólico da rezasurina tal como descrito na secção de materiais e métodos. Além disso foi ainda avaliado o efeito de novos fármacos dirigidos a alvos moleculares, um inibidor do proteasoma, MG-262, e um inibidor da farnesiltransferase, L-744,832. Este tipo de estudo permitiu a selecção das doses adequadas dos fármacos para utilizar em associação com o siRNA anti-*FLT3* (concentração inferior ao IC_{50} , ou seja com pequeno efeito citotóxico quando comparada com o controlo).

Como se pode observar na Figura 3.3, os fármacos convencionais, ácido all-trans retinóico (ATRA) (Figura 3.3.-A) e o Imatinib (Figura 3.3.-B), nas células HL-60 e K562, respectivamente, bem como, o inibidor do proteasoma (MG-262) nas células HL-60 (Figura 3.3.-B) e nas células K562 (Figura 3.3.-C) e o inibidor da farnesiltransferase (L-744,832) nas células HL-60 (Figura 3.3.-D) e K562 (Figura 3.3.-E) induzem diminuição da viabilidade celular de forma dependente da dose e do tempo de incubação. No entanto, todos os compostos induzem efeito citotóxico logo após 24 horas de incubação.

O IC₅₀ do ácido all-trans retinóico, ou seja, a concentração à qual o fármaco possui capacidade de reduzir a viabilidade celular para 50%, é aproximadamente de 100 µM, após 48 horas de tratamento com o fármaco (Figura 3.3.-A). Quando as células são tratadas durante 72 horas, com a concentração de 150 µM, observa-se um efeito citotóxico máximo, diminuindo a viabilidade das células para aproximadamente 30%.

O Imatinib, como se pode observar pela Figura 3.3.-B, induz o seu efeito máximo quando as células são tratadas com 250 ηM do composto durante 72 horas, onde a viabilidade celular decresce até aproximadamente 29%. O IC₅₀ é atingido quando as células são tratadas durante 48 horas com o fármaco na concentração de, aproximadamente, 100 nM

Quando as células HL-60 e K562 são tratadas com o inibidor do proteasoma (MG-262), (Figura 3.3.-C e Figura 3.3.-D, respectivamente), o IC₅₀ é atingido após 48 horas de tratamento, com a concentração de 25 ηM. Nas células HL-60 esta mesma concentração de fármaco induz efeito citotóxico máximo após 72 h, de aproximadamente 72%, correspondendo a diminuição da viabilidade celular para 28%. Nas células K562, por outro lado, observa-se efeito citotóxico máximo, aproximadamente 82%, quando as células são tratadas com uma concentração de 75 ηM, diminuindo a viabilidade celular para 18% (Figura 3.3.-D).

Como podemos observar na Figura 3.3.-E, o inibidor da farnesiltransferase, L-744,832, reduz a viabilidade das células HL-60 para os 50% (IC₅₀), quando as células são tratadas com este composto na concentração de 25 µM, durante 48 horas de incubação. Nas células K562, por outro lado, o IC₅₀ é atingido quando as células são tratadas durante 24 horas com aproximadamente 50 µM deste composto, (Figura 3.3.-C). O efeito citotóxico é máximo após 72 horas de tratamento nas duas linhas celulares. Com o fármaco na concentração de 50 µM, nas células HL-60, observa-se um decréscimo da viabilidade para valores próximos de 11% (Figura 3.3.-E). Nas células K562, observa-se decréscimo na viabilidade celular para aproximadamente 6% quando as células são tratadas com 75 µM. Nestas, verifica-se também que apesar do efeito deste fármaco ser dependente da dose, como referido anteriormente, é de notar, no entanto que, a partir das 48 horas se verifica, em algumas concentrações, reversão do efeito na viabilidade celular.

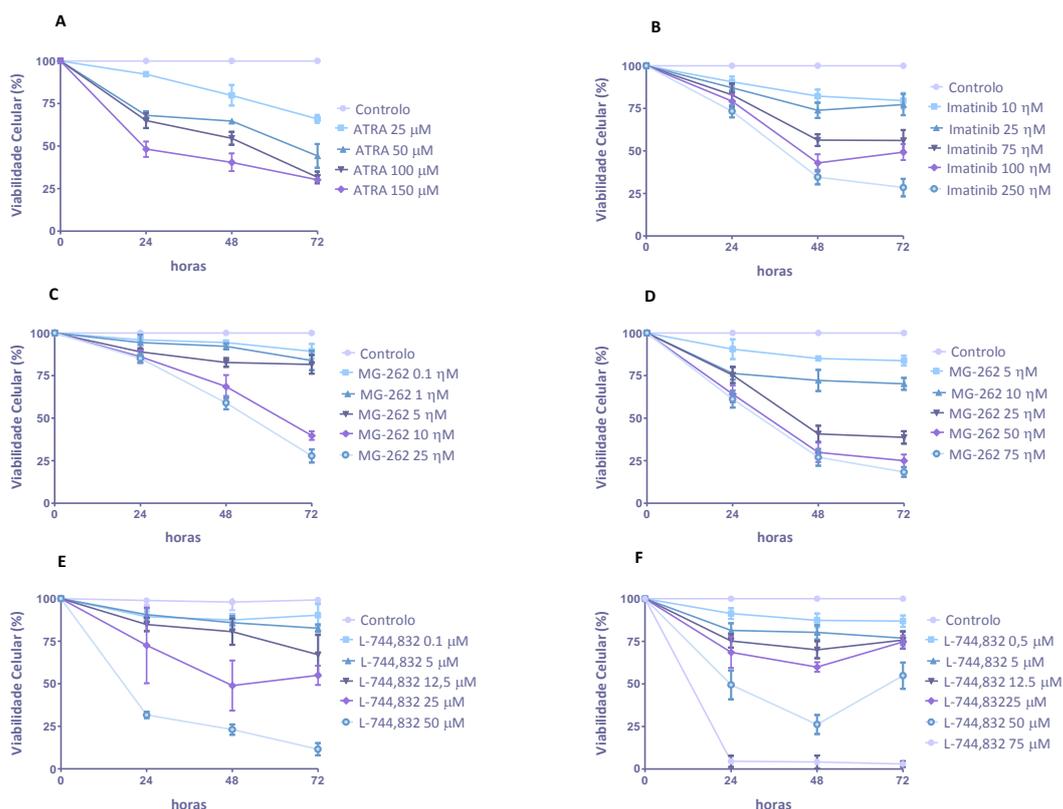


Figura 3. 3. Curvas dose resposta das células HL-60 e K562 tratadas com os fármacos convencionais ATRA (A) e Imatinib (B) e os inibidores MG-262 (C e D) e L-744,832 (E e F).

Em (A) está representado o efeito na viabilidade celular do ácido all-transretinóico (ATRA), nas células HL-60, em (B) o efeito do Imatinib nas células K562, em (C) e (D) o efeito na viabilidade do inibidor do Proteasoma, MG-262, nas células HL-60 e K562, respectivamente, e em (D) e (E) o efeito na viabilidade do inibidor da Farnesiltransferase, L-744,832, também, respectivamente, nas células HL-60 e K562. Todos os fármacos foram administrados às células em doses crescentes durante um período de incubação de 72 horas. Os resultados têm significado estatístico ($p < 0.05$) em (A) para as concentrações 50 μM , 100 μM , 150 μM e 200 μM , de ATRA em (B) para as concentrações, 75 ηM , 100 ηM e 250 ηM , de Imatinib, em (C) para 10 ηM e 25 ηM e (D) 25 ηM , 50 ηM , 75 ηM de MG-262, em (E) para 50 μM e em (F) para 50 μM e 75 μM , de L-744,832, em relação ao controlo (Teste de ANOVA de comparações múltiplas combinado com o teste post-hoc de Dunnet). Os resultados estão expressos em % e representam a média \pm desvio padrão de 5 ensaios independentes.

3.4. Avaliação dos efeitos citotóxico e citostático do siRNA anti-FLT3 em associação com os fármacos convencionais e os inibidores da sinalização celular nas células HL-60 e K562

Para além dos efeitos citotóxico e citoestático do siRNA anti-*FLT3* isolado, observados anteriormente em 3.2, foram avaliados também esses mesmos efeitos, utilizando o método do azul de tripano, do siRNA anti-*FLT3* em associação com os fármacos ATRA e Imatinib, nas células HL-60 e K562, respectivamente. O mesmo estudo foi realizado nos dois tipos de células para a associação terapêutica do siRNA anti-*FLT3* com os inibidores, do proteasoma, MG-262, e da farnesiltransferase, L-744,832.

3.4.1. Avaliação dos efeitos citotóxico e citostático do siRNA anti-*FLT3* em associação com fármacos convencionais nas células HL-60 e K562

As células HL-60 (figura 3.5 (A) e (B)) e as células K562 (figura 3.5 (C) e (D)) foram tratadas com 100 nM de siRNA anti-*FLT3* em associação com os fármacos convencionais ATRA e Imatinib, respectivamente. Tendo por base as curvas dose resposta elaboradas em 3.3 foram escolhidas concentrações dos fármacos convencionais que não apresentassem efeito citotóxico significativo, 25 µM de ATRA e 10 nM de Imatinib, para as células HL-60 e K562 respectivamente. Os siRNA anti-*FLT3* e os fármacos convencionais foram entregues às células, tal como descrito na secção de materiais e métodos, onde permaneceram durante um período de 48 horas de incubação.

De igual modo foram utilizados como controlos, 100 nM do siRNA controlo sozinho, siRNA controlo em associação com os 25 µM de ATRA e 10 nM de Imatinib, e os fármacos convencionais administrados isoladamente.

Nas células HL-60, a associação de 100 nM de siRNA anti-*FLT3* com 25 µM de ATRA, não apresenta qualquer efeito sinérgico quer a nível da viabilidade quer da proliferação celular. De facto, não existem diferenças estatisticamente significativas na viabilidade e densidade das células tratadas com ATRA e siRNA controlo isoladamente e pelo siRNA controlo em associação com ATRA (figura 3.4 (A e B)). Aliás os resultados mostram que o siRNA anti-*FLT3* sozinho tem um efeito citotóxico e citoestático ligeiramente superior ao observado em associação com o ATRA. De facto, no primeiro caso observa-se diminuição de aproximadamente 30% da viabilidade celular quando comparado com o siRNA controlo, enquanto na associação com ATRA esse efeito citotóxico decai para cerca de 10% (figura 3.4 (A)). De igual modo, a associação do

siRNA anti-*FLT3* com o MG-262 apresenta uma densidade celular ($1,3 \times 10^6$ cél/mL) superior à do siRNA anti-*FLT3* aplicado isoladamente ($0,83 \times 10^6$ cél/mL) sendo que, os valores de densidade celular desta associação são similares ao ATRA e ao siRNA controlo aplicados isoladamente, bem como com a associação de ambos, não havendo diferenças estatisticamente significativas (figura 3.4 (B)).

Contrariamente ao observado nas células HL-60, nas células K562 quando tratadas com a associação de 100 η M de siRNA anti-*FLT3* e 10 nM de Imatinib, verifica-se potenciação do efeito citotóxico relativamente ao efeito dos fármacos administrados isoladamente. Assim, este efeito citotóxico traduz-se na diminuição estatisticamente significativa de aproximadamente 30% na viabilidade celular, quer quando comparado com o siRNA anti-*FLT3* sozinho, quer com o Imatinib sozinho. A associação de 10 η M de Imatinib com o siRNA controlo confirma também estes resultados, visto apresentar valores de viabilidade celular inferiores aos do siRNA controlo aplicado isoladamente (sendo estes próximos aos verificados para o Imatinib isolado) (figura 3.4 (C)).

Por outro lado, a associação de 100 η M de siRNA anti-*FLT3* com 10 η M de Imatinib revela diminuição da densidade celular, para valores próximos a $0,57 \times 10^6$ cél/mL, quando comparados com o siRNA anti-*FLT3* sozinho ($1,0 \times 10^6$ cél/mL), com o Imatinib sozinho ($0,857 \times 10^6$ cél/mL) e com a associação do siRNA controlo com o Imatinib ($0,9757 \times 10^6$ cél/mL), as quais são ligeiramente inferiores às do siRNA controlo aplicado isoladamente ($1,1 \times 10^6$) (figura 3.5 (D)). No entanto, estes resultados não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

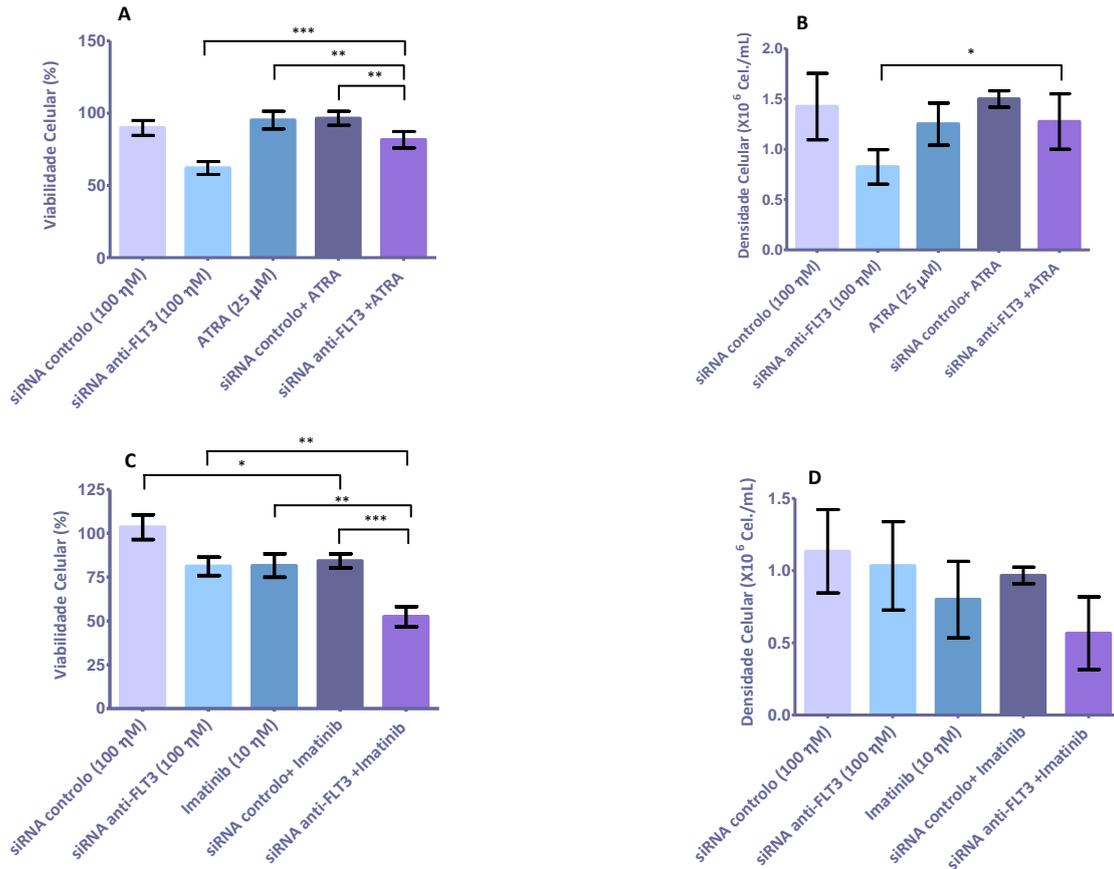


Figura 3. 4. Avaliação do efeito citotóxico e citostático de 48 horas de exposição a 100 nM de siRNA anti-FLT3 em associação com ATRA e Imatinib nas células HL-60 e K562, respectivamente.

Em (A) e (B) estão representados o efeito na viabilidade e densidade celular, respectivamente, de 100 nM de siRNA anti-FLT3 quando aplicado isoladamente, em associação com 25 μM de ATRA e de 25 μM de ATRA sozinhos, nas células HL-60. Em (C) e em (D) estão representados o efeito na viabilidade celular e densidade celular, respectivamente, de 100 nM de siRNA anti-FLT3 sozinho, em associação com 10 nM de Imatinib e de 10 nM de Imatinib sozinho nas células K562. A associação dos fármacos convencionais em ambas as linhas celulares foi comparada com a associação dos mesmos fármacos com o siRNA controlo, o qual é relacionado com o siRNA controlo aplicado isoladamente. Os siRNA anti-FLT3 e os siRNA controlo (quer isolados quer em associação) bem como os fármacos convencionais, foram administrados às células e o seu efeito avaliado passadas 48 horas de incubação pelo método de exclusão do azul de tripano de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos. Os resultados têm significado estatístico (* $p < 0.05$) em (B) e (C) para o siRNA anti-FLT3 em comparação com o 100 nM do siRNA anti-FLT3 em associação com 25 μM de ATRA, para 100 nM do siRNA controlo em comparação com 100 nM do siRNA controlo em associação com 10 nM Imatinib, respectivamente; (** $p < 0.01$) em (A) para o 100 nM de siRNA anti-FLT3 em associação com 25 μM ATRA, quando comparado com 25 μM ATRA isolado e com 100 nM do siRNA controlo+ATRA (25 μM) e em (C) para 100 nM do siRNA anti-FLT3 em associação com 10 nM Imatinib, quando comparado com o siRNA anti-FLT3 e Imatinib isolados; (***) $p < 0.001$) em (A) 100 nM do siRNA anti-FLT3 em associação com 25 μM de ATRA quando

comparado com o siRNA anti-*FLT3* isolado e em (C) para 100 η M do siRNA anti-*FLT3* em associação com o 10 η M de Imatinib comparativamente ao siRNA controlo+Imatinib; Em (D) não existem quaisquer diferenças estatísticas (Teste de ANOVA de comparações múltiplas combinado com o teste post-hoc de Tukey). Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes.

3.4.2. Avaliação dos efeitos citotóxico e citostático do siRNA anti-*FLT3* em associação com o inibidor do proteasoma, MG-262, nas células HL-60 e K562

Foram também avaliados, nas células HL-60 e K562, os efeitos citotóxicos e citostáticos da associação do siRNA anti-*FLT3*, com o inibidor do proteasoma, MG-262 (figura 3.6). Deste modo, 100 η M de siRNA anti-*FLT3* foram administrados em associação com 5 η M e 0,1 η M de MG-262, respectivamente às células HL-60 e K562. Tal como referido para os fármacos convencionais, estas concentrações foram escolhidas, tendo por base as curvas-dose resposta representadas na figura (3.3 (C e D)).

Como podemos verificar na figura 3.5- A, nas células HL-60, a associação de 100 η M do siRNA anti-*FLT3* com 5 η M do inibidor do proteasoma, MG-262, evidenciou potenciação apenas do efeito citotóxico, quando comparado com o efeito observado para os dois compostos aplicados isoladamente. De facto, nas células tratadas com esta associação observa-se diminuição da viabilidade celular mais acentuada (cerca de 40% e 62%) relativamente ao observado com o siRNA anti-*FLT3* e o MG-262, respectivamente, aplicados isoladamente.

Nas células K562, não se observam diferenças na citotoxicidade quando comparamos a administração isolada de 100 η M de siRNA anti-*FLT3* com a associação do mesmo com 0.1 η M de MG-262. No entanto, essas diferenças tornam-se evidentes quando se compara os efeitos da terapêutica combinada com o MG-262 em monoterapia (figura 3.5-C). Como podemos verificar na Figura 3.5-C, nas células tratadas com a referida associação terapêutica, a viabilidade celular diminui para aproximadamente 76%, sendo esta 17% inferior à das células tratadas com o MG-262 aplicado isoladamente. No entanto, as diferenças encontradas não são estatisticamente significativas quando comparadas com a associação do inibidor do proteasoma com o siRNA controlo (figura 3.5 (C)). Além da potenciação do efeito citotóxico, a associação do siRNA anti-*FLT3* com o MG-262 induz diminuição da densidade celular mais acentuada, quando comparada

com o siRNA anti-*FLT3* isolado e em associação com o siRNA controlo. Desta forma, observa-se decréscimo na densidade celular para valores próximos dos $0,4 \times 10^6$ cél/mL, face ao observado quando se trata as células com siRNA anti-*FLT3* isoladamente ($0,8 \times 10^6$ cél/mL) e com a associação do siRNA controlo com o MG-262 ($1,0 \times 10^6$ cél/mL) (figura 3.5 (D)). Apesar de existirem também pequenas diferenças entre o verificado com a associação do siRNA anti-*FLT3* com o MG-262 em relação ao MG-262 isolado, estas não são estatisticamente significativas. De igual modo, não existem quaisquer diferenças entre o efeito da associação do siRNA controlo com o MG-262 e o siRNA controlo isolado (figura 3.6 (D)).

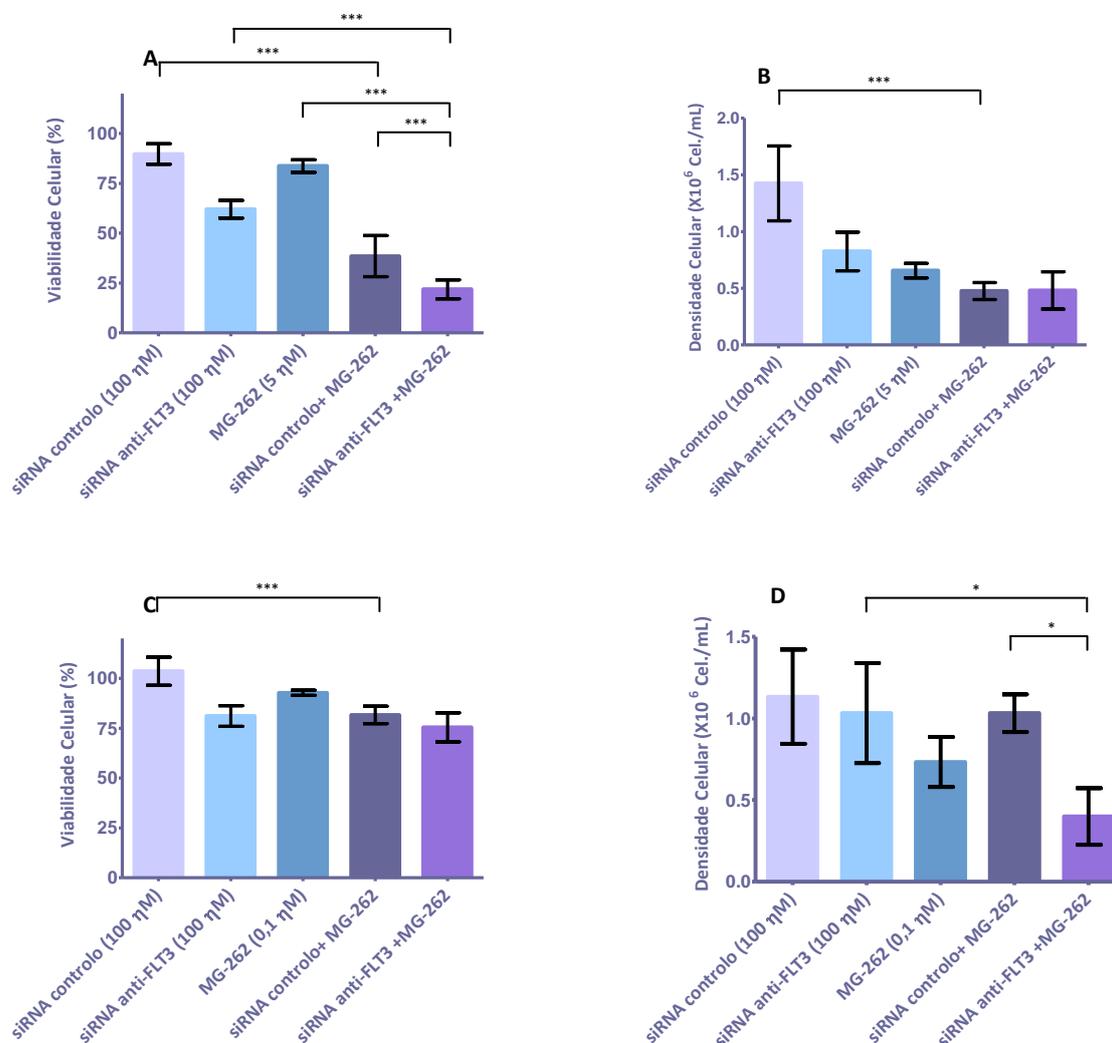


Figura 3. 5. Avaliação do efeito citotóxico e citostático do siRNA anti-FLT3 em associação com o inibidor do proteasoma, MG-262, nas células HL-60 e K562.

Em (A) e (B) estão representados o efeito na viabilidade celular e densidade celular, respectivamente, de 100 nM de siRNA anti-FLT3 e 5 nM de MG-262 isolado quando aplicados isoladamente e em associação, nas células HL-60. Em (C) e em (D) estão representados o efeito na viabilidade celular e densidade celular, respectivamente, do siRNA anti-FLT3 e de 0.1 nM de MG-262 aplicados isoladamente, e em associação com 0.1 nM de MG-262, nas células K562. A associação dos fármacos convencionais foi comparada com a associação dos mesmos fármacos com o siRNA controle, o qual é relacionado com o siRNA controle aplicado isoladamente. O efeito dos compostos foi avaliado passadas 48 horas de incubação pelo método de exclusão do azul de tripano de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos. Os resultados têm significado estatístico (*p <0.05) em (C), para 100 nM do siRNA anti-FLT3 em associação com 0,1 nM de MG-262, quando comparado com o siRNA anti-FLT3 e com a associação do siRNA controle com MG-262; (**p <0.001) em (A) para a associação de 100 nM de siRNA anti-FLT3 com 5 nM de MG-262 em comparação aos dois compostos isoladamente e para a associação de 100 nM do siRNA controle com 5 nM de MG-262 com siRNA controle isolado, em (C) para 100 nM do siRNA controle em associação com o 0,1 nM de MG-262 quando comparado com o siRNA controle isolado; Em (C) não existem quaisquer diferenças estatísticas (Teste de ANOVA de comparações múltiplas combinado com o teste post-hoc de Tukey). Os resultados representam a média ± desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes.

3.4.3. Avaliação dos efeitos citotóxico e citostático do siRNA anti-FLT3 em associação com o inibidor da farnesiltransferase, L-744,832, nas células HL-60 e K562

Os efeitos citotóxico e citostático da associação de 100 nM do siRNA anti-FLT3 com o 0,5 μM e 0,1 μM de inibidor da farnesiltransferase (L-744,832) foram avaliados, respectivamente, nas células HL-60 e K562, como representado na Figura 3.6. As concentrações de L-744,832, mais uma vez foram escolhidas a partir das curvas dose resposta elaboradas previamente, e representadas na figura 3.3 (E e F).

Assim, nas células HL-60 e K562, tratadas com a referida associação terapêutica, não se verificou potenciação do efeito citotóxico nem citostático, quando comparamos com o efeito do tratamento dos dois compostos isoladamente (figura 3.6-A e C). Aliás, verifica-se que a associação, nas células HL-60, tem um efeito citotóxico inferior (cerca de 20%) do que o siRNA anti-FLT3 isolado, embora sem significado estatístico (figura 3.8-A).

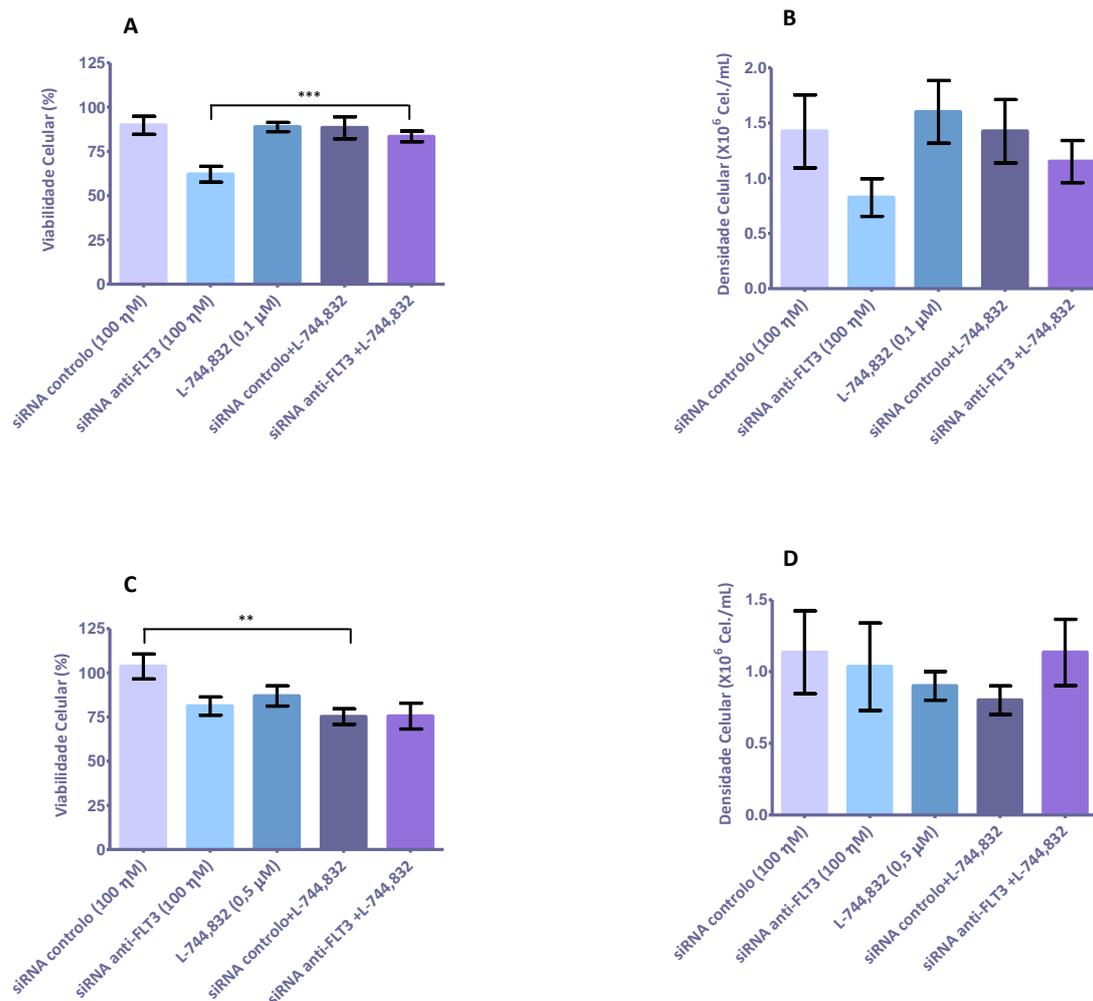


Figura 3. 6. Avaliação do efeito citotóxico e citostático da terapêutica cominada de 100 nM de siRNA anti-FLT3 com o inibidor da farnesiltransferase, L-744,832, nas células HL-60 e K562.

Em (A) e (B) estão representados o efeito na viabilidade e densidade celular, respectivamente, de 100 nM de siRNA anti-FLT3 e de siRNA controlo, da associação destes com 0,1 μM de L-744,832, e 100 nM de L-744,832 em monoterapia, nas células HL-60. Em (C) e em (D) estão representados o efeito na viabilidade e densidade celular, respectivamente, de 100 nM de siRNA anti-FLT3 sozinho, em associação com 0,5 μM de L-744,832 e de 0,5 μM de L-744,832 aplicados isoladamente nas células K562. A associação dos fármacos convencionais em ambas as linhas celulares foi comparada com associação dos mesmos fármacos com o siRNA controlo, o qual é relacionado com o siRNA controlo aplicado isoladamente. Os siRNA anti-FLT3 e os siRNA controlo (quer isolados quer em associação) bem como os fármacos convencionais, foram administrados às células e o seu efeito avaliado passadas 48 horas de incubação pelo método de exclusão do azul de tripano de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos. Os resultados têm significado estatístico (**p < 0.01) em (C), para 100 nM do siRNA controlo em associação com 0,5 μM de L-744,832, quando comparado com o siRNA controlo aplicado isoladamente; (***)p < 0.001) em (A) para 100 nM do siRNA anti-FLT3 em associação com 0,1 μM de L-744,832; em (B) e (D) não existem quaisquer diferenças estatísticas (Teste de ANOVA de comparações

múltiplas combinado com o teste post-hoc de Tukey). Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes.

3.5. Avaliação do tipo de morte celular

A avaliação do tipo de morte celular foi efectuada por microscopia óptica, através das características morfológicas das células, e por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo.

3.5.1. Análise da morte celular por microscopia óptica

O tipo de morte celular induzido pelo siRNA anti-*FLT3* nas células HL-60 e K562 foi analisado por microscopia óptica, através das alterações morfológicas induzidas nas células após tratamento com este composto e após realização de esfregaços corados com solução de May-Grünwald-Giemsa.

Morfológicamente, as células HL-60 apresentam características típicas de promielócitos, com grânulos abundantes no citoplasma e presença de nucléolos (figura 3.7-A). As células K-562 apresentam características morfológicas típicas de blastos com elevada relação núcleo/citoplasma, presença de nucléolos no núcleo e vacúolos citoplasmáticos (figura 3.7-B). Após o tratamento com 100 nM de siRNA anti-*FLT3* nas células HL-60 (figura 3.7-C) e K562 (figura 3.7-D) são visíveis alterações na morfologia características de células em apoptose inicial e tardia, nomeadamente existência de retracção celular, projecções citoplasmáticas (“blebs”) e formação de corpos apoptóticos.

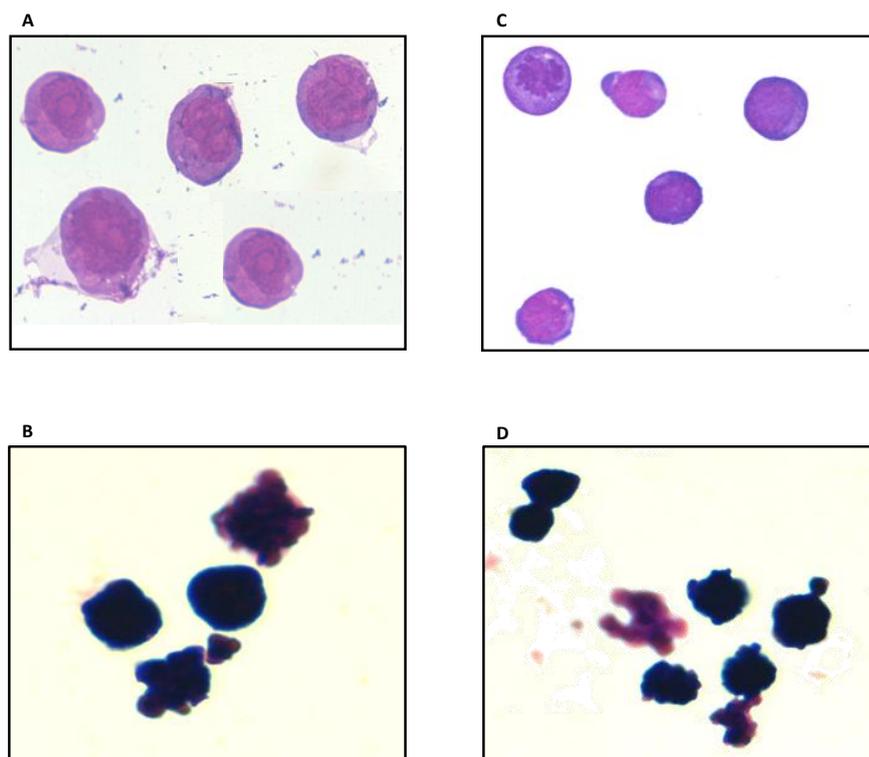


Figura 3. 7. Aspectos morfológicos das células HL-60 e K562 na ausência e após tratamento com o siRNA anti-*FLT3*.

Estão representados os aspectos morfológicos característicos das células HL-60 e K562, na ausência (A e C, respectivamente) e após tratamento com 100 η M do siRNA anti-*FLT3* (B e D, respectivamente). As células foram incubadas durante 48h na ausência e na presença dos compostos e efectuaram-se esfregaços de células e coloração com solução de May-Grünwald-Giemsa, tal como descrito na secção de materiais e métodos. As células foram observadas ao microscópio óptico numa ampliação de 500x.

3.5.2. Análise da Morte Celular por Citometria de Fluxo recorrendo à dupla marcação por Anexina V e Iodeto de propídio

O tipo de morte celular nas células HL-60 e K562, tratadas com siRNA anti-*FLT3* durante 48h, foi também avaliado, recorrendo à dupla marcação com anexina V e iodeto de propídio, tal como descrito na secção de materiais e métodos. Esta técnica permite, distinguir as células viáveis das células mortas, através da alteração na permeabilidade e composição membranar, permitindo ainda distinguir o tipo de morte apoptose e/ou necrose. Os efeitos do siRNA anti-*FLT3* foram comparados com o siRNA controlo, o qual não possui nenhum alvo específico, como referido anteriormente.

Como podemos verificar na figura 3.8-A, o siRNA anti-*FLT3* induz nas células HL-60 diminuição da percentagem de células viáveis, e aumento da percentagem de células em apoptose, relativamente ao siRNA controlo. Nas células K562, verifica-se que o siRNA anti-*FLT3*, em relação ao siRNA controlo, induz também diminuição da percentagem de células viáveis, e aumento da morte celular, preferencialmente, por apoptose e apoptose tardia/necrose (figura 3.9-B). Estes resultados estão de acordo com o observado nos estudos morfológicos referidos anteriormente.

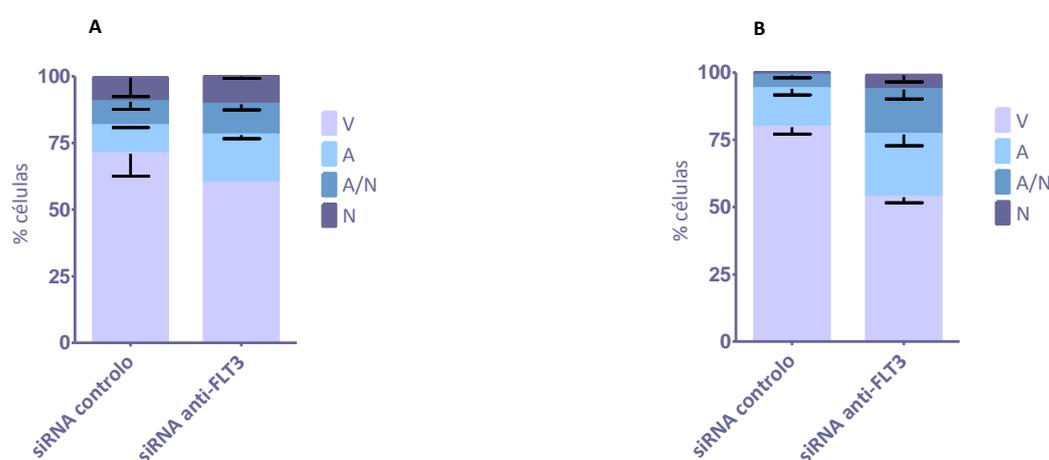


Figura 3. 8. Avaliação do tipo de morte celular por citometria de fluxo nas células HL-60 e K562 tratadas com siRNA anti-*FLT3*.

As células HL-60 (A) e K562 (B) foram incubadas com 100 η M de siRNA anti-*FLT3* e 100 η M do siRNA controlo durante 48 horas, posteriormente as células foram marcadas com anexina V-FITC e iodeto de propídeo (IP), de acordo o descrito na secção material e métodos. V, células viáveis; A, células em apoptose inicial; A/N, células em apoptose tardia/necrose; N, células em necrose. Os resultados são expressos em % e representam a média \pm desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes.

Na figura 3.9 estão representados os efeitos citotóxicos de 100 nM de siRNA anti-*FLT3* em associação com 5 nM de MG-262 nas células HL-60 (A) e com 0,1 η M de MG-262 (B) e 10 η M de Imatinib (C) nas células K562. Como se pode observar, quando a linha celular HL-60 é incubada na presença da associação do inibidor do proteasoma com o siRNA anti-*FLT3*, comparativamente à incubação com o siRNA aplicado isoladamente, verifica-se diminuição da percentagem de células viáveis, tal como verificado no

estudo anterior com o azul de tripano (figura 3.5-A) a qual é acompanhada por um grande aumento da morte celular por apoptose tardia/necrose. Verifica-se no entanto, que quando comparamos a associação do siRNA anti-*FLT3*/MG-262 com a associação do siRNA controlo/MG-262, os efeitos citotóxicos são muito similares, apesar da primeira conferir ligeira diminuição na viabilidade celular (figura 3.9-A), o que está de acordo com os estudos realizados anteriormente. Por outro lado, nas células K562, e de acordo com estudos anteriores, essa mesma associação mostra-se similar ao siRNA anti-*FLT3* isolado (figura 3.9-B), sendo que uma ligeira diminuição da percentagem de células viáveis e aumento da morte celular por apoptose tardia/necrose e por necrose, apenas se observa quando comparamos o efeito com a associação de 100 η M do siRNA controlo e 0,1 η M de MG-262 (figura 3.5-B). Quando comparamos a associação do siRNA anti-*FLT3* e Imatinib, com a associação de 100 η M de siRNA controlo e 10 η M de Imatinib (a qual apresenta efeitos citotóxicos similares ao siRNA controlo isoladamente), e de acordo com a determinação da viabilidade celular através do azul de tripano, observa-se diminuição da percentagem de células viáveis e aumento da morte celular por apoptose (figura 3.9- C).

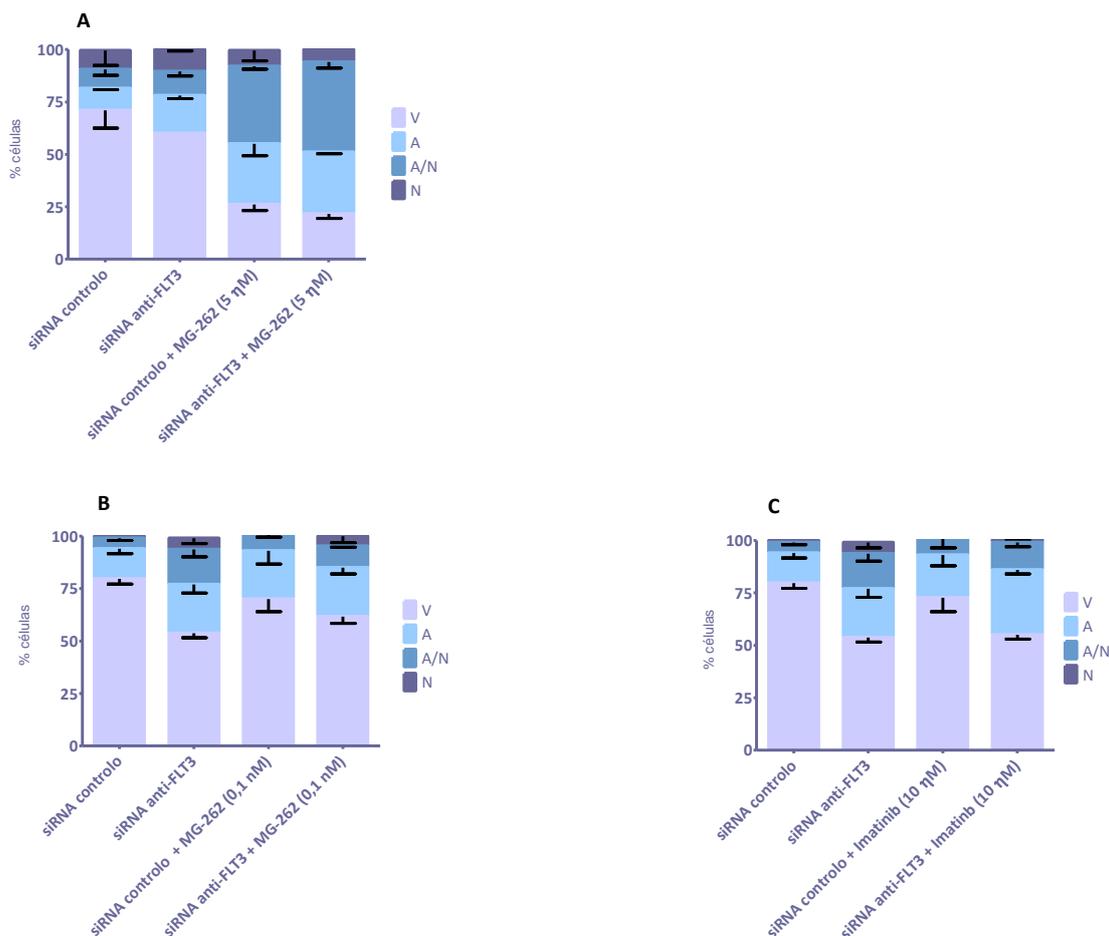


Figura 3. 9. Avaliação do tipo de morte celular por citometria de fluxo nas células HL-60 e K562 tratadas com o siRNA anti-FLT3 em associação com o inibidor do proteasoma, MG-262, e com o inibidor tirosina-cinase, Imatinib.

As células HL-60 e K562 foram incubadas durante 48 h com 100 nM de siRNA anti-FLT3 isoladamente, e em associação com 5 nM (HL-60) e 0,1 nM (K562) de MG-262 (A e B, respectivamente). As células K562 foram também incubadas com 100 nM de siRNA anti-FLT3 isoladamente, e em associação com 10 nM de Imatinib (C). Foram utilizados como controlos 100 nM de siRNA controlo aplicado isoladamente e em associação com MG-262 e Imatinib, nas mesmas condições que o siRNA anti-FLT3. Posteriormente as células foram marcadas com anexina V-FITC e iodeto de propídeo (IP), de acordo o descrito na secção material e métodos. V, células viáveis; A, células em apoptose inicial; A/N, células em apoptose tardia/necrose; N, células em necrose. Os resultados são expressos em % e representam a média \pm desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes.

3.6. Análise da expressão do receptor Flt3 por citometria de fluxo nas linhas celulares HL-60 e K562

De modo a verificar a eficácia de inibição do siRNA anti-*FLT3*, foi avaliada a expressão do receptor Flt3, nas linhas celulares HL-60 e K562. Recorreu-se para este efeito, à marcação do receptor com um anticorpo apropriado, seguido da análise por citometria de fluxo, como referido na secção de materiais e métodos. Desta forma, foi efectuado o tratamento nas células HL-60 e K562 com 100 nM de siRNA anti-*FLT3*, tendo-se utilizado como controlos as células apenas tratadas com lipossomas (controlo) e as células tratadas com 100 nM do siRNA controlo. A citometria de fluxo permite, desta forma, quantificar as células que expressam o receptor Flt3, assim como quantificar os níveis de expressão, através da média da intensidade de fluorescência (MIF).

Como representado na figura 3.10, a percentagem de células HL-60 que expressam o receptor é relativamente pequena, cerca de 6%, sendo que as células K562 revelam uma expressão maior (30%). Após o tratamento das células HL-60 com siRNA anti-*FLT3*, não se observa diferenças estatisticamente significativas na percentagem de células que expressa o receptor, comparativamente ao controlo e ao siRNA controlo (figura 3.10-A). No entanto, e como se pode observar na figura 3.11-A, observa-se diminuição dos níveis de expressão deste receptor de aproximadamente 30 %, após o tratamento com o siRNA anti-*FLT3*, quando comparado quer com o controlo quer com o siRNA controlo.

Por outro lado, nas células K562 tratadas com o siRNA, verifica-se diminuição, de aproximadamente 16%, na percentagem de células que expressam o receptor Flt3, (figura 3.10-B), bem como dos níveis de expressão (figura 3.11-B). De facto, estes últimos, resultados mostram redução aproximada de 12 %, quando se compara com o tratamento com 100 nM do siRNA controlo, e de 23 %, relativamente ao observado nas células tratadas com lipossomas.

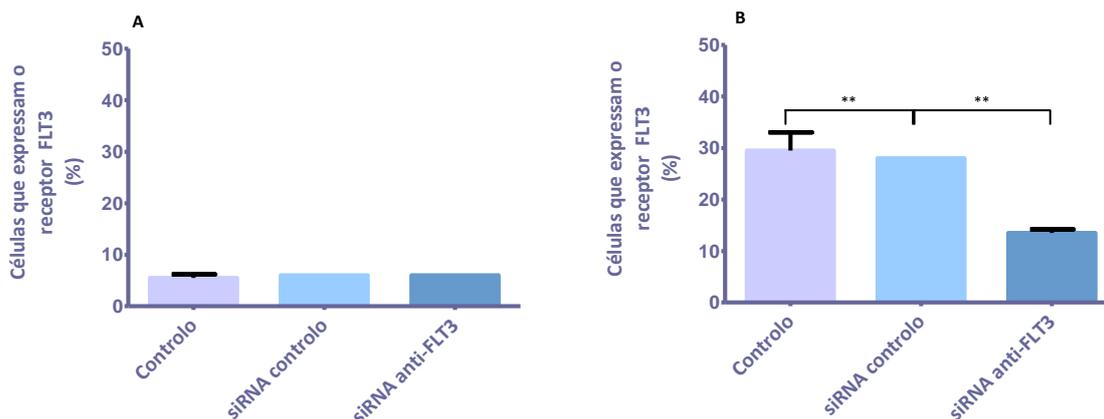


Figura 3. 10. Avaliação da percentagem de células que expressa o receptor Flt3 por citometria de fluxo, após tratamento das células HL-60 (A) e K-562 (B) com siRNA anti-FLT3.

Está representado a expressão do receptor Flt3 após tratamento durante 48 horas com 100 η M de siRNA anti-FLT3, com 100 η M de siRNA controlo, e apenas lipossomas (controlos). Após os tratamentos as células foram marcadas com um anticorpo anti-CD135, como referido na secção material e métodos. Os resultados têm significado estatístico (*p < 0.05) em (B) para o siRNA anti-FLT3, quando comparado quer com o controlo quer com o siRNA controlo; em (A) não existem diferenças estatísticas do siRNA anti-FLT3, comparativamente ao siRNA controlo e controlo (Teste de ANOVA de comparações múltiplas combinado com o teste post-hoc de Tukey). Os resultados estão representados em percentagem (%) e representam a média \pm desvio padrão de 2 ensaios independentes.

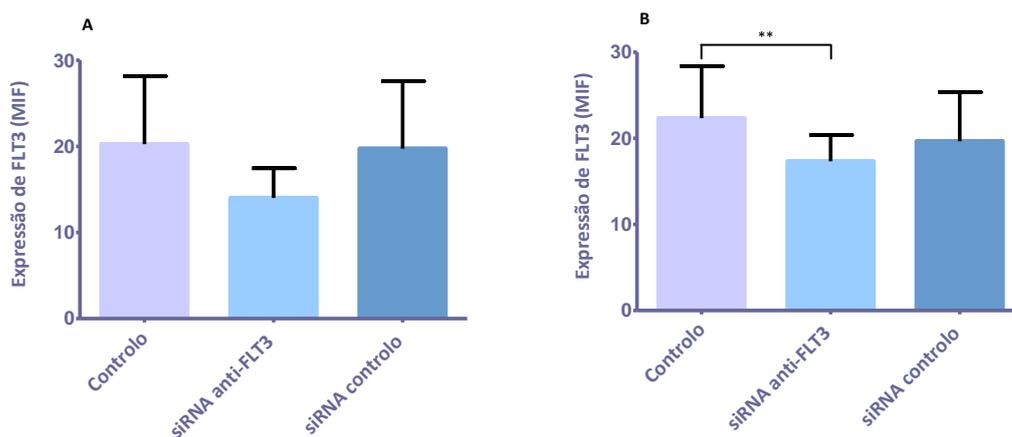


Figura 3. 11. Avaliação da expressão do receptor Flt3 por citometria de fluxo, após tratamento das células HL-60 (A) e K-562 (B) com siRNA anti-FLT3.

Está representado a expressão do receptor Flt3 após tratamento durante 48 horas com 100 nM de siRNA anti-*FLT3*, com 100 nM do siRNA controlo, e apenas lipossomas (controlos). Após os tratamentos as células foram marcadas com um anticorpo anti-CD135, como referido na secção material e métodos. Os resultados têm significado estatístico (* $p < 0.05$) em (B) para o siRNA anti-*FLT3*, quando comparado com o controlo; em (A) não existem diferenças estatísticas do siRNA anti-*FLT3*, comparativamente ao siRNA controlo e controlo (Teste de ANOVA de comparações múltiplas combinado com o teste post-hoc de Tukey). Os resultados estão representados em média da intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média \pm desvio padrão de 2 ensaios independentes.

3.7. Análise da expressão da ciclina D1 por citometria de fluxo nas linhas celulares HL-60 e K562

Para analisar alguns dos mecanismos moleculares envolvidos no efeito antiproliferativo do siRNA anti-*FLT3*, foi avaliada a expressão da molécula reguladora do ciclo celular, Ciclina D1, a qual promove a progressão da fase G1 para S do ciclo celular, e assim a proliferação celular (Fu *et al.*, 2004). Neste sentido, a avaliação da expressão da ciclina D1 foi efectuada antes e após tratamento durante 48h com o siRNA anti-*FLT3*, isoladamente e em associação com o inibidor do proteasoma, MG-262, nas células HL-60 e K562, e com o inibidor da proteína tirosina-cinase, Imatinib, apenas nas células K562. Como controlos foram utilizadas as células apenas tratadas com lipossomas (controlo) e com 100 nM do siRNA controlo. Pela análise da figura 3.12 verifica-se que, nas células K562, após tratamento com 100 nM de siRNA, os níveis de expressão de ciclina D1 são semelhantes aos observados no controlo e no siRNA controlo (figura 3.12-A), o que está de acordo com os estudos de proliferação referidos anteriormente. De facto, como representado na figura 3.2-D, não se verificou efeito antiproliferativo. No entanto, quando as células são tratadas com a associação de 100 nM de siRNA anti-*FLT3* com 0,1 nM de MG-262 ou com 10 nM de Imatinib, verifica-se aumento da expressão de ciclina D1, quando comparada com o siRNA anti-*FLT3* isolado (figura 3.12 (B e C, respectivamente)).

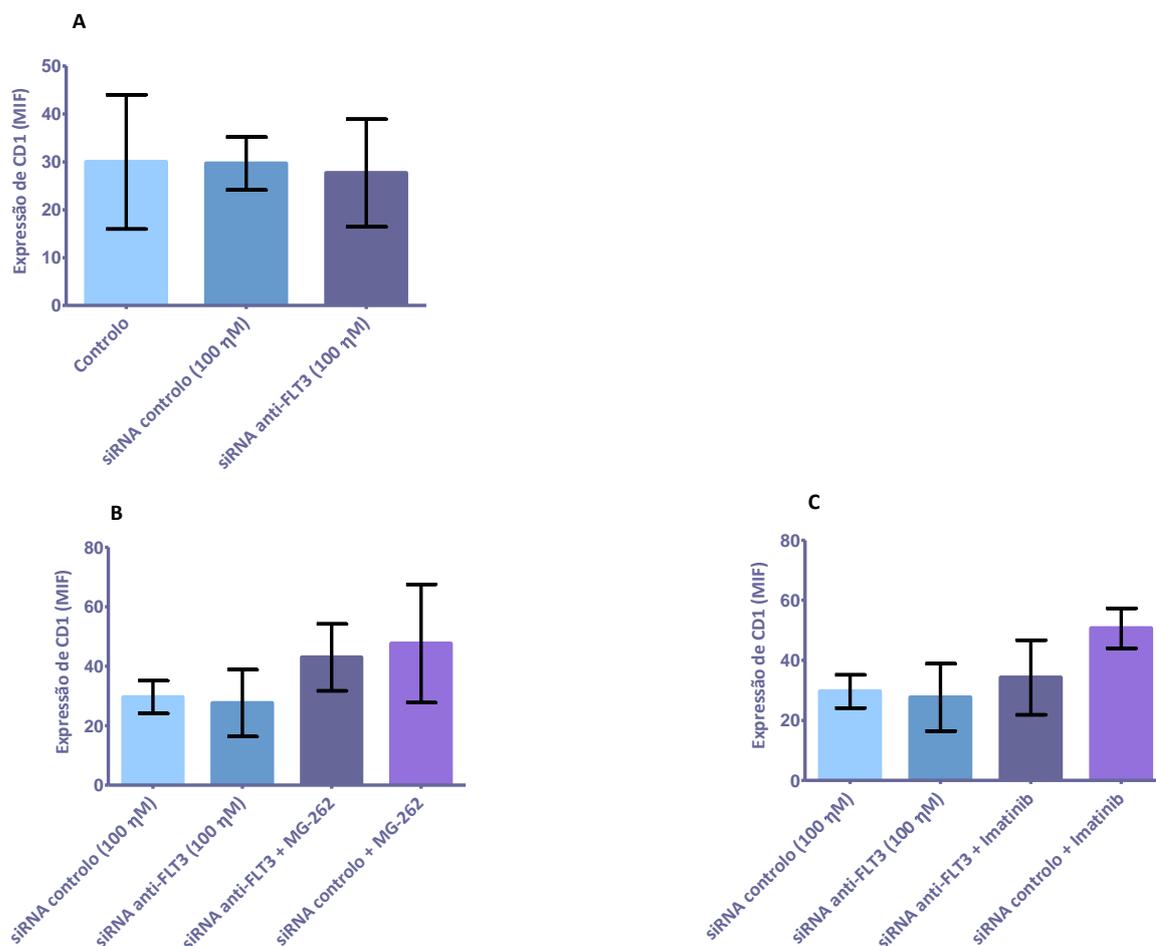


Figura 3. 12. Avaliação da expressão da proteína ciclina D1 (CD1) por citometria de fluxo, após tratamento das células K-562 com siRNA anti-FLT3 (A) em associação com MG-262 (B) e Imatinib (C).

As células foram tratadas durante 48 horas com 100 nM de siRNA anti-FLT3 e com 100 nM do siRNA controlo, o qual juntamente com o controlo onde foram adicionados apenas lipossomas, serviram como controlos (A), enquanto em (B) e (C) estão os resultados após tratamento com 100 nM de siRNA anti-FLT3 em associação com 0.1 nM de MG-262 e 10 nM de Imatinib, respectivamente, bem como dos respectivos controlos, 100 nM de siRNA anti-FLT3 isolado, 100 nM de siRNA controlo isolado e a associação com o siRNA controlo e os mesmos compostos. Após os tratamentos as células foram mantidas em cultura e marcadas com anticorpo anti-CD135, como referido na secção material e métodos. Os resultados não têm qualquer significado estatístico. (Teste de ANOVA de comparações múltiplas combinado com o teste post-hoc de Tukey). Os resultados estão representados em média da intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média de expressão da proteína ciclina D1 \pm desvio padrão de 3 ensaios independentes.

Nas células HL-60 tratadas com 100 η M de siRNA (figura 3.14), os níveis de expressão da ciclina D1 diminuem ligeiramente quando comparados com o controlo e com o siRNA controlo. No entanto, estas diferenças não são estatisticamente significativas (figura 3.14 (A)). Pelo contrário, nas células tratadas com a associação de 100 η M de siRNA anti-*FLT3* com 5 η M de MG-262, verifica-se aumento da expressão de ciclina D1, quando comparada com o siRNA anti-*FLT3* isolado. Por outro lado, observa-se ligeira diminuição da expressão desta ciclina quando as células são tratadas com a associação do siRNA controlo com o MG-262 (figura 3.14 (B)).

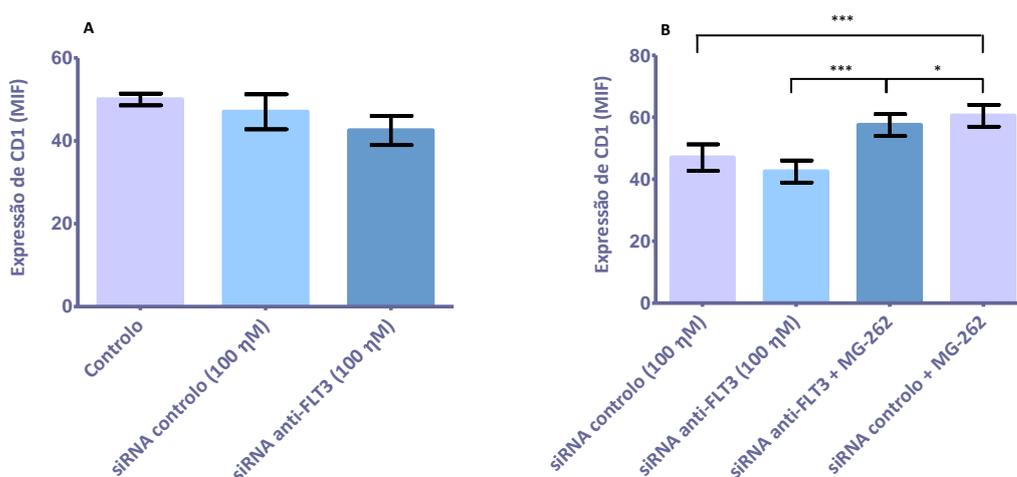


Figura 3. 13. Avaliação da expressão da proteína ciclina D1 (CD1) por citometria de fluxo, após tratamento das células HL-60 com siRNA anti-*FLT3* (A) em associação com MG-262 (B) e Imatinib (C).

As células foram tratadas durante 48 horas com 100 η M de siRNA anti-*FLT3* e com 100 η M do siRNA controlo, o qual juntamente com o controlo onde foram adicionados apenas lipossomas, serviram como controlos (A), enquanto em (B) estão os resultados após tratamento com 100 η M de siRNA anti-*FLT3* em associação com 5 η M de MG-262, bem como dos respectivos controlos, 100 η M de siRNA anti-*FLT3* isolado, 100 η M de siRNA, controlo isolado e a associação com o siRNA controlo e os mesmos copostos. Após os tratamentos as células foram mantidas em cultura e marcadas com anticorpo anti-CD135, como referido na secção material e métodos. Os resultados têm qualquer significado estatístico em (B) (* $p < 0.05$) para a associação do siRNA anti-*FLT3* com o MG-262, quando comparado com a associação do siRNA controlo com o MG-262; (** $p < 0.001$) para o siRNA anti-*FLT3* isolado quando comparado com a associação do siRNA anti-*FLT3* com o MG-262, e para o siRNA controlo isolado comparativamente à sua associação com o MG-262; (Teste de ANOVA de comparações múltiplas combinado com o teste post-hoc de Tukey). Os resultados estão representados em média da intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média de expressão da proteína ciclina D1 \pm desvio padrão de 3 ensaios independentes.

4. Discussão

Apesar dos progressos significativos que têm sido efectuados no tratamento das neoplasias hematológicas, nomeadamente nas leucemias de linhagem miéloide, como a Leucemia Promielocítica Aguda e a Leucemia Mielóide Crónica em crise blástica, estes são em muitos casos insuficientes em induzir remissão completa da doença. Deste modo, e dada a heterogeneidade de todo o processo tumoral, a combinação de várias terapias poderá ser uma mais-valia para o seu tratamento. O conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos nas neoplasias hematológicas tem permitido assim, o desenvolvimento de novos fármacos dirigidos a alvos moleculares, os quais apresentam maior especificidade para a célula tumoral e portanto menor toxicidade.

O receptor Flt3 desempenha um papel importante na hematopoiese normal, bem como, na neoplásica (Shami *et al.*, 2008). De facto, da activação deste receptor resulta uma cascata de sinais intracelulares, envolvendo várias vias de sinalização, como a via da RAS/MAPK cinase, da MEK/ERK e PI3K/AKT, conducentes à proliferação celular e inibição da apoptose no sistema hematopoiético (Takahashi S., 2011).

Vários estudos têm sido realizados de modo a esclarecer o papel deste receptor nas neoplasias hematológicas. Muitos destes estudos identificam que o receptor Flt3 é um alvo atractivo para o tratamento destas neoplasias, podendo a sua inibição constituir uma potencial abordagem terapêutica. Primeiro, porque a maioria das leucemias da linhagem mielóide apresentam sobre-expressão da proteína FLT3. Segundo, porque este é também, normalmente expresso pelos progenitores hematopoiéticos mais primitivos, sendo que durante o processo de diferenciação a sua expressão diminui. Por último, nas neoplasias referidas anteriormente, este aparece mutado numa percentagem significativa de doentes, conferindo pior prognóstico (Chu *et al.*, 2009).

Inúmeras moléculas inibidoras deste receptor têm vindo a ser desenvolvidas ao longo destes últimos anos, encontrando-se muitas delas em fase de ensaio clínico. Apesar de estas mostrarem alguma actividade em monoterapia, a resposta é limitada no tempo. Em muitos casos, as células tornam-se resistentes a estes inibidores, desencadeando cascatas de sinalização intracelulares, independentes do receptor Flt3, que fornecem mecanismos de sobrevivência e proliferação quando o receptor é inibido (Takahashi *et al.*, 2011).

Devido à complexidade multigenética das neoplasias hematológicas, nomeadamente da LMA e LMC, a utilização de outros agentes citotóxicos, como fármacos dirigidos a

outros alvos moleculares específicos, poderá conferir vantagem terapêutica a esta estratégia de inibição do *FLT3*.

Uma vez que na LMA e na LMC o receptor Flt3 possui um papel fulcral, a terapia génica pode ser uma potencial abordagem terapêutica. Neste sentido, o RNA de interferência (RNAi) é um processo celular frequentemente utilizado como ferramenta de pesquisa no controlo da expressão de genes específicos possuindo também, potencialidade terapêutica em inúmeras doenças, como é o caso das doenças oncológicas (Pfeifer *et al.*, 2010). Este tipo de RNA é responsável pela diminuição do mRNA citoplasmático estando este processo relacionado com o silenciamento genético pós-transcricional (Venturini *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2007). Os siRNAs, um dos tipos de RNA de interferência, são moléculas de RNA de dupla cadeia as quais permitem a inibição do mRNA alvo, levando à sua degradação e inibindo assim, a expressão proteica (Mendonça, L.S., 2010).

Neste sentido, um siRNA anti-*FLT3* foi utilizado no nosso estudo pela sua especificidade na inibição da expressão do gene *FLT3*, sendo que outros genes não seriam afectados, tal como reportado em outros estudos (Lu *et al.*, 2008). Essa especificidade evita, por outro lado, a resistência adquirida observada noutros tipos de inibidores do receptor Flt3 (Chu *et al.*, 2009). A entrega do siRNA às células foi efectuada através de lipossomas catiónicos, tal como reportado na secção de materiais e métodos, os quais permitem a protecção do siRNA da degradação por certas nucleases, aumentando desta forma a sua entrega intracelular (Mendonça, L.S., 2010). Assim, no presente trabalho estudou-se o potencial terapêutico de um siRNA dirigido especificamente ao receptor Flt3 em neoplasias hematológicas, nomeadamente na leucemia mielóide crónica e na leucemia mielóide aguda, quer em monoterapia, quer em associação com fármacos convencionais utilizados na clínica, e/ou com novos fármacos dirigidos a alvos moleculares específicos, como inibidores do proteasoma e da farnesiltransferase.

Para este efeito, foram utilizadas as linhas celulares HL-60 e K562. A linha celular HL-60 foi estabelecida a partir de uma doente com Leucemia Promielocítica Aguda (LPA), um subtipo da Leucemia Mielóide Aguda (LMA) (Birnie, G.D., 1988). A linha K562 foi obtida a partir e de uma doente do sexo feminino com 53 anos, à qual lhe foi diagnosticada Leucemia Miéloide Crónica (LMC) em crise blástica (Koeffler *et al.*, 1980).

As células HL-60 apresentam características morfológicas típicas de promielócitos, com a presença de grânulos abundantes no citoplasma e nucléolos. As células K-562, por outro lado, apresentam características de blastos com elevada relação núcleo/citoplasma e com vacúolos citoplasmáticos.

O receptor Flt3 participa na activação da sinalização celular conducente à proliferação e efeitos anti-apoptóticos (Lu *et al.*, 2008), mesmo na ausência de mutações. De facto, e apesar da presença de mutações no gene que codifica este receptor conferir pior prognóstico, as vias de sinalização envolvidas na proliferação e morte celular, a via das proteínas MEK/MAPK e PI3K/AKT, são activadas preferencialmente pelo receptor Flt3 selvagem (Adaptado de Takahashi S., 2011)

Nas células utilizadas no estudo, HL-60 e K562, não foi identificada qualquer mutação no Receptor *FLT3* (pontual e ITD), o que já tinha sido reportado em outros estudos (Seedhou-se *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009).

No entanto, o siRNA anti-*FLT3* induz diminuição da proliferação e viabilidade celulares de modo dependente da dose, do tempo de administração, da linha celular e do esquema terapêutico, e independente da presença de mutações.

Assim, nas células HL-60 verificamos que 100 nM de siRNA anti-*FLT3*, após 48 horas de tratamento, promovem diminuição da viabilidade celular, o que sugere assim um efeito citotóxico mediado pela inibição do *FLT3* pelo siRNA, independente da presença de mutações. Além da ligeira diminuição da percentagem de células viáveis, esta é acompanhada por aumento da apoptose, como evidenciam os estudos de citometria e morfológicos.

Além do efeito citotóxico, verificou-se também, que o siRNA anti-*FLT3* apresenta efeito citostático nas células HL-60, uma vez que se verifica diminuição de aproximadamente 50% na densidade celular, o que poderá estar de acordo com a ligeira diminuição da expressão da ciclina D1 quando comparada aos controlos (controlo e siRNA controlo). A ciclina D1 é uma proteína cuja expressão aumenta durante a fase G1 do ciclo celular, em resposta à activação da sinalização celular mediada por factores de crescimento (Oliveira A.C., 2008). A expressão do receptor Flt3 nas células HL-60 foi também avaliada após tratamento com o siRNA específico, Apesar do tratamento com o siRNA anti-*FLT3* não induzir variação na percentagem de células que expressa *FLT3*, observa-

se diminuição de aproximadamente 30% dos níveis de expressão do receptor. Estes resultados sugerem a eficácia do siRNA na inibição da expressão do *FLT3*.

Nas células K562 também se observa efeito citotóxico mediado pela inibição do *FLT3* pelo siRNA, e morte celular predominantemente por apoptose inicial e apoptose tardia/necrose.

No entanto, nestas células o siRNA anti-*FLT3* não apresenta qualquer efeito citostático, o que está de acordo com os níveis de expressão de ciclina D1. De facto, os níveis de expressão desta proteína após o tratamento com o siRNA anti-*FLT3* mostraram-se similares aos observados para os controlos, o que confirma a ausência do efeito antiproliferativo promovido pelo siRNA anti-*FLT3*.

Além disso, a expressão do receptor Flt3 nas células K562 tratadas com o siRNA anti-*FLT3*, diminui. Esta diminuição da expressão do receptor Flt3 é acompanhada pela diminuição da média de intensidade de fluorescência de células a expressarem este receptor. A diferença dos níveis de expressão de Flt3 entre as células HL-60 e K562, pode em parte influenciar a diferença na resposta a esta terapêutica.

Estes resultados sugerem que o receptor Flt3 selvagem pode estimular as vias anti-apoptóticas mas não as vias de sinalização conducentes à proliferação celular (Minami *et al.*, 2003), visto os resultados da inibição do receptor evidenciarem efeitos apoptóticos mas não anti-proliferativos. O seu efeito anti-apoptótico poderá estar assim envolvido com a fosforilação, e subsequente inactivação, da proteína pró-apoptótica BAD pertencente a família das proteínas BCL2 (Minami *et al.*, 2003). Vários autores sugerem que estes efeitos anti-apoptóticos poderão estar envolvidos com as vias de sinalização MEK/MAPK e PI3K/AKT, as quais estão relacionadas com a resistência à apoptose observada nas células que expressam este receptor. Este efeito é mediado pela inactivação de proteínas pró-apoptóticas, como BAD, BAX ou BID, o qual culmina na sobrevivência celular. (Minami *et al.*, 2003; Scholl *et al.*, 2005). No entanto, será necessário realizar estudos envolvendo a determinação da expressão destas proteínas após inibição do receptor Flt3.

A sinalização intracelular desregulada promovida pelo receptor Flt3 é claramente um evento importante num grande número de doentes com LMA e LMC, o que o torna um excelente alvo molecular. No entanto, inúmeros estudos clínicos sugerem que a inibição deste receptor por si só, não é suficiente para alcançar uma remissão

completa da doença. Deste modo, a combinação desta estratégia com os fármacos convencionais utilizados na quimioterapia, pode melhorar o prognóstico clínico destes doentes (Chu *et al.*, 2009).

Neste estudo, testamos o efeito da combinação do siRNA anti-*FLT3* com os fármacos convencionais utilizados no tratamento de primeira linha na LMA e LMC, como o ácido all-trans retinóico (ATRA) e o Mesilato de Imatinib, respectivamente. Neste sentido, foram inicialmente determinadas concentrações destes fármacos que não apresentassem um efeito citotóxico significativo. De facto, um dos objectivos da combinação farmacológica, baseia-se também, na diminuição da concentração dos compostos utilizados, de modo a minimizar a sua toxicidade e melhorar a qualidade de vida dos doentes (Coelho, A.S., 2009). Para este efeito foram elaboradas curvas dose resposta nas células HL-60 e K562 com concentrações crescentes destes fármacos, recorrendo ao ensaio metabólico da resazurina, como referido na secção de materiais e métodos.

Os fármacos convencionais utilizados induzem diminuição da viabilidade celular, de modo dependente da dose e do tempo. As curvas dose resposta efectuadas, observadas na secção de resultados, permitiram-nos seleccionar as concentrações de 25 μ M de ATRA e 10 η M de Imatinib, as quais foram associadas com 100 nM de siRNA anti-*FLT3*.

Verificou-se que a associação do ATRA com o siRNA anti-*FLT3*, não apresenta quaisquer efeitos sinérgicos em relação ao tratamento isolado dos dois compostos. Aliás, esta associação não se mostrou nada benéfica, uma vez que a viabilidade celular foi superior à observada com o tratamento do siRNA anti-*FLT3* isolado, sugerindo a existência de um efeito antagonista dos dois compostos.

Estes resultados estão de acordo com os de School e colaboradores (2005). Estes autores utilizaram ATRA combinado com um inibidor do receptor Flt3 em três tipos diferentes de linhas celulares de LMA, duas das quais expressavam o *FLT3* mutado, enquanto noutra este não apresentava qualquer tipo de mutação. Os resultados mostraram que esta associação não era terapeuticamente benéfica em células que não apresentavam qualquer mutação no *FLT3*. No entanto, nas células com a mutação interna em tandem, observaram um efeito sinérgico com a referida combinação de fármacos (School *et al.*, 2005). Os autores verificaram também que a associação de

ATRA com o inibidor do receptor Flt3, conduzia à diminuição do mRNA e do nível de expressão da proteína survivina, apenas nas linhas celulares com mutação no *FLT3*, o que tornava as células mais sensíveis à apoptose. A survivina é uma proteína do grupo das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs-*Inhibitor of Apoptosis Protein*), que inibe o processo apoptótico, através da inibição de caspases efectoras. A survivina desempenha também, um papel importante no crescimento celular, através da estabilização de microtúbulos durante a mitose (Cheung *et al.*, 2009). Deste modo, a regulação das proteínas anti-apoptóticas, como a survivina, poderá desempenhar um papel crucial na eficácia terapêutica da associação, permitindo que o ATRA aumente o efeito apoptótico dos inibidores do Flt3 preferencialmente em linhas celulares onde este receptor se encontra mutado. Seria assim, interessante avaliar, no nosso estudo, o papel desta proteína, e utilizar uma linha celular de LMA com o *FLT3* mutado.

Sabe-se que o receptor Flt3, o segundo mais sobre-expresso em doentes com LMC em crise blástica, pode contribuir para a resistência ao imatinib, uma vez que a ligação deste último ao Flt3 é impedida pela cadeia lateral de fenilalanina, do resíduo 691, do local de ligação ao ATP do receptor (Kim *et al.*, 2010). Este receptor mostra também, uma regulação positiva na expressão de antigénios associados à leucemia (LAAs-*Leukemia associated antigens*), em linhas celulares de LMA, promovendo o aumento destes. Este padrão de expressão de LAAs foi evidenciado também na cinase BCR-ABL (Brackertz *et al.*, 2011). Desta forma a inibição do receptor Flt3 poderá conferir às células neoplásicas maior sensibilidade ao imatinib, potenciando efeitos sinérgicos (Kim *et al.*, 2010).

Neste sentido, na linha celular K562 verifica-se que, a associação do siRNA anti-*FLT3* com o Imatinib tem um efeito citotóxico e citostático superior ao efeito observado nas células tratadas com os fármacos isoladamente.

Os resultados sugerem uma acção sinérgica dos dois compostos quando administrados em simultâneo. No entanto, este não foi comprovado pela avaliação da morte celular por citometria de fluxo, a qual revelou que a percentagem de células viáveis da associação é semelhante à verificada para o siRNA anti-*FLT3* isolado. Verifica-se, no entanto, um aumento da morte celular por apoptose e diminuição da morte celular por necrose. O efeito citostático não foi também comprovado pela expressão de Ciclina D1. Aliás, com a associação do siRNA anti-*FLT3* com o Imatinib

observou-se aumento da expressão desta ciclina, sugerindo que outras ciclinas e/ou outro tipo de proteínas poderão estar envolvidas na proliferação celular.

Apesar dos resultados verificados com o azul de tripano não terem sido confirmados por citometria, os primeiros sugerem que a inibição do receptor Flt3 pelo siRNA em combinação com Imatinib poderão ter uma acção sinérgica, no tratamento de doentes com LMC em crise blástica.

Para além do receptor *FLT3* a inibição de outras proteínas, relacionadas com a via de sinalização intracelular deste receptor, poderá constituir uma estratégia eficaz, na terapêutica da LMA e LMC, utilizando assim uma estratégia de inibição de múltiplos alvos (Weisberg *et al.*, 2008).

Neste estudo para além da terapia convencional, foram também utilizados nas células HL-60 e K562 inibidores proteicos específicos, nomeadamente um inibidor da proteína farnesiltransferase (L-744,832) e um inibidor do proteasoma (MG-262), em associação com o siRNA anti-*FLT3*.

Desta forma, e tal como efectuado para o ATRA e Imatinib, foram realizadas previamente curvas dose-resposta utilizando concentrações crescentes destes inibidores com a finalidade de seleccionar aquelas que não possuíssem efeitos citotóxicos significativos. Assim, nas células HL-60 foi utilizada a concentração de 5 η M de MG-262 e 0,1 μ M de L-744,832, e nas K562 utilizou-se 0,1 η M de MG-262 e 0,5 μ M de L-744,832, como referido na secção de resultados.

A Via da ubiquitina-proteasoma (UPP- ubiquitin proteasome pathway) é a via principal da degradação das proteínas intracelulares (Adaptado de Crawford *et al.*, 2011). O MG-262 é um inibidor do proteasoma análogo do Bortezomib, que actua bloqueando directamente a subunidade 20S do proteasoma. Deste modo, inibe o processo de degradação de certas proteínas, as quais se vão acumular nas células, desencadeando a apoptose (Adams, 2004; Oliveira, AC., 2008). Vários estudos experimentais e clínicos, envolvendo inibidores do proteasoma, têm sido amplamente desenvolvidos com especial incidência em neoplasias hematológicas, acrescentando novos mecanismos de acção e potenciais aplicações terapêuticas desta classe de fármacos. Um destes inibidores, o Bortezomib, já se encontra aprovado pela FDA para o tratamento do mieloma múltiplo (Adams, 2004; Gilliland *et al.*, 2004). Os IPs (Bortezomib e MG-262) estabilizam o I-kB, que permanece ligado ao NF-kB, retendo-o no citoplasma. Deste

modo, inibem a proliferação, a diferenciação celular e o desenvolvimento de mecanismos de resistência à radioterapia e quimioterapia, promovendo a apoptose.

A via de sinalização mediada pelo NF- κ B está envolvida na via do receptor Flt3 levando à proliferação desregulada, e ao desenvolvimento do processo leucêmico associado ao FLT3. A inibição deste receptor leva, deste modo, à diminuição da expressão da proteína NF- κ B (Lu *et al.*, 2008). Múltiplos estudos verificaram também, que a terapia combinada com inibidores do FLT3 e da proteína NF- κ B promovem um efeito sinérgico, levando ao aumento da apoptose em várias neoplasias hematológicas (Chu *et al.*, 2009).

Neste sentido a inibição do proteasoma pode constituir uma estratégia terapêutica eficaz, uma vez que ao inibir a proteína NF- κ B, pela estabilização de I- κ B, leva ao aumento da apoptose. Deste modo, o efeito citotóxico poderá ser potenciado pela inibição do receptor Flt3.

De acordo com estas observações, no nosso estudo verificou-se que, nas células HL-60, a combinação do siRNA anti-*FLT3* com o inibidor do proteasoma, MG-262, apresenta efeito citotóxico superior ao verificado para os dois compostos isoladamente, induzindo morte celular por apoptose tardia/necrose. No entanto, esta mostra efeitos similares aos do siRNA controlo em associação com o MG-262.

Os efeitos provocados pelo siRNA controlo poderão ser provocados pelos denominados, *off-targeted effects*. Mesmo os siRNA que não têm nenhum alvo fisiológico, poderão possuir sequências específicas que afectem determinados alvos moleculares (Tschuch, *et al.*, 2008).

Por outro lado, a associação do siRNA anti-*FLT3* com o MG-262, em termos citoestáticos, não apresenta diferenças estatisticamente significativas quando comparada com o efeito dos dois compostos isolados. Estes resultados estão de acordo com o aumento de expressão da CD1, confirmando assim, que esta associação não tem qualquer efeito anti-proliferativo.

Nas células K562 a associação do siRNA anti-*FLT3* com o MG-262 também não apresentou qualquer vantagem citotóxica nem citostática. Apesar, da associação do siRNA anti-*FLT3* com o MG-262, induzir diminuição da densidade celular quando comparada com o siRNA anti-*FLT3* aplicado isoladamente, esta é idêntica ao MG-262 isolado. Estes resultados não foram porém confirmados pela expressão da ciclina D1, a

qual apresenta aumento de expressão nas células tratadas com o siRNA anti-*FLT3* em associação com o MG-262, em relação ao siRNA anti-*FLT3* isolado.

O seu efeito anti-proliferativo poderá estar relacionado com o papel do proteasoma no ciclo celular. Para além de estar envolvido na regulação da degradação de pequenos substratos proteicos, este desempenha funções noutros processos mais complexos. Assim, o proteasoma apresenta um papel importante na formação e composição do cinetocoro (local de ligação dos feixes de tubulina do fuso mitótico aos cromossomas), como também na manutenção do fuso mitótico, envolvendo cinases mitóticas (Gorbsky *et al.*, 1999; Oliveira, AC., 2008). Apesar dos níveis de expressão de CD1 não serem concordantes com os efeitos antiproliferativos observados com o azul de tripano, estes sugerem, que o receptor Flt3, o qual se sabe ser degradado pelo proteasoma (Oshikawa *et al.*, 2011), poderá estar assim relacionado com a ciclina D1 e com a via NF-kB, contribuindo para a proliferação celular desregulada.

A estratégia da utilização dos inibidores da farnesiltransferase, apesar de apresentar resposta limitada em monoterapia nalgumas neoplasias, continua a ser um alvo de interesse. Estes inibidores interferem com a ligação da proteína RAS à membrana celular, a qual é necessária para a sua activação, interferindo desta forma com a via de sinalização subsequente, a qual conduz à proliferação celular e inibição da apoptose. A via de sinalização mediada pela proteína RAS é também uma via promovida pelo receptor Flt3. Desta forma, a combinação de inibidores do FLT3 com inibidores da proteína farnesiltransferase, já se mostrou eficaz em diversas neoplasias (Chu *et al.*, 2009, Weisberg *et al.*, 2009).

Neste estudo utilizou-se o siRNA anti-*FLT3* em associação com o inibidor da proteína farnesiltransferase, L-744,832, nas células HL-60 e K562. Esta associação não se mostrou, porém, eficaz em nenhuma das linhas celulares. Os resultados obtidos não demonstraram potenciação do efeito citotóxicos nem citostático. Nas células HL-60 verificou-se ainda que a associação do siRNA anti-*FLT3* com o L-744,832, conduz a efeito citotóxico e citostático semelhante ao do L-744,832 isoladamente. No entanto, os efeitos na viabilidade e proliferação celular induzidos por esta associação são menores do que os induzidos pelo siRNA anti-*FLT3* isolado.

Os nossos resultados foram desta forma inconclusivos, pois não se mostraram concordantes com estudos anteriores em que inibidores do FLT3 se mostraram

eficazes em linhas celulares de LMA com e sem mutação no receptor Flt3 (Möllgård *et al.*, 2008). Por outro lado, nas células HL-60, parece haver um efeito antagonista da associação do siRNA anti-*FLT3* com o L-744,832, uma vez que o efeito citotóxico revelou-se inferior ao do *siRNA anti-FLT3* isoladamente. Outros estudos, como a avaliação da expressão de certas proteínas envolvidas na cascata de sinalização da RAS/MAPK/MAP cinases seriam importantes, no sentido de perceber se esta via estaria afectada nestas linhas celulares, e de que modo a associação do siRNA anti-*FLT3* com o L-744,832 e os dois compostos isoladamente interferiam com esta.

Em suma, este estudo sugere que os siRNA anti-*FLT3* poderão constituir uma nova abordagem terapêutica na LMA e LMC, em monoterapia e/ou em associação com outros inibidores proteicos específicos, nomeadamente os inibidores do proteasoma, e como coadjuvantes da terapêutica anti-cancerígena convencional, com diminuição da toxicidade secundária normalmente associada ao tratamento de neoplasias.

Apesar da elevada eficácia e especificidade dos siRNA na diminuição dos níveis de expressão das proteínas alvo, existem obstáculos óbvios, como a eficiência da entrega do material genético. Múltiplos estudos estão a ser desenvolvidos neste sentido, os quais revelam resultados promissores (Walters *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2009; Fay *et al.*, 2011).

5. Conclusão

No presente trabalho estudou-se o potencial terapêutico de um siRNA dirigido especificamente ao receptor *FLT3* em neoplasias hematológicas, nomeadamente na leucemia mielóide crónica e na leucemia mielóide aguda, quer em monoterapia quer em associação com fármacos convencionais e novos fármacos dirigidos a alvos moleculares específicos. Da análise deste, foram retiradas as conclusões que a seguir se apresentam:

1. Verificou-se que o siRNA anti-*FLT3* promove um efeito citotóxico e citostático nas células HL-60, e induz morte celular preferencialmente por apoptose. Os resultados parecem ser independentes da existência ou não de mutação no gene deste receptor. Apesar da percentagem de células que expressa o *FLT3* ser baixa, não existindo diferenças quando estas são tratadas com o siRNA, os níveis de expressão do receptor diminuem após o tratamento, comprovando assim a eficácia de inibição do siRNA anti-*FLT3*. Deste modo o receptor *FLT3*, mesmo sem a presença de quaisquer mutações, parece desempenhar um papel importante na proliferação e morte celular.
2. Nas células K562, o efeito citotóxico induzido pelo siRNA anti-*FLT3* não se acompanhou de efeito anti-proliferativo, sugerindo que, nestas células o receptor *Flt33* sem qualquer mutação poderá estimular vias anti-apoptóticas, mas não vias de sinalização conducentes à proliferação celular.
3. A associação do ATRA com o siRNA anti-*FLT3*, na linha celular HL-60, não é benéfica, uma vez que não apresentou quaisquer efeitos sinérgicos, em relação ao tratamento isolado dos dois compostos, verificando-se antagonismo.
4. Nas células K562, os resultados mostram uma acção sinérgica do siRNA anti-*FLT3* com o Imatinib. No entanto, esta não foi comprovada pela avaliação da morte celular por citometria de fluxo nem pelos níveis de expressão de ciclina D1. Apesar dos resultados verificados com o azul de tripano não terem sido confirmados por citometria, os primeiros sugerem que a inibição do receptor

FLT3 pelo siRNA e o Imatinib poderão ter uma acção sinérgica, no tratamento de doentes com LMC em crise blástica.

5. A associação do siRNA anti-*FLT3* com o inibidor do proteasoma nas células HL-60 possui efeitos sinérgicos, os quais são caracterizados apenas por aumento do efeito citotóxico, sugerindo que esta combinação terapêutica poderá ser útil nos doentes com LPA.
6. Nas células K562 a associação do siRNA anti-*FLT3* com o MG-262 não apresentou qualquer vantagem citotóxica, quando comparada com o siRNA anti-*FLT3* e o MG-262 em monoterapia.
7. A associação do siRNA anti-*FLT3* com o inibidor da proteína farnesiltransferase, L-744,832, nas células HL-60 e K562, também não se mostrou eficaz, não se verificando potenciação de efeitos em termos citotóxicos e/ou citostáticos. Aliás, nestas condições parece existir um efeito antagonista.

Embora a presença de mutação no receptor *FLT3*, seja um factor de pior prognóstico na LMA e LMC em crise blástica, este estudo sugere que a inibição do *FLT3* pelo siRNA poderá constituir uma nova abordagem terapêutica nestes doentes mesmo na ausência de qualquer tipo de mutação neste receptor. A associação desta estratégia com fármacos já utilizados na clínica, como o imatinib, ou novos inibidores proteicos específicos, como os que interferem com o proteasoma, revelou-se também promissora. Desta forma, a combinação destas terapias poderá ser uma mais-valia no tratamento destas neoplasias, as quais são caracterizadas por uma complexidade de eventos intracelulares, onde múltiplas vias estão comprometidas.

O sucesso desta aplicação está também relacionado com o desenvolvimento de vectores de transporte do siRNA mais eficientes e com maior aplicabilidade clínica.

6. Referências Bibliográficas

- Adams, J. (2004). The Proteasome: A Suitable Antineoplastic Target. *Nature Reviews Cancer* , 4, 349-360.
- Appelbaum, S. M. (2009). Structural and Functional Alterations of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* 2009 , 15, 4263-4269.
- Aubry, J. P. (1999). Annexin-V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity. *Cytometry* , 37, 197-204.
- Batista, C., Carvalho, C., & Santos, N. (2007). Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* , 43, 167-179.
- Birnie, G. (1988). The HL60 cell line: A model system for studying human myeloid cell differentiation. *Br. J. Cancer* , 58, Suppl. IX, 41-45.
- Brackertz, B., Conrad, H., Daniel, J., Kast, B., Krong, H., Busch, D., et al. (2011). FLT3-regulated antigens as targets for leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood Cancer Journal* , 1, e 11.
- Bryan, J. (2005). *Modulation of FLT3 Inhibitor-induced Cytotoxicity in AML by FLT3 Ligand*. A Senior Honors Thesis, Ohio State University.
- Cardoso, A., Trabulo, S., Moreira, J., Düzgüneş, N., & Lima, M. (2009;). Targeted lipoplexes for siRNA delivery. *Methods Enzymol* , 465, 267-87.
- Chan, P. M. (2011). Differential signaling of Flt3 activating mutations in acute myeloid leukemia: a working model. *Protein Cell* , 2(2), 108–115.
- Choudhary, C., Schwable, J., Brandts, C., Tickenbrock, L., Sargin, B., Kindler, T., et al. (2005). AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. *Blood* , 106, 265-273.
- Chu, S. H., Small, D. (2009). Mechanisms of resistance to FLT3 inhibitors. *Elsevier* , 12, 8-16.
- Coelho, A. S. (2009). *TRAIL/APO2L como uma nova terapêutica anti-cancerígena em neoplasias hematológicas*. Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra.
- Crawford, L. J., Walker, B., & Irvine, A. E. (2011). Proteasome inhibitors in cancer therapy. *J. Cell Commun. Signal.* , 5, 101–110.
- Curley, M., Leslie A. Garrett, L., Schorge, J., Foster, R., & Rueda, R. (2011). Evidence for cancer stem cells contributing to the pathogenesis of ovarian cancer. *Frontiers in Bioscience* , 16, 368-392.
- Da Cruz M.T.G, S. S. (2001). Kinetic analysis of the intrinsic steps involved in lipoplex-cell interaction effect of various factors that influence transfection activity. *In Biochimica et Biophysica Acta (BBA), Biomembranes* , 1510 (1-2), 136-151.

- Daniels, T. D., Rodriguex, J., Helguera, G., & Penichet, M. (2006). The transferrin receptor part 1: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin Immunol* , 121 (2), 144-158.
- Dass, C., & Choong, P. (2006). Selective gene delivery for cancer therapy using cationic liposomes: In vivo proof of applicability. *Journal of Controlled Release* , 113, 155–163.
- Delcros, J. G.-B. (2003). Proteasome Inhibitors as Therapeutic Agents: Current and Future Strategies. *Current Medicinal Chemistry*. 479-503 , 10.
- Doepfner, K. T., Boller, D., & Arcaro, A. .. (2007). Targeting receptor tyrosine kinase signaling in acute myeloid leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* , 63 , 215–230.
- Durkin, W. [. (1979). A methodological approach to the prediction of anticancer approach effect in humans. *Cancer Research* , 39, 402-407.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* , 35: 495.
- Fay, F., & Scott, C. (2011). Antibody-targeted Nanoparticles for Cancer Therapy. *Immunotherapy* , 3(3), 381-394.
- Ferraz, M., & Cabral, C. (s.d.). *Complexos Catiônicos Lipossoma-DNA, Um Veículo Não Viral Alternativo Para Terapia Génica em Tecido Ósseo*. Obtido em Agosto de 2011, de <https://bdigital.ufp.pt/dspace/bitstream/10284/529/1/58-67FCS2006-6.pdf>
- FU, M., WANG, C., LI, Z., SAKAMAKI, T., & PESTELL, R. (2004). Minireview: Cyclin D1: Normal and Abnormal Functions. *Endocrinology* , 145, 5439–5447.
- Gewies, A. (2003). Introduction to apoptosis. *ApoReview* , 1-26.
- Ghobrial, I. W. (2005). Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy . *American cancer society* , 55, 178-194.
- Gilliland, D. G. (2002). The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* , 100, 1532-42.
- Gonçalves, A. C. (2008). *Avaliação do stresse oxidativo na Síndrome Mielodisplásica - Papel da mitocôndria e dos agentes antioxidantes*. Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra.
- Gorbsky G., K. M.[et al] (1999). Protein dynamics at the kinetochore: cell cycle regulation of the metaphase to anaphase transition. *The FASEB Journal* , 13, 5231-5234.
- Gorman, A. [et al]. (1997). Use of flow cytometry techniques in studing mechanisms of apoptosis in leukemic cells. *Cytometry* , 29, 97-105.
- Griffiths, A. J., Wessle, S. R., Lewontin, R. C., Gelbart, W. M., Suzuki, D. T., & Miller, J. H. (2005). *Introdução À Genética* (8 ed.). (P. A. Motta, Trad.) Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN.
- Grimm, K. D., Kay, M.A. (2007). RNAi and Gene Therapy: A Mutual Attraction. *Hematology* , 473-481.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell Press* , 100, 57–70.
- Hausman, C. G. (2007). *The Cell. A Molecular Approach* (4th ed.). U.S.A.: Sinauer Associates.

- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* , 407, 770-76.
- Hoffbrand, N., Moss, H., & Pettit, E. (2006). *Essential Haematology* (5th ed.). Blackwell Publishing.
- Hoffbrand, V. A., Catovsky, D., Tuddenham, E. G., & Green, A. R. (2011). *Postgraduate Haematology* (6th ed.). UK: Wiley-Blackwell - A John Wiley & Sons, Ltd., Publication.
- Irvine, L. J. (2011). Proteasome inhibitors in cancer therapy. *J. Cell Commun. Signal* , 5, 101–110.
- Karin M., C. Y. (2002). NF- κ B in Cancer: From Innocent Bystander to Major Culprit. *Nature Reviews Cancer* , 2, 301-310.
- Kim, K. I., Park, J., Ahn, K.-S., Won, N.-H., Kim, B. K., Shin, W. G., et al. (2010). Molecular characterization and prognostic significance of FLT3 in CML progression. *Leukemia Research* , 34, 995–1001.
- Kiyoi, H., Naoe, T., Yokota, S., Nakao, M., Minami, S., Kuriyama, K., et al. (1997). Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* , 11, 1447-1452.
- KOEFLER, H. B. (1980). An undifferentiated variant derived from the human acute myelogenous leukemia cell line (KG-I). *Blood* , 56, 265.
- Li, H., & Qian, Z. (2002). Transferrin/transferrin receptor-mediated drug delivery. *Med Res Rev* , 22 (3), 225-250.
- Lichtman, M. A., Beutler, E., Kipps, T. J., Seligsohn, U., Kaushansky, K., & Prchal, J. T. (2007). *Williams Hematology*. USA: Mc Graw-Hill Medical.
- Lima, N. M. (1998). *Biotecnologia, fundamentos e aplicações* (1ª Edição ed.). Lisboa: Lidel.
- Lo-Coco, F. &. (2006). The Biology of Acute Promyelocytic Leukemia and Its Impact on Diagnosis and Treatment . *American Society of Hematology* , 156-161.
- Lodish H., B. A. (2004). *Molecular Cell Biology* (Vol. 5ªedição). USA: W.H. Freeman and Company.
- Lu, J. Y. (2008). Efficacy of RNAi-induced down-regulation of wild-type FLT3 on NF- κ B pathway in THP-1 cell line. *Life Science Journal* , 5-2.
- Maitani, Y., Igarashi, S., Sato, M., & Hattori, Y. (2007). Cationic liposome (DC-Chol/DOPE = 1:2) and a modified ethanol injection method to prepare liposomes, increased gene expression. *International Journal of Pharmaceutics* , 342, 33–39.
- Mangues, R., Corral, T., & Kohl, N. E. (1998). Antitumor Effect of a Farnesyl Protein Transferase Inhibitor in Mammary and Lymphoid Tumors Overexpressing N- ras in Transgenic Mice. *Cancer Res* , 58, 1253-1259.

Martinez, J. D., Parker, M. T., Fultz, K. E., Ignatenko, N. A. and Gerner, E. W. (2003). Molecular Biology of Cancer. Burger's Medicinal Chemistry, Drug Discovery and Development. 1–50.

Martínez-Mancilla, M., Zafra-de la Rosa, G., Reynoso-Gómez, E., Astudillo-de la Vega, H., Nambo-Lucio, M. J., Benítez-Bribiesca, L., Martínez-Avalos, A., Rivera-Luna, R., Gariglio, P. (2006). La hemato-oncología molecular y las nuevas estrategias terapéuticas específicas en leucemia. *Gac Méd Méx*, 142-6.

Matthew R. Warr, E. M. (2011). Mechanisms controlling hematopoietic stem cell functions during normal hematopoiesis and hematological malignancies. *John Wiley & Sons, Inc. WIREs Syst Biol Med*.

Meade, B. (2009). The Road to Therapeutic RNA Interference (RNAi): Tackling the 800 Pound siRNA Delivery Gorilla.

Meier, F., Schittek, B., Busch, S., Garbe, C., Smalley, K., Satyamoorthy, K., et al. (2005). THE RAS/RAF/MEK/ERK AND PI3K/AKT SIGNALING PATHWAYS PRESENT MOLECULAR TARGETS FOR THE EFFECTIVE TREATMENT OF ADVANCED MELANOMA. *Frontiers in Bioscience*, 10, 2986-3001.

Mendonça, L. (2010). Novel nanotechnological approaches for Chronic Myeloid Leukemia treatment: Molecular and cellular targeting for gene silencing of overexpressed genes. *Tese de Doutorado*.

Meshinchi, S., & Appelbaum, F. (2009). Structural and Functional Alterations of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*, 15, 4263-4269.

Michael D. Curley, L. A. (2011). Evidence for cancer stem cells contributing to the pathogenesis of ovarian cancer. *Frontiers in Bioscience*, 16, 368-392.

Minami, Y., Yamamoto, K., Kiyoi, H., Ueda, R., Saito, H., & Naoe, T. (2003). Different antiapoptotic pathways between wild-type and mutated FLT3: insights into therapeutic targets in leukemia. *Blood*, 102, 2969-2975.

Mita, M. M., Mita, A. C., & Tolcher, A. W. (2006). Apoptosis: mechanisms and implications for cancer therapeutics. *Target Oncology*, 1, 197-214.

Moretti, L., Yang, E., Kim, K., & Lu, B. (2007). Autophagy signaling in cancer and its potential as novel target to improve anticancer therapy. *Drug Resistance Updates*, 10, 135–143.

Nardi, N. B. (2002). "Gene Therapy". *Ciência & Saúde Coletiva*, 7, 109-116.

Nathwani, A. C. (2004). A review of gene therapy for hematological disorders. *British Journal of Haematology*, 128, 3-17.

Naumann, S., Reutzel, D., Speicher, M., & Decker, H. (2001). Complete karyotype characterization of the K562 cell line by combined application of G-banding, multiplex-

- fluorescence in situ hybridization, fluorescence in situ hybridization, and comparative genomic hybridization. *Leukemia Research* , 25, 313–322.
- O'Donnell, M. (25 de Março de 2011). *Acute Leukemias*. Obtido em Junho de 2011, de Cancer Network: <http://www.cancernetwork.com/cancer-management/acute-leukemias/article/10165/1802772?pageNumber=2>
- Oliveira, A. C. (2008). *Sinalização Celular Mediada pelo receptor Flt3 e Proteínas Ras como Alvos Terapêuticos no Tratamento da Síndrome Mielodisplásica*. Tese de Mestrado.
- Oliveira, A. (2006). *DESENVOLVIMENTO DE COMPLEXOS CATIONICOS LIPOSSOMA DNA PARA TERAPIA GÊNICA EM OSTEOLASTOS*. Tese de Mestrado.
- Oliveira, V. C., Soares, B., Paiva, S. G., Pardini, V. C., & Ferreira, C. (2008). Pesquisa Molecular das Mutações ITD e D835 do Gene FLT3: um Importante Valor Prognóstico para Pacientes com Leucemia Mielóide Aguda. *NewsLab* , 86: 116-122.
- Oshikawa, G., Nagao, T., Wu, N., Kurosu, T., & Miura, O. (2011). C-CBL AND CBL-B MEDIATE 17-AAG-INDUCED DEGRADATION OF AUTOPHOSPHORYLATED FLT3-ITD THROUGH THE UBIQUITIN PROTEASOME PATHWAY. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.*
- PAEZ, J. G., & SELLERS, W. R. (2002). PI3K/PTEIN/AKT PATHWAY-A critical mediator of oncogenic signaling. *Kluwer Academic Publishers* , 1—6.
- Parcells B. W., I. A.-W. (2006). FMS-Like Tyrosine Kinase 3 in Normal Hematopoiesis and Acute Myeloid Leukemia. *Stem Cells* , 24: 1174-1184.
- Pedroso De Lima, M. C., Simões, S., Pires, P., Faneca, H., & Düzgüneş, N. (2001). Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47 (2-3), 277-294.
- Pelengaris, S., & Khan, M. (2006). *The Molecular Biology of Cancer*. (M. K. Stella Pelengaris, Ed.) USA: Blackwell Publishing.
- Pfeifer A., L. A. (2010). Pharmacological potential of RNAi – Focus on miRNA. *Pharmacology & Therapeutics* , 126, 217-227.
- Pinto, A.C, Moreira, J.N, Simões, S. (2011). Liposomal Imatinib-Mitoxantrone Combination: Formulation Development and Therapeutic Evaluation in an Animal Model of Prostate Cancer. *TheProstate* , 71, 71-81.
- Pires, P. S. (1999). Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells. In *Biochimica et Biophysica Acta (BBA), Biomembranes* , 1418 (1), 71-84.
- Polyak, K. (2007). Breast cancer: origins and evolution. *J. Clin. Invest.* , 117, 3155–3163 .
- Qian, Z., Li, H., Sun, H., & Ho, K. (2002). Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol Rev* , 54 (4), 561-587.

- Rawlings, J. S., Kristin M., R., & Harrison, D. A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science* , 117, 1281-1283.
- Reed, J. C. (2000). Mechanisms of apoptosis. *American Journal of Pathology* , 157, 1415-1430.
- Reuter, M. M. (2006). Molecularly Targeted Therapies in Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemias. *Annals of Hematology* , 85: 139-163.
- S., M. S. (2004). Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *Clinical Biochemistry* , 37, 618-635.
- Sarmiento-Ribeiro, A. (2000). *Alterações fenotípicas da célula tumoral e a sua relação com a resistência à quimioterapia*. Tese de Doutoramento, Universidade de Coimbra.
- Sarmiento-Ribeiro, A. B. (2007). Integração do Metabolismo e Comunicação Celular. *Bioquímica-Organização Molecular da Vida* , 599-647.
- Seca, H., Lima, R., Guimarães, J., & Vasconcelos, M. (2011). Simultaneous targeting of P-gp and XIAP with siRNAs increases sensitivity of P-gp overexpressing CML cells to imatinib. *Hematology* , 16, 100-107.
- Seedhouse, C., Hunter, H., Lloyd-Lewis, B., Massip, A.-M., Pallis, M., Carter, G., et al. (2006). DNA repairs contributes to the drug-resistant phenotype of primary acute myeloid leukaemia cells with FLT3 internal tandem duplications and is reversed by the FLT3 inhibitor PKC412. *Leukemia* , 20, 2130-2136.
- Seiter, K., & Besa, E. C. (13 de Junho de 2011). *Acute Myelogenous Leukemia*. Obtido em Junho de 2011, de Medscape Reference: <http://emedicine.medscape.com/article/197802-overview#aw2aab6b2b3aa>
- Sgonc, R. &. (1998). Apoptosis detection: An overview. *Experimental Gerontology* .
- Shami, K. S. (2008). FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia. *Expert Rev Hematology* , 1(2), 153-160 .
- Simões, S. A. (2005). Cationic liposomes for gene delivery. *Expert Opinion* , 2, 2.
- Simoes, S. P. (2003). Gene Delivery by Cationic Liposome-DNA Complexes Containing Transferrin or Serum Albumin. *Methods in Enzymology. Liposomes, Part C. N. Duzgunes, Academic Press* , 369-383.
- Small, D. (2006). FLT3 Mutations: Biology and Treatment. *Hematology* , 2: 178:184.
- Sohal, J., Phan, V. T., Chan, P. V., Davis, E. M., Patel, B., Kelly, L. M., et al. (2003;). A model of APL with FLT3 mutation is responsive to retinoic acid and a receptor tyrosine kinase inhibitor, SU11657. *Blood* , 101, 3188-3197.
- Stirewalt D. L., K. K. (2001). FLT3, RAS and TP53 Mutations in Elderly Patients With Acute Myeloid Leukemia. *Blood* , 97 (11), 3589-3595.

- Subramaniam, D. . (2010). Cancer Stem Cells: A Novel Paradigm for Cancer Prevention and Treatment. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, , , 10, 359-371.
- Swerdlow SH, C. E. (2008). . World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *IARC Press* .
- Takahashi, S. (2011). Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications. *Journal of Hematology & Oncology* , 4:13.
- TAVARES, G. (2006). *DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DE LIPOSSOMAS ANIÔNICOS pH-SENSÍVEIS PARA O TRANSPORTE DE DNA*. Tese de Mestrado.
- Tefferi, A., Thiele, J., & Vardiman, J. W. (2009). The 2008 World Health Organization Classification System for Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer*; , 115:38, 42–7.
- The Chemistry Encyclopedia*. (s.d.). Obtido de <http://www.chemistrydaily.com/chemistry/Imatinib>
- The Encyclopedia of Science*. (s.d.). Obtido em Junho de 2011, de The Encyclopedia of Science: http://www.daviddarling.info/encyclopedia/C/cell_cycle.html
- Thomas, M. S. (2007). RNA INTERFERENCE IN HAEMATOPOIETIC AND LEUKAEMIC CELLS. *Systems Biology* , 29-48.
- Tschuch, C., Schulz, A., Pscherer, A., & Werft, W. (2008). Off-target effects of siRNA specific for GFP. *BMC Molecular Biology* , 9:60.
- Tseng, Y.-C., Mozumdar, S., & Huang, L. (2009). Lipid-based systemic delivery of siRNA. *Advanced Drug Delivery Reviews* , 61 , 721–731.
- Vardiman, J. W. (2002). TheWorld Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* , 100, 2292-2302.
- Venturini, L. E. (2006). RNA- Mediated Gene Silencing in Hematopoietic Cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* , 1-3.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & N., a. B. (2003). .deregulation The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* , 36, 131–149.
- Walters, D. S. (2005). RNAi- induced down-regulation of FLT3 expression in AML cells lines increases sensitivity to MLN518. *Blood* , 105, 2952-4 .
- Wang, Z. (2002). Mechanism of action of all-trans retinoic acid and arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Pubmed* , 1, 214-8.
- Ward, A. C. (2000). The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* , 95, 19-29.

Weisberg, E., Barrett, R., Liu, Q., Stone, R., Gray, N., & Griffin, J. (2009). FLT3 inhibition and mechanisms of drug resistance in mutant FLT3-positive AML. *Drug Resistance Updates*, 12, 81-89.

Wolf, G. D. (2003). Gene therapy for hematological malignancies. *Clin Exp Med*, 3, 4-14.

Wong, K.-K. (2009). Recent Developments in Anti-Cancer Agents Targeting the Ras/Raf/MEK/ERK Pathway. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 4, 28-35 (8).

Yamamoto, Y., Kiyoi, H., Nakano, Y., Suzuki, R., Kidera, Y., Miyawaki, S., et al. (2001). Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, 97.

Zhdanov, R., Podobed, O., & Vlassov, V. (2002). Cationic lipid–DNA complexes—lipoplexes—for gene transfer and therapy. *Bioelectrochemistry*, 58, 53–64.

Zhou, G.-B. Z.-Y.-J. (2007). Treatment of Acute Promyelocytic Leukaemia with all-trans retinoic acid and arsenic trioxide: a paradigm of synergistic molecular targeting therapy. *The Royal Society*, 362, 959-971.