



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Influência do stresse oxidativo na morte das células de Leucemia Aguda em cultura -  
Relação com os níveis de 5-hidroximetilcitosina

Joana Filipa da Silva Leite

---

2012



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Influência do stresse oxidativo na morte das células de Leucemia Aguda em cultura - Relação com os níveis de 5-hidroximetilcitosina

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

Joana Filipa da Silva Leite

---

2012



## **Agradecimentos**

Apesar de ser individual, um trabalho de mestrado não se faz sem o apoio e o contributo de inúmeras pessoas, às quais gostaria de agradecer:

À Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro pela orientação deste projecto, pelo apoio, pela disponibilidade, pela dedicação e empenho, pelas críticas e conselhos ao longo do seu desenvolvimento, mas sobretudo pela confiança. À Professora Doutora Maria Paula Marques pelos conselhos e disponibilidade ao longo deste mestrado.

À Mestre Ana Cristina Gonçalves pela dedicação, pelo apoio, pela motivação, por me desafiar a fazer mais e melhor, mas sobretudo pela paciência e disponibilidade demonstradas sempre. Obrigada por tudo!

Ao laboratório de Biologia Molecular Aplicada da Faculdade de Medicina da UC e a todos os seus investigadores e colaboradores, um sincero obrigado pela ajuda.

À Professora Doutora Raquel Seiça, directora do serviço de Fisiologia (FMUC), à Teresa Louro e aos restantes investigadores e alunos, pelo apoio, disponibilidade e motivação.

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

A todos os que ao longo deste ano foram passando pelo Laboratório de Biologia Molecular Aplicada da FMUC e que de algum modo contribuíram para o presente trabalho.

Aos amigos de curso e de mestrado, em especial à Joana, ao Ivan, à Mariana, à Carina, à Bárbara e à PP, pelo companheirismo, pelo apoio e pela amizade, que tornaram estes anos em Coimbra cheios de boas recordações. Obrigada por estarem sempre presentes!

Às minhas queridas companheiras de laboratório, Mariana, Cátia e Patrícia, pela amizade, pela entajuda, pelos sorrisos e nervosismo partilhados, por tornarem os dias passados no laboratório muito mais divertidos. Sem vocês não era a mesma coisa!

À Raquel, pela disponibilidade, pela motivação, pela paciência, pelos conselhos, mas sobretudo pelo carinho e pela amizade. Obrigada por estares sempre lá para mim!

Finalmente, ao meu pequeno mundo que está sempre presente e nunca deixa de me apoiar:

Aos meus pais, pelo amor, pelo respeito, pelos valores, pelos sermões, por acreditarem sempre em mim, mas sobretudo pelo apoio e dedicação incondicionais.

Ao meu pequeno grande irmão Paulo, pelo amor, carinho e amizade, pelas brincadeiras, mas sobretudo por estar sempre presente nas minhas vitórias e fazer de mim uma irmã melhor.

Aos meus avós, pelos ensinamentos, pelo amor, pela presença e apoio incondicionais.

À minha restante família, que está sempre presente e nunca deixa de me incentivar e apoiar.

À Si, por estar sempre presente, pelo apoio nos momentos bons e menos bons, pelo incentivo, pela amizade e pelo respeito, pelo amor de irmã e pela eterna cumplicidade, por me ensinar que vale sempre a pena lutar. Eu por ti e tu por mim!

À Filipa, pela eterna amizade, pelo apoio incondicional, por ter sempre uma palavra amiga e por me ensinar a não desistir nem deixar de sonhar.

À Bárbara, por tudo e por mais alguma coisa, por nos rirmos juntas por tudo e por nada, pelo companheirismo, por sermos tão parecidas, por aturar o meu mau feitio como ninguém, por ser tão (ou mais) lamechas que eu, por me incentivar sempre, mas sobretudo pela amizade simples e verdadeira. Saíste-me a Sorte Grande!

Ao David, ao André e ao Ilídio, por me fazerem rir, pela amizade, pelo estímulo e pela sensatez com que sempre me apoiaram.

Obrigada a cada um de vocês por me ajudarem a concretizar mais uma jornada da minha vida!

## Resumo

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma neoplasia do sistema hematopoiético que resulta da transformação maligna das células progenitoras linfoides, B ou T, com consequente desregulação da proliferação e/ou bloqueio da diferenciação destas células, conduzindo à acumulação de células imaturas (linfoblastos). No entanto, a maioria das alterações genéticas que ocorrem na LLA não são suficientes para induzir a progressão da doença, o que sugere que existem outros factores genéticos e epigenéticos que contribuem para a transformação leucémica. Um dos mecanismos envolvidos na morte celular por apoptose e/ou proliferação anómala da célula tumoral pode estar relacionado com a produção de radicais livres de oxigénio. Estas espécies reactivas de oxigénio (ROS) são poderosos agentes indutores de lesões do ADN, podendo contribuir para a inactivação de genes supressores tumorais ou para a activação de proto-oncogenes. Contudo, a célula possui um conjunto de defesas antioxidantes, enzimáticas e não enzimáticas, responsáveis pela prevenção das lesões oxidativas. Outro mecanismo implicado no desenvolvimento e progressão do cancro, especialmente no sistema hematopoiético, é a modulação epigenética. Sabe-se que diversos genes supressores tumorais são inactivados devido à hipermetilação das regiões promotoras. Diversos estudos sugerem que as lesões oxidativas do ADN podem afectar os padrões de metilação, levando à expressão génica anómala o que pode contribuir para o desenvolvimento do cancro.

Neste sentido, os principais objectivos deste trabalho foram avaliar o papel das espécies reactivas de oxigénio, em particular do peróxido de hidrogénio e do anião superóxido, nos mecanismos de morte celular de células de leucemia linfoblástica aguda em cultura, e a sua relação com o estado de metilação em particular com os níveis de 5-hidroximetilcitosina, de forma a perceber a importância destas alterações e suas repercussões no tratamento da doença.

Para atingir estes objectivos foi utilizada uma linha celular de leucemia linfoblástica aguda T, as células CEM. Para avaliar o efeito do stresse oxidativo na proliferação/densidade e viabilidade, das células CEM recorreu-se ao teste de exclusão com azul tripano, após incubação das mesmas na ausência e na presença de diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio e menadiona (dador do anião superóxido)

durante 24 a 72h. Os níveis intracelulares do  $H_2O_2$ , do  $O_2^{\bullet-}$  e da defesa antioxidante não enzimática GSH, foram determinados por citometria de fluxo através das sondas fluorescentes DCFH-DA, DHE e Alaranjado de Mercúrio, respectivamente. O potencial de membrana mitocondrial foi analisado por citometria de fluxo através da sonda JC-1. A morte celular foi avaliada por microscopia óptica (coloração de *May-Grünwald-Giemsa*), por citometria de fluxo com a dupla marcação anexina V e iodeto de propídeo e pela avaliação dos níveis de expressão de proteínas envolvidas nos processos de morte celular, como as proteínas BAX, BCL-2, FAS, FAS ligando e caspases. O ciclo celular também foi avaliado por citometria de fluxo através da marcação com Iodeto de Propídeo/RNase. A hidroximetilação global do ADN (níveis de 5-hidroximetilcitosina, 5-hmC) das células tratadas com diferentes concentrações de indutores do stresse oxidativo foi analisada através de um *kit* comercial baseado num teste imuno-enzimático.

Os resultados obtidos mostram que o peróxido de hidrogénio e a menadiona induzem diminuição da viabilidade celular de uma forma dependente da concentração. A avaliação da morte celular por microscopia óptica e citometria de fluxo mostram que estes compostos induzem morte celular principalmente por apoptose, o que está de acordo com o aumento das caspases activadas, da proteína pró-apoptótica BAX e do receptor FAS. A diminuição do potencial mitocondrial e o aumento do pico pré-G0/G1 visualizado na análise do ciclo celular suportam os resultados anteriores. Estes compostos também induzem bloqueio do ciclo celular em fase S, o que poderá estar relacionado com lesão oxidativa do ADN. Além disso, as células submetidas aos indutores de stresse oxidativo mostram níveis de expressão de  $H_2O_2$ , de  $O_2^{\bullet-}$  e de GSH aumentados. Finalmente, também se observou diminuição da quantidade de 5-hidroximetilcitosina, o que pode resultar num ou de um estado de hipometilação generalizado.

Em conclusão, este estudo sugere que, apesar da presença de baixas concentrações de  $H_2O_2$  e de  $O_2^{\bullet-}$  induzirem proliferação celular, níveis mais elevados destas espécies reactivas podem levar à morte celular por apoptose. A persistência do stresse oxidativo pode também causar alterações no estado de metilação do ADN, e conseqüentemente nos níveis de 5-hidroximetilcitosina. Desta forma, torna-se

evidente que os indutores do stresse oxidativo além de poderem constituir uma nova abordagem terapêutica em neoplasias hematológicas, poderão interferir nos mecanismos de regulação epigenética.

**Palavras-chave:**

- Leucemia
- Stresse Oxidativo
- Espécies Reactivas de Oxigénio
- 5-hidroximetilcitosina





## Abstract

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is an hematological neoplasia characterized by the malignant transformation of lymphocyte progenitor cells of the B- or T-cell lineages, leading to a block of differentiation of these cells and therefore to an accumulation of immature cells (lymphoblasts). However, most of the genetic alterations that occur in the ALL are not sufficient to induce disease progression, suggesting that other genetic and epigenetic alterations that can contribute to leukemic transformation. One of the mechanisms involved in apoptotic cell death and/or abnormal proliferation of tumor cells may be related to the production of oxygen free radicals. These reactive oxygen species (ROS) are powerful agents that induce DNA damage and may contribute to the inactivation of tumor suppressor genes or for the activation of proto-oncogenes. Nevertheless, the cell has a set of antioxidant defenses, enzymatic and non-enzymatic, responsible for the prevention of oxidative damage. Another mechanism involved in the development and progression of cancer, especially in the hematopoietic system, is the epigenetic modulation. Many well established tumor suppressor genes have been shown to be inactivated predominantly by promoter hypermethylation. Several studies have suggested that the oxidative DNA damage may affect methylation patterns, leading to abnormal gene expression and possibly contributing to the development of malignancy.

The main objectives of this study was to evaluate the role of reactive oxygen species, in particular hydrogen peroxide and the superoxide anion, in the mechanisms of cell death in ALL cell culture and the relationship with methylation status, namely with 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) levels, in order to realize the importance of such changes and the implications in disease treatment.

For this purpose, we used a well established ALL T cell line, the CEM cells. To evaluate the effect of oxidative stress on cell viability and growth, CEM cells were treated in the absence and presence of different concentrations of hydrogen peroxide and menadione ( $O_2^{\bullet-}$  donor) and were analyzed by the trypan blue assay, during 72h. The intracellular levels of  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\bullet-}$  and the non-enzymatic antioxidant defense, GSH, were determined by flow cytometry (FC), using the probes DCFH-DA, DHE and Orange

Mercury, respectively. Mitochondrial potential was also analyzed by FC using the JC-1 probe. Cell death was determined by optical microscopy (*May-Grünwald-Giemsa* staining), by FC using the annexin V and propidium iodide double staining and by the expression levels of molecules involved in cell death, like BAX, BCL-2, FAS, FAS ligand and caspases. The cell cycle of leukemic cells was also evaluated by FC by staining with propidium iodide/RNase. The overall DNA hydroxymethylation (5-hmC levels) from cells treated with different concentrations of inductors of oxidative stress were examined using a commercial kit based on an immuno-enzymatic assay.

Our results show that hydrogen peroxide and menadione induce a decrease in cell viability in a dose and time dependent manner. Evaluation of cell death by optical microscopy and FC showed that these compounds induce cell death mainly by apoptosis, which is in agreement with the increase of activated caspases, the pro-apoptotic protein BAX and FAS receptor. The decrease in mitochondrial potential and an increase in peak pré-G0/G1 visualized in cell cycle analysis support these findings. These compounds also induce S phase arrest, suggesting DNA damage. Additionally, cells treated with inductors of OS show an increase in the expression levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> and GSH. Finally, we also observed a decrease in amount of 5-hydroxymethylcytosine, which can result in or of a state of generalized hypomethylation.

In conclusion, this study suggests that despite the presence of low concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> induce cell proliferation, higher levels of these reactive species can lead to cell death by apoptosis. The persistence of oxidative stress can also cause changes in DNA methylation state, consequently in levels of 5-hydroxymethylcytosine, suggesting that the reactive oxygen species may play a role in the mechanisms of epigenetic regulation and influence the response to therapy. Thus, it is clear that inductors of oxidative stress could constitute a new therapeutic approach in haematological malignancies, and may also interfere with epigenetic regulation mechanisms.

**Key words:**

- Leukemia
- Oxidative Stress
- Reactive Oxygen Species
- 5-hydroxymethylcytosine



## Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	III
Abstract.....	VII
Lista de Abreviaturas.....	XV
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 O Cancro.....	3
1.2 Sinalização Celular e Cancro.....	5
1.2.1 Sinalização envolvida na proliferação e regulação do ciclo celular.....	6
1.2.2 Sinalização envolvida na morte celular.....	10
1.3 Sistema Hematopoiético.....	14
1.4 Neoplasias Hematológicas – Leucemias.....	16
1.5 Stresse Oxidativo e Cancro.....	18
1.6 Epigenética e Cancro.....	22
1.7 Envolvimento do Stresse Oxidativo na Metilação do ADN.....	28
1.8 Objectivos.....	29
<b>2. Material e Métodos.....</b>	<b>31</b>
2.1 Estudos realizados numa Linha Celular de Neoplasia Hematológica.....	33
2.1.1 Cultura da linha celular.....	33
2.1.2 Incubação da linha celular com Peróxido de Hidrogénio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) e Menadiona.....	33
2.1.3 Análise da Morfologia Celular.....	34

2.1.4	Análise da densidade e da viabilidade celular.....	34
2.1.5	Análise da morte celular por citometria de fluxo.....	35
2.1.6	Avaliação do stresse oxidativo pela produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e expressão de glutatião reduzido (GSH).....	37
2.1.6.1	Avaliação da produção intracelular de peróxidos.....	37
2.1.6.2	Avaliação da produção intracelular do anião superóxido.....	38
2.1.6.3	Avaliação da expressão intracelular do glutatião reduzido.....	39
2.1.7	Avaliação da expressão de moléculas envolvidas na morte celular.....	40
2.1.8	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	41
2.1.9	Análise do ciclo celular.....	42
2.1.10	Extracção e quantificação de ADN genómico.....	43
2.1.11	Quantificação do conteúdo de 5-hidroximetilcitosinas (5-hmC).....	44
2.1.13	Análise Estatística.....	45
<b>3.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>47</b>
3.1	Estudos realizados na linha celular humana CEM.....	49
3.1.1	Caracterização da linha celular.....	49
3.1.2	Análise do efeito anti-proliferativo e citotóxico dos indutores do stresse oxidativo, peróxido de hidrogénio e menadiona.....	50
3.1.2.1	Curvas de proliferação e de viabilidade celular.....	51
3.1.2.2	Avaliação da morte celular por citometria de fluxo.....	53
3.1.2.3	Alterações morfológicas induzidas pelos indutores do stresse oxidativo.....	54
3.1.3	Influência dos indutores do stresse oxidativo na expressão de moléculas envolvidas na morte celular por apoptose.....	55

3.1.4 Influência dos indutores do stresse oxidativo no ciclo celular das células CEM.....	58
3.1.5 Avaliação do stresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogénio e menadiona.....	60
3.1.6 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial nas células tratadas com indutores do stresse oxidativo.....	63
3.1.7 Avaliação da quantidade de 5-Hidroximetilcitosina nas células tratadas com indutores do stresse oxidativo.....	64
<b>4. Discussão e Conclusão.....</b>	<b>67</b>
<b>5. Bibliografia.....</b>	<b>81</b>





## Lista de Abreviaturas

$\Delta\Psi_{mit}$ , potencial de membrana mitocondrial

$\cdot\text{OH}$ , Radical hidroxilo

**5mC**, 5-metilcitosina

**5hmC**, 5-hidroximetilcitosina

**8-OHdG**, 8-hidroxi-2-deoguanosina

**ADN**, Ácido desoxirribonucleico

**APC**, Aloficocianina

**ATCC**, *American Type Culture Collection*

**ATM**, *Ataxia telangiectasia mutated*

**BAK**, *Bcl-2 homologous antagonist/killer*

**BAX**, *Bcl-2 associated X protein*

**BCL-2**, *B-cell leukemia/lymphoma*

**BCL-xL**, *B-cell leukemia extra large*

**BID**, *BH3 interacting domain death agonist*

**C**, citosina

**CAT**, Catalase

**CDC**, *Cell Division Control*

**CDK**, *cyclin-dependent kinase*

**CEC**, Célula estaminal cancerígena

**CEH**, Célula estaminal hematopoiética

**CEP**, Célula estaminal pluripotente

**CLP**, Célula linfóide progenitora

**CMP**, Célula mielóide progenitora

**CPM**, Célula progenitora multipotente

**CT**, Célula tronco

**c-Jun**, *ju-nana*

**c-Myc**, *cellular myelocytomatosis viral oncogene homolog*

**DCF**, 2',7'-diclorofluoresceina

**DCFH**, 2',7'-diclorodihidrofluoresceina

**DCFH-DA**, 2',7'-diclorodihidrofluoresceina diacetato

**DD**, *death domain*

**DED**, *death effector domain*

**DHE**, dihidroetidina ou dihidroetideo

**DISC**, *death receptor-induced signaling complex*

**DMSO**, dimetilsulfóxido

**DNMT**, Metiltransferase de ADN

**EGF**, *epidermal growth factor*

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

**Epo**, *Erythropoietin*

**ER**, *Estrogen receptor*

**FADD**, *FAS-associated death domain*

**FAS**, *tumor necrosis factor receptor superfamily member 6*

**FLT-3 ligand**, *FMS like tirosine kinase 3 ligand*

**G**, Guanina

**GM-CSF**, *Granulocyte Macrophage-colony stimulating factor*

**GRB2**, *growth-factor receptor bound protein 2*

**GSH**, Glutatião reduzido

**GTP**, guanina trifosfato

**G0**, *Gap 0*

**G1**, *Gap 1*

**G2**, *Gap 2*

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**, Peróxido de hidrogénio

**HAT**, Acetiltransferase de histonas

**HDAC**, Desacetilase de histonas

**HIC1**, *Hypermethylated in cancer 1*

**HMT**, Metiltransferase de histonas

**HOCl**, Hipoclorito

**HSC**, *Haematopoietic stem cell*

**IAP**, *Inhibitor of Apoptosis Protein*

**IL**, Interleucina

**IP**, Iodeto de Propídeo

**JAK**, *Just Another Kinase*

**JC1**, *5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide*

**LLA**, Leucemia Linfoblástica Aguda

**LMA**, Leucemia Mielóide Aguda

**LPA**, Leucemia Promielóide Aguda

**M/A**, razão monómeros/agregados de JC1

**M-CSF**, *Macrophage-colony stimulating factor*

**MAPK**, *Mitogen Activated Protein Kinase*

**MAPKK**, *Mitogen Activated Protein Kinase kinase*

**MDR1**, *Multi-Drug Resistance 1*

**NADPH**, dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato reduzido

**NF-κB**, *nuclear factor κB*

**NO<sup>•</sup>**, Óxido nítrico

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>**, Anião superóxido

**P**, grupo fosfato

**PBS**, tampão fosfato

**PDGF**, *platelet-derived growth factor*

**RAS**, *rat sarcoma*

**ROOH**, Hidroperóxidos orgânicos

**ROS**, *Reactive Oxygen Species*

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

**SAH**, S-adenosil-homocisteína

**SAM**, S-adenosil-metionina

**STAT**, *Signal Transducer and Activator of Transcription*

**SCF**, *Stem cell factor*

**SDF-1**, *Stromal cell-derived factor 1*

**SH2**, *Scr-Homology 2*

**SOD**, Superóxido dismutase

**SOS**, *son of sevenless*

**T**, Timina

**TF**, factor de transcrição

**TGF- $\beta$ 1**, *Transforming growth factor beta 1*

**TNF**, *tumor necrose factor*

**TNF- $\alpha$** , *Tumour necrosis factor alpha*

**TNF-R**, tumor necrose factor receptor

**Tpo**, *Trombopoietin*

**TP**, *Trypan Blue*

**TRADD**, *TNF receptor-associated death domain*

**TRAIL**, *TNF related apoptosis inducing ligand*

**TRAIL R1**, *TRAIL receptor-1*

**TRAIL R2**, *TRAIL receptor-2*

---

## ***Introdução***



## 1.1 O Cancro

O cancro é uma doença com uma incidência cada vez mais evidente em todo mundo, havendo uma tendência para aumentar nos países desenvolvidos. Além disso, a maioria dos doentes são diagnosticados já num estágio avançado da doença, necessitando de um tratamento sistémico (Mishra *et al.*, 2006). A quimioterapia convencional actua de uma forma não específica, o que resulta numa elevada toxicidade e efeitos secundários. Por esse motivo, torna-se necessário compreender os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no cancro para assim encontrar novas alternativas terapêuticas.

O cancro é designado como uma doença de genes, cuja alteração confere às células neoplásicas características exclusivas, nomeadamente divisão celular excessiva, bloqueio de diferenciação e/ou resistência à apoptose. O nosso corpo é constituído por milhares de células que, normalmente, se dividem, crescem e morrem. Estas mesmas células, nos primeiros anos de vida, dividem-se de um forma mais rápida para permitir o crescimento, enquanto no estado adulto apenas se dividem para substituir as que morrem ou para reparar lesões (Lodish *et al.*, 2008).

Existem vários tipos de cancro, mas todos têm início numa célula anómala que sofre infinitas divisões mitóticas e/ou que resiste à morte celular por apoptose. Além desta capacidade de divisão, as células cancerosas também podem invadir e metastizar outros tecidos, o que não acontece com as células normais.

A transformação de uma célula normal numa célula maligna implica muitas vezes alterações fenotípicas associadas às fases do processo carcinogénico: iniciação, desenvolvimento e progressão (Figura 1) (Franco *et al.*, 2008). Pode-se então afirmar que o cancro resulta de um processo com múltiplas fases e em várias etapas que envolve muitas vezes alterações na actividade de transcrição e tradução de genes responsáveis por mecanismos celulares essenciais ao desenvolvimento do tumor, nomeadamente para a metastização, sobrevivência e proliferação. Desta forma, torna-se claro que o fenótipo e o comportamento das células são determinados pela expressão dos seus genes (Jones *et al.*, 1999). O comportamento anómalo das células



cancerígenas pode, assim, ser explicado pela diminuição da reparação de lesões do ADN, que podem conduzir, por exemplo, ao aparecimento de mutações. Além disso, a alteração da expressão de genes por mecanismos epigenéticos pode também contribuir para o desenvolvimento do cancro (Franco *et al.*, 2008).



**Figura 1 – Fases do processo carcinogénico.** O cancro envolve a formação de uma célula alterada que, após a primeira replicação do ADN, se transforma numa célula inicial mutada. Esta célula pode continuar a dividir-se quer por indução da proliferação celular quer por inibição da apoptose, originando uma lesão central. A ocorrência de lesões adicionais no ADN e a instabilidade genómica podem contribuir para a progressão de uma lesão pré-neoplásica para um estado neoplásico (Adaptado de Klaunig *et al.*, 1998).

O cancro é o resultado de um processo evolutivo, que é influenciado por múltiplos factores, tanto ambientais como genéticos. De facto, existem mecanismos genotóxicos e não-genotóxicos que contribuem para a transformação maligna. De uma forma geral, os primeiros envolvem alterações nas sequências de genes do ADN que podem provocar mutações, enquanto os segundos englobam mecanismos capazes de modular a expressão genética (Franco *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, surgiu a teoria das células estaminais cancerígenas (CEC) para explicar o desenvolvimento e manutenção de neoplasias. De acordo com esta teoria, as CEC têm capacidade de auto-renovação e de proliferação e potencial para se desenvolverem em qualquer tipo de célula da população tumoral, ou seja, apresentam características similares às células estaminais normais (Jordan *et al.*, 2006). Devido a estas características, esta teoria defende que as células estaminais antigas, ou seja as que sofreram auto-renovação mais vezes, são mais susceptíveis a sofrer mutações originando as CEC (Jordan *et al.*, 2006; Lobo *et al.*, 2007). Desta forma, o cancro pode surgir de células estaminais cancerígenas ou de células mais diferenciadas, que acumulam alterações genéticas e/ou epigenéticas que conduzem à desregulação de

genes que codificam proteínas envolvidas no crescimento, divisão, diferenciação e morte celular por apoptose (Lobo *et al.*, 2007).

É cada vez mais evidente que o desenvolvimento cancerígeno depende não só de alterações genéticas, como também depende de uma memória celular anómala, ou seja, de alterações epigenéticas, as quais são responsáveis pela transmissão dos padrões de expressão genética (Ting *et al.*, 2006). O termo “epigenética” é usado para descrever perfis de expressão genética hereditários, mitótica ou meioticamente. No entanto, e contrariamente ao que se observa nos eventos genéticos, os mecanismos epigenéticos não conduzem a alterações na sequência de nucleótidos do ADN (Bird, 2002). A alteração do padrão de metilação do ADN nas ilhas CpG das regiões promotoras dos genes é o mecanismo chave para a inactivação de genes supressores de tumores, mas também para a activação de oncogenes. Estes eventos epigenéticos têm um papel fundamental na carcinogénese e no desenvolvimento do tumor, e envolvem além das variações dos padrões de metilação do ADN, modificações específicas das histonas (*código das histonas*). Estes mecanismos de regulação da expressão génica em particular a hipermetilação do ADN e a desacetilação das histonas contribuem, em conjunto, para um estado da cromatina transcripcionalmente inactivo, inibindo a expressão de genes, nomeadamente de supressores tumorais (Fuks, 2005; Gal-Yam *et al.*, 2008).

Surgem cada vez mais evidências que sugerem o papel de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e do stresse oxidativo, tanto no desenvolvimento e progressão tumoral (Valko *et al.*, 2007; Sarmiento Ribeiro *et al.*, 2012) como nos processos epigenéticos referidos anteriormente, principalmente ao nível de alterações nos padrões de metilação do ADN. Tais modificações podem afectar fortemente a regulação da expressão de múltiplos genes (Franco *et al.*, 2008).

## **1.2 Sinalização celular e cancro**

A manutenção da homeostase celular depende da regulação precisa de múltiplas vias de sinalização que controlam o destino fisiológico das células: proliferação,

diferenciação, senescência ou morte celular (Sears & Nevins, 2002). De facto, a regulação dos sistemas biológicos é realizada por complexos mecanismos de comunicação intra e extracelulares, mediados por diversas moléculas sinalizadoras. As neoplasias surgem quando clones de células mutadas conseguem escapar a este balanço celular e proliferam indefinidamente sem sofrerem apoptose. Desta forma, o conhecimento dos mecanismos moleculares que controlam os processos fisiológicos normais é fundamental para o estudo da carcinogénese.

### 1.2.1 Sinalização envolvida na proliferação e regulação do ciclo celular

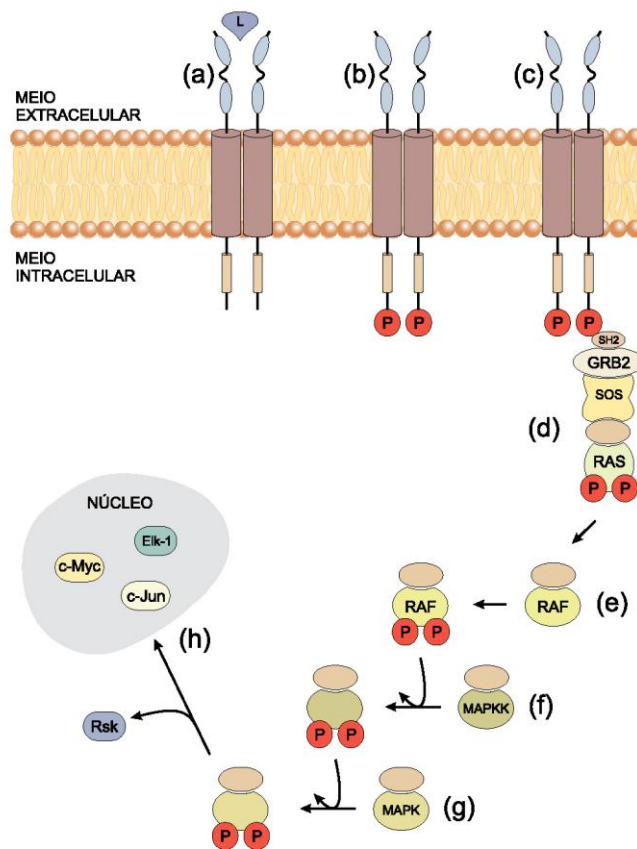
As vias de sinalização que estão envolvidas na proliferação celular são iniciadas, normalmente, pela ligação de factores de crescimento a um receptor membranar, na maioria dos casos com função de tirosina cinase. A fosforilação de proteínas representa, assim, um papel essencial na transdução de sinal, sendo controlada por proteínas que catalisam reacções de fosforilação, as cinases, e por proteínas que catalisam reacções de desfosforilação, as fosfatases. A activação das vias de sinalização celular, por proteínas cinases e fosfatases, termina na transcrição de genes responsáveis pela regulação da diferenciação e progressão do ciclo celular.

A hematopoiese, processo de formação das células sanguíneas, é regulada pela ligação de factores de crescimento a receptores da superfície celular das células estaminais hematopoiéticas. Esta interacção resulta na activação de cascatas de sinalização intracelular responsáveis pela modulação de genes específicos envolvidos na proliferação e diferenciação das células do sistema hematopoiético.

As principais vias de sinalização celular responsáveis pela proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas são a via das MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) e a via das JAK-STAT (*Just Another Kinase – Signal Transducer and Activator of Transcription*) (Sarmiento-Ribeiro, 2000; Hoffbrand *et al.*, 2005).

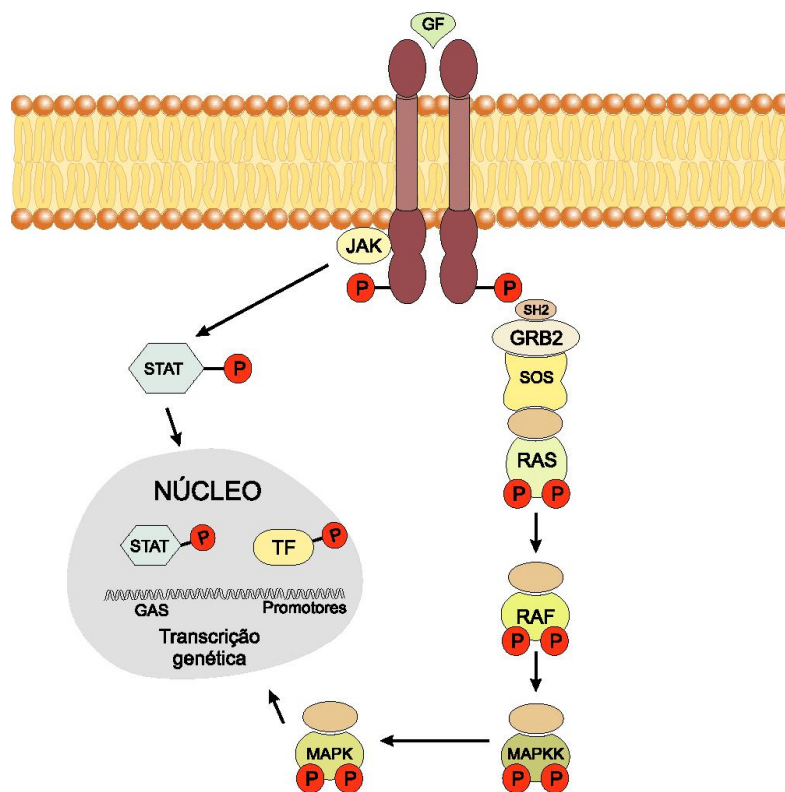
As proteínas cinases activadoras da mitose, as MAPK's, são uma família de cinases de serina/treonina, cuja via de sinalização é activada pela interacção de ligandos

específicos com receptores da superfície celular com actividade tirosina cinase (Figura 2). Estes incluem os receptores da insulina (R-I) e os receptores para factores de crescimento, como por exemplo para o factor de crescimento derivado da plaqueta (PDGF/PDGF-R), o factor de crescimento das células estamina (SCF/c-KIT) e o factor de crescimento das colónias dos granulócitos e monócitos (GM-CSF), entre outros (Sarmiento-Ribeiro, 2000; Sarmiento-Ribeiro *et al.*, 2008; Geest & Coffey, 2009).



**Figura 2 - Transdução de sinal pela via das proteínas cinases activadoras da mitose - Via das MAPK.** A ligação do ligando (L), normalmente um factor de crescimento (por exemplo PDGF, EGF), induz dimerização do receptor R (a), auto-fosforilação do mesmo (b) e activação do seu domínio intracitoplasmático de tirosina cinase (c). Uma vez activa, esta cinase vai fosforilar, em resíduos de tirosina, proteínas alvo com resíduos SH2 (*Src-Homology 2*), como por exemplo a proteína adaptadora GRB2, que assim permite a recolocação da proteína trocadora de GTP, a proteína SOS na membrana, levando à activação da proteína RAS (d). O sinal é assim transmitido ao longo de uma cascata de cinases. A proteína RAS, uma vez activada, activa a proteína RAF, umacina de serina e treonina (e). A proteína RAF induz uma cascata de sucessivas fosforilações em proteínas, primeiro em resíduos de serina e treonina na proteína MAPKK (MEK), activando a actividade de tirosina-treonina cinase desta proteína (f). A MAPKK vai então fosforilar em resíduos de tirosina e treonina a proteína MAPK (ERK) (g) que termina com a activação directa de factores de transcrição nucleares, como o c-MYC, o c-JUN, e o ELK-1, por fosforilação em resíduos de serina e de treonina ou através da proteína RSK (h). MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinase*; MAPKK: *Mitogen Activated Protein Kinase kinase*; PDGF: *platelet-derived growth factor*; EGF: *epidermal growth factor*; GRB2: *growth factor receptor bound protein 2*; SOS: *son of sevenless*; GTP: *guanosine triphosphate*. (Retirado de Sarmiento-Ribeiro *et al.*, 2008)

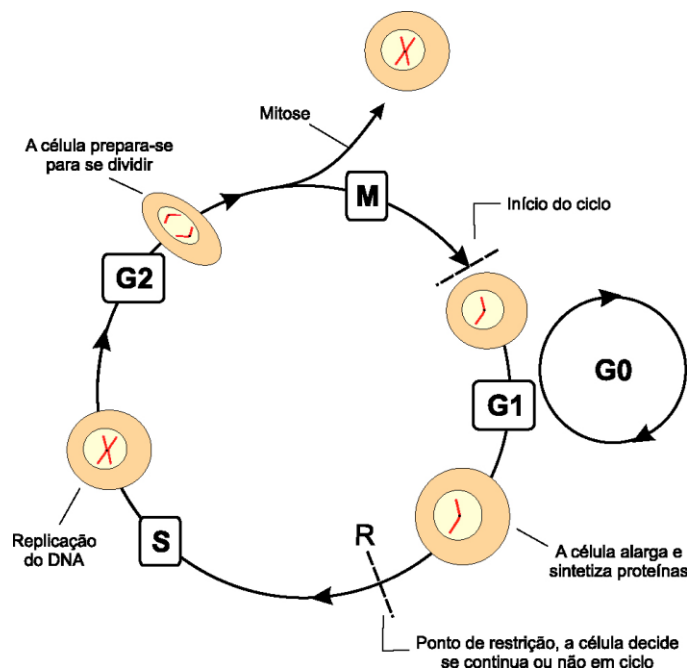
A via das JAK-STAT é o principal mecanismo de sinalização activado por uma grande variedade de citocinas e factores de crescimento. As JAKs correspondem a cinases de tirosina citoplasmáticas, enquanto as STATs são factores de transcrição citoplasmáticos (Figura 3). A activação desta via desempenha um papel fundamental no controlo de várias funções celulares como a proliferação, a diferenciação e a apoptose das células do sistema hematopoiético (Ward *et al.*, 2000; Rawlings *et al.*, 2004; Sarmiento-Ribeito *et al.*, 2008).



**Figura 3 - Representação esquemática da via de transdução de sinal utilizada pelas citocinas, a via JAK-STAT.** A ligação da citocina (GF) ao seu receptor conduz à dimerização do mesmo, levando à activação da respectiva JAK por fosforilação em resíduos de tirosina. Este processo leva, por sua vez, à activação das STAT e, directa ou indirectamente, à activação de outros componentes de sinalização, incluindo factores de transcrição e sequências de ADN específicas, as GAS (*Gamma Activated Sequences*). JAK: *just another kinase*; STAT: *signal transducers and activators of transcription*; MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinase*; MAPKK: *Mitogen Activated Protein Kinase kinase*. P: grupo fosfato; RAS: *rat sarcoma*; RAF: *rat function*; TF: factor de transcrição; SOS: *son of sevenless*, GRB2: *growth factor receptor bound protein 2*; SH2: *Src-homology 2* (Retirado de Sarmiento-Ribeito *et al.*, 2008)

Como referido anteriormente, a activação destas vias de sinalização celular termina com a transcrição de genes envolvidos na proliferação, diferenciação e regulação do ciclo celular. No núcleo, os factores de transcrição activam genes que conduzem a célula através das diferentes fases do ciclo celular (Figura 4).

O ciclo celular pode ser dividido em 4 fases: a fase G1 (*Gap 1*), em que há um aumento do tamanho da célula devido à síntese de ARN e proteínas e em que esta se prepara para duplicar o ADN; a fase S (*Synthesis*), em que ocorre síntese de ADN, com a duplicação do seu conteúdo; a fase G2 (*Gap 2*), em que a célula se prepara para a mitose e, finalmente, a fase M (*Mitosis*), em que há formação de duas células filhas que entram imediatamente na fase G1, podendo aí permanecer temporária ou permanentemente. A transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular representa um período de extrema importância uma vez que é nesta transição que as células progridem no ciclo de divisão ou param o crescimento. A decisão de proliferar ou permanecer num estado quiescente é fundamental para a manutenção e função do sistema hematopoiético (Sarmiento-Ribeiro, 2000; Myatt & Lam, 2007; Sarmiento-Ribeiro *et al.*, 2008). Deste modo, a proliferação celular requer a entrada e uma progressão bem-sucedida durante o ciclo de divisão celular.



**Figura 4 - As fases do ciclo celular.** Em G1 (GAP 1), a célula aumenta de tamanho, sintetizando proteínas necessárias à síntese de ADN que ocorre na fase seguinte, a fase S. A célula pode permanecer em G1, num estado não divisível, também chamado de fase G0 (GAP 0), ou se decidir continuar em ciclo tem que ultrapassar o ponto de restrição (R), entrando em fase S (Síntese). Durante esta fase a célula duplica o seu ADN, preparando-se para a mitose na fase G2 (GAP 2). Na última fase do ciclo celular, a fase M (Mitose) a célula divide-se em duas células filhas, reiniciando cada uma delas novo ciclo celular. (Retirado de Sarmiento-Ribeiro *et al.*, 2008)

A regulação do ciclo celular é rigorosamente controlada por diversas moléculas como as proteínas fosfatases, CDC (*Cell Division Control*), proteínas supressoras tumorais como a pRb (*Retinoblastoma*), a p53, a p16 e a p15 que têm um papel fundamental nos pontos de restrição do ciclo celular, e por complexos Ciclinas/Cinases dependentes de ciclina (CDKs) (Lodish *et al.*, 2007). Os complexos proteicos Ciclina/CDK, cujas funções são interdependentes, possuem actividade de serina-treonina cinase e permitem a progressão das células durante as fases do ciclo celular. A ciclina constitui a subunidade reguladora enquanto a CDK representa a subunidade catalítica, cuja activação depende da sua ligação à ciclina. A subunidade CDK é constitutivamente expressa nas células. Por outro lado, a ciclina é sintetizada apenas em resposta a determinados estímulos (Sarmiento-Ribeiro, 2000; Zhu & Skoultchi, 2001; Sarmiento-Ribeiro *et al.*, 2008).

As células hematopoiéticas são cuidadosamente mantidas através de um rigoroso equilíbrio entre a proliferação, a diferenciação e a morte celular. Nas neoplasias, as células adquirem alterações que levam à desregulação das vias de sinalização celular, o que resulta na divisão celular descontrolada devido à alteração dos padrões normais de diferenciação, proliferação e/ou morte celular.

### 1.2.2 Sinalização envolvida na morte celular

A manutenção da homeostasia celular é fundamental para a integridade dos tecidos, tornando inevitável e necessária a ocorrência de mecanismos de morte celular. Assim, a acumulação de células nas neoplasias é a consequência de uma proliferação excessiva e/ou resistência à morte celular.

Tal como os mecanismos de proliferação e progressão do ciclo celular, também a morte celular programada ou apoptose é regulada por genes que codificam proteínas específicas. Nas células tumorais ocorrem mutações que levam à inactivação de genes pró-apoptóticos ou à sobre-expressão de proteínas com funções anti-apoptóticas, o que confere às células malignas a possibilidade de sobrevivência por resistência à morte celular por apoptose (Evan & Vousden, 2001; Jin & El-Deiry, 2005).

A apoptose corresponde a um processo de morte celular evolutivamente conservado, necessário ao desenvolvimento embrionário e à homeostasia dos tecidos. Este tipo de morte celular pode ser desencadeado fisiologicamente por estímulos intrínsecos, como o stresse oxidativo e a lesão do ADN, e por estímulos extrínsecos, como xenobióticos/fármacos citotóxicos e ligandos de receptores de morte como o TNF alfa (*tumor necrosis factor*), o FAS ligando (FAS-L) ou o TRAIL (*TNF related apoptosis inducing ligand*) (Rossi & Gaidano, 2003).

As células em apoptose apresentam características morfológicas típicas, que resultam de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos regulados geneticamente, tais como diminuição do volume celular, vesiculação da membrana plasmática (*membrane blebbing*), fragmentação do ADN e formação de corpos apoptóticos (Saraste & Pulkki, 2000; Vermeulen *et al.*, 2005). A morte celular programada é desencadeada por diversos factores, como por exemplo a ligação de moléculas a receptores da membrana plasmática, agentes de quimioterapia, radiação ionizante, lesão do ADN, choque térmico, depleção de factores de crescimento, diminuição de nutrientes e aumento dos níveis de espécies reactivas de oxigénio (ROS).

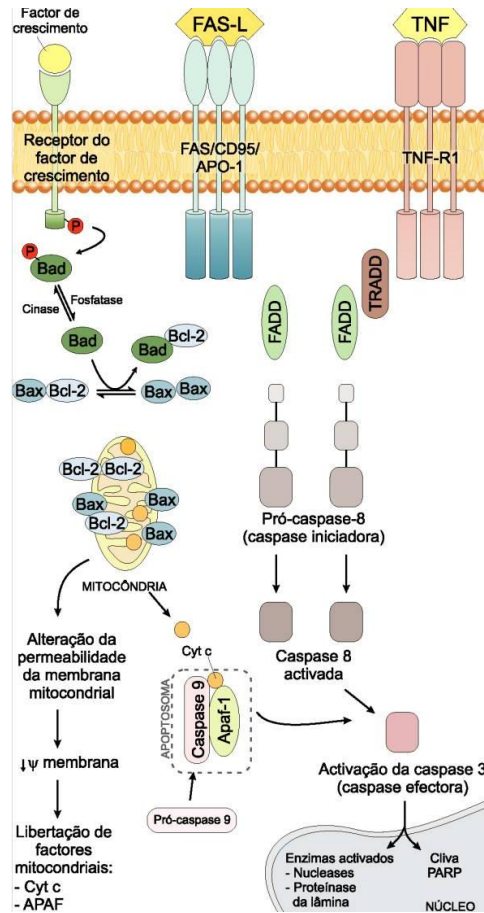
As duas principais vias de sinalização apoptótica são mediadas pela mitocôndria, que representa a via intrínseca, ou pelos receptores membranares da família do TNF, representando a via extrínseca ou membranar. Contudo, a execução final da morte celular converge na activação das caspases, uma família de proteases de cisteína intracelulares. Estas proteases são sintetizadas a nível celular como pro-enzimas inactivas, sendo rapidamente activadas por auto-clivagem proteolítica ou por clivagem através de outras caspases (Hengartner *et al.*, 2000; Rossi & Gaidano, 2003; Vermeulen *et al.*, 2005).

A via extrínseca é activada pela ligação de ligandos específicos a um grupo de receptores membranares da superfamília do receptor do factor de necrose tumoral (TNF) (Figura 5). Estes receptores de morte incluem o TNF-R1, o FAS e os receptores pró-apoptóticos do TRAIL, DR4 e DR5 (TRAIL R1 e R2), os quais contêm um domínio extracelular rico em cisteína necessário à ligação dos respectivos ligandos. Esta ligação



activa o domínio de morte dos receptores, activando consequentemente proteínas como a FADD (*FAS-associated death domain*) e a TRADD (*TNF receptor-associated death domain*). Para que a apoptose ocorra, além da existência do um domínio de morte (DD – *death domain*), é também necessária a existência de um efector do domínio de morte (DED – *death effector domain*) na porção N-terminal. Através deste, as proteínas FADD e TRADD ligam-se a sequências de aminoácidos idênticas noutras proteínas, como a pró-caspase 8. Por outro lado, após a ligação do ligando FAS, dá-se a trimerização do complexo FAS/FADD/pró-caspase 8, ou complexo DISC (*death receptor-induced signalling complex*). De seguida, a pró-caspase 8 é clivada proteoliticamente havendo libertação da caspase 8 activa (caspase iniciadora). Posteriormente, esta activa a caspase 1, que por sua vez activa a caspase 3 por clivagem da respectiva pró-caspase, sendo esta a verdadeira executora da apoptose. A activação da caspase 3 conduz à inactivação de um factor inibidor da fragmentação do ADN, sendo este clivado pela endonuclease responsável pela clivagem internucleossómica da cromatina, característica da apoptose (Cooper *et al.*, 2004; Jin & El-Deiry, 2005; Sarmiento-Ribeiro *et al.*, 2008).

A via intrínseca ou mitocondrial é activada em resposta ao stresse intra ou extracelular como a depleção de factores de crescimento, as lesões do ADN, a hipóxia ou a activação de oncogenes. Nestas condições, ocorre uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial ( $\Psi_{mit}$ ), o que provoca a permeabilização da membrana da mitocôndria e a consequente libertação de moléculas pró-apoptóticas como o citocromo c (Figura 5) (Budihardjo *et al.*, 1999; Reed, 2000).



**Figura 5 - Principais vias bioquímicas envolvidas na apoptose celular.** A activação do receptor do factor de necrose tumoral (TNF-R1) pelo factor de necrose tumoral solúvel (TNF), ou do seu parente, o receptor membranar FAS, desencadeia a interacção do domínio citoplasmático destes receptores da família do TNF com outras proteínas possuidoras do mesmo domínio, nomeadamente com as proteínas FADD, no caso do FAS, ou TRADD, no caso do TNF-R1. Através da sua sequência N-terminal, estas proteínas ligam-se a sequências de aminoácidos idênticas noutras proteínas, como a pró-caspase 8. A trimerização do complexo FAS/FADD/pró-caspase 8, após ligação do respectivo ligando, o FAS e/ou o TNF, leva à clivagem da pró-caspase e consequente libertação da caspase 8 activa (caspase iniciadora). Posteriormente, a caspase 8 activa a caspase 3, por clivagem da respectiva pró-caspase, a qual é o verdadeiro effector da apoptose.  $\Psi$ : potencial de membrana; Apaf-1: factor activador das proteases apoptóticas 1; PARP: poli-ADP-ribose polimerase; TNF: tumor necrosis factor; FAS: tumor necrosis factor receptor superfamily member 6; FADD: FAS-associated death domain; TRADD: TNF receptor-associated death domain; BAX: BCL-2 associated X protein; BCL-2: B-cell leukemia/lymphoma; (Retirado de Sarmento-Ribeiro *et al.*, 2008)

Este processo é regulado pela família das proteínas BCL-2, uma família de proteínas indutoras e repressoras da apoptose. Assim, proteínas como a BCL-2 e a BCL<sub>XL</sub> inibem a apoptose pois previnem a libertação do citocromo c, sendo por isso denominadas como reguladores anti-apoptóticos. Por outro lado, a BAX, a BID e a BAK têm uma acção promotora da morte celular, ou seja, são proteínas pró-apoptóticas. A expressão da BCL-2 consegue inibir a produção de ROS e estabilizar o  $\Psi_{mit}$ , inibindo a apoptose. Desta forma, a homeostase é mantida pelo equilíbrio entre os níveis de proteínas pró e anti-apoptóticas (Hengartner, 2000; Jin & El-Deiry, 2005).

Existe ainda outro grupo de proteínas que participa no controlo da apoptose, as proteínas inibidoras da apoptose ou IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Protein*). Estas proteínas controlam a morte celular programada através da inibição da actividade das caspases efectoras 3 e 7, da caspase iniciadora 9 e da modulação do factor de transcrição NF- $\kappa$ B (Budihardjo *et al.*, 1999; Hengartner, 2000; Reed, 2000).

Nas células cancerígenas, o equilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose parece estar comprometido, nomeadamente devido a alterações nas vias de sinalização apoptótica, o que permite a sobrevivência das células como alterações genéticas.

### 1.3 Sistema Hematopoiético

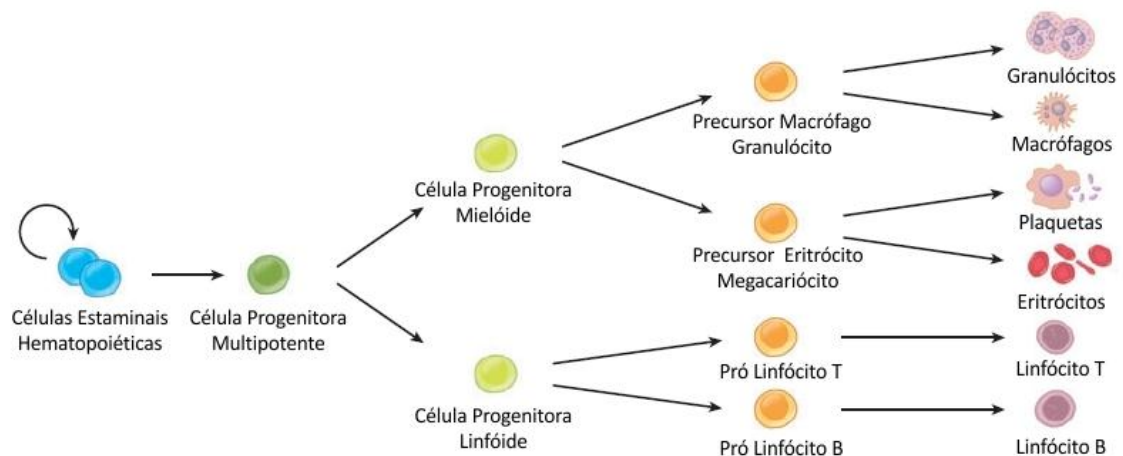
As células sanguíneas são constantemente formadas através de um processo denominado Hematopoiese, que inclui a formação, desenvolvimento e maturação dos elementos constituintes do sangue. Este sistema hematopoiético é um dos sistemas do organismo humano melhor caracterizado em termos de organização hierárquica e diferenciação celular das subpopulações. Diversas observações indicam que o tecido sanguíneo, funcionalmente complexo e heterogéneo, é sustentado por uma população de células indiferenciadas denominadas células estaminais hematopoiéticas (CEH) (Dalerba *et al.*, 2007).

Durante o desenvolvimento fetal, a hematopoiese ocorre no saco vitelino, no fígado, no baço e na medula óssea. Na idade adulta, este processo ocorre principalmente na medula óssea dos ossos chatos e extremidades proximais dos ossos longos, locais que possuem um microambiente favorável ao desenvolvimento da célula estaminal. O microambiente medular é mantido devido à presença de uma rede microvascular, que permite que as células maduras alcancem a circulação sanguínea e de células do estroma, como os adipócitos, os fibroblastos, as células endoteliais e os macrófagos, que asseguram a secreção de substâncias essenciais ao crescimento, diferenciação, maturação e morte das células hematopoiéticas. Entre estas substâncias encontram-se os factores de crescimento, de natureza polipeptídica, tais como o factor

de crescimento das células estaminais (SCF) e o factor de crescimento das colónias (CSFs), entre outros (Fox, 1996; Sarmiento-Ribeiro, 2000; Hoffbrand *et al.*, 2005; Mehta *et al.*, 2005).

Assim, o processo de formação das células hematopoiéticas inicia-se com a divisão da CEH, também conhecida como célula estaminal pluripotente (CEP) ou célula tronco (CT), que por auto-renovação origina uma nova CEH e uma célula progenitora multipotente (CPM). Por sua vez, esta CPM dá origem aos precursores de duas linhagens celulares: a célula linfóide progenitora (CLP), para a linhagem linfóide, e a célula mielóide progenitora (CMP), para a linhagem mielóide. Dependendo dos estímulos presentes, estas células, que já se encontram comprometidas com uma das linhagens, vão sofrer maturação e dar origem aos vários elementos sanguíneos. Desta forma, as CLP vão formar os linfócitos B e T e as células *natural killer* (NK). Por outro lado, as CMP originam os granulócitos, os monócitos/macrófagos, as plaquetas e os eritrócitos (Figura 6) (Fox, 2006; Dalerba *et al.*, 2007; Lobo *et al.*, 2007).

A hematopoiese depende de um microambiente adequado, assim como de factores de crescimento hematopoiéticos (hormonas glicoproteicas), os quais influenciam a proliferação e diferenciação das células do sangue. De uma forma geral, neste processo o potencial de diferenciação e a capacidade de auto-renovação celular diminuem gradualmente e, conseqüentemente, evidenciam-se as características morfológicas das células mais diferenciadas/maduras (Fox, 2006).



**Figura 6 – Esquema representativo da Hematopoiese.** As células estaminais hematopoiéticas (CEH) auto-renovam-se e originam as células progenitoras multipotentes (CPM), que por sua vez se diferenciam em células precursoras da linhagem mielóide e linfóide (CMP e CLP). Estas vão originar os precursores dos diferentes elementos sanguíneos, que culminam em células maduras (adaptado de Lobo *et al.*, 2007).

#### 1.4 Neoplasias Hematológicas – Leucemias

As neoplasias hematológicas são um grupo de doenças clonais malignas que têm início num única célula da medula óssea ou do tecido linfático que sofreu uma alteração genética e/ou epigenética (Hoffbrand *et al.*, 2011). As doenças neoplásicas partilham algumas características: alteração no controlo da divisão, crescimento e diferenciação celular, assim como inibição da morte celular. O equilíbrio dinâmico destes mecanismos moleculares é mais comum em tecidos com um alto volume de renovação celular, em particular no sistema hematopoiético. O fenótipo maligno resulta do aparecimento de anomalias genéticas bem como de modificações epigenéticas, capazes de induzir desregulação de genes que controlam o crescimento celular, diferenciação e apoptose, como referido. Além das translocações, deleções e mutações, nas neoplasias hematológicas, a hipermetilação do ADN é o mecanismo mais comum responsável pela inativação de genes supressores de tumores (Issa *et al.*, 1997; Boulwood *et al.*, 2007).

As leucemias são um grupo de neoplasias hematológicas caracterizadas pela desregulação da proliferação, pela diminuição da apoptose e/ou pelo bloqueio da diferenciação das células hematopoiéticas, resultando numa acumulação de células

anómalas na medula óssea e/ou no sangue periférico (Zhou *et al.*, 2007). As neoplasias hematológicas são classificadas de acordo com a linhagem celular afectada em linfóides ou mielóides, com a velocidade de progressão da doença em agudas ou crónicas e de acordo com a presença de alterações genéticas, como mutações e translocações (Hoffbrand *et al.*, 2011).

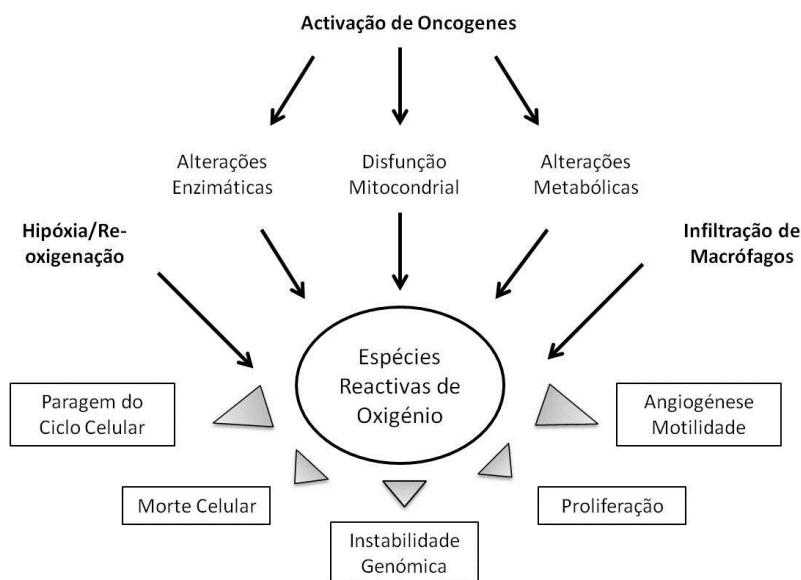
As leucemias agudas correspondem a doenças malignas primárias, caracterizadas pela proliferação descontrolada de células hematopoiéticas imaturas que invadem a medula óssea e que posteriormente atingem o sangue periférico (Sarmiento-Ribeiro, 2000). As células neoplásicas apresentam um carácter clonal, ou seja, todas as células se originam de uma mesma célula (Mehta *et al.*, 2005). A célula proliferante das leucemias agudas denomina-se blasto, pois trata-se de uma célula pouco diferenciada, com uma alta relação núcleo/citoplasma e por vezes com nucléolos proeminentes (Sarmiento-Ribeiro, 2000).

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é caracterizada por um bloqueio na diferenciação das células progenitoras linfóides, B ou T, o que leva a uma acumulação de linfoblastos imaturos (Pui *et al.*, 2004). Esta neoplasia afecta tanto crianças como adultos, mas tem maior incidência entre os 2 e os 5 anos de idade, correspondendo a mais de 50% das neoplasias hematológicas neste grupo etário (Pui *et al.*, 2004; Dunwell *et al.*, 2009). Diversas alterações genéticas das células hematopoiéticas progenitoras estão na origem deste tipo de leucemia, levando à expressão anormal de proto-oncogenes, formação de genes de fusão devido a translocações cromossómicas e hiperploídia, o que contribui para uma modificação das funções celulares (Pui *et al.*, 2004; Pui *et al.*, 2008; Yeoh *et al.*, 2002).

Por outro lado, as leucemias crónicas distinguem-se das leucemias agudas pela sua progressão mais lenta e pela acumulação excessiva de células maduras mas anómalas (Hoffbrand *et al.*, 2011).

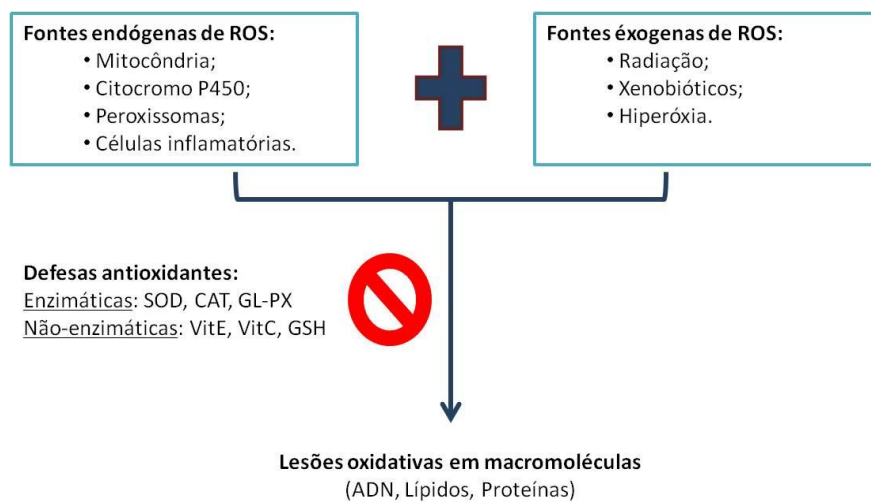
## 1.5 Stresse Oxidativo e Cancro

A produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS – *Reactive Oxygen Species*) afecta profundamente numerosas funções celulares, e a falta de mecanismos detoxificantes eficientes, que permitem remover estes radicais, pode provocar o aparecimento de diversas doenças, como por exemplo o cancro (Storz, 2005). Diversas evidências sugerem que as ROS actuam como mensageiros secundários em cascatas de sinalização intracelular, o que influencia o fenótipo oncogénico das células cancerígenas. Na verdade, estes radicais têm uma enorme variedade de acções nas células, podendo actuar como anticancerígenos, promovendo a senescência, a apoptose, a necrose e a inibição da angiogénese. Por outro lado, podem também ter uma acção pró-cancerígena, promovendo a proliferação, a angiogénese, a metastatização, e inibindo a apoptose (Halliwell, 2007) (Figura 7). Alguns estudos evidenciam o papel das ROS na iniciação tumoral mostrando que estas actuam como agentes que provocam lesões no ADN, aumentando a proporção de mutações, promovendo desta forma a transformação oncogénica (Jackson *et al.*, 2001).



**Figura 7 - Esquema representativo da origem das espécies reactivas de oxigénio (ROS) e dos seus efeitos nas células.** A activação de oncogenes, que provoca alterações enzimáticas, disfunção mitocondrial e alterações metabólicas, associada à hipóxia/reoxigenação e infiltração de macrófagos em tumores induzem a produção de ROS. Estes desempenham diversas funções na regulação da morte celular, senescência, proliferação, instabilidade do genoma, paragem do ciclo celular. (adaptado de Storz, 2005)

O stresse oxidativo ocorre numa célula ou tecido quando a concentração de espécies reactivas de oxigénio produzidas excede a capacidade antioxidante (Sies, 1991). Estas espécies podem ser produzidas endógena ou exogenamente (Figura 8). A fonte endógena de ROS tem origem no metabolismo celular (Citocromo P450), oxidação fosforilativa mitocondrial, peroxissomas e activação de células inflamatórias, enquanto a fonte exógena é referente a substâncias como citostáticos, narcóticos, hormonas, outros químicos xenobióticos (compostos estranhos a um organismo), vários metais de transição e radiação (Franco *et al.*, 2008; Klaunig *et al.*, 2010).



**Figura 8 – Esquema representativo das fontes endógenas e exógenas de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e consequências da sua acumulação.** O estabelecimento do S.O. ocorre quando a quantidade de ROS produzida nas células ultrapassa a capacidade antioxidante celular. Nesta situação ocorre lesão oxidativa das macromoléculas (ADN, Lípidos, Proteínas). CAT: Catalase; GSH: Glutaciona reduzida; GSH: Glutaciona peroxidase reduzida; SOD: Superóxido dismutase; VitC: Vitamina C; VitE: Vitamina E. (adaptado de Klaunig *et al.*, 1998)

As espécies reactivas de oxigénio podem ser divididas em dois grupos: radicais livres de oxigénio e ROS não-radicais. No primeiro grupo, englobam-se os compostos que contêm um ou mais electrões desemparelhados como o anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o radical hidroxilo ( $^{\bullet}OH$ ) e o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ). No segundo grupo, encontram-se o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), os hidroperóxidos orgânicos (ROOH) e o hipoclorito (HOCl) (Storz, 2005). O peróxido de hidrogénio é produzido por várias vias intracelulares, sobretudo através da cadeia respiratória mitocondrial, a qual também é a principal fonte do anião superóxido. A redução de um electrão do oxigénio molecular produz um intermediário relativamente estável, o anião superóxido, que pode ser



considerado o precursor da maioria das ROS. Alternativamente, o stresse oxidativo pode também ocorrer devido à diminuição da capacidade antioxidante da célula (Orrenius et al., 2007; Klaunig *et al.*, 2010). Nas células tumorais, os radicais de oxigénio também podem ser produzidos pela NADPH-oxidase, pela timidina fosforilase ou por receptores membranares que estimulam a produção de ROS pela ou na mitocôndria (Szatrowski *et al.*, 1991; Bae *et al.*, 1997).

De forma a prevenir a acumulação de ROS, a célula possui defesas antioxidantes quer enzimáticas, como as superóxido dismutases, a glutathiona peroxidase e a catalase, quer não enzimáticas, como as vitaminas E e C e a glutathiona (Storz, 2005; Klaunig *et al.*, 2010). A capacidade antioxidante da célula pode diminuir devido a modificações da expressão de genes, diminuição do seu *uptake* na dieta ou devido a uma produção excedente de ROS. O anião superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) sofre uma rápida degradação, como a maioria das ROS, e é reduzido a peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) através da superóxido dismutase (SOD). Por sua vez, o  $H_2O_2$  resultante desta reacção, pode ser convertido a radical hidroxilo pelas reacções de Fenton e Harber-Weiss, que dependem da presença de metais de transição. Adicionalmente, a enzima catalase pode converter o  $H_2O_2$  a água e oxigénio molecular. Desta forma, estes mecanismos permitem uma destoxificação celular eficaz (Hancock *et al.*, 2001; Storz, 2005; Klaunig *et al.*, 2010). No entanto, as células tumorais podem apresentar alterações das defesas antioxidantes enzimáticas, ao nível da sua expressão ou actividade.

O papel das espécies reactivas de oxigénio na etiologia do cancro é suportado por diversos estudos epidemiológicos, que por um lado evidenciam a importância dos agentes antioxidantes na inibição do desenvolvimento do cancro, e por outro mostram a relação entre a indução tumoral e a presença de metais de transição, como o ferro, que facilitam a produção de radicais livres (Kryston *et al.*, 2011; Ziech *et al.*, 2011). Por outro lado, alguns fármacos utilizados na terapêutica do cancro induzem citotoxicidade mediada por ROS e/ou stresse oxidativo (SO) (Halliwell, 2007; Ozben, 2007).

O stresse oxidativo pode provocar lesões em várias macromoléculas celulares importantes, incluindo o ADN, os lípidos e as proteínas (Klaunig *et al.*, 2010), estando

as alterações oxidativas do ADN envolvidas na carcinogénese. A principal causa de lesões provocadas no ADN é a formação do radical hidroxilo, que é extremamente reactivo. Este radical quando “ataca” o ADN pode formar múltiplos produtos mutagénicos resultantes da oxidação de purinas, pirimidinas e desoxirriboses. A formação de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG) (Figura 9) é a alteração mais estudada e pode ser usada como medida da lesão oxidativa do ADN (Klaunig *et al.*, 1998; Kryston *et al.*, 2011). A 8-OHdG é uma lesão mutagénica, uma vez que pode provocar transversões G → T, tanto em células bacterianas como em células de mamíferos. Este tipo de mutação é amplamente encontrada em oncogenes e genes supressores de tumores, em várias neoplasias (Moriya, 1993; Hussain *et al.*, 1998).

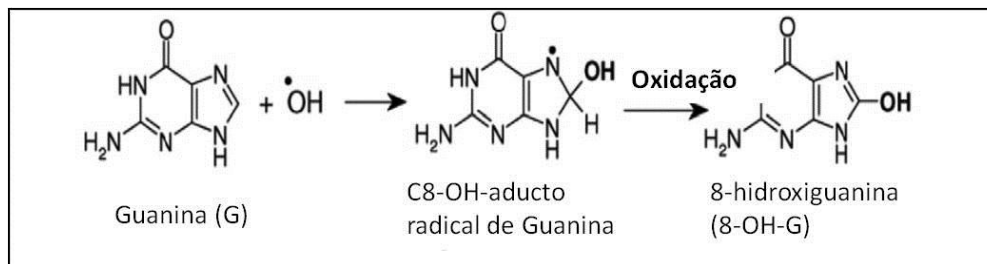


Figura 9 – Exemplo de um produto da oxidação da guanina do ADN (adaptado de Klaunig *et al.*, 2010)

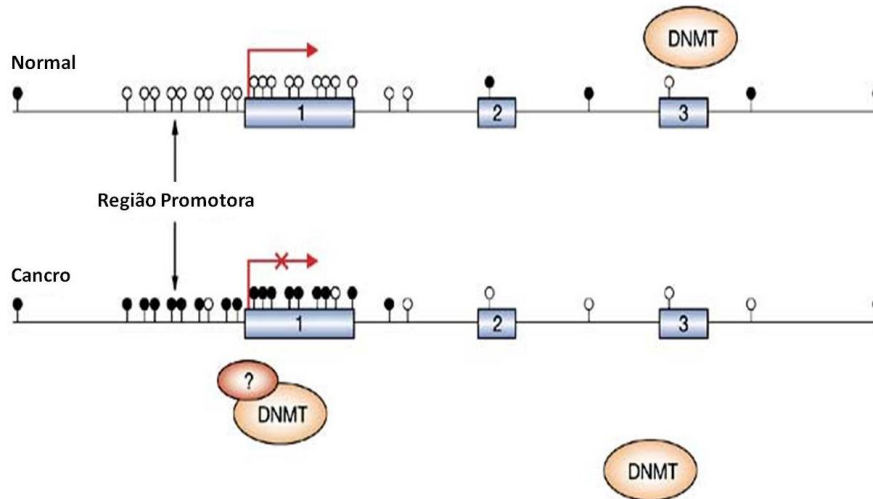
Contudo, existem outros mecanismos responsáveis pelo envolvimento das ROS na carcinogénese e no desenvolvimento tumoral, as quais podem afectar diversos processos celulares como a proliferação, senescência, inflamação ou metastização (Franco *et al.*, 2008). Por exemplo, no que diz respeito à proliferação celular, as ROS modulam a regulação do ciclo celular, através de várias proteínas como a p53, uma proteína supressora tumoral que regula o ciclo celular, ou a ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) uma cinase que participa na regulação do ciclo celular, na reparação de lesões do ADN ou na apoptose (Bensaad *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2006). O processo de metastização também pode ser influenciado pelos altos níveis de espécies reactivas de oxigénio. Este facto é suportado por vários estudos que concluíram que as células tumorais metastáticas produzem um maior quantidade de ROS quando em comparação com as células malignas primárias (Franco *et al.*, 2008).

Em conclusão, pode-se afirmar que a produção de radicais de oxigénio é uma consequência inevitável resultante dos processos aeróbicos que dão suporte à vida. No

entanto, as lesões no ADN provocadas por estes radicais têm sido um importante alvo de estudo na investigação do cancro (Marnett, 2000).

### 1.6 Epigenética e Cancro

Do ponto de vista histórico, a epigenética é definida como um evento que não pode ser explicado pelos princípios genéticos (Goldberg *et al.*, 2007). Actualmente, a epigenética é descrita como sendo uma alteração hereditária na expressão génica, que ocorre independentemente das modificações da sequência nucleotídica do ADN (Momparker, 2003; Sharma *et al.*, 2010). As modificações epigenéticas ocorrem habitualmente em dinucleótidos CpG e dividem-se em duas categorias: metilação/desmetilação do ADN e modificações de histonas (acetilação/desacetilação, metilação/desmetilação, fosforilação, ubiquitinação) (Bernstein *et al.*, 2007). Estes eventos epigenéticos têm um papel bastante importante no desenvolvimento e progressão do cancro, sendo que as principais modificações epigenéticas que ocorrem durante a carcinogénese são alterações do padrão de metilação de genes supressores de tumores e as alterações das histonas na cromatina, nomeadamente a perda de acetilação e metilação (Yoo & Jones, 2006; Ellis *et al.*, 2009). Por exemplo, quando o ADN de regiões promotoras está metilado, os genes são inactivados e silenciados (Bird, 2002; Jones *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2010), estando este processo muitas vezes desregulado nas células tumorais (Figura 10). De facto, a hipermetilação localizada nas regiões promotoras de genes e a hipometilação global do genoma podem contribuir para a inactivação da transcrição/tradução ou para a instabilidade genómica, respectivamente (Yoo & Jones, 2006). O silenciamento epigenético através da hipermetilação está presente em diversos tipos de cancro, em particular nas neoplasias hematológicas, como a Síndrome Mielodisplásica (Baylin, 2005).



**Figura 10 - Padrão Epigenético das regiões promotoras de genes em células normais e células cancerígenas.** Nas células normais, a maioria dos dinucleótidos CpG estão metilados (círculos a preto), enquanto as ilhas CpG (regiões do genoma com uma elevada frequência de dinucleótidos CpG), que se encontram na região promotora dos genes, estão desmetiladas (círculos brancos). Nas células cancerígenas, as ilhas CpG encontram-se hipermetiladas, o que resulta no silenciamento genético, enquanto se verifica uma hipometilação global. Os círculos brancos (°) representam os dinucleótidos CpG não-metilados e os círculos pretos (●) representam os dinucleótidos CpG hipermetilados. Os números 1,2 e 3 referem-se a exões. (adaptado de Baylin, 2005)

Os padrões de metilação são estabelecidos ainda durante o desenvolvimento e são, normalmente, mantidos ao longo da vida. Contudo, durante o envelhecimento podem existir alterações nestes padrões, o que conduz ao controlo menos rigoroso da expressão genética, aumentando consequentemente a instabilidade genómica (Yoo & Jones, 2006).

O processo de metilação do ADN é efectuado por uma família de enzimas, as Metiltransferases do ADN (DNMTs), que adicionam grupos metilo provenientes da S-adenosilmetionina (SAM), através de ligações covalentes, ao carbono 5' do anel de citosina, originando 5'-metilcitosina (Bird, 2002, Huang *et al.*, 2010) (Figura 11). Nos mamíferos, esta alteração observa-se em cerca de 4% do genoma, e encontra-se essencialmente nos dinucleótidos citosina-guanosina (locais de CpG) (Baylin, 2005). Estes locais CpG estão pouco representados no genoma total, devido à ocorrência de desaminação da 5'-metilcitosina em timina (Takai *et al.*, 2002). No entanto, são encontrados mais frequentemente em pequenas áreas do ADN, chamados ilhas CpG, que correspondem a regiões com 500 pares de bases e com uma alta concentração de CpG (Yoo & Jones, 2006). Estas ilhas são tipicamente encontradas nas regiões

promotoras de alguns genes, ou perto destas, onde se inicia a transcrição. O *imprinting* de genes e a inactivação do cromossoma X são exemplos de silenciamento génico devido à metilação das ilhas CpG (Jones *et al.*, 1999).

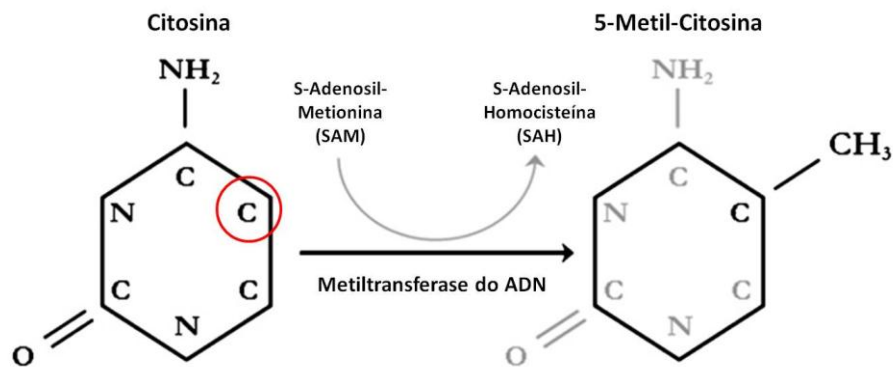


Figura 11 – Reacção de Metilação das citosinas do ADN (adaptado de Meda *et al.*, 2011).

Os grupos metilo não afectam o emparelhamento de bases, no entanto podem influenciar as interacções do ADN com proteínas (Razin *et al.*, 1980), o que sugere que a metilação do ADN inibe a transcrição devido à diminuição da afinidade dos factores de transcrição pelo local de iniciação da mesma (Jones *et al.*, 1999). Deste modo, a metilação do ADN mantém a inactivação da transcrição em zonas do genoma não condicantes, que se encontram por exemplo quando a cromatina está num estado condensado e altamente metilado, que se denomina heterocromatina. Por outro lado, a eucromatina não está metilada nas zonas promotoras, estando por isso num estado favorável à transcrição (Ting *et al.*, 2009; Baylin, 2005). O processo de metilação também pode provocar desaminações espontâneas, aumentando assim a ligação do ADN a agentes cancerígenos, o que aumenta a taxa de mutações e inactivação genética (Baylin, 2005).

A metilação anómala de genes supressores de tumores ocorre, aparentemente, na fase inicial do desenvolvimento tumoral e aumenta de forma progressiva, o que pode levar ao aparecimento do fenótipo maligno e sua manutenção (Momparker, 2003; Yoo & Jones, 2006). Como já foi referido, a adição de grupos metilo a resíduos de citosina é efectuada pelas metiltransferases do ADN (DNMTs), nomeadamente as DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b e DNMT3L (Baylin, 2005; Yoo & Jones, 2006). Estas

proteínas são responsáveis pela metilação *de novo* (DNMT3a, DNMT3b, DNMT3L) bem como pela manutenção dos padrões de metilação (DNMT1, DNMT2) (Yoo & Jones, 2006; Bird, 2002).

Recentemente, foram identificadas uma família de proteínas da família TET (*Ten-eleven translocation*), altamente expressas nas células estaminais embrionárias (ESC) e no sistema hematopoiético, em particular as proteínas TET2. Estas proteínas desempenham função de dioxigenase de metilcitosina (Hussein *et al.*, 2010; Strausberg *et al.*, 2002), catalisando a conversão de 5-metilcitosina (5mC) em 5-hidroximetilcitosina (5hmC), parecendo assim desempenhar um papel na regulação epigenética (Tahiliani *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2010).

Apesar da função exacta da 5hmC não ser totalmente conhecida, Valinluck *et al.* (2004) demonstraram que previne a metilação da citosina quando a reacção é mediada pela DNMT1 e que proteínas que se ligam a ilhas CpG metiladas, nomeadamente as MeCP2 (*methyl-CpG-binding protein 2*), têm afinidade reduzida pela 5hmC. Assim, a hidroxilação da 5mC parece interferir com a manutenção do padrão de metilação durante a divisão celular promovendo um processo de desmetilação passiva. Por outro lado, Tahiliani *et al.*, (2009), identificaram uma glicosilase do ADN específica para a 5hmC, e propuseram que esta possa ser um intermediário chave numa via de desmetilação activa envolvida num processo de reparação do ADN. No entanto, a 5hmC é dependente da 5mC pré-existente e a proporção entre estas é diferente em diferentes regiões genómicas. Assim, o equilíbrio entre a hidroximetilação e a metilação do genoma parece estar intrinsecamente ligado ao equilíbrio entre a pluripotencia e o compromisso na linhagem, regulando o potencial de diferenciação de linhagem nas ESC e no sistema hematopoiético (Ko *et al.*, 2010; Kian Peng *et al.*, 2011).

Estudos efectuados por Ko *et al.*, (2010) em amostras de ADN genómico extraído de medula óssea de doentes com neoplasias hematológicas, quando comparadas com amostras de controlos saudáveis, evidenciaram níveis significativamente baixos de 5hmC e hipometilação na maioria das áreas CpG. Uma vez que a metilação do ADN é um mecanismo reversível, torna-se um importante alvo de tratamento das neoplasias hematológicas. Assim, a terapia epigenética tem como objectivo restabelecer os

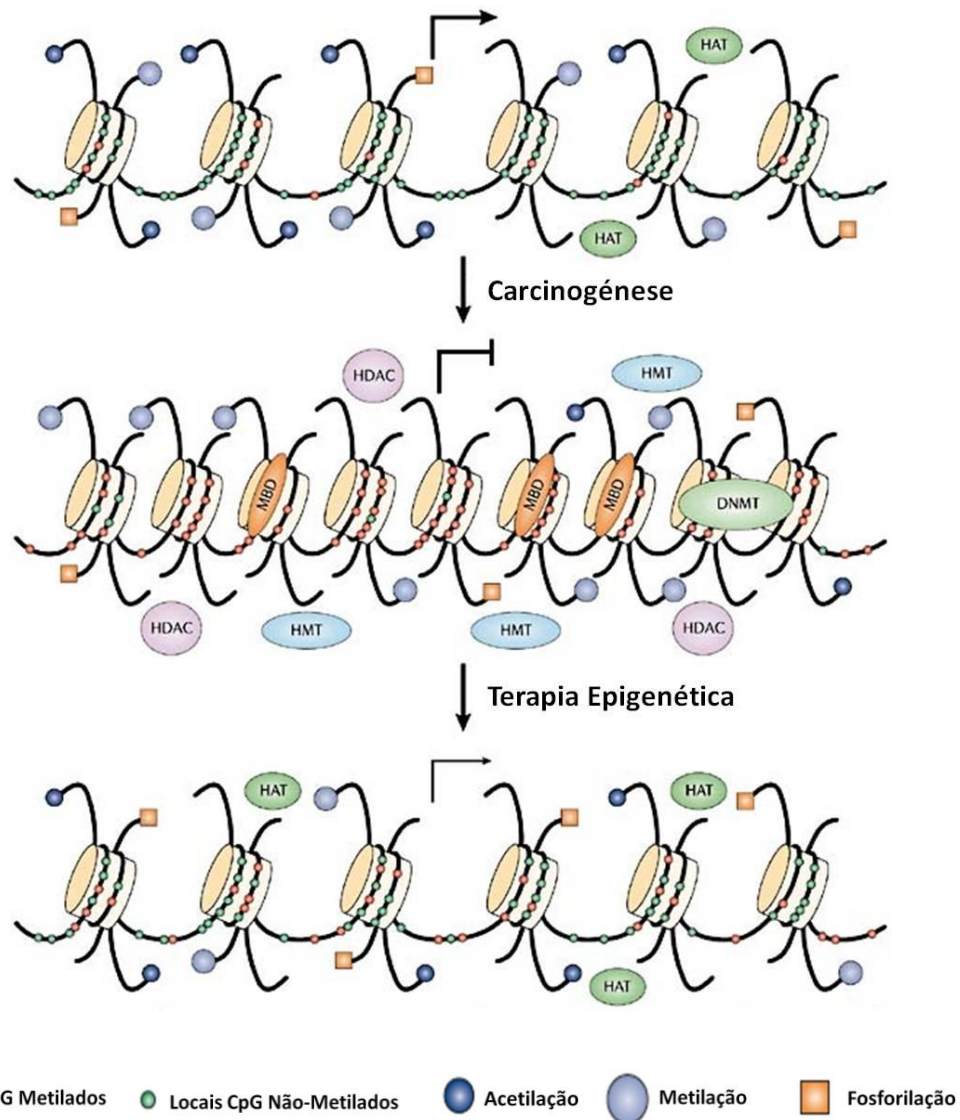
padrões normais de metilação do ADN usando agentes que promovem a desmetilação, como por exemplo 5-aza-2'-desoxicitidina (Yoo & Jones, 2006).

A estrutura da cromatina e a sua reorganização nas regiões promotoras também afectam a metilação do ADN e a actividade da transcrição, regulando assim a expressão de determinados genes (Momparler, 2003). Factores, como a organização dos nucleossomas e a acetilação/desacetilação de histonas, regulam o processo de metilação e a transcrição, o que afecta a ligação dos factores de transcrição (Baylin, 2005). A unidade básica estrutural da cromatina é o nucleossoma, o qual consiste num octómero de histonas onde o ADN se encontra enrolado (146 pares de bases à volta de cada grupo de histonas). O terminal amínico da cauda das histonas pode sofrer modificações pós-tradução, como acetilações ou desacetilações, o que altera a configuração dos nucleossomas (Momparler, 2003; Yoo & Jones, 2006, Stimson *et al.*, 2009). Tais modificações específicas das histonas podem ser usadas como marcadores de actividade da eucromatina ou heterocromatina.

A acetilação de histonas, associada com a metilação, regula a transcrição de genes, pois este processo é necessário para manter a cromatina num estado acessível a factores de transcrição, ou seja, permitindo a expressão genética (Figura 12) (Baylin, 2005). A carga positiva das lisinas não-acetiladas nas histonas, é atraída pela carga negativa do ADN, promovendo a compactação da cromatina e reprimindo a transcrição. Por outro lado, a acetilação de histonas remove a sua carga positiva, o que resulta num estado activo da cromatina (Momparler, 2003).

O processo de acetilação/desacetilação é efectuado por dois grupos de enzimas: acetiltransferases de histonas (HATs), que catalisam a transferência de grupos acetilo para resíduos de lisina; e desacetilases de histonas (HDACs), que efectuem a sua remoção (Stimson *et al.*, 2009; Yoo & Jones, 2006) e mantêm os resíduos desacetilados, garantindo o silenciamento da transcrição. Tem sido demonstrado que compostos inibidores de HDACs inibem a desacetilação de histonas em células tumorais humanas, sendo por isso um agente antiproliferativo eficaz (Stimson *et al.*, 2009, Baylin, 2005). As neoplasias hematológicas são particularmente sensíveis a este

tipo de inibidores porque o tratamento com estes agentes resulta numa paragem do crescimento celular, diferenciação ou apoptose (Baylin, 2005).



**Figura 12 - Esquema que representa o silenciamento epigenético nas células cancerígenas.** Nos mamíferos, tanto a metilação do ADN como a modificação de histonas contribuem para a inibição da expressão de genes. A formação da eucromatina é favorecida pela hipometilação da região promotora e acetilação de resíduos de lisina. Na tumorigénese, há um aumento da ligação de grupos metil nas zonas promotoras (hipermetilação) e um aumento da actividade de deacetilases e metiltransferases de histonas, o que leva ao silenciamento da expressão genética. DNMT: DNA Methyltransferase ; HAT: Histone Acetyltransferase; HMT: Histone Methyltransferase; HDAC: Histone deacetylase. (adaptado de Yoo & Jones, 2006)

Em suma, o significado biológico do processo de metilação do ADN e modificação de histonas na regulação da expressão génica, e o seu papel no desenvolvimento do cancro, torna-se cada vez mais importante. O uso de inibidores da metilação do ADN e da desacetilação de histonas pode ser um alvo terapêutico na reactivação epigenética



de genes envolvidos na carcinogénese, restabelecendo a normal função genética das células (Baylin, 2005).

### 1.7 Envolvimento do Stresse Oxidativo na Metilação do ADN

A interacção entre as células e o seu ambiente extracelular é um componente fundamental do comportamento celular, uma vez que regula a expressão génica, o crescimento celular, a diferenciação, a migração celular, entre outras funções celulares (Campos *et al.*, 2007). São várias as condições adversas que induzem aumento do stresse celular, provocando lesões nos seus diversos constituintes, como o ADN, lípidos ou proteínas. As alterações provocadas no ADN pelo excesso de espécies reactivas de oxigénio são responsáveis pelo aumento da taxa de mutações e desenvolvimento oncogénico, como mencionado (Lee *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2007).

O stresse oxidativo pode contribuir para o desenvolvimento do tumor, através de mecanismos tanto genéticos como epigenéticos, afectando a expressão de genes (Franco *et al.*, 2008). As alterações genéticas provocadas pelas ROS, como mutações ou rearranjos cromossómicos, têm um papel crucial na fase inicial da carcinogénese, enquanto os mecanismos epigenéticos, que perturbam a expressão dos genes, afectam a promoção tumoral, através da estimulação do crescimento e proliferação celular (Guyton *et al.*, 1993; Crawford *et al.*, 1995; Lim *et al.*, 2008). A produção de radicais hidroxilo pode provocar lesões no ADN, nomeadamente deleções, quebra da cadeia de ADN e modificações de bases nucleotídicas, as quais alteram a interacção desta macromolécula com as DNMTs, o que pode resultar num estado de hipometilação (Franco *et al.*, 2008). A presença de 8-OHdG nas ilhas CpG, que resulta da oxidação do ADN, inibe a metilação de citosinas e, por conseguinte, a formação de 5hmc, interferindo na regulação da expressão de genes (Weitzman *et al.*, 1994; Valinluck *et al.*, 2004).

Por outro lado, a oxidação da 5-metilcitosina pode contribuir para o aumento de mutações nas ilhas CpG, como por exemplo através de transições C → T. Os radicais de oxigénio reagem com a citosina metilada o que provoca a oxidação de uma dupla

ligação 5,6, resultando dessa reacção um composto denominado 5-metilcitosina glicol (Lee *et al.*, 2002). Este produto intermediário sofre uma desaminação e forma timina glicol, o qual é um composto quimicamente muito estável que bloqueia a transcrição e pode emparelhar com a adenina (Zuo *et al.*, 1995). Outro exemplo de uma lesão no ADN provocada pelo stresse oxidativo é a produção de O<sup>6</sup>-metilguanina. A sua presença pode dificultar a ligação das metiltransferases do ADN, inibindo a metilação de citosinas adjacentes, resultando num estado de hipometilação, o que leva à activação de oncogenes (Franco *et al.*, 2008). Por outro lado, o stresse oxidativo também pode resultar na formação de cadeias simples de ADN que podem sofrer metilação *de novo*, contribuindo para a alteração dos padrões de metilação (Franco *et al.*, 2008).

Podemos então concluir que a alteração dos padrões de metilação do ADN pode contribuir para o processo carcinogénico, sendo bastante frequente em doenças neoplásicas humanas. Por outro lado, o stresse oxidativo pode provocar lesões do ADN que também contribuem para o desenvolvimento do cancro quer directamente, quer através da sua interferência nos mecanismos epigenéticos responsáveis pelo controlo da transcrição/tradução (Cerdea *et al.*, 1997; Ziech *et al.*, 2011), podendo ainda interferir na resposta à terapêutica e contribuir para a recidiva da doença.

## **1.8 Objectivos**

Tentado responder a algumas questões ainda por esclarecer à cerca do papel do stresse oxidativo em neoplasias hematológicas e a sua relação com a epigenética, os principais objectivos deste trabalho foram avaliar o papel das espécies reactivas de oxigénio, em particular do peróxido de hidrogénio e do anião superóxido, nos mecanismos de morte celular de células de leucemia linfoblástica aguda em cultura e a sua relação com os níveis de 5-hidroximetilcitosina, de forma a perceber a importância destas alterações e suas repercussões no tratamento da doença.



***Material e  
Métodos***

---



## 2.1 Estudos realizados numa Linha Celular de Neoplasia Hematológica

### 2.1.1 Cultura da linha celular

Neste estudo foi utilizada uma linha celular de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), as células CEM, obtidas na *American Type Culture Collection* (ATCC). Esta linha celular foi estabelecida a partir de células linfoblásticas obtidas a partir do sangue periférico de uma doente do sexo feminino, com 4 anos de idade, com diagnóstico de LLA (Foley *et al.*, 1965).

Assim, as células foram mantidas em cultura no meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI 1640) a pH 7,4, contendo 2 mM de L-Glutamina, 20 mM de HEPES-Na, 1,5 g/l de NaHCO<sub>3</sub>, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, e enriquecido com soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen) a 10%. As células foram propagadas e mantidas em cultura à temperatura de 37°C numa atmosfera humedecida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, iniciando-se a cultura a uma densidade entre 0,3 e 0,5 milhões de células por ml (0,5x10<sup>6</sup> cel/ml).

### 2.1.2 Incubação da linha celular com Peróxido de Hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e Menadiona

As células CEM foram mantidas em cultura nas condições referidas na secção 2.1.1, na ausência e na presença de diferentes concentrações de Peróxido de Hidrogénio e de Menadiona (um dador de anião superóxido – O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), como mostra a Tabela 1, durante um período de 72h.

Tabela 1 – Concentrações de Peróxido de Hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e Menadiona

	Concentração (µM)					
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,1	5	10	25	50	100
Menadiona	2	5	7,5	10	15	

As células foram mantidas em frascos ou em placas de cultura dependendo da quantidade de células necessárias aos estudos posteriores, e numa densidade celular inicial de 0,5 milhões de células por ml ( $0,5 \times 10^6$  cel/ml).

### **2.1.3 Análise da Morfologia Celular**

A análise das características morfológicas da linha celular referida na secção 2.1.1, incubada na ausência e na presença dos compostos em estudo, foi efectuada por microscopia óptica após a realização de esfregaços de células e respectiva coloração com corante de *May-Grünwald-Giemsa* (Sigma-Aldrich).

Assim, os esfregaços foram preparados a partir da recolha de 50.000 células, centrifugadas durante 5 minutos a 300xg e lavadas, por centrifugação similar à anterior, com tampão fosfato (PBS). De seguida, as células obtidas foram ressuspensas num pequeno volume de soro fetal bovino, para melhorar a adesão das células à lâmina, e foi realizado o esfregaço (Houwen, 2001).

Desta forma, os esfregaços obtidos foram corados durante 3 minutos com a solução de *May-Grünwald* (preparada em 0,3% de metanol e diluída da proporção de 1:1 com água destilada, na altura da utilização). De seguida, adicionou-se solução de *Giemsa* (1 grama de corante de *Giemsa* dissolvido em 66 ml de glicerol e 66 ml de metanol, diluído na proporção de 1:8 com água destilada, aquando da utilização) durante 15 minutos. Seguidamente, procedeu-se à lavagem dos esfregaços com água destilada e, após secagem, a morfologia das células foi analisada por microscopia óptica e fotografada. Para este efeito utilizou-se um Microscópio Óptico *Axioskop 2* (Zeiss) que permitiu a aquisição de imagens e o seu processamento no programa *AxioVision LE*.

### **2.1.4 Análise da densidade e da viabilidade celular**

Os estudos de densidade e viabilidade celular permitem avaliar os efeitos exercidos pelos compostos em estudo no crescimento e na morte celular da linha celular anteriormente referida. Assim, para avaliar estes parâmetros e efectuar curvas dose-

resposta recorreu-se ao teste de exclusão com o corante vital azul de tripano (*Trypan Blue*, TB). Este teste baseia-se na diferença de permeabilidade membranar das células viáveis e das células mortas. Desta forma, as células viáveis apresentam a membrana plasmática intacta que é impermeável ao corante, o que impede a sua entrada para o citoplasma. Por outro lado, as células mortas apresentam destruição total ou parcial da membrana plasmática sendo, portanto, permeáveis ao azul de tripano, possibilitando a sua entrada para o citoplasma. Quando visualizadas ao microscópio, as células mortas apresentam uma coloração azul (Adaptado de Gonçalves, A.C., 2008). A contagem das células é feita através de um hemocítmetro ou câmara de Neubauer, utilizando um microscópio óptico de luz invertida. O perfil de crescimento da linha celular foi obtido através da aplicação deste teste. Assim, as células foram plaqueadas com uma densidade inicial de 0,5 milhões de células por ml, durante 72 horas. A cada período de 24 horas, foi retirada uma alíquota de suspensão celular e feita a contagem das células vivas e mortas e determinada a densidade (número de células vivas) e a viabilidade celulares (percentagem de células vivas em relação ao total de células, vivas e mortas) . Os resultados apresentam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 ensaios independentes.

### **2.1.5 Análise da morte celular por citometria de fluxo**

A técnica de Citometria de Fluxo permite analisar e quantificar células, ou outras partículas biológicas (núcleos, microrganismos, cromossomas, etc.), baseada na dispersão de luz e na fluorescência emitida por fluorocromos, que podem estar ligados a anticorpos ou outros compostos. Por outro lado, é também possível utilizar sondas fluorescentes que se liguem a diferentes componentes celulares, como o ADN ou o ARN (Brown & Wittwer, 2000; Gonçalves, A.C., 2008).

A morte celular foi avaliada por citometria de fluxo através da dupla marcação com anexina V (ligada ao fluorocromo alofocianina – anexina V-APC) em combinação com o iodeto de propídeo (IP). Assim, com esta técnica é possível distinguir as células viáveis das células mortas e, dentro destas, as células em apoptoses e/ou necrose.



A apoptose é uma forma de morte celular programada que desempenha um papel fundamental na homeostase dos tecidos. Durante o processo apoptótico, a célula sofre uma série de alterações moleculares, entre as quais a alteração da distribuição dos fosfolípidos da bicamada lípida. Durante a fase inicial da apoptose, a fosfatidilserina (PS), um fosfolípido de carga negativa, sofre uma translocação do folheto interno para o folheto externo da membrana celular. Assim, a anexina V, uma molécula com elevada afinidade para fosfolípidos de carga negativa, liga-se fortemente à fosfatidilserina na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e, quando conjugada com um fluorocromo, permite identificar as células em apoptose inicial. O iodeto de propídeo é um composto que se intercala na dupla cadeia de ADN emitindo fluorescência. No entanto, entra para o interior das células apenas quando estas apresentam perda da integridade membranar, ou seja se encontram em necrose e/ou apoptose tardia.

Desta forma, quando as células são expostas a esta dupla marcação, torna-se possível distinguir as células viáveis (não marcadas), 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 apenas com IP) (Engeland *et al.*, 1998; Gonçalves, A.C, 2008).

Assim, nas células CEM expostas, durante 24 horas, à ausência e à presença dos compostos anteriormente descritos, foi avaliada a viabilidade e o tipo de morte celular. Para isso, recolheu-se o volume equivalente a 1 milhão de células da suspensão celular e lavou-se com tampão fosfato (PBS) por centrifugação durante 5 minutos a 1000xg. O sedimento foi ressuspenso em 100  $\mu\text{l}$  de tampão de ligação frio e incubado com 5  $\mu\text{l}$  de anexina V-APC e 2  $\mu\text{l}$  de IP, durante 15 minutos ao abrigo da luz, de acordo com o descrito pelo fabricante (BD). De seguida, adicionou-se 400  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação e realizou-se a análise num citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickison) equipado com um laser de árgon. Os comprimentos de onda de excitação utilizados foram 785 nm e 640 nm para a anexina V-APC e para o IP, respectivamente.

Foram adquiridas 10.000 células através do programa CellQuest™ (BD) e os dados obtidos foram analisados com recurso ao programa Paint-a-Gate™ (BD). Os resultados

são expressos em percentagem de cada uma das subpopulações celulares identificadas com base na positividade e/ou negatividade para a marcação com a anexina V e IP.

### **2.1.6 Avaliação do stresse oxidativo pela produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e expressão de glutatião reduzido (GSH)**

De modo a avaliar o papel do stresse oxidativo nas células CEM, foi analisada a presença de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e da defesa anti-oxidante GSH (glutatião reduzido) através da técnica de citometria de fluxo. Para isso foram utilizadas as sondas 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) e dihidroetidina (DHE), para analisar a expressão intracelular do peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e do anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), respectivamente. A expressão de GSH foi efectuada recorrendo ao alaranjado de mercúrio.

#### **2.1.6.1 Avaliação da produção intracelular de peróxidos**

A expressão de peróxidos na linha celular CEM, incubada na ausência e na presença dos compostos em estudo, foi analisada por citometria de fluxo seguindo a oxidação intracelular da sonda não-fluorescente DCFH-DA. A sonda não-polar DCFH-DA, quando aplicada às células intactas, atravessa a membrana celular e sofre uma hidrólise enzimática por esterases intracelulares, o que dá origem ao composto não-fluorescente DCFH. Na presença de peróxidos, o composto DCFH é oxidado e forma o composto altamente fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), que é facilmente visualizado pela emissão de fluorescência no comprimento de onda de 525 nm quando excitado a 488 nm (Halliwell & Witheman, 2004). A fluorescência emitida é directamente proporcional à concentração de  $H_2O_2$  (Wang & Joseph, 1999).

De modo a analisar a produção intracelular de  $H_2O_2$ , recolheu-se o volume equivalente a 1 milhão de células de suspensão celular e lavou-se com tampão fosfato (PBS) pH=7,4 por centrifugação durante 5 minutos a 300xg. De seguida, as células foram ressuspensas em 1 ml de PBS e incubadas, durante 45 minutos a 37°C em atmosfera apropriada e ao abrigo da luz, com 1  $\mu$ l de DCFH-DA (Molecular Probes,

Invitrogen), dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) a 1 mM, de forma a obter uma concentração final de 5  $\mu$ M. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS por centrifugação durante 5 minutos a 300xg, ressuspensas em 400  $\mu$ l do mesmo tampão e analisadas num citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickison), equipado com laser de árgon, utilizando o comprimento de onda de excitação de 525 nm.

Foram adquiridas 10.000 células através do programa CellQuest™ e os dados obtidos foram analisados e quantificados com recurso ao programa Paint-a-Gate™. Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP) de 3 ensaios independentes.

#### **2.1.6.2 Avaliação da produção intracelular do anião superóxido**

A avaliação da produção intracelular do anião superóxido nas células da linha celular de LLA, incubadas na ausência e na presença dos compostos em estudo, foi efectuada por citometria de fluxo com recurso à sonda dihidroetidina (DHE). A sonda DHE, obtida pela redução com dois electrões do etídeo, consegue atravessar facilmente a membrana celular e na presença do anião superóxido, é convertida a etídeo, um composto fluorescente de cor vermelha que se intercala no ADN e permanece no interior da célula (Zhao *et al.*, 2005).

Assim, recolheu-se o volume equivalente a 1 milhão de células em suspensão celular, lavou-se com tampão fosfato (PBS) pH=7,4 por centrifugação durante 5 minutos a 300xg e o sedimento foi ressuspenso em 1 ml do mesmo tampão. Seguidamente, as suspensões celulares foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com 2  $\mu$ l de DHE (Sigma-Aldrich), preparado em dimetilsulfóxido (DMSO) a 1 mM, de modo a obter uma concentração final de 5  $\mu$ M. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS por centrifugação durante 5 minutos a 300xg, ressuspensas em 400  $\mu$ l do mesmo tampão. A detecção foi efectuada por citometria de fluxo, com recurso ao equipamento já descrito anteriormente e utilizando o comprimento de onda de excitação de 620 nm. Os resultados são

expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP) de 3 ensaios independentes.

### **2.1.6.3 Avaliação da expressão intracelular do glutatião reduzido**

A análise da expressão do glutatião reduzido (GSH), uma defesa antioxidante não-enzimática, foi efectuada por citometria de fluxo utilizando o composto fluorescente alaranjado de mercúrio (1-(4-Chloromercuriophenylazo)-2-naphthol). O alaranjado de mercúrio é um composto mercurial que se liga estequiometricamente a grupos sulfidril, o que provoca a formação de ductos fluorescentes. Contudo, este composto reage mais rapidamente com o GSH (reacção ocorre em aproximadamente 5 minutos) do que com os grupos sulfidril das proteínas (tempo de reacção superior a 8 horas). Com base neste princípio foi desenvolvida uma técnica que permite a determinação dos níveis de GSH por citometria de fluxo através da utilização do alaranjado de mercúrio, uma vez que o produto de reacção com a GSH emite fluorescência vermelha, quando excitado com um laser de árgon no comprimento de onda de 488 nm (O'Connor *et al.* 1988).

Para o efeito, foi recolhido o volume equivalente a 1 milhão de células sujeitas aos diferentes tratamentos, e este foi lavado com tampão fosfato (PBS) pH=7,4 por centrifugação durante 5 minutos a 300xg e posteriormente ressuspensão em 1 ml do mesmo tampão. De seguida, as suspensões celulares foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com 1  $\mu$ l de alaranjado de mercúrio (Sigma-Aldrich), preparado em acetona a 10 mM, de modo a se obter uma concentração final de 40  $\mu$ M. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 300 xg durante 5 minutos e ressuspensas em 400  $\mu$ l do mesmo tampão. A detecção foi efectuada no comprimento de onda de excitação de 620 nm, por citometria de fluxo usando o equipamento descrito anteriormente. Os resultados são expressos em MIF e representam a média de expressão intracelular de GSH nas células incubadas nas condições do estudo. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP) de 3 ensaios independentes.

### **2.1.7 Avaliação da expressão de moléculas envolvidas na morte celular**

A avaliação da expressão das moléculas envolvidas nos processos de morte celular permite concluir sobre os mecanismos desencadeados pelos compostos em estudo a que as células foram expostas. Através da técnica de citometria de fluxo, e com recurso a anticorpos monoclonais associados a fluorocromos, foram analisados os níveis de expressão das proteínas pró-apoptóticas FAS, FAS Ligando, BAX e Caspases e da proteína anti-apoptótica BCL-2. Desta forma, o volume equivalente a 1 milhão de células incubadas nas condições referidas anteriormente, foi lavado por centrifugação com tampão fosfato (PBS) pH=7,4 durante 5 minutos a 300xg.

A expressão do receptor FAS e do seu ligando é avaliada na superfície da membrana celular. Para tal, as suspensões celulares foram incubadas, durante 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com 1 µg do anticorpo anti-FAS FITC (R&D) e 1 µg do anticorpo anti-FAS ligando ficoeritrina (PE) (Santa Cruz Biotechnology). Após o período de incubação, as células foram lavadas por centrifugação com PBS (pH=7,4) durante 5 minutos a 300xg e ressuspensas em 400 µl do mesmo tampão.

Por outro lado, a avaliação da expressão intracelular de BAX e BCL-2 requer a fixação e a permeabilização das células a analisar. Assim, de acordo com as instruções do fabricante do *kit* IntraCell (ImmunoStep), as células foram incubadas, durante 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com 100 µl de solução de fixação. Após lavagem, por centrifugação com PBS (pH=7,4) durante 5 minutos a 300xg, as células foram incubadas com 100 µl da solução de permeabilização, 1 µg do anticorpo anti-BAX PE (Santa Cruz Biotechnology) e 1 µg do anticorpo anti-BCL2 FITC (Santa Cruz Biotechnology), durante 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. De seguida, as células foram lavadas por centrifugação com PBS (pH=7,4) durante 5 minutos a 300xg e ressuspensas em 400 µL do mesmo tampão.

Finalmente, os níveis das caspases activadas presentes nas células foram analisados através do *kit* ApoStat (R&D Systems). Desta forma, após lavagem inicial das células, estas foram ressuspensas em 1 ml de PBS e incubadas com 10 µl de ApoStat,

durante 30 minutos a 37°C. Seguidamente, as células foram lavadas por centrifugação em 4 ml de PBS durante 5 minutos a 300xg e ressuspensas em 500 µl do mesmo tampão.

A detecção foi efectuada por citometria de fluxo usando o equipamento já descrito anteriormente. Os resultados são expressos em MIF e representam a média de expressão das caspases activadas nas células em estudo. Os resultados representam a média ± desvio padrão (DP) de 3 ensaios independentes.

### 2.1.8 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_{mit}$ ), cuja perda é característica do processo de morte celular por apoptose, foi avaliado por citometria de fluxo através da utilização da sonda fluorescente 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC1). Esta sonda é um catião lipofílico que atravessa facilmente as membranas biológicas, acumulando-se no interior da mitocôndria. Quando ocorre diminuição do  $\Delta\Psi_{mit}$ , ou seja, quando a membrana mitocondrial está despolarizada, a sonda JC1 permanece no citoplasma, sob a forma monomérica (M) e exibe fluorescência verde. Por outro lado, quando há o aumento do  $\Delta\Psi_{mit}$ , os monómeros de JC1 entram na mitocôndria formando agregados (A) que exibem fluorescência vermelha (Salvioli *et al.*, 1997; Yao *et al.*, 2008). Assim, a estimativa do  $\Delta\Psi_{mit}$  é determinada pela razão entre a intensidade da fluorescência verde e vermelha, ou seja, pela razão Monómeros/Agregados.

Para tal, da mesma forma que nos procedimentos anteriores, o volume equivalente a 1 milhão de células sujeitas aos diferentes tratamentos, foi lavado por centrifugação com PBS pH=7,4 durante 5 minutos a 300xg. De seguida, as células foram ressuspensas em 1 ml do mesmo tampão e incubadas durante 15 minutos a 37°C, em atmosfera apropriada e ao abrigo da luz, com 1 µl de JC1 (Molecular Probes, Invitrogen), preparado em DMSO a 5 mg/ml, de modo a obter uma concentração final de 5 µg/ml. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas por centrifugação com PBS durante 5 minutos a 300xg e ressuspensas em 400 µl do mesmo tampão.

A detecção foi efectuada por citometria de fluxo usando o equipamento já descrito anteriormente. Os resultados representam a média da razão entre os MIF dos monómeros e dos agregados de JC1 (M/A de JC1). Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão (DP) de 3 ensaios independentes.

### **2.1.9 Análise do ciclo celular**

O ciclo celular, dividido em quatro fases como referido anteriormente, foi analisado por citometria de fluxo através da solução de Iodeto de Propídeo/RNase (Immunostep). O IP liga-se à molécula de ADN, intercalando-se na sua cadeia dupla, e emite fluorescência de modo dependente da quantidade de ADN presente. Além da quantificação do conteúdo de ADN, esta técnica permite também determinar a distribuição da população celular pelas diferentes fases do ciclo. Isto é possível através da identificação de três grupos de células: um com menor quantidade de ADN, correspondente ao pico G0/G1, outro com o dobro da quantidade de ADN, com uma fluorescência dupla da do primeiro, correspondendo às células em fase G2/M, e um terceiro grupo com uma quantidade de ADN intermédia e que corresponde às células em fase de síntese (S).

Assim, da mesma forma que nos procedimentos anteriores, o volume equivalente a 1 milhão de células sujeitas aos vários tratamentos, foi lavado por centrifugação com PBS a pH=7,4 durante 5 minutos a 300xg. De seguida, as células foram fixadas através da adição de 200  $\mu$ l de etanol a 70%. Após o tempo de incubação de 30 minutos a uma temperatura de 4°C, as células foram lavadas por centrifugação com PBS durante 5 minutos a 300xg e ressuspensas em 500  $\mu$ l da solução de Iodeto de Propídeo/RNase. Após um tempo de incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, a análise foi efectuada por citometria de fluxo, usando o equipamento já descrito anteriormente.

### 2.1.10 Extração e quantificação de ADN genómico

O ADN genómico das células CEM foi obtido através da técnica de adsorção em matriz de sílica com recurso ao kit *Illustra™ Tissue & Cells genomicPrep Mini Spin* (GE Healthcare). Esta técnica baseia-se na capacidade de adsorção dos ácidos nucleicos a formulações de sílica de modo dependente do pH e da concentração salina, o que permite a obtenção de amostras de ADN de elevada pureza e integridade física.

Assim, o volume equivalente a 5 milhões de células incubadas na ausência e na presença de diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e menadiona, foi centrifugado durante 1 minuto a 2300xg, de modo a obter um concentrado de células. Seguidamente, após remoção do sobrenadante, adicionou-se 100 µl do tampão de lise 1 (kit *Illustra™*) e 10 µl de Proteinase K (kit *Illustra™*), tendo-se incubado durante 15 minutos a 56°C e de seguida durante 2 minutos a 70°C. Posteriormente, adicionou-se 500 µl do tampão de lise 2 (kit *Illustra™*) e incubou-se à temperatura ambiente durante 10 minutos. Transferiu-se a mistura para uma coluna de purificação, contendo uma matriz de sílica colocada num tubo colector, e centrifugou-se durante 1 minuto a 11.000xg. Adicionou-se 500 µl do tampão de lise 2 e centrifugou-se novamente durante 1 minuto a 11.000xg. De seguida, adicionou-se 500 µl do tampão de lavagem (kit *Illustra™*) e centrifugou-se durante 3 minutos a 11.000xg. Transferiu-se a coluna de purificação para um microtubo de 1,5 ml e adicionou-se 200 µl de tampão de eluição (pré-aquecido a 70°C, kit *Illustra™*). Incubou-se durante 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugou-se durante 1 minuto a 11.000 xg recolhendo-se o eluído contendo o ADN.

Posteriormente, as amostras de ADN genómico foram quantificadas, de forma a saber qual a concentração e grau de pureza do material genético. Estes parâmetros são determinados através de uma medição espectrofotométrica, utilizando um espectrofotómetro (NanoDrop) e um programa designado ND1000 (Thermo Scientific). O grau de pureza é determinado através da razão entre as densidades ópticas avaliadas nos comprimentos de onda de 260 nm (o ADN absorve luz neste comprimento de onda) e de 280 nm (as proteínas absorvem luz neste comprimento de onda), sendo que o valor ideal desta razão para as amostras de ADN é de 1,8. Para esta



quantificação utilizou-se um volume de 2 µl de cada amostra para a medição e ainda 2 µl do respectivo tampão de eluição para fazer a medição do branco, que nos serviu de referência.

#### **2.1.11 Quantificação do conteúdo de 5-hidroximetilcitosinas (5-hmC)**

A 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) é uma modificação do ADN que se forma a partir da conversão enzimática da 5-metilcitosina (5-mC) por acção de uma dioxigenase de metilcitosina da família das proteínas TET. Para a sua rápida detecção e quantificação utilizou-se um teste imuno-enzimático, o kit *Global DNA Hydroxymethylation ELISA Kit* (Cell Biolabs).

Para tal, o ADN das células, incubadas na ausência e na presença de diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e menadiona durante 24 horas, foi extraído de acordo com o protocolo descrito em 2.1.10. Após a quantificação das amostras, o equivalente a 2 µg/ml de ADN foi diluído em PBS, num volume final de 250 µl. Seguidamente, 100 µl de cada amostra de ADN e de cada amostra padrão foram adicionados a uma placa de 96 poços (*96-well DNA High-Binding Plate*), ficando a incubar durante a noite a 4°C. De seguida, lavaram-se os poços com PBS e adicionou-se 150 µl do tampão de diluição (*Assay Diluent*) deixando-se 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 100 µl do Anticorpo Primário (*Anti-5-hmC Antibody*), e incubou-se durante 1 hora à temperatura ambiente num agitador orbital. Após esta incubação, os poços foram lavados 3 vezes com 250 µl de tampão de lavagem 1x (*Wash Buffer*) e juntou-se 150 µL do tampão bloqueador (*Blocking Reagent*) 1x, e agitou-se durante 1 hora à temperatura ambiente num agitador orbital. De seguida, os poços foram novamente lavados com tampão de lavagem 1x, como descrito anteriormente, e adicionou-se 100 µl do Anticorpo Secundário (*Secondary Antibody-Enzyme Conjugate*), seguindo-se um período de incubação de 1 hora à temperatura ambiente num agitador orbital. Os poços foram novamente lavados com tampão de lavagem 1x e adicionou-se 100 µl do substrato (*Substrate Solution*) a cada poço, demorando esta incubação 30 minutos à temperatura ambiente. Por fim, de forma a parar a reacção enzimática, acrescentou-se

100 µl da solução de paragem (*Stop Solution*). A leitura das absorvâncias, no comprimento de onda de 450 nm, foi efectuada num espectrofotómetro leitor de placas (Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek Instruments). A quantidade de 5-hmC das amostras é determinada através da comparação das suas absorvâncias com a curva padrão das amostras *standard*.

### **2.1.13 Análise Estatística**

O tratamento estatístico dos resultados foi efectuado utilizando o software GraphPad 5.0 e Microsoft Excel.

Na análise estatística dos parâmetros avaliados por citometria de fluxo recorreu-se a análises de variância (ANOVA de uma via) e sempre que necessário foram aplicados testes de comparações múltiplas. Para efectuar as comparações com a condição controlo foi aplicado o teste de Dunnet.

Em todos os testes utilizados considerou-se um nível de significância estatística a 95% ( $p < 0,05$ ). Os dados são apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão.



---

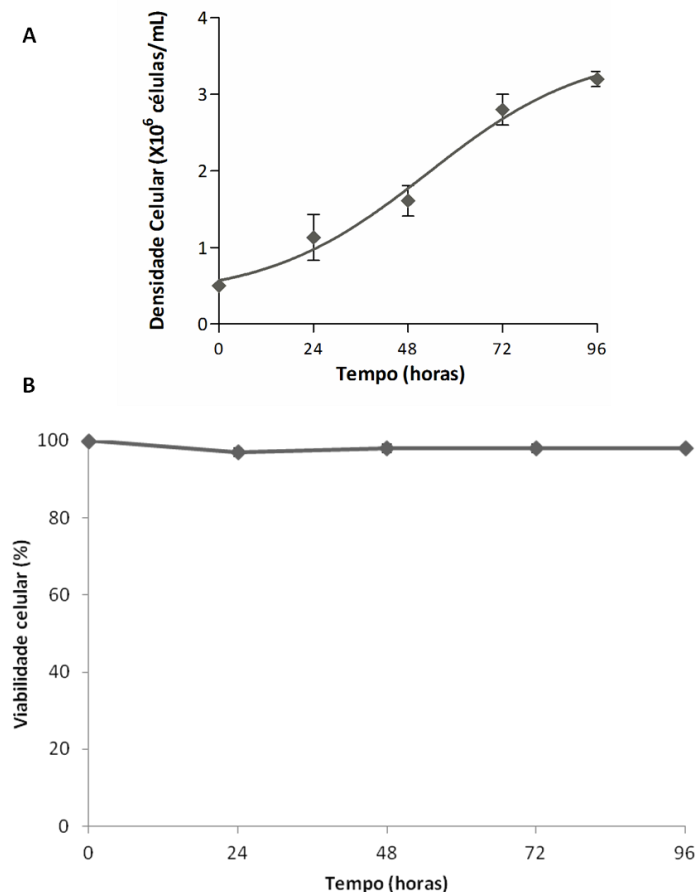
***Resultados***



### 3.1 Estudos realizados na linha celular humana CEM

#### 3.1.1 Caracterização da linha celular

No presente estudo foi utilizada a linha celular humana CEM, obtida de um doente com leucemia Linfoblástica aguda T. Estas células crescem em suspensão, quando mantidas em cultura num meio nutritivo apropriado e à temperatura de 37°C, em atmosfera humedecida, com 5% de CO<sub>2</sub>, de acordo com o perfil representado na figura 13 - A. A fase exponencial de crescimento decorre ao longo de 72 horas. A densidade celular observada nas células CEM duplica a cada 24 horas até um máximo aproximado de 2,5x10<sup>6</sup> células/mL. A viabilidade celular (figura 13 – B) mantém-se elevada (90-100%) no decurso da fase exponencial de crescimento.



**Figura 83 - Curvas de proliferação (A) e de viabilidade celular (B) das células CEM.** As células foram incubadas em meio RPMI 1640 enriquecido com soro fetal bovino a 10%, numa densidade inicial de 0,5x10<sup>6</sup> células/mL. A cada 24 horas foram recolhidas amostras das suspensões celulares e foi determinada a densidade celular pela técnica de azul de tripano, sendo que os resultados representam a média ± desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes.

Morfologicamente, as células CEM apresentam características típicas de blastos, provavelmente linfoblastos (leucemia linfoblástica aguda T), como se pode observar na figura 14. Estas células apresentam uma relação núcleo/citoplasma elevada, acentuada basofilia citoplasmática, núcleo periférico com condensação da cromatina e sboçando nucléolo, granulações citoplasmáticas evidentes observando-se também várias células em mitose.



**Figura 94 – Aspectos morfológicos das células CEM.** Os esfregaços de células foram corados com a solução *May-Grünwald-Giemsa* e observados ao microscópio óptico com ampliação de 500x.

### **3.1.2 Análise do efeito anti-proliferativo e citotóxico dos indutores do stresse oxidativo, peróxido de hidrogénio e menadiona**

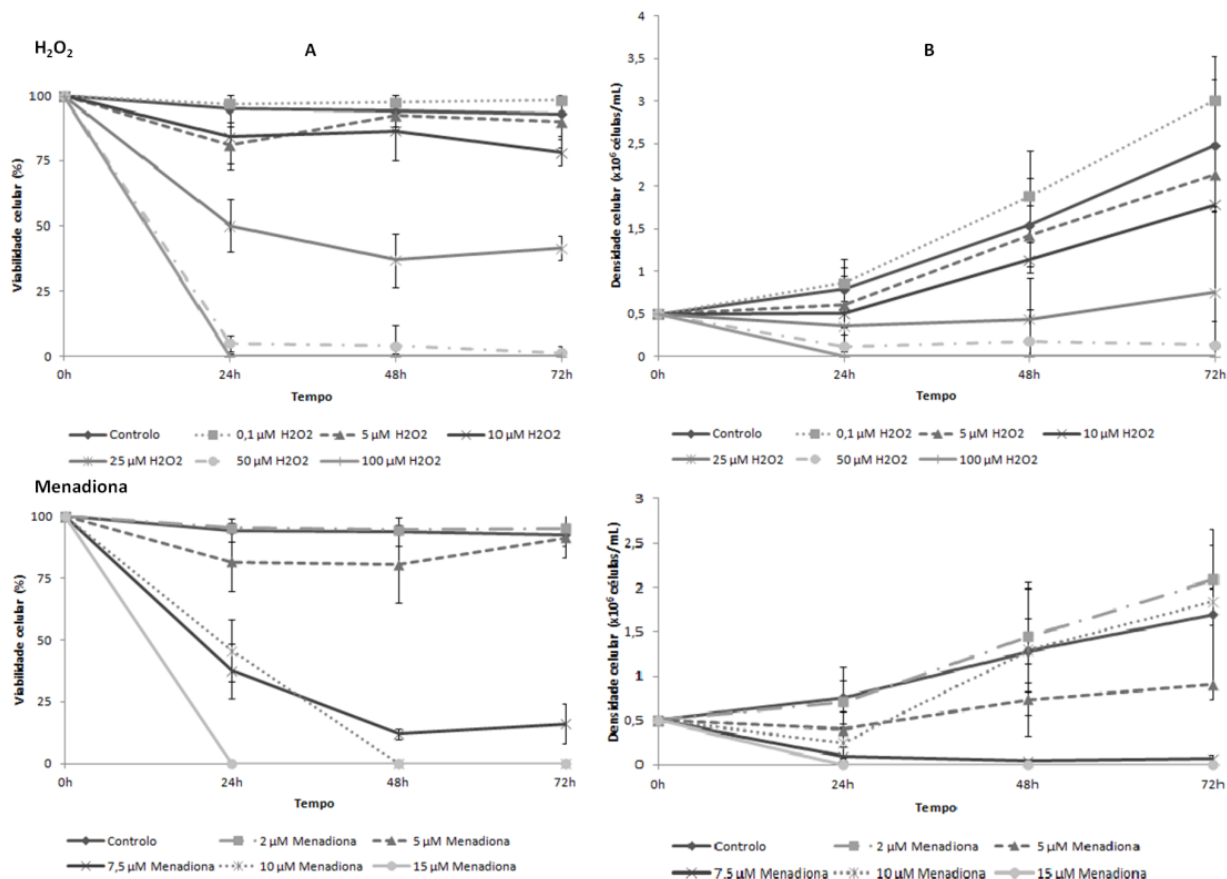
Para estudar os efeitos anti-proliferativos e citotóxicos dos indutores do stresse oxidativo, peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e menadiona (dador do anião superóxido) ( $O_2^{\bullet-}$ ), foram avaliados os seguintes parâmetros: variação na densidade e viabilidade celular e avaliação do tipo de morte celular. Para a avaliação deste último parâmetro recorreu-se à citometria de fluxo, através da dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo, e à análise dos aspectos morfológicos, por microscopia óptica.

### **3.1.2.1 Curvas de proliferação e de viabilidade celular**

Na figura 15 estão representados os efeitos dos indutores do stresse oxidativo,  $H_2O_2$  e do dador de  $O_2^{\bullet-}$ , na densidade e viabilidade das células CEM. Os efeitos citotóxicos (figura 15 – A) e anti-proliferativos (figura 15 – B) dependem da concentração e do tempo de exposição das células a estes compostos.

A exposição das células CEM a baixas concentrações de  $H_2O_2$  (0,1  $\mu M$ ) induz um ligeiro aumento do crescimento celular, sem alteração da viabilidade celular, relativamente às células controlo. No entanto, quando se utiliza concentrações superiores a 5  $\mu M$  observa-se diminuição da densidade celular e da viabilidade de modo dependente da dose mas praticamente independente do tempo de incubação (Figura 15). Assim, quando as células CEM são incubadas na presença de 25  $\mu M$  de  $H_2O_2$  há uma redução de forma mais acentuada da viabilidade celular em cerca de 50% em relação ao controlo (IC50), após 24 horas de incubação. Concentrações mais elevadas desta substância produzem efeitos citotóxicos muito acentuados, ocorrendo morte celular total às 24 horas quando as células são incubadas na presença de 100  $\mu M$  de  $H_2O_2$ .





**Figura 15 - Efeito do Peróxido de Hidrogénio e da Menadiona na viabilidade (A) e na proliferação (B) das células CEM.** As células CEM foram incubadas numa densidade inicial de  $0,5 \times 10^6$  células/mL, durante 72 horas, com diferentes concentrações de  $H_2O_2$  e do dador de  $O_2^{\bullet}$ . A viabilidade (A) e a densidade (B) foram avaliadas em intervalos de 24 horas através do teste de exclusão com azul de tripano, de acordo com o descrito na secção de material e métodos. O número de células em B representa exclusivamente células viáveis. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes.

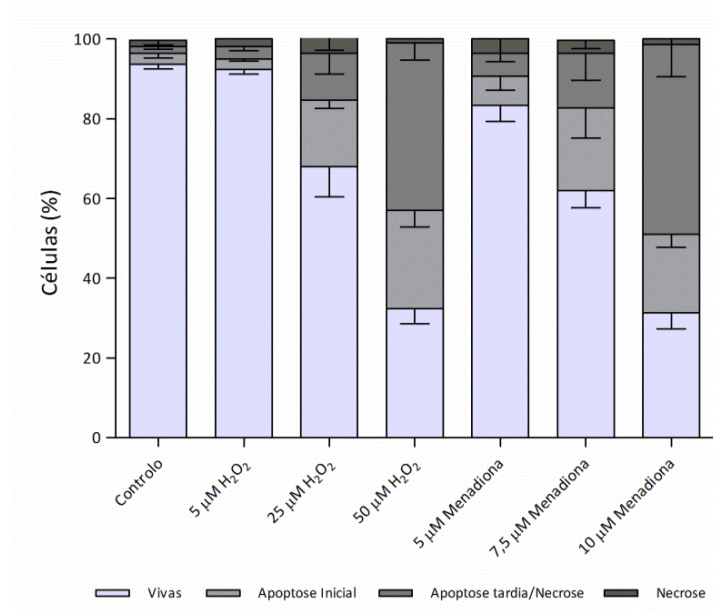
Por outro lado, quando as células CEM são tratadas com o dador de  $O_2^{\bullet}$  na concentração de  $2 \mu M$  mantêm uma viabilidade elevada, idêntica à das células controlo, induzindo um ligeiro aumento da densidade celular a partir das 48 horas de incubação. Na concentração de  $5 \mu M$ , a menadiona induz diminuição da proliferação, bem como da viabilidade celular, em cerca de 20%, sendo o IC50 obtido às 24 horas, quando as células são tratadas com menadiona na concentração aproximada de  $7,5$  a  $10 \mu M$ . A concentração mais elevada deste composto ( $15 \mu M$ ) produz um efeito citotóxico muito acentuado, ocorrendo morte celular total após 24 horas de incubação.

Assim, observou-se que as células CEM são mais sensíveis à menadiona (dador de  $O_2^{\bullet-}$ ), uma vez que são necessárias doses mais elevadas de  $H_2O_2$  para a viabilidade celular diminuir para 50%.

### **3.1.2.2 Avaliação da morte celular por citometria de fluxo**

Os efeitos citotóxicos dos indutores do stresse oxidativo ( $H_2O_2$  e  $O_2^{\bullet-}$ ), nas células de LLA-T em cultura foram avaliados por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo. Esta técnica permite distinguir as células viáveis das células mortas, através de alterações na permeabilidade e composição membranar, possibilitando ainda a distinção do tipo de morte celular predominante: apoptose ou necrose.

Em consonância com os resultados obtidos anteriormente, a figura 16 evidencia que os indutores de stresse oxidativo,  $H_2O_2$  e  $O_2^{\bullet-}$ , induzem diminuição da viabilidade das células CEM e morte celular, predominantemente, por apoptose. No entanto, a percentagem de células em apoptose tardia/necrose, depende da concentração do composto indutor de stresse oxidativo, havendo um aumento destas nas doses mais elevadas de cada composto. Observou-se ainda um máximo de 4% de células em necrose.



**Figura 16 - Avaliação do efeito citotóxico dos indutores do stresse oxidativo, peróxido de hidrogénio e menadiona, nas células CEM, por citometria de fluxo.** As células foram incubadas numa densidade inicial de  $0,5 \times 10^6$  células/mL, durante 24h na ausência (Controlo) e na presença das concentrações indicadas na figura. Posteriormente as células foram marcadas com anexina V e iodeto de propídeo, de acordo com o descrito na secção de material e métodos. Os resultados são expressos em percentagem (%) e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes.

### 3.1.2.3 Alterações morfológicas induzidas pelos indutores do stresse oxidativo

O efeito citotóxico dos compostos indutores do stresse oxidativo foi também caracterizado pela análise das características morfológicas das células, por microscopia óptica, na ausência e presença de  $H_2O_2$  e  $O_2^{\bullet-}$ .

A figura 17 mostra os aspectos morfológicos característicos dos efeitos citotóxicos dos indutores do stresse oxidativo,  $H_2O_2$  (A) e dador de  $O_2^{\bullet-}$  (B) em concentração de 25  $\mu M$  e 7,5  $\mu M$ , respectivamente. De acordo com os resultados obtidos por citometria de fluxo, ambos os compostos induzem alterações morfológicas típicas de células em apoptose inicial e tardia, tais como projecções da membrana celular e vacuolização citoplasmática, condensação e fragmentação nuclear. Também se verifica a presença de algumas células com alterações morfológicas típicas de necrose, com ruptura da membrana citoplasmática e saída do conteúdo intracelular para o exterior (Figura 17).

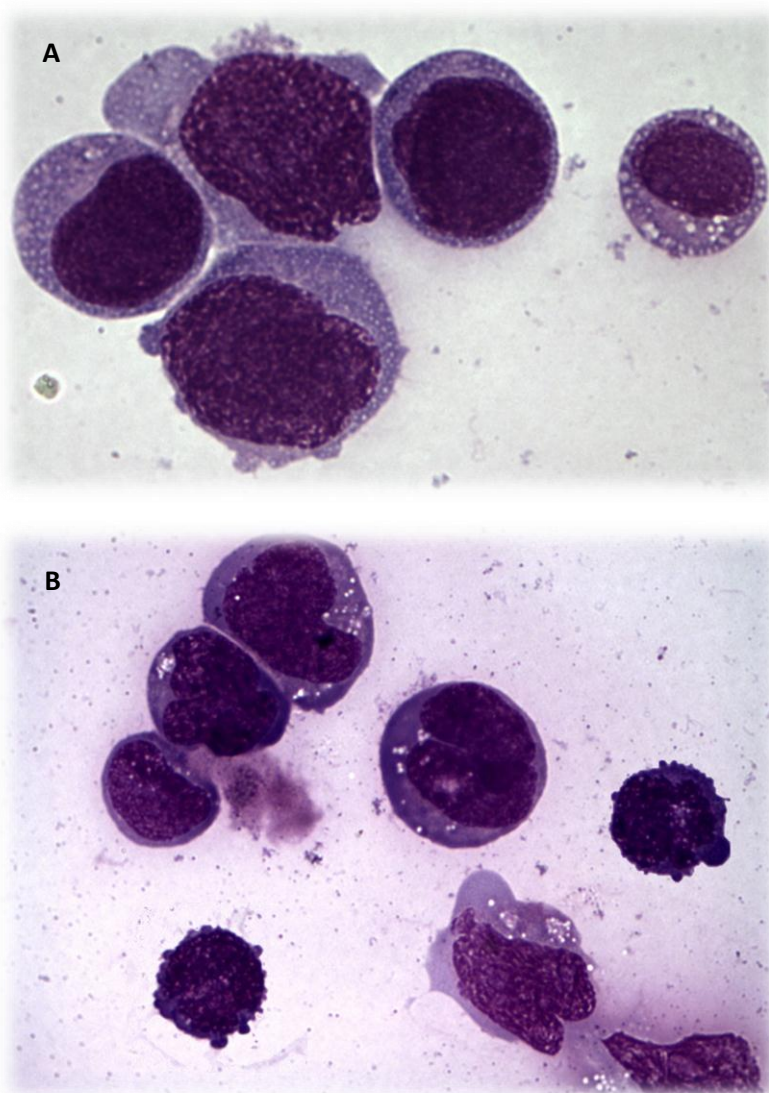


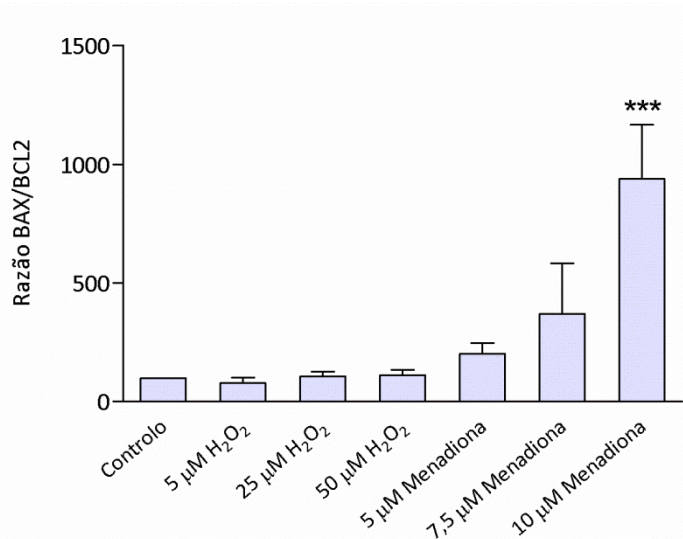
Figura 107 – Aspectos morfológicos das células CEM após tratamento com peróxido de hidrogénio 25  $\mu\text{M}$  (A) e com menadiona 7,5  $\mu\text{M}$  (B). Os esfregaços de células foram corados com a solução *May-Grünwald-Giemsa* e observados ao microscópio óptico com ampliação de 500x.

### 3.1.3 Influência dos indutores do stresse oxidativo na expressão de moléculas envolvidas na morte celular por apoptose

De forma a esclarecer alguns dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade induzida pelos indutores do stresse oxidativo,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , nomeadamente na mediação da morte celular por apoptose, foi avaliada a expressão de moléculas envolvidas na regulação deste processo, as proteínas da família BCL-2, BCL-2 e BAX, o

receptor de superfície membranar da família do TNF, FAS e seu ligando (FAS-L) e as proteases de cisteína, as caspases.

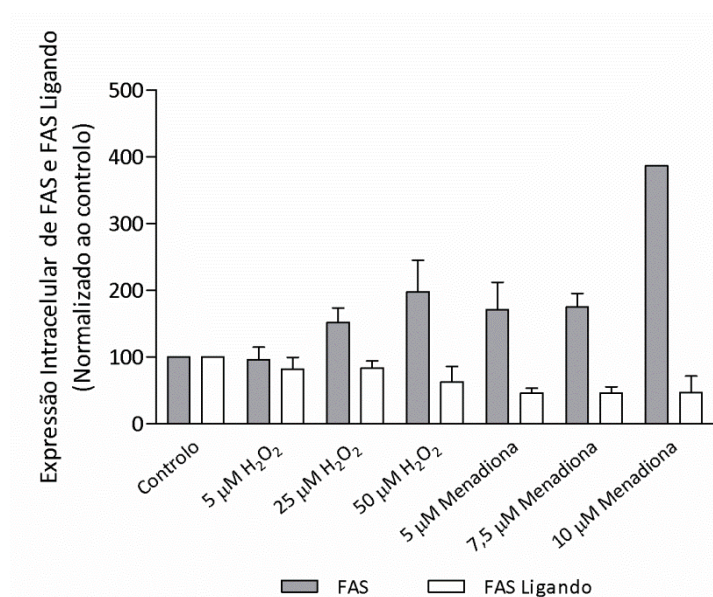
Na figura 18 encontra-se representado o efeito do  $H_2O_2$  e  $O_2^{\bullet-}$  na expressão da razão BAX/BCL-2 (Figura 18-A) nas células leucémicas CEM. Como se pode observar, quando as células são expostas a baixas concentrações de  $H_2O_2$  (5  $\mu M$ ) verifica-se diminuição da razão BAX/BCL2, a qual sofre um aumento com as doses mais elevadas deste composto (25  $\mu M$  e 50  $\mu M$ ). Quando as células são expostas a doses crescentes do dador de  $O_2^{\bullet-}$ , verifica-se um aumento bastante significativo da razão BAX/BCL2, aproximadamente 9 vezes superior para a concentração de 10  $\mu M$ , que é explicado pelo aumento da molécula pró-apoptótica BAX.



**Figura 18 - Análise da razão BAX/BCL2 em células expostas a indutores do stresse oxidativo, por citometria de fluxo.** As células foram incubadas numa densidade inicial de  $0,5 \times 10^6$  células/ml, durante 24 horas com as concentrações indicadas na figura. Posteriormente as células são marcadas com os respectivos anticorpos anti-BCL2 e anti-BAX marcados com fluorocromos, de acordo com o procedimento descrito na secção de material e métodos. A razão BAX/BCL2 foi calculada através da razão entre os MIF (média de intensidade de fluorescência) de cada uma das moléculas, nas diferentes condições de tratamento, e posteriormente fez-se a normalização dos valores em relação ao controlo. Os resultados consistem na média  $\pm$  desvio padrão de 2 a 3 ensaios diferentes. A análise estatística foi efectuada por comparação com o controlo (células incubadas na ausência dos compostos em estudo), utilizando o teste de Dunnett, sendo \*\*\* $p < 0,001$ .

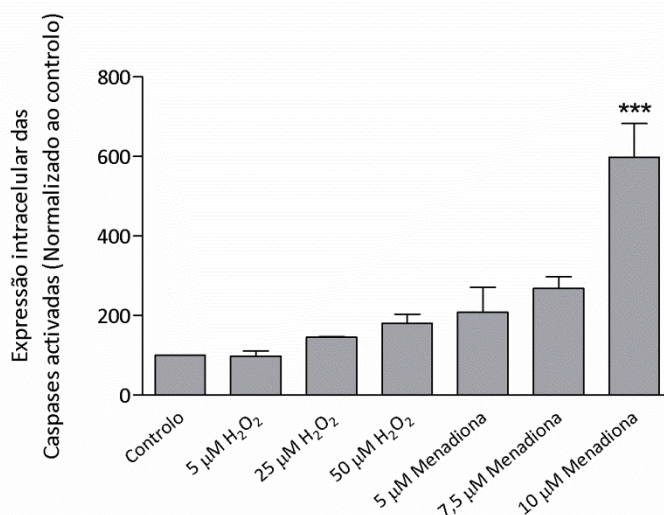
Seguidamente, avaliou-se o efeito dos compostos indutores do stresse oxidativo na expressão do receptor FAS e do seu ligando (figura 19). Nas células expostas quer ao  $H_2O_2$  quer ao dador de  $O_2^{\bullet-}$ , verifica-se um elevado aumento da expressão do receptor FAS (aumento que varia entre 2 a 4 vezes em relação ao controlo). No

entanto, a expressão do seu ligando, FAS-L, diminui consideravelmente, aproximadamente 50% em relação aos níveis de expressão das células controlo.



**Figura 19 - Expressão do receptor FAS e do respectivo ligando FAS-L em células expostas a indutores do stresse oxidativo.** As células foram incubadas numa densidade inicial de  $0,5 \times 10^6$  células/ml, durante 24 horas com as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Menadiona indicadas na figura. Posteriormente as células são marcadas com os respectivos anticorpos anti-FAS e anti-FAS ligando marcados com fluorocromos, de acordo com o procedimento descrito na secção de material e métodos. Os resultados obtidos em MIF (média de intensidade de fluorescência) e depois normalizados em relação ao controlo, representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 a 3 ensaios diferentes.

Por fim, avaliou-se a participação das caspases activadas na morte celular induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Como podemos observar na Figura 20 a exposição das células CEM aos dois compostos indutores de stresse oxidativo, induz aumento bastante significativo da expressão destas moléculas, que depende do composto e da concentração do mesmo. De facto, como se pode observar nesta Figura, o aumento mais significativo da expressão de caspases activadas verifica-se quando as células são tratadas com 10 µM de menadiona, sendo este aumento aproximadamente de 6 vezes em relação ao controlo.



**Figura 20 - Expressão intracelular de caspases em células expostas a indutores do stresse oxidativo.** As células foram incubadas numa densidade inicial de  $0,5 \times 10^6$  células/ml, durante 24 horas com as concentrações indicadas na figura. Posteriormente, as células foram analisadas de acordo com o descrito na secção de material e métodos. Os resultados são obtidos em MIF (média de intensidade de fluorescência) e depois normalizados em relação ao controlo. Os resultados consistem na média  $\pm$  desvio padrão de 2 a 3 ensaios diferentes. A análise estatística foi efectuada por comparação com o controlo (células incubadas na ausência dos compostos em estudo), utilizando o teste de Dunnett, sendo  $***p < 0,001$ .

### 3.1.4 Influência dos indutores do stresse oxidativo no ciclo celular das células CEM

Para caracterizar a influência dos indutores de stresse oxidativo no ciclo celular das células CEM, fomos avaliar a percentagem das células pelas diferentes fases do ciclo celular (Figura 21 e Tabela 2). Para tal, as células foram incubadas na ausência (controlo) e na presença de diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de menadiona, o dador de O<sub>2</sub><sup>•</sup>, e o conteúdo em ADN foi analisado por citometria de fluxo, após marcação das células com iodeto de propídeo, de acordo com o procedimento descrito anteriormente. Na figura 21, encontram-se representados alguns exemplos dos histogramas obtidos da análise do ciclo celular. Como podemos verificar, nas células tratadas com 50 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 10 µM de menadiona, observa-se a presença de um pico pré-G1 mais acentuado nas células submetidas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além disso, verifica-se alteração na distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular, mais acentuada nas células tratadas com menadiona. Nesta condição ocorre diminuição da percentagem de células na fase G0/G1 e aumento na fase S.

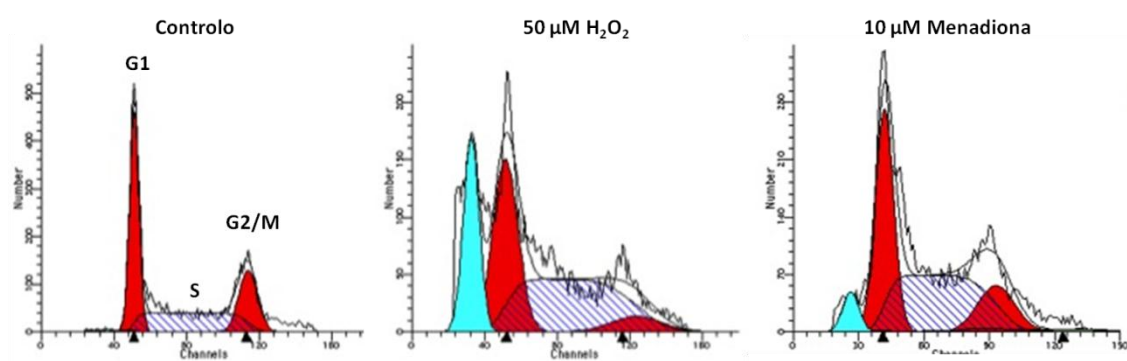


Figura 21 – Histogramas representativos da distribuição das células CEM pelas diferentes fases do ciclo celular. Nas células controlo é possível distinguir as fases do ciclo celular, G0/G1, S e G2/M. A fase G1 corresponde às células com conteúdo de ADN igual a 2n, enquanto na fase G2/M as células possuem um conteúdo de ADN igual a 4n. A azul está representado um pico pré-G1 com menor quantidade de ADN (pico apoptótico)

Tabela 2 – Efeito dos indutores do stresse oxidativo na distribuição das células CEM pelas fases do ciclo celular.

	Número de células (%) ± Desvio Padrão			
	Pré-G0/G1	G0/G1	S	G2/M
<b>Controlo</b>	0,33 ± 0,58	43,33 ± 5,51	34,00 ± 0,00	22,67 ± 5,51
<b>5 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	0,67 ± 0,58	41,33 ± 3,06	36,00 ± 4,36	22,67 ± 6,03
<b>25 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	6,33 ± 5,13	31,00 ± 7,94	47,67 ± 9,24	21,33 ± 2,08
<b>50 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	38,33 ± 11,85	36,00 ± 12,12	40,00 ± 14,73	23,67 ± 13,80
<b>5 μM Menadiona</b>	3,33 ± 1,53	36,67 ± 4,93	38,33 ± 3,06	24,67 ± 3,51
<b>7,5 μM Menadiona</b>	12,00 ± 2,65	31,33 ± 3,51	49,00 ± 3,61	19,67 ± 0,58
<b>10 μM Menadiona</b>	39,00 ± 6,24	28,67 ± 6,03	54,33 ± 4,73	17,00 ± 1,73



A tabela 2 mostra a distribuição das células CEM, sujeitas ou não a tratamento com indutores do stresse oxidativo, pelas diferentes fases do ciclo celular. Verifica-se que a proporção relativa de células em cada uma das fases do ciclo celular varia com a concentração dos compostos utilizados. Assim, aproximadamente 43% das células controlo encontra-se na fase G0/G1, 34% na fase S e aproximadamente 23% na fase G2/M. As células expostas às concentrações mais baixas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e do dador de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (5 µM) mantêm uma distribuição pelas diferentes fases do ciclo celular quase idêntica às células controlo, havendo apenas ligeira diminuição do número de células em fase G0/G1 (41% para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 37% para o O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), e um aumento pouco acentuado de células em fase S (36% para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 38% para o O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Ambos os compostos exercem efeitos qualitativamente semelhantes a nível do ciclo celular das células CEM, embora diferentes quantitativamente. Como se pode verificar na tabela 1, estes compostos induzem bloqueio do ciclo celular em fase S, com conseqüente redução do número de células em fase G0/G1. Estes efeitos são mais acentuados quando as células são tratadas com as concentrações mais elevadas de cada composto (50 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 10 µM de menadiona, o dador de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) em particular com menadiona. Por outro lado, observa-se a formação de um pico pré-G0/G1, correspondente a células em apoptose, de acordo com os resultados da análise da morte celular por citometria de fluxo e microscopia óptica.

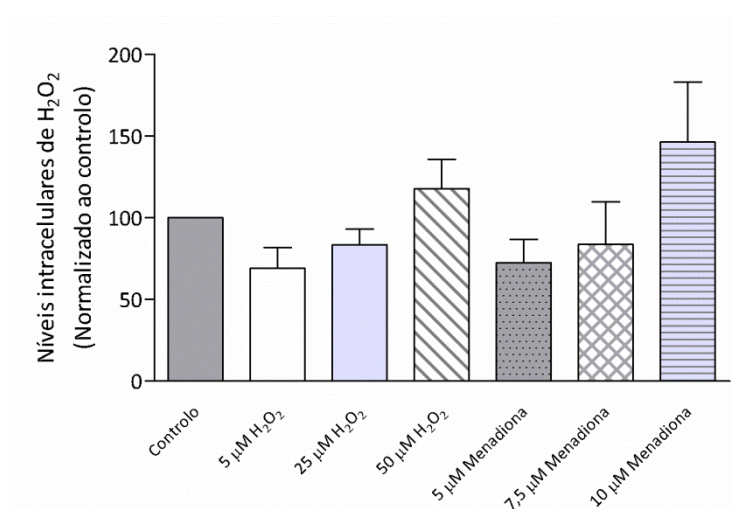
A percentagem de células em apoptose, detectada pela altura do pico apoptótico, aumenta significativamente na presença de concentrações elevadas dos indutores do stresse oxidativo.

### **3.1.5 Avaliação do stresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogénio e menadiona**

O stresse oxidativo tem sido implicado no crescimento e na morte das células neoplásicas. Para avaliar o papel do peróxido de hidrogénio e menadiona na indução de stresse oxidativo, analisou-se a produção intracelular de ROS através da expressão intracelular de peróxidos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e de anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), por citometria de fluxo,

recorrendo às sondas fluorescentes, DCFH-DA e DHE, respectivamente. Além disso foi também avaliada a capacidade de resistência ao stresse oxidativo através dos níveis intracelulares da defesa antioxidante GSH.

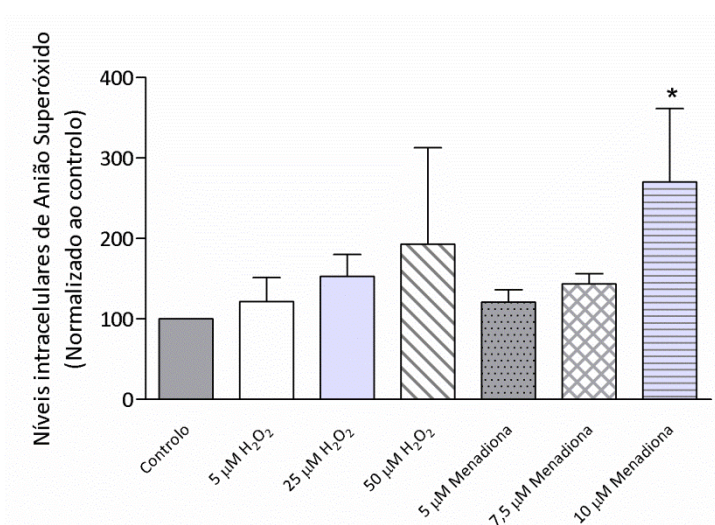
A figura 22 representa a expressão intracelular de  $H_2O_2$  nas células CEM, incubadas na ausência e na presença de diferentes concentrações dos compostos indutores do stresse oxidativo,  $H_2O_2$  e menadiona. Como se pode observar, nas células tratadas com as concentrações mais baixas de  $H_2O_2$  (5  $\mu M$  e 25  $\mu M$ ) e de menadiona (dador de  $O_2^{\bullet -}$ ; 5  $\mu M$  e 7,5  $\mu M$ ), verifica-se uma diminuição da produção intracelular de peróxidos, relativamente às células incubadas na ausência destes compostos (controlo). Por outro lado, na presença de concentrações mais elevadas destes compostos (50  $\mu M$  de  $H_2O_2$  e 10  $\mu M$  de menadiona), observa-se um aumento da produção intracelular de peróxidos, o que pode estar relacionado com o efeito pró-oxidante destes compostos nestas concentrações.



**Figura 22 – Efeito dos indutores do stresse oxidativo na expressão intracelular de  $H_2O_2$  nas células CEM.** As células foram incubadas numa densidade inicial de  $0,5 \times 10^6$  células/mL, durante 24 horas, com as concentrações de  $H_2O_2$  e menadiona indicadas na figura. Posteriormente, os níveis intracelulares de peróxidos ( $H_2O_2$ ) foram determinados por citometria de fluxo através da sonda fluorescente DCFH-DA, tal como descrito na secção de material e métodos. A expressão intracelular de  $H_2O_2$  está expressa em % em relação ao controlo. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes.

Assim, o aumento de  $H_2O_2$  nas condições acima referidas, pode estar relacionado com a morte celular por apoptose e/ou necrose induzida por estes compostos, como referido em 3.1.2.2.

De seguida, foi analisado a produção intracelular do anião superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) nas células tratadas com indutores do stresse oxidativo,  $H_2O_2$  e menadiona (Figura 23). Quando as células são expostas a concentrações crescentes de  $H_2O_2$ , a expressão intracelular do anião superóxido aumenta de forma dependente da concentração. O mesmo se verifica quando as células são tratadas com menadiona, sendo que se observa um aumento mais significativo na presença de 10  $\mu M$  deste composto, aproximadamente 3 vezes superior ao controlo, de acordo com o esperado, uma vez que a menadiona é um dador de anião superóxido.

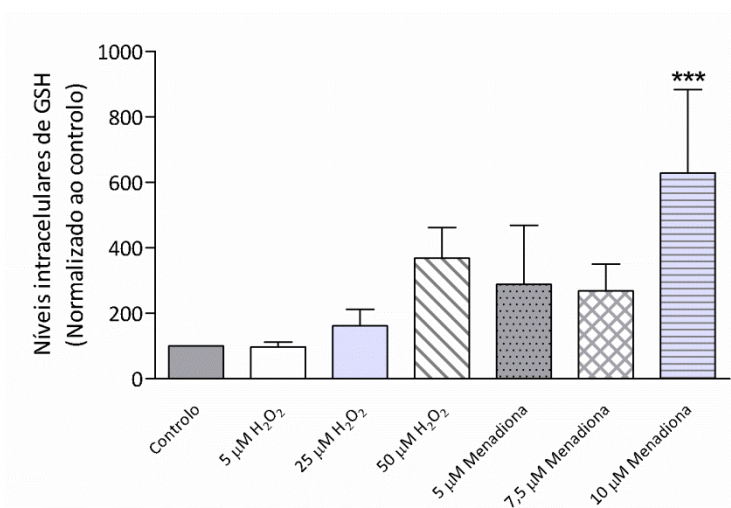


**Figura 23 – Efeito dos indutores do stresse oxidativo na expressão intracelular do anião superóxido nas células CEM.** As células foram incubadas numa densidade inicial de  $0,5 \times 10^6$  células/mL, durante 24 horas com as concentrações de  $H_2O_2$  e menadiona indicadas na figura. Posteriormente, os níveis intracelulares do anião superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) foram determinados por citometria de fluxo através da sonda fluorescente DHE, tal como descrito na secção de material e métodos. A expressão intracelular de  $O_2^{\bullet -}$  está expressa em % em relação ao controlo. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efectuada por comparação com o controlo (células incubadas na ausência dos compostos em estudo), utilizando o teste de Dunnett, sendo  $*p < 0,05$ .

Como mencionado anteriormente, e de forma a avaliar a capacidade de resistência das células CEM ao stresse oxidativo, determinou-se também a expressão intracelular da defesa anti-oxidante não enzimática glutatíão reduzido (GSH), por citometria de fluxo, utilizando-se o Alaranjado de Mercúrio (AM).

Como podemos observar na Figura 24, quando se incubaram as células CEM na presença de baixas concentrações de  $H_2O_2$  (5  $\mu M$ ), observou-se ligeira diminuição da expressão de GSH. No entanto, verifica-se aumento mais acentuado para

concentrações mais elevadas do mesmo composto (50  $\mu\text{M}$ ). Por outro lado, quando estas células foram expostas à menadiona (dador de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), a expressão intracelular de GSH aumenta consideravelmente, sendo que este aumento só é estatisticamente significativo na presença de 10  $\mu\text{M}$  deste composto (Figura 24).



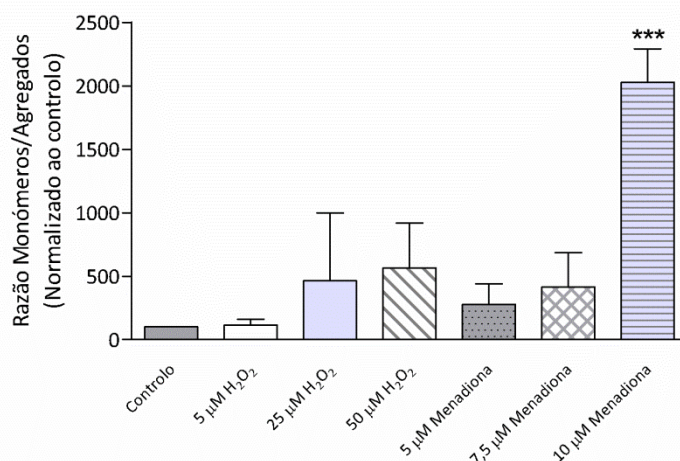
**Figura 24 – Efeito dos indutores do stresse oxidativo na expressão intracelular de glutatião reduzido nas células CEM.** As células foram incubadas numa densidade inicial de  $0,5 \times 10^6$  células/mL, durante 24 horas com as concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e menadiona indicadas na figura. Posteriormente, os níveis intracelulares de glutatião reduzido (GSH) foram determinados por citometria de fluxo com recurso ao composto fluorescente alaranjado de mercúrio, tal como descrito na secção de material e métodos. A expressão intracelular de GSH está expressa em % em relação ao controlo e os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efectuada por comparação com o controlo (células incubadas na ausência dos compostos em estudo), utilizando o teste de Dunnett, sendo \*\*\* $p < 0,001$ .

### 3.1.6 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial nas células tratadas com indutores do stresse oxidativo

Para avaliar as possíveis alterações da função mitocondrial pelos compostos indutores do stresse oxidativo, determinou-se o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_{\text{mit}}$ ) das células CEM na ausência e na presença de diferentes concentrações dos compostos em estudo. Para tal, recorreu-se à técnica de citometria de fluxo utilizando a sonda fluorescente JC1, nas condições descritas na secção de material e métodos.

Os resultados são apresentados sob a forma da razão Mónomeros/Agregados (M/A), de forma a perceber se há aumento ou diminuição do  $\Delta\psi_{\text{mit}}$ . Como se pode observar na figura 25, nas células tratadas com 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  verifica-se um aumento da razão M/A, apesar de não ser estatisticamente significativo. Por outro

lado, na presença do composto dador de  $O_2^{\bullet-}$  verifica-se o aumento mais acentuado da razão M/A, sendo este estatisticamente significativo para a concentração de 10  $\mu$ M. O aumento da razão M/A traduz diminuição do  $\Delta\Psi_{mit}$  e, por conseguinte, despolarização da membrana mitocondrial, resultados estes concordantes com os obtidos anteriormente.



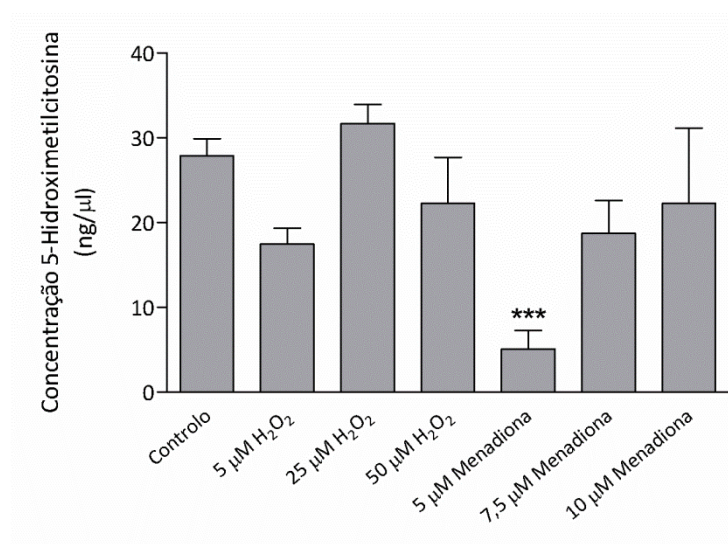
**Figura 25 – Avaliação do potencial de membrana mitocondrial nas células CEM.** As células foram incubadas numa densidade inicial de  $0,5 \times 10^5$  células/ml, durante 24 horas com as concentrações de  $H_2O_2$  e menadiona indicadas na figura. Posteriormente, o potencial de membrana mitocondrial foi determinado por citometria de fluxo com recurso à sonda fluorescente JC1, tal como descrito na secção de material e métodos. Os resultados são expressos em % relativamente ao controlo da razão monómeros/agregados (M/A) de JC1 e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efectuada por comparação com o controlo (células incubadas na ausência dos compostos em estudo), utilizando o teste de Dunnett, sendo \*\*\* $p < 0,001$ .

### 3.1.7 Avaliação da quantidade de 5-Hidroximetilcitosina nas células tratadas com indutores do stresse oxidativo

A variação da quantidade de 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) tem sido implicada em diversas patologias, nomeadamente nas neoplasias hematológicas. Para verificar a influência do stresse oxidativo nos níveis desta base, procedeu-se à sua detecção e quantificação utilizando-se um teste imuno-enzimático, como descrito na secção de material e métodos.

A figura 26 representa a variação de 5-hidrometilcitosina nas células sujeitas a diferentes tratamentos com  $H_2O_2$  e menadiona em diferentes concentrações. Como se pode observar nesta figura, nas células tratadas com ambos os indutores de stresse

oxidativo observa-se diminuição da concentração de 5-hmC, excepto quando as células foram incubadas com 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . No entanto, as alterações observadas apenas têm significado estatístico nas células tratadas com menadiona (dador de  $\text{O}_2^{\bullet}$ ) na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , nas quais se verifica a diminuição mais acentuada da quantidade de 5-hmC.



**Figura 26 – Detecção e quantificação da 5-hidroxi metilcitosina (5-hmC) nas células CEM.** O ADN genómico, das células incubadas durante 24 horas com as concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e de menadiona indicadas na figura, foi extraído e utilizado na quantificação da 5-hmC, de acordo com o descrito na secção de material e métodos. Os resultados são expressos pela concentração de 5-hmC e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 a 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efectuada por comparação com o controlo (células incubadas na ausência dos compostos em estudo), utilizando o teste de Dunnett, sendo \*\*\* $p < 0,001$ .



***Discussão e  
Conclusão***

---





O stresse oxidativo tem sido implicado na patogénese de diversas doenças, nomeadamente nas doenças oncológicas (Valko *et al.*, 2007; Klaunig *et al.*, 2010). Este surge quando há um desequilíbrio entre a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS – *Reactive Oxygen Species*) e a sua inactivação pelas defesas antioxidantes (Halliwell, 1989; Valko *et al.*, 2007). Inúmeros estudos têm demonstrado existir diminuição das defesas antioxidantes e aumento da produção de ROS em doenças hemato-oncológicas, nomeadamente em leucemias (Sarmiento-Ribeiro, 2000; Sarmiento-Ribeiro *et al.*, 2012a). De facto, o aumento da produção de ROS tem sido relacionado com a progressão de neoplasias mielóides como a leucemia mielóide crónica (LMC) e a leucemia mielóide aguda (LMA) (Sallmyr *et al.*, 2008), assim como de leucemias da linhagem linfóide (Sarmiento-Ribeiro AB *et al.*, 2012a). Silva e colaboradores (2008), por exemplo, demonstraram o envolvimento das ROS na leucemia linfoblástica aguda das células T (LLA-T), mostrando que os níveis destes radicais estão aumentados nestas células.

Neste sentido, fomos estudar alguns dos mecanismos bioquímicos envolvidos na citotoxicidade mediada por alguns indutores de stresse oxidativo, nomeadamente o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e o anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), em células em cultura obtidas a partir de um doente com leucemia linfoblástica aguda de células T (células CEM).

O método mais directo para avaliar o efeito de um composto na proliferação celular é, sem dúvida, a análise da variação do número de células antes e após a exposição aos referidos compostos, por períodos de tempo variáveis (Freshney, 1987). Assim, um dos métodos mais utilizados para determinar a viabilidade e a densidade celular, é a avaliação da incorporação do corante azul de tripano pelas células mortas, como descrito na secção de material e métodos.

Neste trabalho, os resultados obtidos com as células CEM mostram que os efeitos dos indutores do stresse oxidativo na proliferação celular dependem da concentração do composto e do tempo de exposição. Assim, as células CEM são mais sensíveis à menadiona (dador de  $O_2^{\bullet-}$ ), uma vez que em concentrações mais baixas deste composto têm um efeito antiproliferativo e citotóxico mais acentuado do que o

exercido pelo  $H_2O_2$  (figura 15). Jones *et al.* (2000) também obtiveram resultados idênticos, quando expuseram hepatócitos a diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio e menadiona, sendo que estes apresentaram maior sensibilidade ao dador do anião superóxido. Além disso, no nosso trabalho, verificámos que o  $H_2O_2$  e a menadiona em baixas concentrações (0,1  $\mu M$  e 2  $\mu M$ , respectivamente) têm um efeito promotor da proliferação.

Existem evidências de que as ROS podem promover quer a proliferação, quer a morte das células, dependendo da concentração em que se encontram, através da sua acção de segundos mensageiros nas vias de sinalização celular (Halliwell, 2007; Manda *et al.*, 2009), pelo menos *in vitro* (Ozben, 2007).

De facto, quando se encontram em baixas concentrações, as ROS podem induzir a activação de vias de transdução de sinal que terminam na activação de factores de transcrição, como o NF-kB, envolvidos na transcrição de genes responsáveis pelo crescimento ou sobrevivência celular. Por outro lado, quando as ROS se encontram em elevadas concentrações, são capazes de modular diferentes tipos de morte celular, através da lesão oxidativa de biomoléculas como o ADN, os lípidos, as proteínas e os açúcares, bem como pela promoção da disfunção mitocondrial (Valko *et al.*, 2007).

Além da participação do peróxido de hidrogénio na proliferação e na morte induzida por stresse oxidativo, também a menadiona tem sido utilizada com o mesmo objectivo. Chuang *et al.* (2002) demonstraram, por exemplo, que baixas concentrações de menadiona induzem a expressão de genes dependentes de sinalização redox, como por exemplo o p21. Por outro lado, os baixos níveis de stresse oxidativo induzidos por este composto, foram implicados na mimetização de sinais oxidativos endógenos e no desenvolvimento de protecção de lesões cardíacas isquémicas (Heinzel *et al.*, 2005). Contudo, concentrações elevadas de menadiona induzem níveis tóxicos de stresse oxidativo que levam à activação da morte celular (Loor *et al.*, 2010). No nosso trabalho, a proliferação celular e a citotoxicidade foram ainda avaliadas através da medição da viabilidade e da morte celular por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação das células com anexina V marcada com APC, em combinação com o iodeto de propídeo. No entanto, como esta técnica dificulta a distinção das células em

apoptose tardia das células em necrose, recorreremos à microscopia óptica para avaliarmos as características morfológicas das células

Os resultados obtidos, quer com base na morfologia celular quer nos estudos de citometria de fluxo, indicam que os compostos em estudo induzem morte celular sobretudo por apoptose (figuras 16 e 17) de modo dependente da concentração e do composto utilizado. De facto, os efeitos citotóxicos mais acentuados foram observados nas células CEM tratadas com peróxido de hidrogénio e com o dador de anião superóxido, na gama de concentrações de 25  $\mu\text{M}$  e 7,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente. As células tratadas com estes compostos apresentam características típicas de apoptose, observando-se projecções citoplasmáticas (“blebs”) e vacuolização, além de células com contração e fragmentação nuclear, características típicas de estádios mais avançados de morte celular por apoptose.

Como já foi referido, as ROS são moléculas sinalizadoras com funções distintas de acordo com a concentração, podendo influenciar processos celulares tão diferentes como o crescimento e a morte celular. Sabe-se também que as ROS podem regular diferentes tipos de morte celular (por apoptose ou por necrose) dependendo da concentração e da persistência do stresse oxidativo (Gardner *et al.*, 1997; Susuki *et al.*, 1997; Toyokuni, 1999; Sarmiento-Ribeiro, 2000; Sarmiento Ribeiro *et al.*, 2012b). Desta forma, considerando os sinais de proliferação induzidos pelas ROS nas células tumorais e a conseqüente resistência destas a sinais pró-apoptóticos, a estratégia terapêutica passa por terapias anti-neoplásicas que induzam a formação de ROS até um limite crítico que provoque a morte celular (Lee *et al.*, 1997; Manda *et al.*, 2009). Existem evidências que implicam o stresse oxidativo como um potencial mediador da apoptose (Gardner *et al.*, 1997; Matés & Jiménez, 2000). Em 1997, Toledano *et al.*, mostraram que o peróxido de hidrogénio em baixas concentrações induz apoptose através da produção de radicais hidroxilo e alteração das vias oxidantes/antioxidantes. Por outro lado, tem sido demonstrado que a resistência ao stresse oxidativo (Sarmiento Ribeiro *et al.*, 2012b) e à apoptose (Sarmiento Ribeiro *et al.*, 2012a) podem constituir mecanismos envolvidos na falência da terapêutica anticancerígena e na recidiva do cancro, em particular em leucemias. O envolvimento da apoptose em diversas

doenças, nomeadamente nas doenças hemato-oncológicas, torna necessário o conhecimento dos mecanismos e das vias de transdução de sinal envolvidas na regulação da apoptose nas células tumorais. Este conhecimento irá permitir o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças como as leucemias e os linfomas (Sarmiento-Ribeiro, 2000). Assim, confirmados os efeitos antiproliferativos e citotóxicos dos indutores de stresse oxidativo, fomos estudar alguns dos mecanismos envolvidos na sua acção citotóxica. Assim, avaliámos a expressão de moléculas envolvidas na regulação da morte celular por apoptose, nomeadamente as caspases, as proteínas reguladoras da via intrínseca ou mitocondrial da apoptose, as proteínas BCL-2 e BAX, e da via membranar ou extrínseca, o receptor de superfície FAS e o seu ligando.

As caspases são enzimas proteolíticas com um papel essencial na execução do processo apoptótico e dividem-se em caspases iniciadoras e caspases efectoras. Existem diversas evidências experimentais que implicam a desregulação da actividade das caspases como forma das células neoplásicas escaparem e/ou resistirem à morte celular (Fadeel *et al*, 1998; Olsson & Zhivotovsky, 2011). Dados obtidos, quer *in vitro* quer *in vivo*, confirmam que a desregulação das vias de sinalização apoptóticas contribuem para o desenvolvimento e progressão do cancro. A inactivação de componentes pró-apoptóticos e/ou a activação de moléculas anti-apoptóticas da maquinaria de morte celular têm sido encontrados em diversos tipos de cancro (Hanahan & Weinberg, 2000; Philchenkov *et al*, 2004).

Em 1997, Hampton *et al.*, demonstraram que baixas doses de peróxido de hidrogénio podiam activar caspases, induzindo apoptose, em linfócitos. No entanto, doses elevadas deste composto inibiam estas proteases, provocando nas células morte celular por necrose. Esta última evidência não está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, uma vez que verificámos aumento da expressão de caspases na presença de elevadas concentrações dos dois indutores do stresse oxidativo, sugerindo que a morte celular por apoptose é mediada por caspases. Uma vez mais, a menadiona (dador do anião superóxido) é o composto que induz efeitos mais acentuados, e 10  $\mu$ M deste composto induzem aumento estatisticamente significativo

na expressão de caspases em comparação com o controlo ( $p < 0,001$ ), o que está de acordo com os estudos morfológicos referidos anteriormente.

A indução da apoptose e da expressão de caspases, induzidas pela menadiona, está de acordo com estudos prévios realizados em hepatócitos (Jones *et al*, 2000; Rosa *et al*, 2006). No entanto, estudos efectuados por diversos autores (Prokop *et al*, 2000; Hofmann *et al*, 2001) mostram diminuição da expressão da actividade das caspases em neoplasias hematológicas, o que pode justificar a resistência à morte celular nestas doenças. Além disso, o aumento das caspases pode resultar da disfunção mitocondrial e consequente libertação de factores pró-apoptóticos (Saleh *et al.*, 1999). De facto, no nosso trabalho verificámos nas células tratadas com peróxido de hidrogénio e menadiona diminuição da razão Monómeros/Agregados de JC1, o que está de acordo com a diminuição do potencial de membrana mitocondrial e, portanto com a apoptose observada.

Como já foi referido, a morte celular por apoptose é um processo fisiológico importante do desenvolvimento e regulação da homeostase tecidual. Além do papel crucial das caspases neste processo, outras proteínas estão envolvidas na regulação deste tipo de morte celular. Entre elas está a proteína BCL-2, uma proteína de 26 kDa localizada na mitocôndria, no retículo endoplasmático e na membrana nuclear, codificada pelo gene *BCL-2* (Jin & El-Deiry, 2005). Esta proteína, da família de proteínas BCL-2, desempenha um papel importante na regulação do processo de morte celular, nomeadamente como inibidora da apoptose. Diversos autores sugerem que a localização da BCL-2 na mitocôndria defende estes compartimentos de lesões causadas por diversos compostos citotóxicos, incluindo as espécies reactivas de oxigénio. Assim, a proteína BCL-2 é importante na manutenção da homeostase, incluindo a manutenção da integridade da membrana mitocondrial (Kannan & Jain, 2000). Esta proteína pode interagir com outras proteínas homólogas, como por exemplo a proteína pró-apoptótica BAX de 21 kDa, com a qual forma heterodímeros (Hengartner, 2000; Kannan & Jain, 2000; Jin & El-Deiry, 2005). Uma outra proteína envolvida na morte celular por apoptose é o receptor membranar FAS, que pertence à família do factor de necrose tumoral (TNF – *tumor necrosis factor*). Esta proteína de 48 kDa

encontra-se expressa na superfície de linfócitos activos, em diversos tecidos de origem linfóide e não-linfóide, bem como em células tumorais (Krammer, 2000; Jin & El-Deiry, 2005). O seu ligando, FAS ligando, é produzido por células T activas e desempenha um importante papel na regulação do sistema imunitário e na apoptose (Fulda & Debatin, 2006).

Este estudo mostra que vários mecanismos estão envolvidos na citotoxicidade induzida pelo stresse oxidativo, e que estes dependem não só do composto utilizado mas também da sua concentração. De facto, observámos que o peróxido de hidrogénio e a menadiona aumentam essencialmente a expressão de moléculas pró-apoptóticas, BAX e FAS, embora em proporções diferentes. Assim, o aumento da proteína BAX pode justificar o aumento da razão BAX/BCL2, sendo este aumento mais significativo quando as células são tratadas com menadiona. Também as alterações morfológicas características da morte celular por apoptose, poderão estar relacionadas com o aumento da expressão destas proteínas pró-apoptóticas, BAX e FAS. Além disso, o aumento dos níveis da proteína BAX pode estar relacionado com o aumento de actividade da proteína p53 em resposta à lesão oxidativa do ADN. Esta proteína desempenha um papel fundamental na manutenção da integridade do genoma e o aumento da sua actividade leva ao aumento de expressão da proteína pró-apoptótica BAX (Ott *et al.*, 2007). Nas neoplasias hematológicas, os níveis da proteína BCL-2 são normalmente elevados, o que pode levar à resistência à morte celular nas células tumorais (Findley *et al.*, 1997; Hogarth & Hall, 1999). Por outro lado, linfócitos B tratados com trióxido de arsénio sofrem morte celular por apoptose, associada aos elevados níveis de ROS e à diminuição do potencial de membrana mitocondrial, com consequente sobre-expressão da proteína pró-apoptótica BAX (Baysan *et al.*, 2007). Diversos autores demonstraram que compostos anti-cancerígenos e com propriedades pró-oxidantes, induzem morte celular por apoptose, com aumento da expressão da proteína BAX (Marfe *et al.*, 2009). O aumento do receptor FAS após exposição das células a indutores do stresse oxidativo também foi verificado por Denning *et al.* (2002) e Devadas *et al.* (2003).

Neste trabalho, estudámos ainda a acção dos indutores do stresse oxidativo no ciclo celular das células de leucemia linfoblástica aguda T, recorrendo à citometria de fluxo. A quantificação do ADN é uma das importantes aplicações da citometria de fluxo, permitindo o estudo dos efeitos de compostos citostáticos na proliferação e na morte celular (Darzynkiewicz *et al.*, 2001). As alterações causadas pelos indutores do stresse oxidativo, na percentagem de células em cada uma das fases do ciclo celular, variam essencialmente com a concentração utilizada de cada composto. Desta forma, observámos que o  $H_2O_2$  e a menadiona exercem efeitos qualitativamente semelhantes. Estes compostos induzem uma acumulação de células em fase S, provavelmente devido a um bloqueio da progressão através desta fase do ciclo celular. Além disso, verifica-se aumento da percentagem de células em fase pré-G0, o que corresponde a um pico pré-apoptótico, resultados estes que estão de acordo com os resultados anteriores. Como já foi referido, o excesso de ROS pode provocar lesões em macromoléculas, especialmente no ADN. De forma a reparar estas lesões, as células activam os seus pontos de controlo do ciclo celular (G1, S, G2, M), o que leva ao bloqueio do ciclo de forma a prevenir a replicação do ADN danificado (Barzilai & Yamamoto, 2004). De facto, estudos anteriores em leveduras demonstram que a exposição a agentes indutores do stresse oxidativo, como o peróxido de hidrogénio e a menadiona, induz a paragem do ciclo celular (Flattery-O'Brien & Dawes, 1998; Leroy *et al.*, 2001). Apesar dos efeitos citotóxicos das ROS, em baixas concentrações estas espécies reactivas são fundamentais na regulação dos processos de auto-renovação e diferenciação das células estaminais hematopoiéticas (Sardina *et al.*, 2012).

A persistência do stresse oxidativo, como consequência do aumento da produção de quantidades sub-letais de ROS ou devido à diminuição das defesas antioxidantes, tem sido implicado na proliferação e morte das células malignas (Toyokuni *et al.*, 1995; Valko *et al.*, 2007) e na resistência à terapêutica anti-cancerígena. Assim, neste estudo avaliou-se também a produção intracelular de ROS, nomeadamente do peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e do anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), e a expressão da defesa antioxidante não enzimática, glutatião reduzido (GSH). Além disso, a variação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_{mit}$ ), nas células CEM expostas aos compostos indutores do stresse oxidativo referidos anteriormente, foi também analisado.



Os nossos resultados mostram que apenas nas concentrações mais elevadas de peróxido de hidrogénio (50  $\mu\text{M}$ ) e de menadiona (10  $\mu\text{M}$ ) se verifica aumento da expressão intracelular de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Por outro lado, ambos os compostos, em todas as concentrações testadas induzem aumento da expressão intracelular do anião superóxido, de forma dependente da concentração. Estes factos parecem determinar a existência de uma situação de persistência de stresse oxidativo que pode originar a morte celular. As ROS, apesar de reactivas, possuem semi-vida curta apresentando carácter transitório a nível celular (Valko *et al.*, 2007).

O peróxido de hidrogénio é formado pela dismutação do anião superóxido, numa reacção catalisada pela superóxido dismutase, ou resultante da acção da xantina-oxidase e NADPH-oxidase. Este composto possui grande facilidade de difusão, o que aumenta a sua capacidade de provocar lesão celular, sobretudo quando na presença de metais de transição descompartimentados, o que pode levar à produção do radical hidroxilo altamente reactivo, através das reacções de Fenton e Harber-Weiss (Valko *et al.*, 2007; Manda *et al.*, 2009).

O anião superóxido é pouco reactivo, uma vez que possui carga negativa, provocando lesões apenas em biomoléculas da sua proximidade (Sarmiento-Ribeiro, 2000). A acumulação do anião superóxido verificada neste estudo, pode ser devida à diminuição da expressão da superóxido dismutase de manganésio (MnSOD), facto verificado por Van Driel *et al.*, (1997) no cancro colorectal e por Cullen *et al.* (2003) no cancro pancreático. De acordo com estes factos, podemos dizer que a morte celular verificada anteriormente neste estudo, pode dever-se à capacidade lesiva das espécies reactivas de oxigénio, o que demonstra que elevados níveis de ROS são letais para as células tumorais.

Diversos estudos mostram que o desequilíbrio redox induzido pelo stresse oxidativo nas células pode estar relacionado com a estimulação oncogénica, e que a lesão oxidativa do ADN interfere com a expressão de genes envolvidos na regulação de diversas vias de transdução de sinal (Valko *et al.*, 2007). Apesar do vasto leque de defesas antioxidantes que a célula possui, vários estudos têm demonstrado que as células tumorais possuem um sistema antioxidante deficiente e/ou produzem

quantidades excessivas de ROS, nomeadamente  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$ , os quais actuando como mensageiros celulares podem induzir a proliferação tumoral. Assim, estes factores contribuem para a persistência do stresse oxidativo nas células tumorais, o qual pode ser responsável pela proliferação celular anómala ou pela resistência à terapia (Sarmiento-Ribeiro, 2000; Faquhar & Bowen, 2003).

Na adaptação ao stresse oxidativo parece ser importante o aumento da expressão da defesa não enzimática GSH verificado neste estudo. Este aumento pode contribuir para a maior capacidade de destoxificação do  $H_2O_2$ , contribuindo para o restabelecimento do equilíbrio redox. No entanto, estudos realizados em doentes com leucemia linfoblástica crónica (LLC), mostram uma diminuição dos níveis de GSH (Sarmiento-Ribeiro *et al.*, 2012). Os mesmos autores mostram, contudo, um aumento da GSH em doentes com leucemia linfoblástica aguda (LLA). A GSH é o principal antioxidante mitocondrial, participando na redução do peróxido de hidrogénio a água, desempenhando um papel fundamental na manutenção do equilíbrio redox (Valko *et al.*, 2007; Manda *et al.*, 2009). No entanto, apesar dos elevados níveis da defesa antioxidante, a morte celular verificada neste estudo pode dever-se à disfunção mitocondrial resultante da acção dos radicais livres, com consequente diminuição da síntese de ATP, o que leva à morte das células e/ou à activação da apoptose.

A mitocôndria é a principal fonte de radicais de oxigénio, sendo portanto bastante sensível a alterações do estado redox da célula. Vários estudos mostram que a disfunção mitocondrial devido a condições de stresse oxidativo contribuem para a morte celular programada (Zamzami *et al.*, 1995, Susin *et al.*, 1998; Morel & Barouki, 1999). A manutenção da integridade da membrana mitocondrial e a variação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_{mit}$ ) são processos dinâmicos e influenciados pelas espécies reactivas de oxigénio (Kannan & Jain, 2000). A análise do  $\Delta\psi_{mit}$  efectuada neste trabalho, através da sonda JC-1 com recurso à citometria de fluxo, mostra diminuição do  $\Delta\psi_{mit}$ , devido ao aumento da despolarização da membrana. Este acontecimento pode conduzir à morte celular por apoptose devido à libertação do citocromo c, como demonstrado por Anuradha *et al.* (2001), podendo o mesmo mecanismo verificar-se nas células CEM expostas ao peróxido de hidrogénio e à

menadiona. Esta perda de potencial pode comprometer o transporte de proteínas, a produção de novas espécies reactivas de oxigénio e a capacidade de reparação de lesões do ADN mitocondrial (Santos *et al*, 2003).

Outro objectivo do nosso trabalho foi estudar o papel do stresse oxidativo na regulação epigenética nas neoplasias hematológicas, através da avaliação da quantidade de 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) presente nas células expostas aos compostos pró-oxidantes peróxido de hidrogénio e menadiona.

As modificações epigenéticas desempenham um papel fundamental na diferenciação celular e têm sido implicadas no desenvolvimento de diversas doenças, incluindo o cancro (Jones & Balin, 2007; Reik, 2007; Esteller, 2008; Chen & Riggs, 2011). A modificação epigenética mais estudada e melhor caracterizada é a adição de um grupo metilo na posição 5 das citosinas, resultando na base 5-metilcitosina (5-mC) (Dahl *et al.*, 2011; Haffner *et al.*, 2011). De uma forma geral, a metilação das regiões promotoras dos genes está associada com o silenciamento da expressão génica. Além disso, alterações nos padrões de metilação do ADN estão relacionadas com a progressão de doenças oncológicas (Grønbaek *et al*, 2007; Jones & Balin, 2007). Em 2009, foi descoberta uma sexta base existente no material genético, a 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) (Kriaucionis & Heintz, 2009; Tahiliani *et al*, 2009). A 5-hmC foi encontrada no ADN genómico isolado de células estaminais embrionárias e parece ser relativamente abundante no sistema nervoso central (Kriaucionis & Heintz, 2009; Tahiliani *et al*, 2009). Apesar destas recentes descobertas, o papel fisiológico desta base modificada ainda não é totalmente conhecido. Não se sabe se a 5-hmC é um marcador epigenético ou simplesmente um intermediário oxidativo na desmetilação do ADN (Wanunu *et al*, 2011). Este produto tem como precursor a 5-metilcitosina que sofre oxidação pelas enzimas TET (*ten-eleven translocation*), e parece ser um intermediário no processo de remoção da 5-mC (Tahiliani *et al*, 2009; Branco *et al*, 2012).

Apesar da distribuição celular da 5-hmC ainda não estar bem documentada, Haffner *et al.* (2011) verificaram uma profunda redução do conteúdo em 5-hmC em tumores da próstata, mama e cólon, sugerindo que a perda desta base está associada

à carcinogénese. De facto, os baixos níveis de 5-hmC, em algumas neoplasias hematológicas como a leucemia mielóide aguda e a síndrome mielodisplásica, têm sido associados a mutações nos genes *TET* (Ko *et al.*, 2010; Konstandin *et al.*, 2011). Neste trabalho, verificámos que, com excepção do peróxido de hidrogénio na concentração de 25  $\mu$ M, todas as condições testadas induziram diminuição da quantidade de 5-hmC. No entanto, Münzel *et al* (2011) descreveram que, como resposta ao stresse oxidativo, haveria formação de 5-hmC nos locais com 5-mC. Apesar disso, e considerando esta quantificação da 5-hmC como uma avaliação indirecta do estado de metilação, sabe-se que a perda desta base modificada pode simplesmente refletir a diminuição dos níveis de 5-mC, fenómeno que ocorre em diversas neoplasias (Haffner *et al*, 2011).

Em conclusão, os resultados de uma forma geral foram ao encontro do esperado, permitindo uma melhor compreensão do papel das espécies reactivas de oxigénio na morte das células de leucemia linfoblástica aguda. Além disso, apesar da influência das ROS na morte celular, elas também podem levar a alterações do estado de metilação das células tumorais.

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

- Os efeitos dos indutores de stresse oxidativo, peróxido de hidrogénio e menadiona, nas células de leucemia linfoblástica aguda T (células CEM), dependem da concentração e do tempo de exposição. Assim, verifica-se que as concentrações mais baixas dos compostos utilizados têm sobretudo um efeito antiproliferativo, enquanto as concentrações mais elevadas, os efeitos citotóxicos são mais evidentes.
- Os estudos realizados na linha celular CEM mostraram que o stresse oxidativo diminui o crescimento das células de leucemia humana e induz morte celular preferencialmente por apoptose.
- A expressão de moléculas envolvidas na regulação da morte celular poderá influenciar os efeitos citotóxicos dos compostos utilizados. O peróxido de hidrogénio e a menadiona aumentam a expressão de moléculas pró-apoptóticas, BAX e FAS, e de

caspsases o que pode contribuir para que a citotoxicidade destas substâncias seja preferencialmente por indução da morte celular por apoptose.

- Os efeitos antiproliferativos dos indutores do stresse oxidativo traduzem-se também por alterações no ciclo celular das células CEM, nomeadamente um aumento da percentagem das células em fase S, o que traduz um bloqueio da progressão no ciclo celular, e um aumento do pico pré-apoptótico. Estas alterações podem constituir um estímulo pelo qual as células iniciam o seu programa de morte celular.

- A alteração da produção de espécies reactivas de oxigénio em resposta aos agentes indutores do stresse oxidativo indica alteração do estado redox das células leucémicas em estudo, o que poderá contribuir para a morte celular e/ou para a capacidade destas células se adaptarem ao stresse oxidativo. De facto, a existência de níveis basais aumentados de peróxido de hidrogénio e de menadiona, pode levar a uma situação de persistência do stresse oxidativo, o que pode conduzir a um aumento das defesas antioxidantes, nomeadamente de GSH, contribuindo para o restabelecimento do equilíbrio redox.

- A diminuição do potencial de membrana mitocondrial, devido à despolarização da membrana, nas células leucémicas tratadas com indutores do stresse oxidativo, poderá conduzir à morte celular por apoptose, com libertação do citocromo c e consequente activação de caspsases.

- A alteração dos níveis de 5-hidroximetilcitosina nas células tratadas com o peróxido de hidrogénio e sobretudo com menadiona em baixas concentrações sugerem que as espécies reactivas de oxigénio poderão ter um papel importante nos mecanismos de regulação epigenética e influenciar a resposta à terapêutica. No entanto, necessitamos de efectuar mais estudos, como por exemplo avaliar os níveis de 5-metilcitosina ou mesmo o perfil de metilação de alguns genes envolvidos na etiopatogenia das leucemias e na resposta à terapêutica.

## ***Bibliografia***

---



Anuradha, C. D., Kanno, S., Hirano, S., Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells, *Free Radical Biology and Medicine*, 31 (2001) 367-373

Bachman, K. E., Park, B. H., Rhee, I., Rajagopalan, H., Herman, J. G., Baylin, S. B., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene, *Cancer Cell*, 3 (2003) 89-95

Bae, Y. S., Kang, S. W., Seo, M. S., Baines, I. C., Tekle, E., Chock, P. B., Rhee, S. G., Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation, *Journal of Biological Chemistry*, 272 (1997) 217-221

Barzilai, A., Yamamoto, K., DNA damage responses to oxidative stress, *DNA repair*, 3:9-9 (2004) 1109-1115

Bassat, H. B., Polliack, A., Shlomai, Z., Kohn, G., Hadar, R., Rabinowitz, R., et al., Farage, a novel early B-cell lymphoma cell line with trisomy 11, *Leukemia and Lymphoma*, 6:6 (1992) 513-521

Baylin, S. B., DNA methylation and gene silencing in cancer, *Nature Clinical Practice Oncology*, 2 (2005) 4-11

Baysan, A., Yel, L., Gollapudi, S., Su, H., Gupta, S., Arsenic trioxide induces apoptosis via the mitochondrial pathway by upregulating the expression of Bax and Bim in human B cells, *International Journal of Oncology*, 30 (2007) 313-318

Bensaad, K., Vousden, K. H., Savior and slayer: the two faces of p53, *Nature Medicine*, 11 (2005) 1278-1279

Bernstein, B. E., Meissner, A., Lander, E. S., The mammalian epigenome, *Cell*, 128 (2007) 669-681

Bird, A., DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes and Development*, 16 (2002) 6-21



- Birnie, G. D., The HL-60 cell line: A model system for studying human myeloid cell differentiation, *British Journal of Cancer*, 58 (1998) 41-45
- Boultonwood, J., Wainscoat, J. S., Gene silencing by DNA methylation in haematological malignancies, *British Journal of Haematology*, 138 (2007), 3-11
- Branco, M. R., Ficz, G., Reik, W., Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome, *Nature Reviews*, 13 (2012) 7-13
- Budihardjo I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X., Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis, *Annual Reviews Cell Development Biology*, 15 (1999) 269-290
- Brown, M., Wittwer, C., Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology, *Clinical Chemistry*, 46:8 (2000) 1221-1229
- Byrd, J. C., Stilgenbauer, S., Flinn, I. W., Chronic Lymphocytic Leukemia, *Hematology*, 2004:1 (2004) 163-183
- Campos, A. C. E., Molognoni, F., Melo, F. H. M., Galdieri, Carneiro, C. R. W., D'Almeida, V., et al, Oxidative Stress Modulates DNA methylation during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation, *Neoplasia*, 9:12 (2007) 1111-1121
- Cerda, S., Weitzman, S. A., Influence of oxygen radical injury on DNA methylation, *Mutation Research*, 386 (1997) 141-152
- Chen, Z. X., Riggs, A. D., DNA methylation and demethylation in mammals, *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (2011) 18347-18353
- Chiba, S., Takaku, F., Tange, T., Shibuya, K., Misawa, C., Sasaki, K, et al., Establishment and erythroid differentiation of a cytokine-dependent human leukemic cell line F-36: a parental line requiring granulocyte- macrophage colony-stimulating factor or interleukin-3, and a subline requiring erythropoietin, *Journal of The American Society of Hematology*, 78 (1991) 2261-2268

Chiorazzi, N., Rai, K. R., Ferrarini, M., Chronic Lymphocytic Leukemia, *The New England Journal of Medicine*, 352 (2005) 804-815

Chuang, Y. Y., Chen, Y., Gadiseti, Chandramouli, V. R., Cook, J. A., Coffin, D. et al, Gene Expression after Treatment with Hydrogen Peroxide, Menadione, or *t*-Butyl Hydroperoxide in Breast Cancer Cells, *Cancer Research*, 62 (2002) 6246-6254

Cooper, M., Ytrehus, K., Cell survival signalling in heart derived myofibroblasts induced by preconditioning and bradykinin: the role of p38 MAP kinase, *Molecular Cell Biochemistry*, 259(1-2) (2004) 83-90

Crawford, D. R., Edbauer-Nechamen, C. A., Schools, G. P., Salmon, S. L., Davies, J. M. S., Davies, K. J. A, Oxidant-modulated gene expression in Davies and Ursini, *The Oxygen Paradox*, (1995) 327-335

Cullen, J. J., Mitros, F. A., Oberley, L. W., Expression of antioxidant enzymes in diseases of the human pancreas: another link between chronic pancreatitis and pancreatic cancer, *Pancreas*, 26 (2003) 23-27

Dahl, C., Grønbaek, K., Guldberg, P., Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited, *Clinica Chimica Acta*, 412 (2011) 831-836

Darzynkiewicz, Z., Bedner, E., Smolewski, P., Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis, *Seminars in Hematology*, 38:2 (2001) 179-193

Deininger, M. W. N., Goldman, J. M., Melo, J. V., The molecular biology of chronic myeloid leukemia, *Blood*, 96:10 (2000) 3343-3356

Denning, T. L., Takaishi, H., Crowe, S. E., Boldogh, I., Jevnikar, A., Ernest, P. B., Oxidative stress induces the expression of Fas and Fas ligand and apoptosis in murine intestinal epithelial cells, *Free Radical Biology and Medicine*, 33:12 (2002) 1641-1650

Devadas, S., Hinshaw, J. A., Zaritskaya, L., Williams, M. S., Fas-stimulated generation of reactive oxygen species or exogenous oxidativestress sensitize cells to Fas-mediated apoptosis, *Free Radical Biology and Medicine*, 35:6 (2003) 648-661

- Dunwell, T. L., Hesson, L. B., Pavlova, T., Zabarovska, V., Kashuba, V., Catchpoole, B., *et al*, Epigenetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia, *Epigenetics*, 4:3 (2009) 185-193
- Ellis, L., Atadja, P. W., Johnstone, R. W., Epigenetics in cancer: Targeting chromatin modifications, *Molecular Cancer Therapeutics*, 8 (2009) 1409-1420
- Engeland, M., Nieland, L.J.W., Ramaekers, F.C.S., Schutte, B., Reutelingsperger, C.P.M., Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure, *Cytometry*, 31 (1998) 1-9
- Esteller, M., Epigenetics in cancer, *The New England Journal of Medicine*, 358 (2008) 1148-1159
- Evan, G. I., Vousden, K. H., Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer, *Nature*, 411 (2001) 342-347
- Farquhar, M. J. and Bowen, D. T., Oxidative Stress and the Myelodysplastic Syndromes, *International Journal of Hematology*, 77 (2003) 342-350
- Findley, H. W., Gu, L., Yeager, A. M., Zhou, M., Expression and Regulation of Bcl-2, Bcl-xl, and Bax Correlate With p53 Status and Sensitivity to Apoptosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, *Blood*, 89:8 (1997) 2986-2993
- Flattery-O'Brien, J. A., Dawes, I. W., Hydrogen peroxide causes RAD9-dependent cell cycle arrest in G2 in *Saccharomyces cerevisiae* whereas menadione causes G1 arrest independent of RAD9 function, *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (1998) 8564-8571
- Foley, G. E., Lazarus, H., Farber, S., Uzman, B. G., Boone, B. A., McCarthy, R. E., Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia, *Cancer*, 18:4 (1965) 522-529
- Fox, S. I., *Human Physiology*, USA, The McGraw-Hill Companies Inc, 6ª edição (2006)
- Franco, R., Schoneveld, O., Georgakilas, A. G., Panayiotidis, M., Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis, *Cancer Letters*, 266 (2008) 6-11

- Freshney, R.I. (1987). Measurement of cytotoxicity and viability, *in* Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2ªedição, New York: Alan R. Liss, pp 245-256
- Fulda, S., Debatin, K. M., Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy, *Oncogene*, 25 (2006) 4798-4811
- Fuks, F., DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes, *Current Opinion in Genetics and Development*, 15 (2005) 490-495
- Gallagher, A., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., et al., Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia, *Blood*, 54 (1979) 713-733
- Gal-Yam, E. N., Saito, Y., Egger, G., Jones, P. A., Cancer epigenetics: modifications, screening and therapy, *Annual Review of Medicine*, 59 (2008) 267-280
- Galm, O., Herman, J. G., Baylin, S. B., The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies, *Blood Reviews*, 20 (2006) 1-13
- Galm, O., Wilop, S., Luders, C., Jost, E., Gehbauer, G., Herman, J. G., Osieka, R., Clinical implications of aberrant DNA methylation patterns in acute myelogenous leukemia, *Annals of Hematology*, 84 (Supl.13) (2005) 39-46
- Gardner, A. M., Xu, F. H., Fady, C., Jacoby, F. J., Duffey, D. C., Tu, Y., et al, Apoptotic vs. nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide, *Free Radical Biology & Medicine*, 22:1e-2 (1997) 73-83
- Geest, C. R., Coffey P. J., MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis, *Journal of Leukocyte Biology*, 86 (2009) 237-250
- Goldberg, A. D., Allis, C. D., Bernstein, E., Epigenetics: a landscape takes shape, *Cell*, 128 (2007) 635-638
- Gore, S. D., Baylin, S., Sugar, E., Carraway, H., Miller, C. B., Carducci, et al., Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloide neoplasms, *Cancer Research*, 66 (2006) 6361-6369

- Grønbaek, K., Hother, C., Jones, P. A., Epigenetic changes in cancer, *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 115 (2007) 1039-1059
- Guyton, K. Z., Kensler, T. W., Oxidative mechanisms in carcinogenesis, *British Medical Bulletin*, 49 (1993) 523-544
- Haffner, M. C., Chaux, A., Meeker, A. K., Esopi, D. M., Gerber, J., Pellakuru, L., G., et al, Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers, *Oncotarget*, 2:8 (2011) 627-637
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., Free radicals in Biology and Medicine, 2ª edição (1989), Clarendon Hematology, Oxford
- Halliwell, B., Oxidative stress and cancer: have we moved forward?, *Biochemical Journal*, 401 (2007) 1-11
- Halliwell B. and Whiteman M., Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?, *British Journal of Pharmacology*, 142 (2004) 231–255
- Hampton, M. B. and Orrenius, S., Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis, *FEBS Letters*, 414 (1997) 552–556
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., The hallmarks of cancer, *Cell*, 100 (2000) 57-70
- Hancock, J. T., Desikan, R., Neill, S. J., Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways, *Biochemical Society Transactions*, 29:2 (2001) 345-350
- Heinzel, F. R., Luo, Y. K., Li, X. K., Boengler, K., Buechert, A., Garcia-Dorado, D., et al, Impairment of diazoxide-induced formation of reactive oxygen species and loss of cardioprotection in connexin 43 deficient mice, *Circulation Research*, 97 (2005) 583-586
- Hengartner, M. O., The biochemistry of apoptosis, *Nature*, 407 (2000) 770-76

- Herman, J. G., Civin, C. I., Issa, J. P., Collector, M. I., Sharkis, S. J., Baylin, Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies, *Cancer Research*, 57 (1997), 837-841
- Hoffbrand, A. V., Catovsky, D., Tuddenham, E. G. D., Postgraduate Haematology, USA, Blackwell Publishing, 5ªedição (2005)
- Hoffbrand, A. V., Moss, P. A. H., Essential Haematology, USA, Blackwell Publishing, 6ªedição (2011)
- Hofmann, W.K., de Vos, S., Tsukasaki, K., Wachsman, W., Pinkus, G. S., Said, J. W., Koeffler, H. P., Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray, *Blood*, 98 (2001) 787-794
- Hogarth, L. A., Hall, A. G., Increased BAX Expression Is Associated With an Increased Risk of Relapse in Childhood Acute Lymphocytic Leukemia, *Blood*, 93:8 (1999) 2671-2678
- Houwen, B., The differential cell count, *Laboratory Hematology*, 7(2) (2001) 89-100
- Huang, Y.-W., Kuo, C.-T., Stoner, K., Huang, T. H.-Y. Wang, L.-S., An overview of epigenetics and chemoprevention, *FEBS Letters*, 10 (2010) 1016-1023
- Hussain, S. P., Harris, C. C., Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes, *Cancer Research*, 58 (1998) 4023-4037
- Issa, J. P., Baylin, S. B., Herman, J. G., DNA methylation changes in hematologic malignancies: biologic and clinical implications, *Leukemia*, 11 (Supl.1) (1997) 7-11
- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Ohmura, M., Naka, K., Hosokawa, K., Ikeda, Y., Sudda, T., Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells, *Nature Medicine*, 12 (2006) 446-451

- Ito, S., D'Alessio, A. C., Taranova, O. V., Hong, K., Sowers, L. C., Zhang, Y, Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification, *Nature*, 466 (2010) 1129-1133
- Jackson, A. L., Loeb, L. A., The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer, *Mutation Research*, 477 (2001) 7-21
- Jin, Z., El-Deiry, W. S., Overview of cell death signaling pathways, *Cancer Biology and Therapy*, 4:2 (2005) 139-163
- Jones, B. E., Lo, C. R., Liu, H., Pradhan, Z., Garcia, L., Srinivasan, A., et al, Role of caspases and NF-kB signaling in hydrogen peroxide-and superoxide-induced hepatocyte apoptosis, *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*, 278 (2000) 693-6999
- Jones, P. A., Baylin, S. B., The epigenomics of cancer, *Cell*, 128 (2007) 683-692
- Jones, P A., Baylin, S. B, The fundamental role of epigenetic events in cancer, *Nature Reviews Genetics*, 3 (2002) 415-428
- Jones, P. A., Laird, P. W., Cancer epigenetics comes of age, *Nature Genetics*, 21 (1999) 163-167
- Kannan, K., Jain, S.K., Oxidative stress and apoptosis, *Pathophysiology*, 7:27 (2000) 153-163
- Koh, K. P., Yabuuchi, A., Rao, S., Huang, Y., Cunniff, K., Nardone, J., et al, Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosin production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells, *Cell Stem Cell*, 8 (2011) 200-13
- Klaunig, J. E., Xu, Y., Isenberg, J. S., Bachowski, S., Kolaja, K. L., Jiang, J., Stevenson, D. E., Walborg, E. F. Jr., The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis, *Environmental Health Perspectives*, 106:1 (1998) 289-295
- Klaunig, J. E, Kamendulis, M. L., Hocevar, B. A., Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis, *Toxicologic Pathology*, 38 (2010) 96-109

Ko, M., Huang, Y., Jankowska, A. M., Pape, U. J., Tahiliani, M., Bandukwala, H., S., et al, Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2, *Nature*, 468 (2010) 839-43

Konstandin, N., Bultmann, S., Szwagierczak, A., Dufour, A., Ksienzyk, B., Spiekermann, K., et al, Genomic 5-hydroxymethylcytosine levels correlate with TET2 mutations and a distinct global gene expression pattern in secondary acute myeloid leukemia, *Leukemia*, 25 (2011) 1649-1652

Krammer, P. H., CD95's deadly mission in the immune system, *Nature*, 407 (2000) 789-795

Kriaucionis, S., heintz, N., The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in purkinje neurons and the brain, *Science*, 324 (2009) 929-930

Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P., Georgakilas, A. G., Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis, *Mutation Research*, 711 (2011) 193-201

Lanotte, M., Thouvenin, V. M., Najman, S., Balerine, P., Valensi, F., Berger, R., NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3), *Blood*, 77 (1991) 1080-1086

Lee, D. H., O'Connor, T. R., Pfeifer, G. P., Oxidative DNA damage induced by copper and hydrogen peroxide promotes CG → TT tandem mutations at methylated CpG dinucleotides in nucleotide excision repair-deficient cells, *Nucleic Acids Research*, 30:16 (2002) 3566-3573

Lee, Y., Shacter, E., Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells, *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (1999) 19792-19798

Leroy, C., Mann, C., Marsolier, M. C., Silent repair accounts for cell cycle specificity in the signaling of oxidative DNA lesions, *The EMBO Journal*, 20 (2001) 2896-2906

Lim, S., Gu, J., Kim, M. S., Kim, H., Park, Y. N., Park, C., K., et al, Epigenetic Changes Induced by Reactive Oxygen Species in Hepatocellular Carcinoma: Methylation of the E-cadherin Promoter, *Gastroenterology*, 135 (2008) 2128 –2140



Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P., Molecular cell biology, New York, WH Freeman and Company, (2008) 1107-1150

Loor, G., Kondapalli, J., Schriewer, J. M., Chandel, N. S., Hoek, T. L. V., Schumacker, P. T., Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis, *Free Radical Biology & Medicine*, 49 (2010) 1925-1936

Lozzio, C. and B. Lozzio, Human chronic myelogenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosome, *Blood*, 45:3 (1975) 321-334

Manda, G., Nechifor, M. T., Neagu, T. M., Reactive Oxygen Species, Cancer and Anti-Cancer Therapies, *Current Chemical Biology*, 3 (2009) 341-366

Marfe, G., Tafani, M., Indelicato, M., Sinibaldi-Salimei, P., Reali, V., Pucci, B., et al, Kaempferol Induces Apoptosis in Two Different Cell Lines Via Akt Inactivation, Bax and SIRT3 Activation, and Mitochondrial Dysfunction, *Journal of Cellular Biochemistry*, 106 (2009) 643-650

Marnett, L. J., Oxyradicals and DNA damage, *Carcinogenesis*, 21:3 (2000) 361-370

Matés, J. M., Jiménez, F. M. S., Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32 (2000) 157-170

Mehta, A. B., Hoffbrand, A. V., Haematology at a glance, USA, Blackwell Publishing, 2ªedição (2005)

Melo, J. V., Hughes, T. P., Apperley, J. F., Chronic Myeloid Leukemia, *Hematology* 2003:1 (2003) 132-152

Mishra, B. K., Parikh, P. M., Targeted therapy in oncology, *Medical Journal Armed Forces India*, 62 (2006) 169-173

Momparler, R. L., Cancer epigenetics, *Oncogene*, 22 (2003) 6479-6483

Moran-Crusio, K., Reavie, L., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Ndiaye-Lobry, D., et al, TET2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation, *Cancer Cell*, 20 (2011) 11-24

Morel, Y., Barouki, Repression of gene expression by oxidative stress, *Biochemical Journal*, 342 (1999) 481-496

Moriya, M., Single-stranded shuttle phagemid for mutagenic studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G:C → T:A transversions in simian kidney cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90 (1993) 1122-1126

Mrózek, K., Marcucci, G., Paschka, P., Whitman, S. P., Bloomfield, C. D., Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification?, *Blood*, 109:2 (2007) 431-448

Münzel, M., Globisch, D., Carell, T., 5-hydroxymethylcytosine, the sixth base of the genome, *Angewandte Chemie International Edition*, 50 (2011) 6460-6468

Myatt, S. S., Lam, E. W., Promiscuous and lineage-specific roles of cell cycle regulators in haematopoiesis, *Cell Division*, 2:6 (2007)

Navarro, J., Obrador, E., Carretero, J., Petschen, I., Avinó, J., Perez, P., et al, Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and cancer cells associated with tumour growth in vivo, *Free Radical Biology & Medicine*, 26:3e-4 (1999) 410-418

O'Connor, J. E., Kimler, B. F., Morgan, M. C., Tempas, K. J., A flow cytometric assay for intracellular nonprotein thiols using mercury orange, *Cytometry*, 9 (1988) 529-532

Orrenius, S., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47 (2007) 143-183

Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Mitochondria, oxidative stress and cell death, *Apoptosis*, 12 (2007) 913-922

- Ozben, T., Oxidative stress and apoptosis: Impact on cancer therapy, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96 (2007) 2181-2196
- Philchenkov, A., Zavelevich, M., Krocak, T. J., Los, M., Caspases and Cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities, *Experimental Oncology*, 26:2 (2004) 82-97
- Prokop, A., Wieder, T., Sturm, I., Essmann, F., Seeger, K., Wuchter, C., et al, Relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with a decrease of the Bax/Bcl-2 ratio and loss of spontaneous caspase-3 processing in vivo, *Leukemia*, 14 (2000)1606-1613
- Pui, C. H., Relling, M.V., Downing, J. R., Acute Lymphoblastic Leukemia, *New England Journal of Medicine*, 350 (2004) 1535-1548
- Pui, C. H., Robison, L. L., Look, A. T., Acute Lymphoblastic Leukemia, *Lancet*, 371 (2008) 1030-1043
- Rawlings, J. S., Rosler, K. M., Harrison, D. A., The JAK/STAT signaling pathway, *Journal of Cell Science*, 117 (2004) 1281-1283
- Razin, A., Riggs, A. D., DNA methylation and gene function, *Science*, 210 (1980) 604-610
- Reed, J. C., Mechanisms of apoptosis, *American Journal of Pathology*, 157 (2000) 1415-1430
- Reik, W., Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development, *Nature*, 447 (2007) 425-432
- Rosa, L. C., Schoemaker, M. H., Vrenken, T. E., Buist-Homan, M., Havinga, R., Jansen, P. L. M., Moshage, H., Superoxide anions and hydrogen peroxide induce hepatocyte death by different mechanisms: involvement of JNK and ERK MAP kinases, *Journal of Hepatology*, 44 (2006) 918-929
- Rossi, D. and Gaidano, G., Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease, *Haematologica*, 88 (2003) 218

Sallmyr, A., Fan, J., Rassool, F. V., Genomic instability in myeloid malignancies: increased reactive oxygen species (ROS), DNA double-strand breaks (DSBs) and error-prone repair, *Cancer Letters*, 270:1 (2008) 1-9

Saleh, A., Srinivasula, S. M., Acharya, S., Fishel, R., Alnemri, E. S., Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation, *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (1999) 17941-17945

Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C., Cossarizza, A., JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess  $\Delta\Psi$  changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis, *FEBS Letters*, 411:1 (1997) 77-82

Santos, J. H., Hunakova, L., Chen, Y., Bortner, C., Van Houte, B., Cell Sorting Experiments Link Persistent Mitochondrial DNA Damage with Loss of Mitochondrial Membrane Potential and Apoptotic Cell Death, *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (2003) 1728-1734

Saraste, A. and Pulkki, K., Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis, *Cardiovascular Research*, 45 (2000) 528-537

Sardina, J. L., López-Ruano, G., Sánchez-Sánchez, B., Llanillo, M., Hernández-Hernández, A., Reactive oxygen species: Are they important for haematopoiesis?, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 81 (2012) 257-274

Sarmiento-Ribeiro, A. B. (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., et al (2008) Integração do Metabolismo e Comunicação Celular. In: Bioquímica-Organização Molecular da Vida, Lidel-Edições Técnicas, pp: 599-647

Sarmiento-Ribeiro, A. B., Dourado, M., Paiva, A., Freitas, A., Silva, T., Regateiro, E., Oliveira, C. R., Apoptosis deregulation influences chemoresistance to azaguanine in human leukemic cell lines, *Cancer Investigation*, 30 (2012) 331-342 (a)

Sarmiento-Ribeiro, A. B., Proença, M. T., Sousa, I., Pereira, A., Guedes, F., Teixeira, A., Oliveira, C. R., A possible role for oxidation stress in lymphoid leukaemias and therapeutic failure, *Leukemia Research*, 36 (2012) 1041-1048 (b)

Sawyers, C. L., Chronic Myeloid Leukemia, *The New England Journal of Medicine*, 340:17 (1999) 1330-1340

Sears, R. C., Nevis, J. R., Signalling networks that link cell proliferation and cell fate, *The Journal of Biological Chemistry*, 277:14 (2002) 11617-11620

Sharma, S., Kelly, T. K., Jones, P. A., Epigenetics in cancer, *Carcinogenesis*, 31:1 (2010) 27-36

Sies, H., Oxidative stress: introduction *in* Oxidative stress: oxidants and antioxidants, *Academic Press* (1991) 15-22

Silva, A., Yunes, J. A., Cardoso B. A, Martins, L. R., Jotta, P. Y., Abecasis, M., *et al*, PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability, *The Journal of Clinical Investigation*, 118:11 (2008) 3762-3774

Stimson, L., Wood, V., Khan, O., Fotheringham, S., La Thangue, N. B., HDAC inhibitor-based therapies and haematological malignancy, *Annals of Oncology*, 20 (2009) 1293-1302

Storz, P., Reactive oxygen species in tumor progression, *Frontiers in Bioscience*, 10 (2005) 1881-1896

Susin, S. A., Zamzami, N., Kroemer, G., Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1366 (1998) 151-165

Susuki, Y. J., Forman, H. J., Sevanian, A., Oxidants as stimulators of signal transduction, *Free Radical Biology & Medicine*, 22:1e-2 (1997) 269-281

Szatromski, T. P., Nathan, C. F., Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells, *Cancer research*, 51 (1991) 794-798

Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y. H., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., et al, Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1, *Science*, 324 (2009) 930-935

Takai, D., Jones, P. A., Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99 (2002) 3740-3745

Ting, A. H., McGarvey, K. M., Baylin, S. B., The cancer epigenome – components and functional correlates, *Genes and Development*, 20 (2006) 3215-3231

Tormo, M., Marugán, I., Calabuig, M., Myelodysplastic syndromes: an update on molecular pathology, *Clinical and Translational Oncology*, 12:10 (2010) 652-661

Valinluck, V., Tsail, H., Rogstad, D. K., Burdzy, A., Bird, A., Sowers, L. C., Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2), *Nucleic Acids Research*, 32 (2004) 4100-4108

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., Telser, J., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39 (2007) 44-84

Van Driel, B. E., Lyon, H., Hoogenraad, D. C., Anten, S., Hansen, U., Van Noorden, C. J., Expression of CuZn- and Mn-superoxide dismutase in human colorectal neoplasms. *Free Radical Biology & Medicine*, 23 (1997) 435-444

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., Berneman, Z. N., Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer, *Annals of Hematology*, 84 (2005) 627-639

Wang, H., Joseph, J.A., Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader, *Free Radical Biology and Medicine*, 27:5/6 (1999) 612-616

Wang, Z.-Y., Chen, Z., Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable, *Blood*, 111 (2008) 2505-2515

- Wanunu, M., Cohen-Karni, D., Johnson, R. R., Fields, L., Benner, J., Peterman, N., et al, Discrimination of Methylcytosine from Hydroxymethylcytosine in DNA Molecules, *Journal of the American Chemical Society*, 133 (2011) 486-492
- Ward, A. C., Touw, I., Yoshimura, A., The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis, *Blood*, 95:1 (2000) 19-29
- Weitzman, S. A., Turk, P. W., Milkowski, D. H., Kozlowski, K., Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91 (1994) 1261-1264
- Wiernik, P. H., Goldman, J. M., Dutcher, J. P., Kyle, R. A., Neoplastic diseases of blood, Cambridge University Press, 4ª edição (2003)
- Yao, K., Ye, P., Zhang, L., Tan, J., Tang, X., Zhang, Y., Epigallocatechin gallate protects against oxidative stress-induced mitochondria-dependent apoptosis in human lens epithelial cells, *Molecular Vision*, 14 (2008) 217-223
- Yeoh, E. J., Ross, Ma E., Shurtleff, S. A., Williams, W. K., Patel, D., Mahfouz, R. et al, Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling, *Cancer Cell*, 1 (2002) 133-143
- Yoo, C. B., Jones, P. A., Epigenetic therapy of cancer: past, present and future, *Nature Reviews*, 5 (2006) 37-50
- Yoo, M. J., Lee, H. J., Kim, J. H., Kim, D. K., Extracellular ATP induces apoptotic signaling in human monocyte leukemic cells, HL-60 and F-36P, *Archives of Pharmacal Research*, 29:11 (2006) 1032-1041
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T. et al, Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death, *The Journal of Experimental Medicine*, 182 (1995) 367-377
- Zhao, H., Joseph, J., Fales, H. M., Sokoloski, E. A., Levine, R. L., Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., Detection and characterization of the product of hydroethidine and

---

intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (2005) 5727-5732

Zhu, L., Skoultschi, A. I., Coordinating cell proliferation and differentiation, *Current Opinion in Genetics and Development*, 10 (2001) 91-97

Ziech, D., Franco, R., Pappa, A., Panayiotidis, M. I., Reactive Oxygen Species (ROS) - Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711 (2011) 167-173

Zuo, S., Boorstein, R. J., Teebor, G. W., Oxidative damage to 5-methylcytosine in DNA, *Nucleic Acids Research*, 25 (1995) 3239-3243



