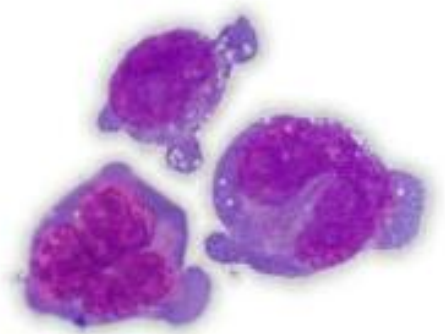




# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Avaliação da inibição de Metaloproteinases da Matriz como alvo terapêutico em Neoplasias Hematológicas



Ana Cláudia da Costa Pires

2014





# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Avaliação da inibição de Metaloproteinases da Matriz como alvo terapêutico em Neoplasias Hematológicas

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

---

Ana Cláudia da Costa Pires

2014



## Agradecimentos

Apesar de ser um trabalho individual, uma tese de mestrado não poderia ser concluída sem a ajuda de inúmeras pessoas, às quais gostaria de agradecer.

Em primeiro lugar, à Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro, pela orientação neste projeto, pelo apoio e pela disponibilidade e pelos conselhos ao longo do trabalho. À Professora Doutora Paula Veríssimo, pelo apoio, pelos conselhos e pela disponibilidade ao longo de todo o mestrado.

À Doutora Ana Cristina Gonçalves por todo o apoio, pela disponibilidade e dedicação, pela partilha de conhecimentos, pela ajuda na parte experimental do trabalho, pela motivação e pela paciência demonstrada.

À Mestre Raquel Alves, pela gigante ajuda na parte laboratorial, pela partilha de conhecimentos, pelos desbloqueamentos mentais, por todos os sábados no laboratório, pelos conselhos, pela paciência, mas principalmente pela amizade.

Ao grupo da Professora Doutora Maria Celeste Lopes, principalmente à Joana Balça, à Joana Liberal e à Ana Rufino, pela disponibilidade e colaboração neste projeto.

Ao grupo da Professora Doutora Raquel Seiça pela disponibilidade e colaboração neste projeto.

Às minhas colegas do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, e a todos os investigadores e colaboradores, em especial às Saras e à Cátia por toda a ajuda ao longo deste trabalho, pelo apoio, pelos conselhos, por todos os momentos menos trabalhadores, pelas informações inúteis, pelas tardes de gargalhadas.

À Joana, por me ter acompanhado ao longo destes três anos, pelos momentos mais alegres e pelos mais sérios, de aparvalhanço e de pânico, pelo apoio, pelo companheirismo, pela amizade.

À Mariana, à Ana, ao Paulo, à Laura e à Catarina, por toda a preciosa ajuda ao longo do Mestrado, por todos os momentos de descontração, por sermos os melhores *outsiders* que nos podíamos ter juntado.

Aos “Velhotes” por toda a amizade, por todos os conselhos, pelos sete anos que partilhámos e vivemos Coimbra. Sem vós certamente nada seria o mesmo.

À Andreia Albuquerque, por me ter dado uma oportunidade para conseguir prosseguir com os meus estudos, por ter sido uma chefe, uma conselheira, mas principalmente uma amiga. À Virginia, pela confiança que depositou em mim, por ter acreditado sempre em mim, pelos bons momentos no trabalho (e fora dele), pela maluqueira e pela amizade. A todas as meninas que trabalharam comigo, em especial à Joana, à Andreia Lopes, à Ju, e à Raquel, por todos os conselhos, por aturarem os meus surtos de pânico e por serem mais que colegas de trabalho.

Ao Pedro, pelo apoio, pelos momentos de descontração, pelos passeios, pelo carinho, por toda a paciência, e por tornar este final bem mais fácil.

Por fim, um agradecimento especial àqueles que sempre estiveram do meu lado e me apoiaram incondicionalmente:

À minha Mãe, por tudo o que me ensinou, por todos os esforços que fez para eu chegar aqui, por todo o apoio, por todo o amor, por ser um exemplo de Mulher, um exemplo de força e de coragem.

À minha irmã, a minha pequena, por apesar de ter estado longe nos anos mais importantes da vida dela, estar sempre perto, sempre com um conselho, sempre com um sorriso. Ao Zé, por todo o apoio, por todos os conselhos, por não ser um padrasto, mas sim um amigo.

À Carla e ao Silva, pelo exemplo que me deram da vida académica, pelo enorme apoio na minha “estadia” em Coimbra, pela companhia, pelos conselhos, pelo carinho.

À minha Avó, por tudo o que fez por mim ao longo de toda a vida, por ser mais que uma Mãe para mim. Ao meu Avô, à Susete e à Lili, por estarem sempre por perto e pelo apoio mesmo quando a vida não corre da melhor forma. Não menos importantes, às minhas pequenas princesas, Pipa, Daniela, Lara e Nô, por me lembrarem que ser criança é a melhor coisa do mundo! Um dia irei retribuir a todos vocês tudo o que fizeram por mim.

Por tudo isto, e muito mais,

**Um Gigante Obrigada!**

## Resumo

O microambiente medular sendo o principal suporte da hematopoiese normal, é a estrutura que fornece proteção às células estaminais hematopoiéticas de agressões externas, bem como indicações fisiológicas necessárias à regulação destas células. No entanto, esta estrutura também é importante na formação, sustentação e desenvolvimento de clones neoplásicos.

Um dos seus componentes, as metaloproteinases da matriz (MMPs), são enzimas que são responsáveis pela degradação e modulação da matriz extracelular. Estas são enzimas altamente reguladas no organismo e a mais pequena desregulação pode originar um descontrolo dos processos celulares, promovendo a formação de neoplasias. Uma vez que as terapêuticas atuais não são eficazes em todos os doentes com neoplasias hematológicas e as recidivas são frequentes, a inibição das MMPs poderá constituir uma nova abordagem terapêutica para os doentes com estas neoplasias.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial terapêutico do Batimastat (BB-94), um inibidor das MMPs, em modelos *in vitro* de neoplasias hematológicas.

Para o efeito, foram utilizadas quatro linhas celulares de neoplasias hematológicas, 2 de Leucemia Promielocítica Aguda, sem e com a translocação t(15;17), as células HL-60 e NB-4, respetivamente; 1 de Mieloma Múltiplo, as células H929, e 1 de Síndrome Mielodisplásica, as células F36-P. Primeiro foi determinada a expressão basal das MMPs, por Citometria de Fluxo (CF), com recurso a anticorpos específicos marcados com sondas fluorescentes. As células foram incubadas na ausência e na presença de diferentes concentrações de BB-94, entre 0,1 e 10 $\mu$ M, administrado em toma única ou fraccionada.

Para avaliar o efeito deste inibidor na viabilidade e na densidade celular foi usado o teste de exclusão por azul de tripano. A morte celular foi avaliada por microscopia óptica, após coloração de esfregaços usando o método de May-Grünwald-Giemsa, e por CF, através da dupla marcação com Anexina V e Iodeto de Propídeo. Foi também avaliada a activação de caspases, utilizando a sonda Apostat, bem como o ciclo celular, com recurso a Iodeto de Propídeo, ambos avaliados por CF. Para confirmar a atividade gelatinolítica das MMPs, utilizou-se também o método de zimografia em gelatina, antes e após a incubação com o

inibidor. Por fim, verificou-se a influência do inibidor nas vias de sinalização celular, através da expressão das proteínas ERK 1/2 e AKT, por *western blot*.

Os resultados mostram que o BB-94 reduz a viabilidade e a proliferação celular de uma forma dependente do tempo, da dose e das características da linha celular. O IC<sub>50</sub> do fármaco, após 48h de exposição é, aproximadamente, 7,5 µM para a linha NB-4, 10 µM para a linha F36-P e entre 7,5 e 10 µM para as linhas celulares HL-60 e H929. Além disso, os resultados sugerem que a administração diária do fármaco é mais eficaz na redução da viabilidade e da proliferação celular quando comparado à mesma dose (total) em administração única. Por outro lado, o efeito citotóxico do BB-94 é mais acentuado na linha celular de LPA que apresenta a translocação t(15;17), e este efeito aparenta ser independente da expressão de MMPs.

O BB-94 induz morte celular por apoptose com ativação de caspases, de forma dependente da dose. A análise do ciclo celular confirma a atividade anti-proliferativa do fármaco, uma vez que é observado um bloqueio na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> nas células HL-60 e H929, na fase S nas células NB-4 e na fase G<sub>2</sub>/M nas células F36-P. A zimografia em gelatina confirma a atividade do BB-94, ao ser possível observar-se um bloqueio na atividade gelatinolítica das MMPs diretamente proporcional à dose de fármaco administrada. A análise do *western blot* indicam que há um aumento da expressão da ERK nas células tratadas com o BB-94, quando comparado com as células sem tratamento, nas linhas celulares HL-60 e F36-P, não se observando diferenças significativas nas linhas NB-4. Por outro lado, o BB-94 induziu um aumento na expressão de AKT nas células HL-60, enquanto nas H929 foi observada uma diminuição, em comparação com o controle.

Em conclusão, estes resultados sugerem que o BB-94 poderá constituir uma potencial e nova abordagem terapêutica no tratamento de neoplasias hematológicas, apresentando um papel importante na regulação das vias de sinalização celular que controlam papéis fundamentais tanto no crescimento e desenvolvimento celular, como no controle da morte celular. Contudo, a eficácia terapêutica poderá depender do tipo e das características genéticas da neoplasia, bem como do esquema terapêutico utilizado.



## **Palavras-chave**

- Metaloproteinases da Matriz
- Batimastat
- Microambiente medular
- Neoplasias hematológicas



## Abstract

The bone microenvironment is the main support normal hematopoiesis, is the structure that provides support, protection of hematopoietic stem cells from external aggression, and provides the details required for the physiological regulation of these cells. However, this structure also important in formation support and neoplastic clones.

One of its components, matrix metalloproteinases (MMPs) are enzymes that are responsible for modulation and degradation of the extracellular matrix. These are highly regulated enzymes in the body and the smallest disruption can lead to an uncontrolled cellular processes, promoting the formation of neoplasms. Since current therapies are not effective in all patients with hematological malignancies and relapses are frequent, inhibition of MMPs may constitute a novel therapeutic approach to patients with these malignancies.

The aim of this study was to evaluate the therapeutic potential of Batimastat (BB-94), a matrix metalloproteinases inhibitor, in *in vitro* models of hematological neoplasias.

For this purpose, we used four hematological neoplasia cell lines, two Acute Promyelocytic Leukemia cell lines (NB-4 and HL-60 cells, with and without the translocation t(15;17), respectively), one Multiple Myeloma cell line (H929 cells), and one Myelodysplastic Syndrome cell line (F-36P cells). We detected the protein basal expression of MMP-2, -8 and -9, by Flow Cytometry (FC) using specific antibodies. All cell lines were cultured in absence and presence of different concentrations of BB-94 ranged from 0,1  $\mu$ M to 10  $\mu$ M, in a daily or single dose administration.

To evaluate the effect of this inhibitor on cell viability and cell density we used the Trypan Blue Assay. Cell death was determined by optical microscopy, after staining smears using the method of May-Grünwald-Giemsa, and by FC using the Annexin V and Propidium Iodide double staining. It was also evaluated the activation of caspases, using apostat probe as well as the progression through the cell cycle, using propidium iodide, both by CF. We also used gelatin zymography to confirm the gelatinolytic activity of MMPs before and after incubation with the inhibitor. In order to understand the role of BB-94 in cell proliferation, we evaluated the ERK 1/2 and AKT expression by Western Blot.

Our results showed that BB-94 reduces cell viability and proliferation in a time, dose and cell line dependent manner. We found that the half maximal inhibitory concentration

(IC50) at 48 hours of exposure was, approximately, 7,5  $\mu$ M for NB-4, 10  $\mu$ M for F36-P, and between 7,5 and 10  $\mu$ M for HL-60 and H929. Furthermore, the results suggest that the daily administration schedule is more effective in the reduction of cell viability and proliferation when compared to the same doses in single administration, when compared to the same dose (total) in a single administration. Moreover, the cytotoxic effect of BB-94 is more pronounced in cell lines that presents APL translocation t(15; 17) , and this effect seems to be independent of MMPs expression levels..

BB-94 induced cell death by apoptosis with activation of caspases, in a dose-dependent manner. The antiproliferative effect is confirmed through of cell cycle analysis, which revealed an arrest in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase in HL-60 and H929 cells, in S phase in the NB-4 cell and G<sub>2</sub>/M phase of the F36-P cells. The gelatin zymography confirmed the activity of BB-94, to be possible to observe a block in gelatinolytic activity of MMPs directly proportional to the dose of drug. In Western Blot analysis it was observed an increase of ERK expression in the cells treated with BB-94 when compared to the cells without treatment, in HL-60 and F36-P cell lines, while in NB-4 and H929 cell lines no significant differences were observed. On the other hand, BB-94 induced an increase in AKT expression in HL-60 cell line, while in H929 a decreased was observed, compared to control.

In conclusion, our results suggest that BB-94 is a potential new targeted therapy in hematological neoplasias and also support a role for the ERK and AKT signaling pathway in BB-94-induced apoptosis. However, therapeutic efficacy may depend on the cell type and genetic characteristics of the neoplasia, as well as the therapeutic schedule used.

### **Key-words**

- Matrix metalloproteinases
- Batimastat
- Bone Marrow Microenvironment
- Hematologic Neoplasias

# Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	ix
Índice de Figuras.....	xiv
Índice de Tabelas.....	xvi
Lista de Abreviaturas.....	xvii
<b>1 - Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 - Origem do Cancro.....	3
1.2 - Sistema Hematopoiético.....	4
1.3 - Microambiente Medular.....	6
1.3.1 - Nichos Hematopoiéticos.....	7
1.3.2 - Regulação do Microambiente Medular.....	10
1.4 - Metaloproteínas da Matriz (MMPs).....	11
1.4.1 - Caracterização das Metaloproteínas da Matriz.....	11
1.4.2 - Regulação das Metaloproteínas da Matriz.....	13
1.4.3 - O papel das Metaloproteínas da Matriz no cancro.....	15
1.4.4 - O papel das MMPs nas neoplasias hematológicas.....	17
1.4.5 - Inibidores sintéticos das Metaloproteínas da Matriz.....	18
1.4.6 - Batimastat.....	21
1.5 - Neoplasias Hematológicas.....	22
1.5.1 - Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) .....	23
1.5.2 - Síndrome Mielodisplásica (SMD) .....	24
1.5.3 - Mieloma Múltiplo (MM).....	24
1.6 - Objetivos.....	25
<b>2 - Materiais e Métodos.....</b>	<b>27</b>
2.1 - Descrição das linhas celulares.....	29

2.2 - Avaliação da expressão proteica de Metaloproteinases da Matriz nas diferentes linhas celulares por Citometria de Fluxo .....	30
2.3 - Incubação das linhas celulares com Batimastat.....	31
2.4 - Avaliação da proliferação e viabilidade celular pelo teste de exclusão com azul de tripano.....	32
2.5 - Avaliação de morte celular por microscopia óptica e por citometria de fluxo.....	33
2.5.1 - Avaliação de morte celular por microscopia óptica.....	33
2.5.2 - Avaliação de morte celular por citometria de fluxo.....	34
2.5.3 - Avaliação da expressão de caspases por citometria de fluxo.....	35
2.6 - Avaliação da progressão do Ciclo Celular por citometria de fluxo.....	36
2.7 - Avaliação da atividade das Metaloproteinases da Matriz através de ensaios zimográficos.....	36
2.8 - Análise da influência do inibidor das MMPs na expressão de proteínas intracelulares (ERK 1/2 e AKT) por western blot.....	38
2.8.1 - Quantificação proteica pelo método do ácido bicinconínico.....	38
2.9 - Análise estatística.....	40
<b>3 - Resultados.....</b>	<b>41</b>
3.1 - Caracterização das linhas celulares.....	43
3.1.1 - Avaliação da expressão proteica das Metaloproteinases da Matriz.....	45
3.2 - Avaliação do potencial terapêutico do inibidor das Metaloproteinases da Matriz, Batimastat, em linhas celulares de neoplasias hematológicas .....	46
3.2.1 - Curvas de viabilidade e proliferação celular.....	47
3.2.2 - Avaliação do efeito citotóxico induzido pelo Batimastat por citometria de fluxo.....	53
3.2.3 - Análise do tipo de morte celular induzida pelo Batimastat por microscopia óptica.....	55
3.2.4 - Avaliação da expressão de caspases por citometria de fluxo.....	57
3.2.5 - Avaliação do efeito do Batimastat no ciclo celular.....	57
3.3 - Avaliação da atividade das Metaloproteinases da Matriz por zimografia de gelatina.....	59
3.4 - Análise da ação do Batimastat na expressão das proteínas ERK 1/2 e AKT por western blotting .....	60

<b>4 - Discussão.....</b>	<b>63</b>
4.1 - Avaliação do efeito do potencial terapêutico de um inibidor das Metaloproteinases da Matriz em modelos <i>in vitro</i> de neoplasias hematológicas.....	65
4.2 - Avaliação do efeito do Batimastat na atividade das Metaloproteinases da Matriz.....	70
4.3 - Avaliação do efeito do Batimastat na regulação de proteínas intracelulares.....	71
<b>5 - Conclusão.....</b>	<b>75</b>
<b>6 - Bibliografia.....</b>	<b>79</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b>	Esquema representativo dos três modelos de propagação tumoral.....	4
<b>Figura 2</b>	Esquema representativo da Hematopoiese.....	6
<b>Figura 3</b>	Esquema hipotético de um nicho de células estaminais, com os componentes e funções.....	7
<b>Figura 4</b>	Microambiente medular: o nicho osteoblástico e vascular.....	9
<b>Figura 5</b>	Estrutura e classificação das Metaloproteinasas da Matriz.....	12
<b>Figura 6</b>	Resumo esquemático do papel das Metaloproteinasas da Matriz no cancro.....	16
<b>Figura 7</b>	Representação esquemática de possíveis abordagens terapêuticas para inibir as MMPs.....	19
<b>Figura 8</b>	Dot plot representativo da análise da morte celular por citometria de fluxo com a dupla marcação Anexina-V (AV) e iodeto de propídeo (IP)..	35
<b>Figura 9</b>	Curvas de crescimento e de viabilidade celular das linhas celulares HL-60, NB-4, F36-P e H929.....	43
<b>Figura 10</b>	Aspectos morfológicos das células em estudo.....	45
<b>Figura 11</b>	Avaliação da expressão basal das Metaloproteinasas da Matriz por citometria de fluxo em linhas celulares de neoplasias hematológicas.....	46
<b>Figura 12</b>	Efeito do Batimastat (BB-94) na viabilidade das células HL-60, NB-4, F36-P e H929.....	48
<b>Figura 13</b>	Figura 13 - Efeito do Batimastat (BB-94) na proliferação das células HL-60, NB-4, F36-P e H929.....	49
<b>Figura 14</b>	Regressão logarítmica do IC <sub>50</sub> do Batimastat celulares de neoplasias hematológicas .....	50
<b>Figura 15</b>	Efeito do Batimastat (BB-94) em administração fracionada viabilidade das células HL-60, NB-4, F36-P e H929.....	51
<b>Figura 16</b>	Efeito do Batimastat (BB-94) em administração fracionada na proliferação das células em estudo .....	53
<b>Figura 17</b>	Avaliação do efeito citotóxico do Batimastat nas linhas celulares HL-60, NB-4, F36-P e H929.....	54
<b>Figura 18</b>	Aspeto morfológico das diferentes linhas celulares de neoplasias hematológicas na ausência (controlo) e após o tratamento com Batimastat (BB-94).....	56
<b>Figura 19</b>	Avaliação da expressão de caspases por citometria de fluxo em células de neoplasias hematológicas tratadas com Batimastat (BB-94).....	57
<b>Figura 20</b>	Gel representativo de zimografia em gelatina para avaliar a influência do Batimastat (BB-94) na atividade das Metaloproteinasas da Matriz.....	59
<b>Figura 21</b>	Efeito do Batimastat na atividade enzimática das gelatinases.....	60



**Figura 22** Análise do efeito do Batimastat nos níveis das proteínas ERK 1/2 e AKT fosforiladas por western blot nas células HL-60, NB-4, F36-P e H929.....

61

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Classificação das Metaloproteinases da Matriz. ....	14
<b>Tabela 2</b>	Características do crescimento celular das linhas celulares em estudo...	44
<b>Tabela 3</b>	Análise do IC <sub>50</sub> do Batimastat nas linhas celulares de neoplasias hematológicas.....	50
<b>Tabela 4</b>	Análise do efeito do Batimastat (BB-94) na distribuição das células pelas fases do ciclo celular.....	58

## Lista de abreviaturas

- ADN** - Ácido Desoxirribonucleico
- AMPS** - Ácido 2-acrilamido-2-metilpropano sulfónico
- ANG-1** - Angiopietina-1
- APC** - Aloficocianina
- ARNm** - Ácido Ribonucleico mensageiro
- AREB** - Anemia Refratária com Excesso de Blastos
- ARSA** - Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel
- ATCC** - *American Type Culture Collection*
- ATRA** - *All-trans retinoic acid*
- AV** - Anexina V
- BB-94** - Batimastat
- BMP** - *Bone Morphogenetic Protein*
- CAR** - *CXCL-12 Abundant Reticular Cells*
- CBD** - Domínio de ligação ao colagénio, do inglês *Collagen Binding Domain*
- CEC** - Célula Estaminal Cancerígena
- CEH** - Célula Estaminal Hematopoiética
- CF** - Citometria de Fluxo
- CO<sub>2</sub>** - Dióxido de Carbono
- CRDM** - Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem
- CRDU** - Citopenia Refratária com Displasia Unilinhagem
- CXCL12** - *CXC chemokine ligand 12*
- CXCR4** - *CXC chemokine receptor type 4*
- C-Myc** - *Cellular Myelocytomatosis gene*
- DP** - Desvio padrão
- DSMZ** - *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*
- DTT** - Ditiotreitól
- ECACC** - *European Collection of Cell Cultures*
- ECF** - *Enhanced Chemofluorescence Substrate*

**EGFR** - Recetor do fator de crescimento epidermal, do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*

**EPO** - Eritropoietina

**ERK** - Cinase Regulada Extracelularmente, do inglês *Extracellular Regulated Kinase*

**FAB** - Grupo Franco-Americano-Britânico

**FAK** - Cinase de adesão focal, do inglês *Focal Adhesion Kinase*

**FBS** - *Fetal Bovine Serum*

**FITC** - Isotiocianato de Fluoresceína

**FL**- Ligando do receptor tirosina cina FLT-3

**FLT-3** - *FMS-like tyrosine kinase 3*

**g** - Força centrífuga

**G1** - Gap 1

**G2** - Gap 2

**GPI** - Domínio de glicosilfosfatidilinositol

**HB-EGF** - Fator de ligação à heparina tipo EGF

**HH** - Via de sinalização Hedgehog

**IC<sub>50</sub>** - Concentração que reduz em 50%

**IGF** - Fator de crescimento tipo insulina, do inglês *Insulin Growth Factor*

**IGF-BP1** - Proteína de ligação ao fator de crescimento tipo insulina-1, do inglês *Insulin Growth Factor Binding Protein 1*

**Ig** - Imunoglobulina

**IL-3** - Interleucina-3

**IP** - Iodeto de Propídeo

**IPSS** - *International Prognostic Scoring System*

**LMA** - Leucemia Mieloide Aguda

**LPA** - Leucemia Promielocítica Aguda

**M** - Mitose

**MAPK** - *Mitogen Activated Protein Kinase*

**MGUS** - Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado, do inglês *Monoclonal Gamopathy of Undetermined Significance*

**MIF** - Média de Intensidade de Fluorescência

**MM** - Mieloma Múltiplo

**MMPs** - Metaloproteinases da Matriz, do inglês *Matrix Metalloproteinases*

**MT-MMP** - Metaloproteinase da Matriz Transmembranar

**NF- $\kappa$ B** - Fator de transcrição nuclear *kappa B*

**PARP** - do inglês, *Poly (ADP-ribose) Polymerase*

**PBS** - Tampão fosfato

**PCL** - Progenitor Comum Linfóide

**PCM** - Progenitor Comum Mielóide

**PE** - Ficoeritrina

**PEX** - Domínio C-terminal tipo hemopexina

**PI3K** - Fosfatidilinositol-3 cinase, do inglês *Phosphatidylinositol-3 kinase*

**PIP2** - Fosfatidilinositol-2-fosfato

**PIP3** - Fosfatidilinositol-3-fosfato

**PKB** - Proteína Cinase B, do inglês *Protein Kinase B*

**PKC** - Proteína Cinase C, do inglês *Protein Kinase C*

**PML** - *Promyelocytic Leukemia gene*

**PVDF** - Fluoreto de polivinilideno

**RAF** - *RAS function*

**RAS** - *Rat Sarcoma*

**RAR $\alpha$**  - *Retinoic Acid Receptor  $\alpha$*

**RIL** - Recetor de Interleucina

**RPMI** - *Roswell Park Memorial Institute*

**RTK** - Recetor de Tirosina Cinase

**SCF** - Fator da Célula Estaminal, do inglês *Stem Cell Factor*

**SDF-1** - *Stromal Derived Factor-1*

**SDS** - do inglês, *sodium dodecyl sulfate*

**SMD** - Síndrome Mielodisplásica

**TEMED** - Tetrametiletlenodiamina

**TGF $\beta$**  - Fator de crescimento transformante  $\beta$ , do inglês *Transforming Growth Factor  $\beta$*

**TIMP** - Inibidor das MMPs, do inglês *Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases*

**TM-I** - Domínio Transmembranar do Tipo I

**TPO** - Trombopoietina

**WNT** - Via de sinalização *Wingless*

**$\alpha_2$ M** -  $\alpha_2$  macroglobulina

# *1. Introdução*







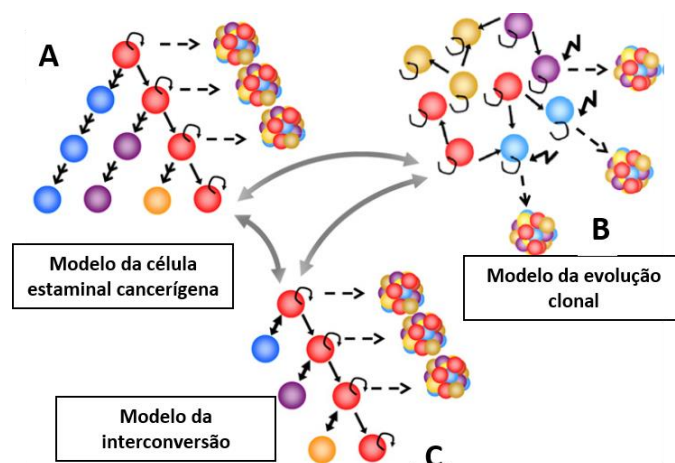
## 1.1 - Origem do Cancro

O desenvolvimento de cancro requer normalmente vários fatores estando bastante assente na genética, no ambiente envolvente do tumor e na regulação do sistema imunitário dentro de cada indivíduo. Diferentes tipos de cancros possuem diferentes riscos ambientais e aproximadamente uma em cada cinco pessoas morre de cancro (Alberts *et al*, 2007).

As células tumorais são definidas por duas características principais: reproduzem-se em desafio às restrições normais do crescimento e divisão celulares, e invadem e colonizam territórios normalmente reservados a outros tipos de células. A sua capacidade de auto-renovação é a que vai permitir manter pelo menos um descendente com o mesmo potencial de desenvolvimento (Shackleton, 2010). A invasão é uma característica fundamental das células cancerígenas por permitir a formação de metástases noutros tecidos do organismo. Nas células filhas acumulam-se alterações que lhes permitem elevado crescimento, divisão e sobrevivência, quando comparadas com as células vizinhas. O ambiente tumoral é normalmente constituído pelas células tumorais e por outros tipos celulares, como é o caso dos fibroblastos, células endoteliais inflamatórias (Alberts *et al*, 2007).

As células estaminais normais conseguem alterar as suas capacidades de proliferação e de diferenciação em resposta a alterações ambientais, sendo esta característica a que faz com que o organismo consiga manter a sua homeostase. Assim, as células estaminais cancerígenas, bem como as normais, conseguem adaptar-se a diferentes ambientes, como a exposição a agentes terapêuticos (Shackleton, 2010).

Foram propostos três modelos para explicar a propagação tumoral sendo eles o modelo da célula estaminal cancerígena (CEC), o modelo da evolução clonal, ou estocástico, e o modelo da interconversão (Figura 1). O primeiro, o mais aceite, tem em conta a possibilidade de uma perda irreversível de potencial estaminal nalgumas células cancerígenas através de mecanismos determinados hierarquicamente. O modelo da evolução clonal é baseado na instabilidade genética das células cancerígenas, em que apenas algumas ganham vantagem, ao adquirirem mutações genéticas adicionais. Por último, o terceiro modelo envolve a capacidade das células cancerígenas se interconverterem entre estados mais proliferativos ou mais quiescentes (Shackleton, 2010).



**Figura 1 - Esquema representativo dos três modelos de propagação tumoral.** (A) Modelo das Células Estaminais Cancerígenas (CEC), em que estas dão origem não só a mais CEC, como também a células não cancerígenas estáveis. (B) Modelo da evolução clonal, em que várias células possuem o potencial maligno, mas só algumas ganham vantagem na propagação da doença, ao adquirirem mutações genéticas adicionais. (C) Modelo da interconversão, em que as células conseguem passar de um estado maligno ativo para um estado relativamente quiescente, e vice-versa. As células vermelhas representam as células tumorais com potencial de auto-renovação, as células azuis, roxas e amarelas representam células não tumorais fenotipicamente distintas. As setas centrais representam a ideia de que estes modelos não são exclusivos, e que as CEC podem sofrer posteriores mutações genéticas ou podem ser interconvertidas num estado maligno menos ativo. (Adaptado de Shackleton, 2010)

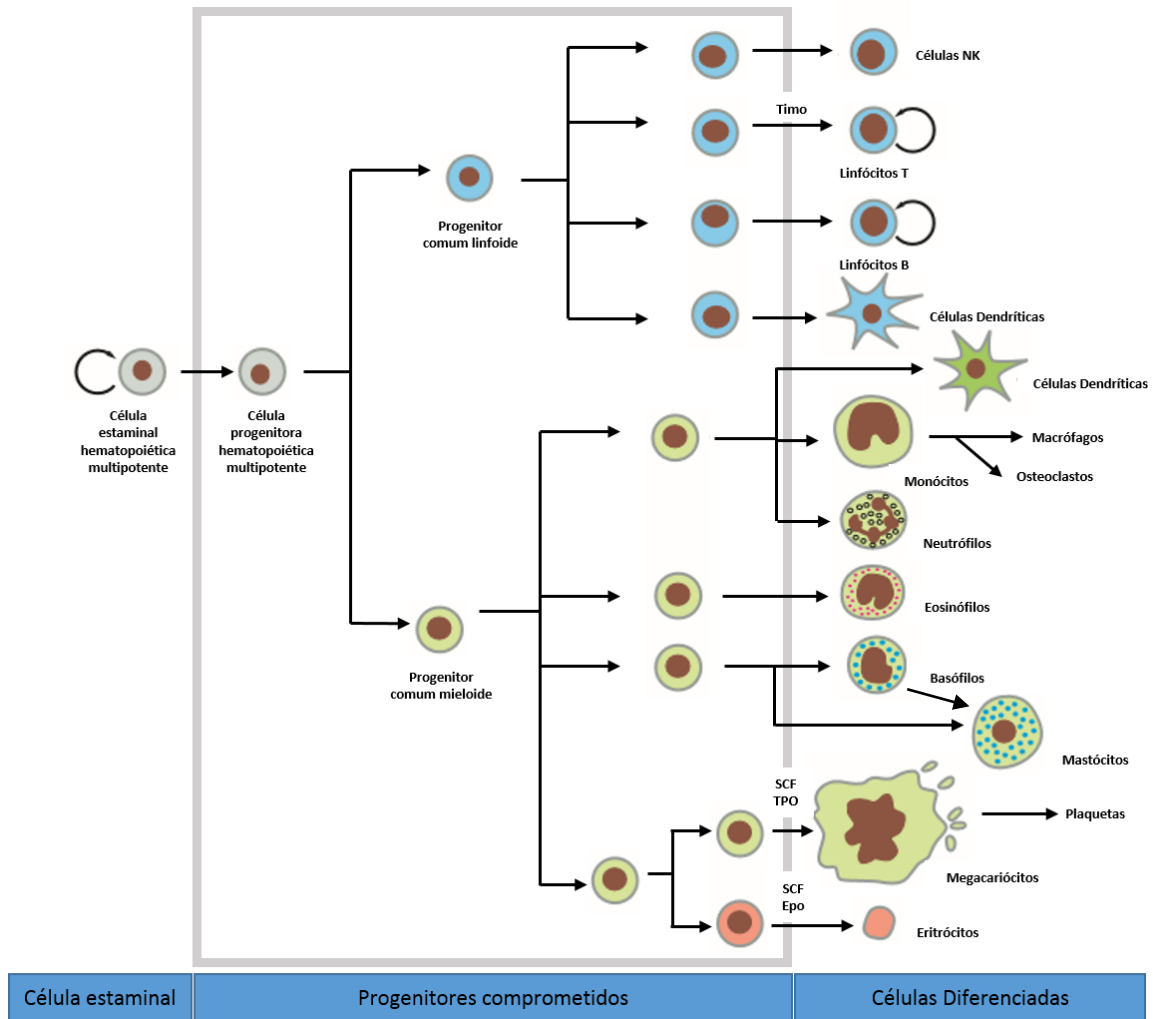
O modelo da CEC veio introduzir várias questões, como a utilização da célula estaminal cancerígena como alvo de tratamento em neoplasias, uma vez que se estas células clonais não forem removidas o tumor recidiva. Assim, a célula estaminal cancerígena encontra-se atualmente no centro de vários estudos como potenciais alvos terapêuticos para que se encontrem formas de eliminar estas células, de modo a minimizar as recidivas ao longo do tempo.

## 1.2 - Sistema Hematopoiético

O sangue possui vários tipos de células com funções desde o transporte de oxigénio até à produção de anticorpos. Todas elas são originadas a partir de uma célula estaminal comum na medula óssea (Figura 2). Esta célula estaminal hematopoiética (CEH) é multipotente, originando todos os tipos de células sanguíneas diferenciadas, bem como outros tipos de células, como os osteoclastos nos ossos (Alberts *et al*, 2007). As CEHs são células estaminais adultas que possuem características típicas, como auto-renovação,

quiescência, dormência e capacidade de diferenciação em células do sangue especializadas. A maioria das células encontram-se no seu estado quiescente no nicho, mantendo assim a *pool* de CEHs. O distúrbio da homeostase faz com que sejam enviados sinais, intrínsecos ou extrínsecos, para que as CEHs possam responder de forma adequada às necessidades do organismo (Celso e Scadden, 2011; Chotinantakul e Leeanansaksiri, 2012). Assim, o sistema hematopoiético vai permitir a criação de células completamente diferenciadas e ao mesmo tempo manter a regulação da homeostase das CEHs. A diferenciação hematopoiética é principalmente regulada pela combinação entre vários fatores de transcrição e de crescimento, e ao se dividirem, as células vão perdendo o seu potencial de auto-renovação e ganham maior comprometimento com a respetiva linhagem (Kanji *et al*, 2011).

Este sistema está, então, organizado numa hierarquia que é sustentada por uma população de CEHs quiescentes, com um período de vida longo e capacidade de auto-renovação (Wang e Dick, 2005). As CEHs não se diferenciam diretamente de um estado multipotente para um estado comprometido com uma única via de diferenciação. Estas passam por uma série de restrições específicas em que o primeiro passo é o comprometimento para uma linha mieloide ou uma linha linfoide (Alberts *et al*, 2007). Os progenitores multipotentes dão origem a progenitores oligopotentes, os progenitores comuns mielóides (PCM) e progenitores comuns linfóides (PCL). Estes progenitores diferenciam-se em células comprometidas a uma linhagem: os PCM dão origem aos megacariócitos, eritrócitos, granulócitos, macrófagos e células dendríticas, os PCL dão origem a linfócitos T, linfócitos B, células *Natural-Killer* e células dendríticas (Chotinantakul e Leeanansaksiri, 2012) (Figura 2).



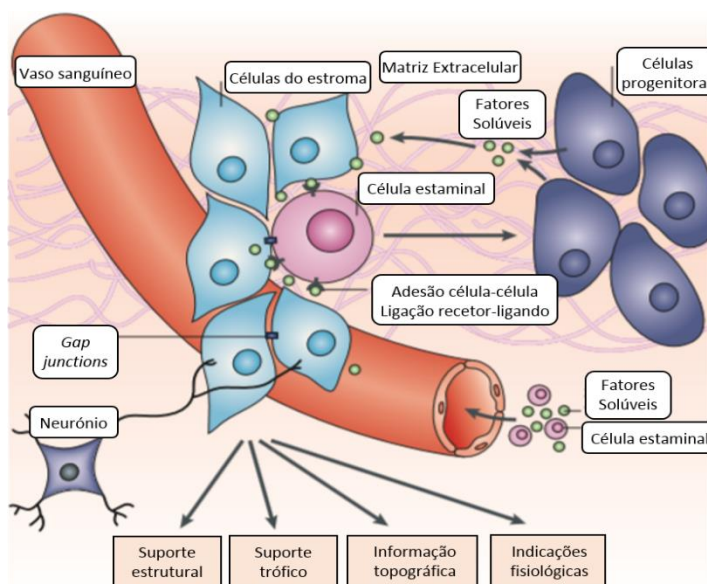
**Figura 2 - Esquema representativo da Hematopoiese.** As células estaminais hematopoiéticas possuem a capacidade de auto-renovção, de forma a manterem a sua *pool*, e de diferenciação, dando a sua primeira divisão origem aos progenitores comuns linfoide e mieloide. A diferenciação destas células vai dar origem às células maduras, tanto da linhagem mieloide como da linhagem linfoide. SCF, fator de células estaminais; TPO, trombopoietina; Epo, Eritropoietina (Adaptado de Alberts *et al*, 2007)

### 1.3 - Microambiente Medular

Foi postulada por Schofield, em 1978, a hipótese do nicho celular, que diz que as células estaminais residem em compartimentos fixos, os chamados nichos, que permitem a manutenção das propriedades estaminais. Estes nichos são compartimentos anatómicos definidos que produzem sinais para as células estaminais sob a forma de moléculas secretadas ou membranares de forma a controlarem a proliferação, a determinar o comprometimento com a descendência, e a proteger as células estaminais da exaustão ou morte. As principais funções do nicho são o suporte estrutural e trófico, a informação

topográfica celular para a regulação da função das células estaminais (Figura 3) (Jones e Wagers, 2008).

O microambiente da medula óssea consiste numa estrutura complexa, altamente especializada, composta tanto por células hematopoiéticas como por células não-hematopoiéticas (fibroblastos, adipócitos, células endoteliais), uma matriz extracelular constituída essencialmente e fatores membranares e solúveis que cooperam entre si de forma a sustentarem a hematopoiese normal, uma vez que esta não ocorre sem um ambiente de suporte (Blau, 2011). Este microambiente é constituído por dois nichos diferentes, o nicho osteoblástico e o vascular, que apresentam funções distintas no que toca à regulação da auto-renovação e da diferenciação das CEHs. Apesar de diferentes, trabalham em conjunto para um objetivo comum: a produção de células maduras sanguíneas e a sua libertação na corrente sanguínea (Jones e Wagers, 2008; Blau, 2011).



**Figura 3 - Esquema hipotético de um nicho de células estaminais, com os componentes e funções.** O nicho é uma estrutura dinâmica que recebe e transmite sinais. Os seus componentes são, geralmente, as próprias células estaminais, as células do estroma, fatores solúveis, a matriz extracelular, neurónios, a rede vascular e os componentes da adesão celular. Nem todos os nichos apresentam necessariamente todos os componentes, no entanto, todos eles apresentam os suficientes para que possam ser exercidas as suas funções específicas (Adaptado de Jones e Wagers, 2008).

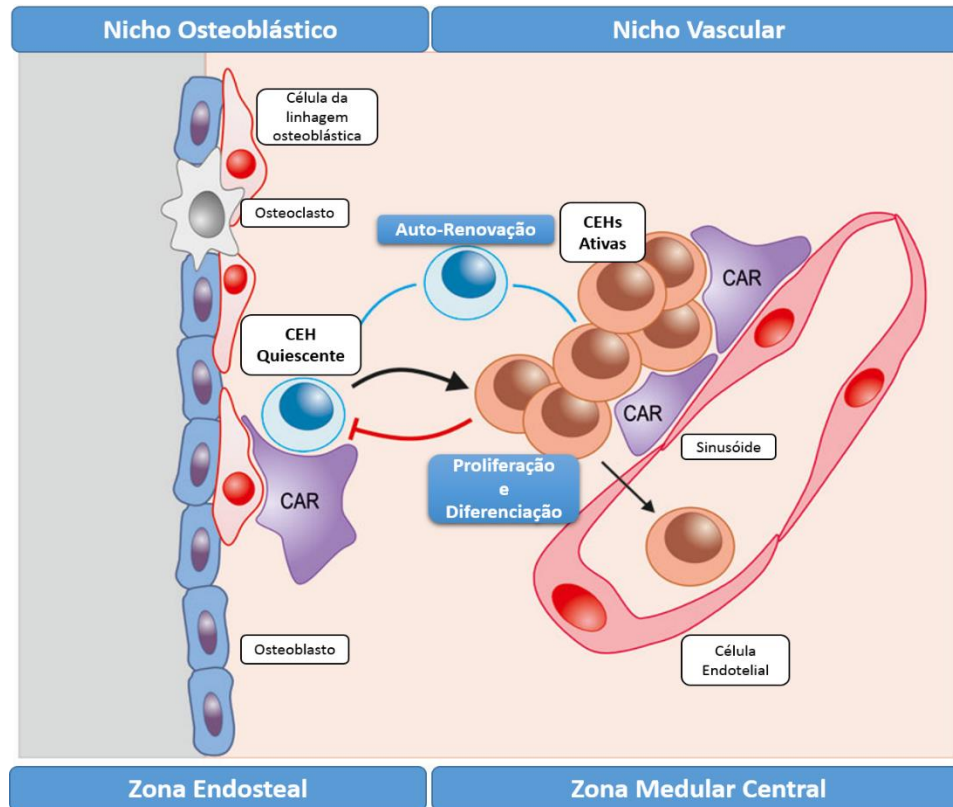
### 1.3.1 - Nichos hematopoiéticos

Para manterem a sua *pool* de células quiescentes, as CEHs necessitam de abrigo face às agressões externas. Por este motivo, vários estudos mostraram que a sua principal

localização é junto à superfície endosteal, particularmente nas regiões trabeculares, sendo também frequente a sua visualização próximo dos vasos sanguíneos (Figura 4). Sabe-se já também que quanto maior for a diferenciação das células, mais afastadas estas se encontram do endósteo (Chotinantakul e LEEANANSAKSIRI, 2012; Nwajei e Konopleva, 2013).

O nicho osteoblástico está localizado na zona endosteal. Esta zona corresponde à superfície interna da cavidade medular, é constituída por osso cortical e trabecular, onde se encontra uma hematopoiese ativa. Esta superfície é delimitada por células remodeladoras dos ossos, os osteoblastos e os osteoclastos, que trabalham em conjunto para a formação e a reabsorção óssea, respetivamente. Estas funções são importantes durante o crescimento, para uma correta mineralização óssea, e na fase adulta, para que seja recuperado o tecido ósseo perdido. As CEHs que se encontram num estado quiescente, associam-se a osteoblastos e adquirem a capacidade de sobreviver e contribuir para a hematopoiese durante um grande período de tempo. Os osteoblastos ativos formam, então, um microambiente informativo que controla a migração, a adesão e a proliferação das CEHs (Chotinantakul e LEEANANSAKSIRI, 2012; Nwajei e Konopleva, 2013).

O nicho vascular está localizado nos sinusoides. Estes são vasos sanguíneos de paredes finas, que fazem a comunicação entre a cavidade medular e a circulação sanguínea. Outras células, como as células reticulares adventícias, células do estroma perivascular, células estaminais mesenquimais e neurónios, associam-se aos sinusoides para que haja uma maior regulação e manutenção das CEHs. Neste local dá-se uma grande libertação de moléculas, como citocinas, fator de crescimento das células estaminais (SCF), CXCL12 e fosfatase alcalina, que contribuem não só para o suporte e a manutenção das CEHs, mas também para o controlo da hematopoiese (Blau, 2011; Nwajei e Konopleva, 2013). A integridade e a regeneração desta estrutura são fundamentais para que haja recuperação da medula após transplantes mieloablativos (Celso e Scadden, 2011). O nicho vascular é o local que abriga mais CEHs, sendo também aqui o local onde elas se diferenciam e proliferam (Chotinantakul e LEEANANSAKSIRI, 2012).



**Figura 4 – Microambiente medular: o nicho osteoblástico e vascular.** O microambiente medular é constituído por dois nichos – osteoblástico e vascular. O primeiro encontra-se na zona endosteal, que é constituída principalmente por osteoblastos, osteoclastos e CEHs no seu estado quiescente. O nicho vascular encontra-se situado na zona central da medula, onde há bastante vascularização. Aqui, as CEHs encontram-se no seu estado ativo, preparando-se assim para a proliferação e diferenciação celular. Durante as divisões celulares, ocorrem divisões assimétricas que dão origem a duas células filhas com funções distintas: uma mantém-se no seu estado ativo de proliferação e diferenciação, enquanto a outra regride a um estado de quiescência, regressando assim ao nicho osteoblástico. As CAR (*CXCL-12 Abundant Reticular Cells*) produzem fatores de adesão celular, auxiliando as CEHs na ancoragem aos nichos. (Adaptado de Suárez-Álvarez *et al*, 2012)

Assim, os osteoblastos conferem um contexto de dormência às CEHs, mantendo-as inativas, enquanto o nicho vascular confere um ambiente intermediário, onde as CEHs ativas estão prontas para se diferenciarem ou reverterem para o estado quiescente, dependendo das necessidades do organismo (Celso e Scadden, 2011). As divisões assimétricas destas células vão permitir que uma célula filha volte ao estado quiescente, e se desloque para o nicho osteoblástico, enquanto a segunda célula filha segue o processo de diferenciação hematopoiético (Chotinantakul e Leraanansaksiri, 2012).

As células estaminais mesenquimais são consideradas o elemento chave neste ambiente complexo (Konopleva *et al*, 2009; Blau, 2011). Estas são consideradas células não-hematopoiéticas, estaminais multipotentes que, dependendo do estímulo, são capazes de

se diferenciar em linhagens mesenquimais e não-mesenquimais. Esta capacidade de diferenciação torna estas células essenciais, pois conseguem fornecer os mais importantes componentes de suporte à hematopoiese. Os estímulos aumentam em caso de lesão, o que permite às células migrarem através da circulação para o local da lesão (Blau, 2011).

### 1.3.2 - Regulação do microambiente medular

Devido à sua elevada complexidade, é necessário que o microambiente seja altamente regulado para conseguir responder de forma eficiente aos estímulos do organismo.

As células estaminais mesenquimais apresentam um papel fundamental nesta questão, ao regularem o desenvolvimento das células hematopoiéticas através da produção de citocinas, quimiocinas e sinais intracelulares iniciados pela adesão celular. Dentro dos vários tipos de citocinas e quimiocinas produzidas salienta-se o fator derivado do estroma (SDF-1 ou CXCL12) que regula a localização das CEHs (Celso e Scadden, 2011), e o ligando do recetor da tirosina cinase 3 tipo FMS (FLT-3), FL, que juntamente com a angiopoietina-1 (ANG-1) controlam a interação com osteoblastos, a manutenção e o estado de quiescência das CEHs (Konopleva *et al*, 2009; Celso e Scadden, 2011). As células estaminais mesenquimais dão origem aos mais diversos tipos celulares, como por exemplo, os osteoblastos, os osteoclastos, as células endoteliais e as células reticulares perivasculares. Estes tipos celulares regulam a manutenção e a localização das CEHs (Konopleva *et al*, 2009).

Há também várias vias de sinalização celular que estão envolvidas na regulação das CEHs e da hematopoiese. Exemplo disso são as vias de sinalização *Wingless* (WNT), Notch e Hedgehog (HH). Os osteoblastos sobre-expressam um inibidor da via WNT, o qual tem sido associado ao bloqueio da auto-renovação das CEHs, indicando o papel desta via no microambiente medular. A via Notch e a HH estão envolvidas na proliferação, diferenciação e na manutenção das CEHs, no entanto, a HH está envolvida de uma forma indireta, ativando outra via, a via de sinalização BMP (*Bone Morphogenetic Protein*). Foi também proposta a via HH como sendo um regulador negativo da quiescência das CEHs. Existe também a via de sinalização SDF-1/CXCR4 que possui também um papel importante na manutenção e adesão das CEHs ao nicho (Celso e Scadden, 2011; Chotinantakul e Leraanaksiri, 2012).



Não menos importantes nesta função, são as proteínas de adesão que participam na retenção das CEHs aos seus nichos, como é o caso das integrinas. Estas interagem com proteínas da matriz extracelular e, juntas, controlam a mobilização das CEHs para o nicho. Há também vários componentes da matriz extracelular que participam ativamente nesta regulação, como é o caso dos glicanos e dos eicosanóides. Por fim, e como peça fundamental, os gradientes químicos de cálcio e oxigénio, e o pH. Os osteoclastos libertam cálcio durante a reabsorção óssea que vai ser posteriormente aproveitado para a atividade de outras moléculas presentes no microambiente. O gradiente de oxigénio é fundamental para o correto funcionamento das CEHs, visto que elas se encontram no seu estado quiescente em áreas hipóxicas (nicho osteoblástico), mas apresentam-se ativas em áreas ricas em oxigénio (nicho vascular) (Celso e Scadden, 2011).

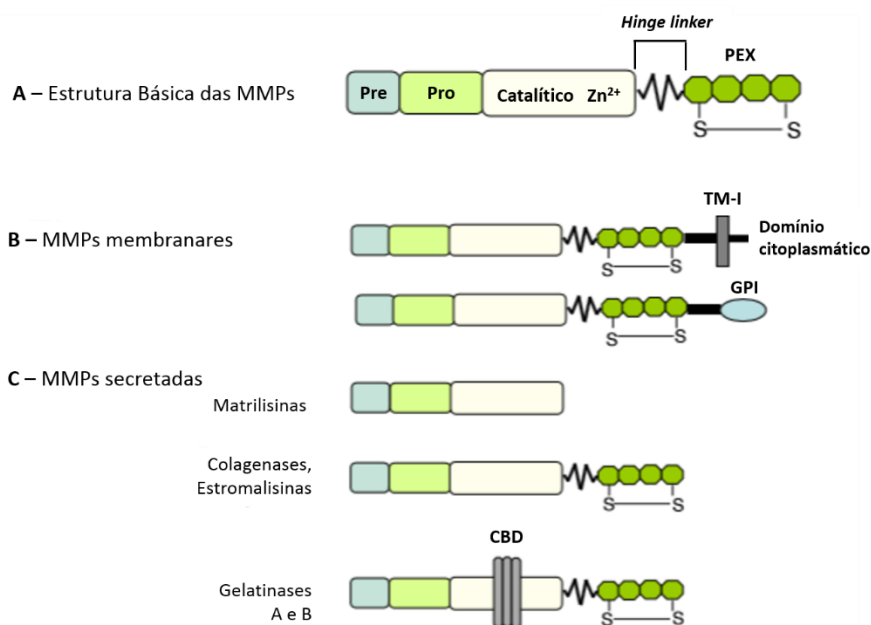
## **1.4 - Metaloproteinases da Matriz (MMPs)**

Um dos principais constituintes do microambiente são as Metaloproteinases da Matriz (MMPs). Estas são uma família de endopeptidases secretadas por um elevado número de tipos celulares, capazes de clivar várias macromoléculas presentes na matriz extracelular, bem como membranas basais. Esta família é constituída por inúmeras MMPs diferentes (Tabela 1), no entanto, estas enzimas apresentam características comuns, como a capacidade de hidrolisarem proteínas ou proteoglicanos da matriz extracelular, a necessidade de iões de cálcio e de zinco para a sua atividade catalítica, a típica forma latente em que todas são excretadas (Figura 5), e o facto de todas poderem ser inibidas pelos seus inibidores naturais, os inibidores tecidulares das MMPs (TIMPs) (Klein *et al*, 2004; Sbardella, 2012).

### **1.4.1 - Caracterização das Metaloproteinases da Matriz**

Apesar de ser uma família bastante heterogénea, as MMPs apresentam uma estrutura primária comum, com três domínios estruturalmente bem preservados: o peptídeo sinal, o propeptídeo e o domínio catalítico (Figura 5-A). O primeiro está envolvido no processo de síntese e o propeptídeo é auto-inibidor, conferindo a latência

característica destas enzimas. Para a ativação das MMPs é necessário que este domínio seja clivado. A maioria das MMPs possuem ainda um terminal carboxílico tipo hemopexina (PEX) que permite o reconhecimento e a posição dos substratos (Klein *et al*, 2004; Sbardella, 2012).



**Figura 5 – Estrutura e classificação das Metaloproteínases da Matriz.** (A) Todas as MMPs possuem uma estrutura básica, comum entre elas. Esta estrutura é constituída pelo peptídeo sinal (Pre) que guia a MMP durante a sua síntese. O domínio propeptídico (Pro) é o que confere latência à MMP. O domínio catalítico contém uma região com íons Zn<sup>2+</sup> altamente conservada. A maioria das MMPs possui também uma região no terminal carboxílico tipo hemopexina (PEX) que se encontra ligada ao domínio catalítico por um *hinge linker*. (B) As MMPs membranares possuem, a seguir à região PEX, ou um domínio transmembranar do tipo I (TM-I) ou um domínio de glicosilfosfatidilinositol (GPI), que lhes permite ficarem ancoradas na membrana. (C) Das MMPs secretadas, matrilisinas, colagenases, estromalisinas e gelatinases, as gelatinases são as que apresentam maior diferença, contendo um domínio com repetições de fibronectina tipo II, que interage com o colagénio e com a gelatina (CBD). (Adaptado de Bauvois, 2012)

No geral, esta família de proteínas apresenta funções de grande importância na morfogénese, no metabolismo de péptidos biologicamente ativos e de hormonas, regulação do ciclo celular, na proliferação celular, na migração e na adesão celular. As MMPs apresentam assim um papel regulatório, ao ativarem vários fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas que se encontram no estado latente (Bauvois, 2012). No entanto, a desregulação destas enzimas pode estar envolvida em múltiplas doenças como cancro, neurodegeneração, inflamação, artrite e doenças cardiovasculares (Sbardella, 2012).

As MMPs estão tipicamente divididas segundo a sua estrutura e a sua especificidade pelo substrato em 5 grupos principais: as colagenases, as gelatinases, as estromalisinas, as

matrilisinas e as MMPs membranares (Figura 5-B e C) (Tabela 1). Os quatro primeiros grupos estão divididos segundo a especificidade pelo substrato, enquanto as MMPs membranares estão separadas devido à sua estrutura. (Klein *et al*, 2004; Sbardella, 2012). Para além da especificidade do substrato e da estrutura, esta família apresenta outras diferenças, principalmente na sua função, sendo que algumas apresentam funções mais associadas a processos patológicos, como é o caso das gelatinases (Tabela 1).

#### 1.4.2 - Regulação das Metaloproteinases da Matriz

Tendo em conta a quantidade de processos fisiológicos em que as MMPs participam, e a importância destes processos, estas enzimas têm que ser altamente reguladas. A regulação das MMPs dá-se a três níveis principais: a nível da transcrição, da ativação das MMPs latentes e da inibição das MMPs.

Existem vários fatores que alteram os níveis de expressão basal e a estabilidade do ácido ribonucleico mensageiro (ARNm) das MMPs, quando é necessária uma remodelação da matriz extracelular. São exemplo destes fatores as citocinas, os fatores de crescimento, as hormonas, os próprios componentes da matriz extracelular e os contactos célula-célula (Klein *et al*, 2004; Yu e Han, 2006). Para além deste nível de regulação, as gelatinases são ainda reguladas por modificações pós transcricionais (Yu e Han, 2006).

As MMPs são normalmente expressas como precursores latentes sob a forma solúvel ou membranares. Para que possam ser ativadas, é necessário que ocorra a clivagem do seu terminal amínico, e que o íon zinco passe a estar disponível para interações com os substratos (Yu e Han, 2006). Esta clivagem é feita por proteases serínicas presentes no plasma ou nos tecidos, como a plasmina e a urocinase, removendo o domínio propeptídico, e induzindo uma ativação autocatalítica das MMPs. As MT-MMPs e a proMMP-2 são a exceção a esta regra, uma vez que as MT-MMPs são ativadas intracelularmente antes do transporte para a superfície celular, e as proMMP-2 não apresentam um motivo básico de aminoácidos, não podendo ser ativadas desta forma (Klein *et al*, 2004). Neste caso, outras formas da ativação ocorrem, sendo a mais comum a ativação dependente de outras MMPs, normalmente as MT-MMPs, que necessita também da colaboração de pequenas quantidades de TIMPs. Neste caso ocorre uma clivagem para formar uma forma intermediária da molécula e esta forma intermediária é processada novamente para a forma ativa (Yu e Han, 2006).

**Tabela 1 - Classificação das Metaloproteínas da Matriz.** Caracterização segundo o substrato, funções no estado neoplásico e não-neoplásico e neoplasias associadas à sua desregulação.

Classificação	Substrato	Função	Neoplasias associadas	Tipo
<b>Colagenases</b>	Colagénio tipo I, II, III, VII, X e XIV Fibronectina Reconhecimento pelo PEX	<u>No tecido normal:</u> remodelação do colagénio na matriz extracelular - cicatrização <u>No tecido neoplásico:</u> libertação de fatores de crescimento; promoção do crescimento tumoral; invasão tumoral	Cancro da mama Tumores no sistema digestivo Cancro do ovário Carcinoma das células escamosas	MMP-1 MMP-8 MMP-13
<b>Gelatinases</b>	Colagénio desnaturado (gelatina), tipo I, II, IV, V e X Laminina V Reconhecimento pelo CBD e pelo PEX Citocinas, recetores, fatores de crescimento	Maioritariamente associadas a <u>processos patológicos:</u> propriedades pro-inflamatórias; criação do microambiente favorável ao crescimento das células tumorais; sobrevivência celular; angiogénese; migração celular	Cancro da mama Cancro da próstata Tumores no sistema digestivo Cancro nos ossos Melanoma	MMP-2 (A) MMP-9 (B)
<b>Estromalinas</b>	Colagénio tipo III, IV, V e IX e X, laminina, fibronectina, elastina, proteoglicanos Citocinas, fatores de crescimento, moléculas solúveis reguladoras	<u>No tecido normal:</u> Implantação dos embriões, formação do cordão umbilical, morfogénese, ovulação Ativação de outras MMPs <u>No tecido neoplásico:</u> Migração celular Iniciação e progressão tumoral Angiogénese Propriedades pro-apoptóticas	Cancro da pele Cancro da mama Cancro do útero Cancro da cabeça e do pescoço	MMP-3 MMP-10 MMP-11
<b>Matrilisinas</b>	Maioria dos componentes da matriz extracelular Citocinas, fatores de crescimento e recetores	Alteração da matriz extracelular Correlacionadas com a agressividade tumoral Invasão e metastização Angiogénese	Cancro das células escamosas do esófago Cancro do pulmão de não-pequenas células Cancro da mama Cancro do colon	MMP-7 MMP-26
<b>Membranares (MT-MMPs)</b>	Colagénio tipo I, III e IV Fibronectinas, lamininas, Fibrina	<u>No tecido normal:</u> Sinalização e localização sub-celular, dimerização e tráfico de MT-MMP, ativação de outras MMPs <u>No tecido neoplásico:</u> Invasão tumoral, metastização Modulação da adesão celular e da organização do citoesqueleto	Cancro da mama Cancro cervical Cancro do colon Cancro da bexiga Cancro gástrico Glioma Cancro pancreático Cancro do fígado Cancro do ovário Cancro da próstata Cancro da tiróide	MT-1 MMP MT-2 MMP MT-3 MMP MT-4 MMP MT-5 MMP MT-6 MMP

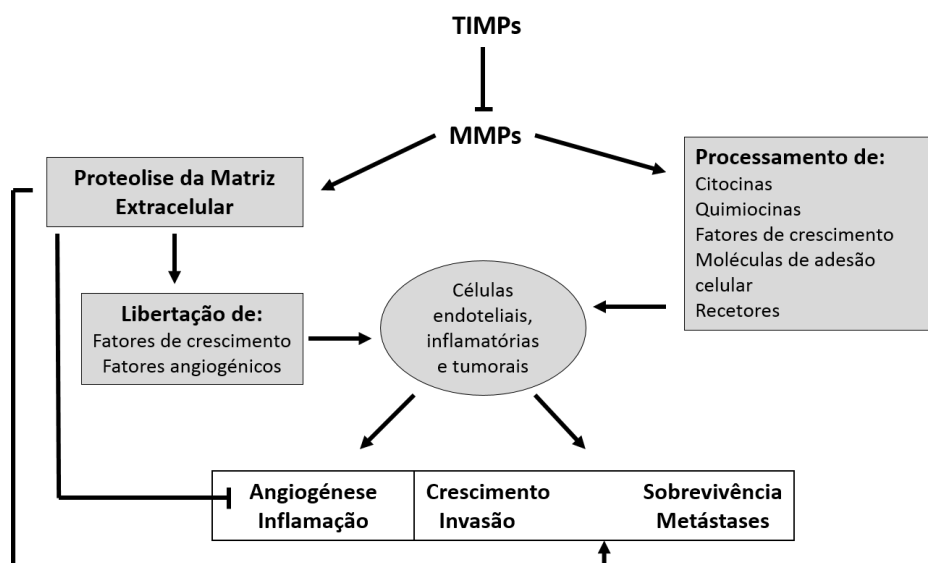
Quanto à inibição das MMPs, esta pode ocorrer de diferentes formas. Existem inibidores endógenos que garantem o equilíbrio da atividade das MMPs, em que os mais comuns são os TIMPs e a  $\alpha_2$  macroglobulina ( $\alpha_2$ M) (Klein *et al*, 2004).

Os TIMPs são um grupo de proteínas endógenas, constituído por quatro elementos, TIMP-1 a 4. Estes ligam-se ao local ativo das MMPs resultando numa inibição reversível da sua atividade enzimática. Os TIMPs apresentam padrões de inibição específicos para as MMPs, visto que a especificidade para as MMPs e a sua distribuição nos tecidos difere entre os TIMPs. Foi já observado também que os TIMPs conseguem inibir as proMMPs impedindo a correta ativação da enzima (Yu e Han, 2006). Para além da modulação da atividade das MMPs, e portanto influenciar a angiogénese e o crescimento tumoral, os TIMPs também provocam a redução do crescimento celular e são capazes de induzir apoptose (Klein *et al*, 2004). É necessário um correto equilíbrio entre as MMPs e as TIMPs para que haja a manutenção da homeostase da matriz extracelular (Yu e Han, 2006).

A  $\alpha_2$ M é um inibidor de proteases não específico, expresso normalmente no plasma sanguíneo. A sua estrutura permite que se ligue ao local ativo das MMPs induzindo a atividade catalítica destas. Assim que a  $\alpha_2$ M é clivada, sofre uma alteração estrutural que lhes permite capturar as MMPs, e expor o próprio domínio recetor, sendo todo o complexo rapidamente enviado para as vias de endocitose. Sabe-se também que a  $\alpha_2$ M consegue capturar também MMPs inativas (Klein *et al*, 2004).

### **1.4.3 - O papel das Metaloproteinases da Matriz no cancro**

Como referido anteriormente, as MMPs regulam uma série de processos celulares, e a sua atividade necessita de uma estreita regulação. Quando ocorre desregulação das MMPs ocorre um descontrolo de sinalização celular, contribuindo para a formação de neoplasias. Tem sido descrita a ligação das MMPs com vários processos tumorais, em particular no crescimento tumoral, na metastização e angiogénese (Figura 6).



**Figura 6 - Resumo esquemático do papel das Metaloproteínases da Matriz no cancro.** As MMPs processam moléculas sinalizadoras, como as citocinas e as quimiocinas, que têm como alvo as células endoteliais, inflamatórias e tumorais, promovendo os processos de angiogénese, inflamação, crescimento, invasão, metastização e sobrevivência. Por outro lado, as MMPs degradam a matriz extracelular, permitindo a invasão celular e a metastização, e libertando os fatores de crescimento e angiogénicos que se encontram na matriz. No entanto, as MMPs também libertam alguns inibidores como a endostatina. (—| regulação negativa, —> regulação positiva). (Adaptado de Bauvois, 2012.)

O processo de metastização pode ser dividido em várias etapas, que resumidamente envolvem a dissociação das células do tumor, invasão da matriz extracelular, migração pelo sistema circulatório para locais distantes do tumor original, invasão do novo ambiente e sobrevivência e crescimento das células tumorais no novo ambiente. Neste caso, o papel das MMPs parece ser a degradação da matriz extracelular para que as células tumorais possam migrar e colonizar novos tecidos (Klein *et al*, 2004).

A angiogénese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes, e é um pré-requisito para o crescimento e metastização tumoral. Um dos primeiros passos para a angiogénese tumoral é a degradação da matriz extracelular pelas MMPs. Depois disto, as células endoteliais conseguem migrar e proliferar para que haja a formação dos novos vasos. Para além disto, a degradação da matriz vai libertar, clivar e ativar fatores de crescimento que vão promover o crescimento tumoral. No entanto, as MMPs não têm apenas um efeito positivo na angiogénese. A degradação da matriz liberta também alguns fragmentos da própria matriz, fragmentos de plasminogénios, e mesmo alguns domínios das MMPs (PEX) que tem sido associados na inibição da angiogénese. Por outro lado, os TIMPs, ao inibirem as MMPs, vão indiretamente inibir a degradação da

matriz e por sua vez inibir a angiogénese. Assim, o processo de formação de novos vasos mantém-se controlado (Klein *et al*, 2004).

O principal papel das MMPs na progressão tumoral é, então, a degradação da matriz extracelular e a libertação e ativação de fatores de crescimento, em que os produtos resultantes desta atividade são capazes de afetar esta progressão (Klein *et al*, 2004). No entanto, sabe-se que algumas MMPs, nomeadamente as gelatinases não promovem a invasão das membranas basais, possuindo antes um papel indireto na regulação do ciclo celular, ao controlar a biodisponibilidade e a bioatividade das moléculas que regulam processos como crescimento celular, migração, inflamação e angiogénese (Bauvois, 2012).

Na Tabela 1 estão descritas as funções de cada grupo de MMPs no tecido tumoral, bem como as neoplasias em que ocorre a alteração da sua expressão e/ou atividade.

#### **1.4.4 - O papel das MMPs nas neoplasias hematológicas**

Durante a hematopoiese normal, o microambiente é a entidade responsável por regular a proliferação, diferenciação e migração das CEHs, através das suas interações com estas. Sendo as MMPs um constituinte importante do microambiente, estas enzimas tornam-se também responsáveis pelo controlo destes processos. Por exemplo, ao degradarem a matriz libertam citocinas e fatores de crescimento que vão alterar as interações das CEHs com o microambiente e, ao mesmo tempo, promovem a migração e a diferenciação das CEHs. Sabe-se também que as MMPs participam no processo de reconstrução hematopoiética depois de eventos mieloablativos. Para além disto, participam também em processos que envolvem células mais diferenciadas, como é o caso da migração dos megacariócitos e libertação de plaquetas (Yu e Han, 2006).

Como foi referido, é necessária uma regulação estreita das MMPs para garantir uma correta alteração da matriz, de forma a manter a homeostase da medula óssea. Uma simples alteração na expressão ou na atividade destas enzimas é o suficiente para alterar o microambiente hematopoiético, resultando numa hematopoiese anormal (Yu e Han, 2006).

Nas neoplasias hematológicas sabe-se que as MMPs participam na maioria dos processos de progressão leucémica da mesma forma que contribuem para a progressão de

qualquer outro tumor, através da degradação da matriz e libertação de citocinas e fatores de crescimento, podendo também ter um papel contrário, ao inibirem a angiogénese através da libertação de fragmentos de constituintes da matriz e das próprias MMPs. Este duplo papel é o que pode explicar em parte a diferença de níveis de expressão entre várias linhas celulares de neoplasias hematológicas e mesmo entre doentes com várias neoplasias (Yu e Han, 2006).

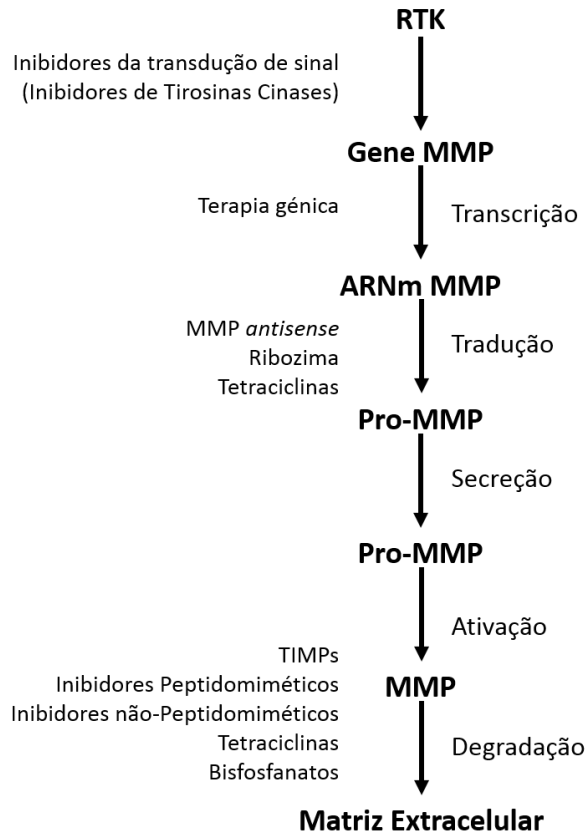
As gelatinases são o grupo de MMPs que se encontra melhor estudado neste tipo de neoplasias. Por serem as MMPs que estão mais sobreexpressas em vários tipos de cancro, e pela sua expressão estar associada com a agressividade tumoral e com o mau prognóstico, estas poderão ser consideradas como biomarcadores tumorais. As neoplasias hematológicas não são exceção, podendo ser observada uma desregulação na expressão das MMPs na leucemia linfoblástica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, síndrome mielodisplásica e linfoma de Hodgkin e não Hodgkin (Bauvois, 2012).

#### **1.4.5 - Inibidores sintéticos das Metaloproteinases da Matriz**

Desde a expressão génica até a atividade da enzima, há vários momentos onde as MMPs podem ser reguladas, e é a partir desses pontos que se têm desenvolvido várias abordagens terapêuticas (Figura 7).

Alguns estudos mostraram que a via das MAP cinases (MAPK) está diretamente envolvida na expressão génica das MMPs. Assim, usando inibidores das MAPK é possível diminuir a expressão de MMPs (Hidalgo e Eckhardt, 2001). Uma outra forma de inibição encontra-se a nível do ARNm através do uso de oligonucleótidos *antisense*. A principal vantagem deste método é a especificidade para os tipos de MMPs, reduzindo assim os efeitos secundários sistémicos (Hidalgo e Eckhardt, 2001).





**Figura 7 - Representação esquemática de possíveis abordagens terapêuticas para inibir as MMPs.** Existem vários pontos onde as MMPs podem ser inibidas, desde a expressão gênica até à sua atividade enzimática. Processos como a transcrição gênica, a tradução, a secreção, a ativação e ainda a atividade enzimática podem ser vistos como alvos terapêuticos. Do lado esquerdo do esquema estão indicados possíveis intervenientes aos vários níveis. (Adaptado de Hidalgo e Eckhardt, 2001.) RKT - Recetores com atividade de Tirosina Cinase.

Apesar destas opções, inibir a função das MMPs na matriz extracelular parece ser uma melhor opção terapêutica. À primeira vista, os TIMPs seriam boas opções terapêuticas, mas por apresentarem um período de meia-vida demasiado curto, e por não ter sido encontrado um método eficiente de entrega de genes, foram excluídos. Assim, começaram a ser desenvolvidos inibidores sintéticos de MMPs. Estes são divididos em quatro categorias principais: os peptidomiméticos de colagénio, os não-peptidomiméticos, os derivados de tetraciclina e os bisfosfonatos (Hidalgo e Eckhardt, 2001; Klein *et al*, 2004).

Os inibidores peptidomiméticos são sintetizados de forma a imitarem a estrutura do colagénio no local onde as MMPs se ligam para o clivar. O inibidor liga-se reversivelmente no local ativo das MMPs de uma forma estereoespecífica e induz a quelatação do átomo de zinco no local de ativação da enzima. Existem vários grupos de ligação ao zinco, mas o mais usado é o hidroxamato. Exemplos destes inibidores são o Batimastat e o Marimastat.

O Batimastat foi o primeiro inibidor de MMPs a ser testado em doentes com cancro. É um fármaco de baixo peso molecular, que demonstrou efeitos anti-proliferativos em várias linhas celulares, em modelos metastáticos e de crescimento tumoral (Hidalgo e Eckhardt, 2001).

Para superar os problemas da pouca biodisponibilidade oral no caso do Batimastat, e da falta relativa de especificidade para as MMPs, foram introduzidos os inibidores não-peptidomiméticos. Estes são sintetizados com base na conformação tridimensional da cristalografia por raio-x do local ativo das MMPs (Hidalgo e Eckhardt, 2001; Klein *et al*, 2004). A maioria destas moléculas demonstrou possuir uma atividade anti-tumoral em modelos pré-clínicos. Por exemplo, o AG3340, BAY 12-9566 e BMS-275291 são fármacos desenhados especificamente para inibirem as MMP-2 (Hidalgo e Eckhardt, 2001).

Os derivados de tetraciclina são antibióticos clássicos como a tetraciclina, a doxiciclina e a minociclina que foram modificados para eliminar a sua atividade antibiótica. A ação destes inibidores é atingida através de diferentes mecanismos como o bloqueio da atividade de MMPs maduras pela quelatação do átomo de zinco, interferem com a atividade proteolítica da enzima, reduzem a expressão de MMPs, e protegem as MMPs de degradação oxidativa e proteolítica (Hidalgo e Eckhardt, 2001).

Os bisfosfonatos são compostos sintéticos que possuem uma elevada afinidade pela hidroxiapatite nos ossos. Ainda não é bem conhecido o seu mecanismo de ação, no entanto pensa-se que estes inibem diretamente os osteoclastos, e como a produção de citocinas. Nas MMPs pensa-se possuírem funções inibitórias a nível da atividade enzimática (Hidalgo e Eckhardt, 2001).

É, no entanto, difícil obter a aprovação de um fármaco, pois existe uma grande falibilidade nos ensaios clínicos. As principais causas são a toxicidade dependente da dose, o facto de os ensaios serem realizados em doentes em fase terminal, o que implica a simultaneidade de várias vias afetadas, e o principal motivo, a dificuldade em ter inibidores altamente específicos, visto o local ativo das MMPs ser muito semelhante entre todos os tipos (Bauvois, 2012). Este último ponto torna-se importante na medida em que as diferentes neoplasias apresentam alterações em diferentes tipos de MMPs.

#### 1.4.6 - Batimastat

A nível celular, estão já estudados alguns mecanismos moleculares deste fármaco. O que está melhor descrito na literatura é o bloqueio da ativação do Recetor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR). Este é um recetor que possui vários ligandos, e ao ser ativado, sofre dimerização e autofosforilação em vários resíduos de tirosina. Este processo vai ativar segundos mensageiros que ativam diversas vias de sinalização intracelulares como a via das MAPK e da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K). Depois da fosforilação do recetor, a via das MAPK é ativada através da ativação da proteína G RAS, pela indução da ativação de serina/treonina cinase RAF e ativação das cinases reguladas extracelularmente (ERK) 1 e 2. São estas últimas que vão ativar fatores de transcrição que regulam a proliferação celular e a progressão do ciclo celular. A via da PI3K é ativada pela fosforilação da molécula fosfatidilinositol-2-fosfato (PIP2), dando origem ao segundo mensageiro fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP3). Um dos alvos desta via, a proteína cinase B (PKB), possui efeito anti-apoptótico, envolvendo o fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Também foi demonstrada a importância desta via na progressão do ciclo celular ao envolver a proteína cinase C (PKC). Simultaneamente, a PKB regula a via das MAPK ao inibir a RAF. O EGFR está também envolvido nos mecanismos de adesão celular. Este recetor ativa as cinases de adesão focal (FAK), o que vai levar a uma colaboração entre o EGFR e as integrinas para que ocorram os processos de migração e adesão celular (Prenzel *et al*, 2001). O Batimastat, ao inibir a MT1-MMP, esta não consegue ativar os ligandos do EGFR e as vias de sinalização celular descritas ficam bloqueadas, inibindo também processos como a migração celular, a transcrição de genes, a progressão do ciclo celular, a sobrevivência e a proliferação celular (Prenzel *et al*, 2001).

A equipa de Uchiyama-Tanaka (2002) observou que o fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) está envolvido na ativação das ERK, e que as MMPs ativam e libertam o fator intermediário entre o TGF- $\beta$  e as ERK – fator de ligação à heparina tipo EGF (HB-EGF) (Uchiyama-Tanaka *et al*, 2002). Por sua vez, Fromigué e colaboradores (2003), verificaram que a MMP-11 não cliva os componentes típicos da matriz extracelular, mas sim inibidores de proteases serínicas, bem como a proteína de ligação ao fator de crescimento tipo insulina-1 (IGF-BP1). Esta última modula a atividade do IGF-1, que é um conhecido fator de sobrevivência de células malignas, através da ativação das duas vias acima descritas (Fromigué *et al*, 2003). Nestes dois casos, o Batimastat apresenta-se como um inibidor da via de sinalização das MAPK.

Outro mecanismo de ação do Batimastat está ligado aos recetores de Interleucinas (RIL). Quando são libertados sinais anti-inflamatórios, observa-se um aumento da expressão génica dos RIL armadilha e libertação destes nas células mielomonocíticas. Quando no meio está presente Batimastat ocorre bloqueio tanto a nível das vias de produção dos RIL, como a nível das vias de libertação dos mesmos (Orlando *et al*, 1997).

Foi observado por Erba e os seus colaboradores (1999), que o Batimastat apresenta um efeito inibidor clonogénico, isto é, impede a proliferação dos clones malignos. Esta equipa observou também que o Batimastat induz um bloqueio na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> numa linha celular de cancro do ovário (Erba *et al*, 1999).

Todas estas observações apontam para a potencial relevância do Batimastat no tratamento do cancro, em particular de neoplasias hematológicas.

## 1.5 – Neoplasias Hematológicas

O objetivo principal da hematopoiese, como descrito na secção 1.2, é a produção de células sanguíneas diferenciadas que desempenhem as funções necessárias à homeostasia do organismo. No entanto, elas possuem um período de vida limitado, sendo necessária uma produção constante ao longo da vida (Alberts *et al*, 2007). Este processo de reposição constante implica uma acumulação de erros, que por vezes leva ao desenvolvimento de neoplasias.

As Leucemias são um grupo de neoplasias hematológicas onde ocorre proliferação descontrolada das células hematopoiéticas na medula, bem como bloqueio da diferenciação terminal devido à transformação maligna das CEHs. Estes processos vão culminar numa rápida acumulação de células imaturas e outras proliferativas na medula (blastos). Com a agregação das células pode ocorrer um colapso das interações célula-estroma, originando mobilização das células imaturas da medula para o sangue periférico. Este processo pode levar à invasão destas células transformadas para outros tecidos (Yu e Han, 2006).

A classificação deste tipo de neoplasias prende-se com o tipo de linhagem afetada, a velocidade de progressão da doença e com a presença de alterações genéticas, como as mutações ou as translocações (Alves, 2011). Apesar da existência de vários tipos de

leucemias, há vários aspetos comuns entre todas. O primeiro é a formação deficiente de células do sangue, levando a anemia, hemorragia por falta de plaquetas, e infeções relacionadas com deficiências na linhagem mieloide ou linfoide. Outro aspeto comum é a presença de massas tumorais com elevados níveis de células leucémicas no sangue, órgãos linfoides ou outros órgãos, como por exemplo o Sistema Nervoso Central (Thé *et al*, 2012).

### 1.5.1 - Leucemia Promielocítica Aguda (LPA)

A LPA é uma forma de Leucemia Mieloide Aguda (LMA), do subtipo M3, segundo a classificação do grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) (He *et al*, 2000). Apesar de rara, é uma neoplasia bastante agressiva, visto que apresenta uma evolução espontânea muito rápida (Thé *et al*, 2012). Caracteriza-se pela acumulação anormal na medula de precursores mieloides bloqueados no estado de promielócito. Este bloqueio vai originar leucocitoses severas e hemorragias (Lin *et al*, 1999).

Alterações genéticas e/ou epigenéticas no gene do recetor nuclear do ácido retinóico  $\alpha$  (RAR $\alpha$ ) podem ocorrer, sendo a mais comum a translocação recíproca entre o gene RAR $\alpha$  (Cromossoma 17) e o PML (Cromossoma 15). Em resultado desta translocação formam-se a proteína de fusão PML-RAR $\alpha$ , presente em mais de 98% dos casos de LPA (Thé *et al*, 2012). O gene PML (*Promyelocytic Leukemia gene*) funciona como organizador de domínios nucleares, participando no controlo do crescimento celular, bem como no processo de morte celular programada. Neste caso, é esta a proteína responsável pelo bloqueio da diferenciação mielóide (Lin *et al*, 1999; Thé *et al*, 2012). O RAR $\alpha$  é o gene do recetor  $\alpha$  do ácido retinóico e está implicado na regulação do desenvolvimento, da diferenciação e da granulopoiese (Wang e Chen, 2008).

O Ácido *all-trans* Retinóico (ATRA) é o tratamento de primeira linha da LPA, induzindo remissão completa na maioria dos doentes. A remissão completa da doença dá-se quando há a diferenciação terminal dos blastos leucémicos em neutrófilos. No entanto, a maioria dos doentes adquirem resistência secundária e conseqüentemente recidivas. Estas recidivas podem ser ultrapassadas com o uso de trióxido de arsénio, no entanto este revelou ser tóxico para os fibroblastos (Lin *et al*, 1999). Neste sentido, é necessário encontrar novas abordagens terapêuticas para o tratamento deste tipo de leucemia.

### 1.5.2 - Síndrome Mielodisplásica (SMD)

A SMD constitui um grupo heterogéneo de doenças clonais da célula estaminal hematopoiética, caracterizadas pela presença de medula hiperclular e displásica com hematopoiese ativa, mas ineficaz, que origina diminuição na produção de células sanguíneas (citopenias) (Nimer, 2008). Esta hematopoiese ineficaz deve-se ao facto de ocorrer apoptose intramedular excessiva (Raza e Galili, 2012). A SMD apresenta um elevado risco de evolução para LMA (Tefferi e Vardiman, 2009), e pode ser dividida em duas categorias principais: a primária e a secundária (ou relacionada com terapia) (Foran e Shammo, 2012).

Atualmente, a SMD segue a classificação estabelecida pela Organização Mundial de Saúde, em 2008, dividindo os doentes em sete grupos, entre eles Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA), Citopenia Refratária com Displasia Uni- ou Multilinhagem (CRDU ou CRDM), Anemia Refratária com Excesso de Blastos-1 ou -2 (AREB-1 ou AREB-2) e SMD associada à deleção isolada do cromossoma 5q (Síndrome 5q-). Esta classificação é feita tendo por base as características displásicas das células afetadas e a contagem de blastos. Para avaliar o prognóstico dos doentes utiliza-se o *International Prognostic Scoring System* (IPSS), que se baseia na contagem de blastos, no cariótipo do doente e no número de citopenias (Vardiman *et al*, 2009).

Devido à sua heterogeneidade morfológica e citogenética, a doença nas suas várias formas constitui um grupo de entidades molecularmente distintas com vários graus de hematopoiese deficiente e de suscetibilidade de transformação para leucemia. Mutações secundárias, haploinsuficiência, alterações epigenéticas, respostas alteradas a citocinas, bem como alterações do sistema imunitário contribuem para o fenótipo da doença (Tefferi e Vardiman, 2009). A progressão da SMD pode ser definida pelo agravamento das citopenias, aumento relativo do número de blastos na medula com transformação leucémica (Hellström-Lindberg e Malcovati, 2008).

### 1.5.3 - Mieloma Múltiplo (MM)

O MM é uma neoplasia das células B, progressiva e fatal, com maior incidência em idades entre os 65 e os 70 anos. É caracterizada por proliferação maligna de plasmócitos monoclonais na medula, normalmente mais de 10%, sobreprodução de imunoglobulinas

(Ig) ou proteínas de cadeias leves (>30g/L) no soro ou na urina, por lesão de órgão (sintomas CRAB: hipercalcemia, insuficiência renal, anemia e lesão óssea) (Hecht *et al*, 2007; Allegra *et al*, 2013; Oranger *et al*, 2013).

O MM normalmente surge pela evolução de uma condição pré-maligna, a Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado (MGUS). A progressão para o estado maligno resulta de alterações no microambiente medular, onde há um aumento da angiogênese, da supressão da resposta imunitária e reabsorção óssea elevada. O equilíbrio entre as funções dos osteoblastos e dos osteoclastos fica comprometido, pois ocorre aumento da função dos osteoclastos em detrimento da função dos osteoblastos. Foi já observada uma produção de fatores pelas células malignas que as tornam impercetíveis ao sistema imunitário, o que induz um agravamento rápido da doença (Oranger *et al*, 2013).

Quanto às terapias, existem já vários fármacos disponíveis, como o Bortezomib, Lenalidomida e o Talidomida. No entanto tem sido relatadas inúmeras recidivas, o que tem feito com que continuem a ser procuradas novas estratégias terapêuticas (Allegra *et al*, 2013).

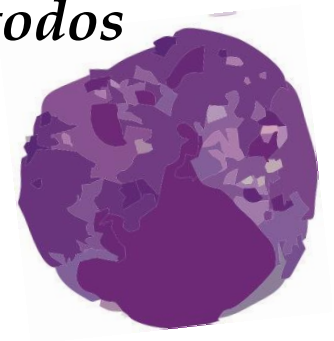
## 1.6 - Objetivos

Um dos grandes problemas dos doentes hematológicos são as recidivas e o desenvolvimento de resistência às terapêuticas existentes, tornando-se necessário procurar alternativas que superem este problema. A ação dos inibidores das MMPs, apesar de estarem bastante estudados em diferentes neoplasias, pouco se conhece no que toca a neoplasias hematológicas. Assim, este trabalho tem como principal objetivo avaliar o potencial terapêutico de um inibidor das MMPs, neste caso o Batimastat, em modelos *in vitro* de diferentes neoplasias hematológicas, em administração única ou fracionada, bem como alguns dos seus mecanismos de ação.





## ***2. Materiais e Métodos***





## 2.1 – Descrição das linhas celulares

Neste estudo foram utilizadas quatro linhas celulares de neoplasias hematológicas: a linha HL-60 e a linha NB-4, ambas estabelecidas a partir de doentes com LPA, a linha F-36P, estabelecida a partir de um doente com SMD, e a linha NCI-H929, estabelecida a partir de um doente com MM.

A linha celular HL-60, obtida na ATCC, foi estabelecida por Collins e seus colegas, em 1977, tendo sido uma das primeiras culturas em suspensão a ser estabelecida. Esta linha foi obtida de leucócitos do sangue periférico de uma doente do sexo feminino, caucasiana, com 36 anos de idade, por meio de uma leucoferese. As células HL-60 apresentam a particularidade de não possuírem a translocação t(15;17) característica da LPA (Drexler, *et al* 1995). Quanto à morfologia, as células apresentam características de promielócitos, são redondas ou ovóides, possuem um núcleo largo e redondo com margens regulares e bem definidas, com a cromatina fina e entre 2 a 4 nucléolos (Gallagher *et al*, 1979).

A segunda linha utilizada, NB-4, obtida na DSMZ, foi estabelecida a partir da medula óssea de uma doente do sexo feminino, com 23 anos de idade que apresentava características morfológicas, tipos citogenéticos e clínicos de LPA em segunda recidiva e resistente ao tratamento com ATRA. Esta linha celular apresenta a translocação t(15;17) que dá origem ao gene de fusão PML/RAR $\alpha$  (Drexler *et al*, 1995). Morfologicamente, esta linha caracteriza-se pela presença de células isoladas em suspensão, redondas e polimórficas, com a presença de poucas células gigantes.

A linha celular F-36P, obtida na ECACC, foi estabelecida a partir do líquido pleural de um doente do sexo masculino, diagnosticado com AREB-t, um subtipo de SMD, de acordo com a classificação FAB. Morfologicamente, as células apresentam normalmente núcleos multilobulados, com a cromatina em posição marginal e alguns nucléolos grandes, citoplasma proeminente contendo os mais diversos constituintes celulares. Em termos citogenéticos, as células desta linha apresentam várias anomalias cromossômicas, incluindo várias deleções e a presença de 4 cromossomas marcadores (Chiba *et al*, 1991).

Por fim, a linha celular H929, obtida também na ATCC, foi estabelecida a partir do líquido pleural de uma doente do sexo feminino, caucasiana, de 62 anos, diagnosticada com mieloma múltiplo IgAk. Morfologicamente, estas células possuem retículo

endoplasmático rugoso e abundante, muitas mitocôndrias, nucléolos proeminentes e a cromatina encontra-se agregada. A nível citogenético, a maioria das células são tetraplóides e apresentam rearranjo próximo do gene *c-myc*. (Gazdar *et al*, 1986)

Todas as linhas celulares foram mantidas em cultura no meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI 1640) (Gibco) 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 (Gibco), 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco) e enriquecido com soro fetal bovino (Gibco) a 15%. O meio de cultura da linha celular F-36P foi ainda suplementado com 10 ng/mL de IL-3. As células foram mantidas em cultura à temperatura de 37°C numa atmosfera humedecida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, numa densidade inicial de 0,3 milhões de células/mL (10<sup>6</sup> cel/mL), no caso das células HL-60 e NB-4, 0,5x10<sup>6</sup> cel/mL no caso das células H929 e das F-36P.

## **2.2 – Avaliação da expressão proteica de Metaloproteinases da Matriz nas diferentes linhas celulares por citometria de fluxo**

Para se realizarem os estudos com o inibidor das MMPs, foi necessário perceber os níveis de expressão basal das proteínas nas linhas celulares. Foram então avaliados os níveis de expressão proteica por citometria de fluxo, recorrendo a anticorpos monoclonais específicos para as MMPs marcados com sondas fluorescentes.

A citometria de fluxo é uma técnica que consegue avaliar características celulares, como o tamanho e a complexidade interna, baseada na dispersão da luz. Além disso, é possível identificar várias moléculas à superfície da célula e/ou no seu interior, através da fluorescência emitida a diferentes comprimentos de onda por fluorocromos associados aos anticorpos monoclonais. O citómetro de fluxo faz uma análise individual das células quando estas passam num fluxo laminar, e ao serem intersectadas por uma fonte de luz (raio laser), esta vai provocar a excitação das moléculas fluorescentes para um estado de energia mais elevado. Os fluorocromos emitem assim energia a elevados comprimentos de onda ao voltarem para um estado de repouso (Brown e Wittwer, 2000).

Assim, foi analisada a expressão proteica das MMP-2, MMP-8 e MMP-9 nas quatro linhas celulares, sendo utilizados para tal anticorpos monoclonais conjugados diretamente com sondas fluorescentes, no caso da MMP-2, o anti-hMMP-2-FITC (isocianato de

fluoresceína) (R&D Systems) e no caso da MMP-9, o anti-hMMP-9-PE (ficoeritrina) (R&D Systems). Para a MMP-8 foi utilizada uma marcação indirecta recorrendo ao anti-hMMP8 (R&D Systems), tendo sido necessária a utilização de um anticorpo secundário, este último conjugado com alofocianina (APC) (Santa Cruz Biotechnology).

Para cada uma das linhas celulares,  $0,5 \times 10^6$  células foram lavadas em PBS por centrifugação durante 5 min a 300 xg. O sobrenadante foi decantado e o *pellet* foi incubado durante 15 min ao abrigo da luz em 100  $\mu$ L de solução de fixação (Solução A, Immunostep). Posteriormente foi efetuada uma nova lavagem com PBS, como descrito anteriormente, e o *pellet* foi incubado novamente durante 15 min ao abrigo da luz em 100  $\mu$ L de solução de permeabilização (Solução B, Immunostep) e 1  $\mu$ g de anti-hMMP-8. Após uma nova lavagem com PBS, o *pellet* foi incubado durante 15 min ao abrigo da luz em 1  $\mu$ g do anticorpo secundário goat anti-mouse IgG F(ab')<sub>2</sub>-APC. Procedeu-se a uma nova lavagem com PBS, e o *pellet* foi incubado ao abrigo da luz durante 15 min em 10  $\mu$ L com 1  $\mu$ g de anti-hMMP-2 e de anti-hMMP-9. Realizou-se uma última lavagem com PBS, e as células foram depois ressuspensas em 300  $\mu$ L de FACSflow e analisadas num citómetro de fluxo FACSCalibur equipado com um laser de Hélio e de Árgon. Os comprimentos de onda de emissão e de excitação foram de 519 e 495 nm, respectivamente, para os anticorpos conjugados com FITC, de 578 nm de emissão e 480 nm de excitação para os anticorpos conjugados com PE e 660 nm de emissão e 650 nm de excitação para os anticorpos conjugados com APC. Foram adquiridas 10 mil células através do programa CellQuest™ e os dados analisados com recurso ao programa Paint-a-Gate™. Os resultados são apresentados, em percentagem de células que expressam as MMPs e em níveis de expressão de MMPs por célula, através da Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) nas células em estudo. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 ensaios independentes.

### **2.3 - Incubação das linhas celulares com Batimastat**

As quatro linhas celulares foram mantidas em cultura, como descrito na secção anterior, na ausência e na presença do inibidor das MMPs, Batimastat (BB-94) (Tocris Bioscience) com concentrações deste fármaco na gama de 0,1  $\mu$ M a 10  $\mu$ M, durante um período de 72h a 96h, a 37°C numa atmosfera humedecida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram mantidas em placas de cultura, numa densidade celular inicial de  $0,3 \times 10^6$  cel/mL

no caso da linha HL-60 e da linha NB-4, e de  $0,5 \times 10^6$  cel/mL no caso das células H929 e F36-P. Procedeu-se também à avaliação de dois esquemas de administração fracionada do fármaco comparativamente à administração única. Para tal, foram usadas as concentrações de  $0,1 \mu\text{M}$  e de  $0,5 \mu\text{M}$  em administração diária, comparando-se com  $0,3 \mu\text{M}$  e  $1,5 \mu\text{M}$  (ou  $0,4 \mu\text{M}$  e  $2 \mu\text{M}$ , no caso da linha celular H929), respetivamente, em administração única.

## 2.4 – Avaliação da proliferação e viabilidade celular pelo teste de exclusão com azul de tripano

Os estudos de densidade e viabilidade celular permitem avaliar os efeitos do fármaco na patologia em estudo, recorrendo a curvas de crescimento celular (densidade celular) e de dose-resposta específicas do fármaco (através de viabilidade celular). Para a elaboração destas curvas existem vários testes que proporcionam os dados necessários, sendo um deles o teste de exclusão com azul de tripano.

O azul de tripano é um corante vital, que tem como base as diferenças de permeabilidade membranar entre as células viáveis e as células mortas. Nas células viáveis, a membrana celular encontra-se intacta, sendo portanto impermeável ao corante; já as células mortas apresentam uma membrana danificada ao sofrerem rutura pelos processos de morte celular, o que leva à entrada do corante na célula e à aquisição da cor azul (Durkin *et al*, 1979). Para determinar a densidade celular são contadas as células viáveis e aplicada a Fórmula 1, sendo o resultado expresso em  $10^6$  células/ml.

Fórmula 1	$Densidade\ Celular = \text{Número de células viáveis} / 10^{-4}$
-----------	---

Relativamente à viabilidade celular corresponde à percentagem de células vivas no total de células, calculado através da Fórmula 2.

Fórmula 2	$Viabilidade\ celular = \frac{\text{Número de células viáveis}}{\text{Número de células totais}} \times 100$
-----------	--

Para a determinação da proliferação e da viabilidade celular, as células foram plaqueadas segundo as condições descritas no ponto anterior, e a cada período de 24h foi retirada uma alíquota de suspensão celular e determinada a densidade e a viabilidade celular após contagem das células, vivas e mortas, num hemocitómetro, depois de coradas com azul de tripano (Sigma-Aldrich). Os resultados estão apresentados pela média  $\pm$  erro padrão de 4 ensaios independentes.

## **2.5 - Avaliação de morte celular por microscopia ótica e citometria de fluxo**

A avaliação do tipo de morte celular foi realizada por microscopia ótica, através do estudo das características morfológicas, e por citometria de fluxo, auxiliada pela marcação com Anexina V e Iodeto de Propídeo. Foi ainda utilizada a sonda Apostat, que permite verificar a actividade das caspases.

### **2.5.1 - Avaliação da morte celular por microscopia ótica**

Para o estudo das características morfológicas, foram realizados esfregaços das linhas celulares, sendo estes posteriormente submetidos à coloração de *May-Grünwald-Giemsa* (Houwen, 2000), para avaliação ao microscópio ótico.

Para a realização dos esfregaços, foram recolhidas 50 mil células previamente incubadas, durante um período de 48h, na ausência e presença de BB-94, e centrifugadas a 500 x g durante 5 minutos. Depois de lavadas com tampão fosfato (PBS) (Gibco), por centrifugação nas condições anteriores, as células foram ressuspensas numa pequena quantidade de FBS, para facilitar a adesão celular às lâminas, e por fim foi realizado o esfregaço.

Para a coloração de *May-Grünwald-Giemsa*, os esfregaços obtidos foram corados durante 3 minutos com a solução de *May-Grünwald* (Sigma-Aldrich) (preparada em 0,3% de metanol e diluída na proporção de 1:1 com água destilada, aquando da utilização).

Seguidamente, adicionou-se a solução de Giemsa (Sigma-Aldrich) (1g de corante de Giemsa dissolvido em 66 mL de glicerol e 66 mL de metanol; diluído de 1:8 com água destilada, aquando da utilização) durante 15 minutos. Por fim, os esfregaços foram lavados com água destilada e após secagem, foi realizada a análise morfológica das células ao microscópio ótico. Para tal, utilizou-se um Microscópio Ótico *Zeiss Axioskop2* acoplado a uma câmara digital *Zeiss Axiocam ICc3*, que permitiu a aquisição de imagens e o seu processamento no programa *AxioVision LE*.

### 2.5.2 - Avaliação de morte celular por citometria de fluxo

A morte celular torna-se possível de ser detetada por citometria de fluxo, recorrendo a marcadores característicos dos processos de apoptose e necrose, como é o caso da anexina V (AV) e do iodeto de propídeo (IP), através de emissão de fluorescência. Assim, é possível distinguir com esta técnica as células vivas das células mortas, e dentro destas últimas, as células em necrose e/ou apoptose.

Durante a apoptose, uma das características das células é a alteração da distribuição dos fosfolípidos que compõem a bicamada lipídica. Quando se inicia a morte celular por apoptose ocorre a translocação da fosfatidilserina, um fosfolípido com carga negativa, localizado no folheto interno, para o folheto externo da membrana celular. A AV é uma molécula que liga especificamente fosfolípidos com carga negativa na presença de cálcio ( $Ca^{2+}$ ). Esta, ao estar ligada a um fluorocromo, permite determinar a localização da fosfatidilserina na membrana e, assim, identificar as células em apoptose inicial (van Engeland *et al*, 1998). Quanto ao IP, este é um composto que se intercala na cadeia de ADN, emitindo fluorescência. Durante a necrose, há edema celular seguido de lise por rutura da membrana celular, conduzindo ao extravasamento do conteúdo celular para o espaço extracelular. Durante a apoptose, ocorre contração celular, condensação da cromatina e *blebbing*, sendo ativadas proteases e endonucleases que vão degradar todas as proteínas e ácidos nucleicos (fragmentação do ADN).

Como tal, nas células viáveis não ocorre marcação, ou seja são AV e IP negativas, as células em apoptose inicial ficam marcadas com AV mas não com o IP, as células em apoptose tardia/necrose ficam marcadas com AV e IP, e as células em necrose ficam exclusivamente marcadas com IP (van Engeland *et al*, 1998) (Figura 8).



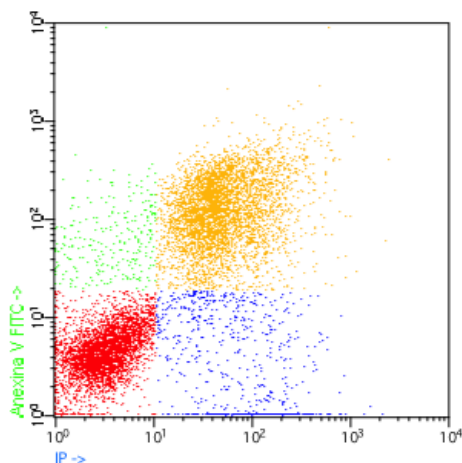


Figura 8 – Dot plot representativo da análise da morte celular por citometria de fluxo com a dupla marcação Anexina-V (AV) e iodeto de propídeo (IP). As células vermelhas representam as células viáveis, duplamente negativas para a marcação com AV e IP; as células em apoptose inicial, positivas para a AV, correspondem à população verde; a população azul corresponde às células em necrose, apenas positivas para o IP; e as células amarelas correspondem à população em apoptose tardia/necrose, duplamente positivas.

Assim, a viabilidade e o tipo de morte celular induzida pelo BB-94 foi avaliada nas quatro linhas celulares incubadas durante 48h, na ausência e na presença de fármaco. Recolheu-se  $0,5 \times 10^6$  células da suspensão celular e lavou-se com PBS por centrifugação durante 5 min a 1000 xg. O sedimento foi ressuspenso em 100  $\mu$ L de tampão de ligação frio e incubado com 2,5  $\mu$ L de AV-APC (BD Biosciences) e 2  $\mu$ L de IP (BioLegends), durante 15 minutos ao abrigo da luz. Posteriormente, adicionou-se 300  $\mu$ L de tampão de ligação e analisou-se no citómetro de fluxo já descrito anteriormente. Os comprimentos de onda de emissão e excitação foram de 660 nm e 650 nm, respetivamente.

Foram adquiridas 10 mil células através do programa CellQuest™ e os dados foram analisados com recurso ao programa Paint-a-Gate™. Os resultados são apresentados em percentagem com base na positividade e/ou negatividade para a dupla marcação, representando média  $\pm$  desvio padrão de 4 ensaios independentes.

### 2.5.3 – Avaliação da expressão de caspases por citometria de fluxo

Os níveis de caspases foram avaliados por um *kit* de deteção intracelular de caspases, o ApoStat (R&D Systems). As células foram submetidas a uma lavagem inicial, posteriormente ressuspenso em 1 mL de PBS e incubadas com 2  $\mu$ L de ApoStat, durante

15 minutos a 37°C. Seguidamente, as células foram lavadas em 2 mL de PBS por centrifugação a 1000 x g durante 5 minutos e ressuspensas em 300 µL do mesmo tampão.

A deteção da expressão de caspases foi efectuada por citometria de fluxo, usando o equipamento já descrito anteriormente, com comprimentos de onda de emissão de 519 nm e de excitação de 488 nm, utilizando um laser de Árgon. Foram adquiridas 10 mil células através do programa CellQuest™ e os dados analisados com recurso ao programa Paint-a-Gate™. Os resultados a percentagem de células positivas para caspases ativadas, e os níveis de expressão de caspases ativadas, através de Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) nas células em estudo. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 4 ensaios independentes.

## **2.6 – Avaliação do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo**

A avaliação do Ciclo Celular foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o *kit* de deteção PI/RNase (ImmunoStep). Recolheu-se 0,5x10<sup>6</sup> células da suspensão celular e lavou-se com PBS durante 5 min a 160 x g. O *pellet* foi ressuspense em 200 µL de etanol a 70% frio, em agitação no vórtex, sendo incubado durante 30 min no frio, com o objetivo de fixar as células. De seguida, as células foram lavadas novamente com PBS nas mesmas condições de centrifugação. Por fim colocou-se 300 µL de PI/RNase, e as células foram analisadas com o mesmo equipamento anteriormente descrito, com comprimentos de onda de emissão de 617 nm e de excitação de 488 nm. Foram adquiridas 25 mil células através do programa CellQuest™ e os dados analisados com recurso ao programa Modfit™. Os resultados representam a média da percentagem de células que se encontram em cada fase do ciclo celular, representando a média ± desvio padrão de 4 ensaios independentes.

## **2.7 – Avaliação da atividade das MMPs através de ensaios zimográficos**

A zimografia de gelatina é uma técnica que permite identificar a atividade gelatinolítica de amostras biológicas, e divide-se em três fases fundamentais. Na primeira

fase as amostras são separadas por electroforese, tirando partido de um gel de SDS (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*) –poliacrilamida, que é co-polimerizado com gelatina de pele de porco. Esta electroforese é realizada em condições não redutoras para manter a atividade enzimática. A segunda fase consiste numa remoção do SDS recorrendo ao uso de Triton X-100 e incubação do gel num tampão com cálcio. Esta incubação permite a renaturação parcial das proteínas, o suficiente para que hidrolisem a gelatina *in situ*. No último passo, o gel é corado com uma solução de *Comassie Brilliant Blue* e descorado de seguida. O resultado final é um gel azul com bandas transparentes, no local onde a gelatina foi degradada. Estas bandas permitem identificar quais as MMPs que estão ativas, a partir da sua massa molecular relativa. As pro-MMPs podem também ser identificadas por esta técnica, tendo em conta que o SDS faz o *unfolding* da proteína, bem como uma dissociação irreversível do pro-domínio do local ativo. Tendo em conta que a massa molecular relativa do pro-domínio é de aproximadamente 10 kDa, torna-se possível a sua identificação no gel (Toth *et al*, 2012).

Assim, para a determinação da atividade gelatinolítica, as linhas celulares foram incubadas, na ausência e na presença de BB-94, durante 48h, num meio condicionado sem soro fetal bovino. De seguida, o sobrenadante foi retirado e guardado para posterior análise.

A zimografia iniciou-se pela preparação do gel, com 1,5 M de Tris (Calbiochem) (pH 8,8), acrilamida (Sigma-Aldrich) a 40%, SDS (AppliChem) a 20%, solução de gelatina (Sigma-Aldrich) a 10 mg/mL, 18 µL de TEMED (Sigma-Aldrich) e 100 µL de AMPS (Calbiochem) por cada 10 mL, e água bidestilada. De seguida, as amostras foram diluídas no tampão de amostras para a zimografia, contendo 0,5 M de Tris-HCl (pH 6,8), 2 mL de glicerol (Sigma-Aldrich), SDS a 10%, azul de bromofenol (AppliChem) e água bidestilada, e foram deixadas durante 10 min à temperatura ambiente. Seguidamente, procedeu-se à electroforese que correu no frio durante 90 min a 140 V. Por fim, o gel foi colocado em tampão de renaturação, contendo 50 mM de Tris (pH 7,6), 150 mM de NaCl (Carlo Erba Reagents), 5 mM de CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) e 0,25% de Triton X-100 (MP-Bio), com agitação, sendo substituído ao final de 30 min por novo tampão. No final deste período de tempo, o tampão de renaturação foi substituído por tampão de digestão, contendo 50 mM de Tris (pH 7,6), 150 mM de NaCl, 5 mM de CaCl<sub>2</sub> e 0,1% de Triton X-100, e incubado a 37°C durante 18h. No dia seguinte, o gel foi lavado duas vezes em água bidestilada e posteriormente colocado em solução corante, contendo 0,25% de *Comassie Brilliant Blue*

(Sigma-Aldrich), 50% de Metanol (Sigma-Aldrich) e 10% de Ácido Acético (Sigma-Aldrich), durante 15 min num agitador. Posteriormente, o gel foi lavado novamente com água bidestilada, e colocado em solução descorante, contendo 25% de Metanol e 5% de Ácido Acético. Esta solução foi substituída periodicamente, até as bandas estarem bem visíveis.

O gel foi posteriormente analisado pelo ChemiDoc, no programa Quantity One®, permitindo a aquisição de dados como a densidade das bandas de interesse. Os dados foram normalizados ao controlo e os resultados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão de 3 ensaios independentes.

## **2.8 - Análise da influência do inibidor das MMPs na expressão de proteínas intracelulares (ERK 1/2 e AKT) por *western blot***

De seguida, avaliou-se a influência do inibidor das MMPs, Batimastat, na sinalização intracelular através da expressão das proteínas ERK 1/2 e AKT na forma fosforilada por *western blot* após quantificação da proteína total.

A técnica de *western blot* é uma técnica bastante usada em biologia molecular, que permite identificar, quantificar e determinar o tamanho de proteínas específicas, tendo evoluído de duas outras técnicas semelhantes, o *southern* e *northern blot*, que separam e identificam, respetivamente, fragmentos de ADN e ARN. Resumidamente, o procedimento inicia-se com uma eletroforese em gel de poliacrilamida, com o objetivo de separar as proteínas. Estas são de seguida transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde são bloqueadas com um anticorpo específico para a proteína em estudo. Finalmente faz-se a deteção e quantificação das bandas em questão, bem como a análise dos dados (Jensen, 2012).

### **2.8.1 - Quantificação proteica pelo método do ácido bicinonínico**

De forma a utilizar sempre a mesma quantidade de proteína no ensaio foi necessário proceder à quantificação da mesma nos extratos celulares, utilizando o método do ácido bicinonínico (BCA). Este método baseia-se na formação de complexos entre a proteína e

o  $\text{Cu}^{2+}$  sob condições alcalinas, ocorrendo uma redução do  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  pelo BCA, sendo esta redução proporcional à quantidade de proteína presente em cada amostra. Esta reação resulta na formação de um complexo azul/roxo que pode ser medido posteriormente por espectrofotometria ao comprimento de onda de 562 nm (Smith *et al*, 1985).

Para isso, as células foram incubadas com 5 $\mu\text{M}$  de BB-94, durante 48h, sendo depois lisadas com um tampão constituído por RIPA (tampão de sacarose), suplementado com inibidores de proteases, *Complete Mini* (Roche), e de fosfatases, *PhosphoSTOP* (Roche). O núcleo e os detritos celulares insolúveis foram removidos por uma centrifugação a 12 000 xg durante 10 min a 4°C. Os extratos foram recolhidos e usados como lisados celulares. Os lisados celulares foram adicionados a uma mistura de sulfato de cobre II a 4%, com 50 volumes de BCA e foi feita uma curva padrão utilizando quantidades conhecidas de albumina bovina sérica (BSA). A mistura foi incubada durante 30 min a 37°C, e no final deste período de tempo foi realizada a leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 562 nm. Esta leitura foi realizada num espetofotómetro leitor de placas (Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek Instruments). Depois de preparada a curva padrão foram calculadas as concentrações proteicas dos extratos.

Os lisados celulares foram desnaturados a 95°C, durante 5 min, no tampão de amostras, contendo 0,125 mM Tris (pH 6,8), SDS a 2%, 100 mM de DTT, 10% de glicerol e azul de bromofenol. A separação da proteína iniciou-se pela adição a cada poço do gel SDS-PAGE a 12% de 30  $\mu\text{g}$  de proteína total, e procedeu-se à electroforese que correu durante 60 min a 130 V. Posteriormente as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF. A imunodeteção da expressão das proteínas foi realizada depois da incubação da membrana durante a noite, na presença de um anticorpo de coelho anti-p-ERK 1/2 e anti-p-AKT (*Cell Signalling Technology* 1:1 000) sendo as proteínas depois quantificadas pelo método de quimiofluorescência com substrato, ECF (*Enhanced Chemofluorescence Substrate*). De modo a normalizar a quantidade de proteína em cada poço, efetuou-se também a quantificação da ERK 1/2 e da AKT total, utilizando os anticorpos anti-ERK e anti-AKT. Os dados foram normalizados ao controlo, estando apresentados em percentagem sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão, e representam 3 ensaios independentes.

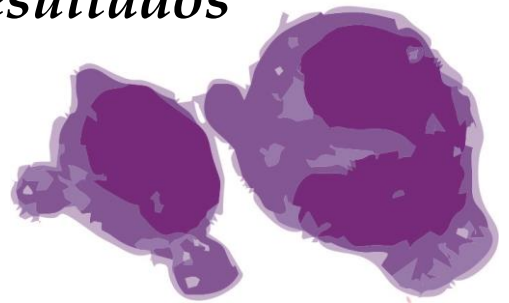
## 2.9 - Análise Estatística

Para a determinação dos respectivos  $IC_{50}$  do BB-94 nas várias linhas celulares, foi aplicada uma regressão não linear logística aos dados relativos à exposição das células durante 48h ou 72h no caso das células H929.

Na análise estatística dos níveis de expressão das MMPs, das caspases, da atividade das MMPs e da expressão das proteínas ERK 1/2 e AKT, recorreu-se a análises de variância (ANOVA de uma via) e, sempre que necessário, foram aplicados testes de comparações múltiplas. O teste de Dunnett foi aplicado para efectuar as comparações com a condição controlo e o teste de Tukey para a comparação entre todas as condições em estudo.

Os resultados foram analisados utilizando o software GraphPad 5.0 e SPSS, sendo considerado um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) para todas as análises efetuadas.

### *3. Resultados*



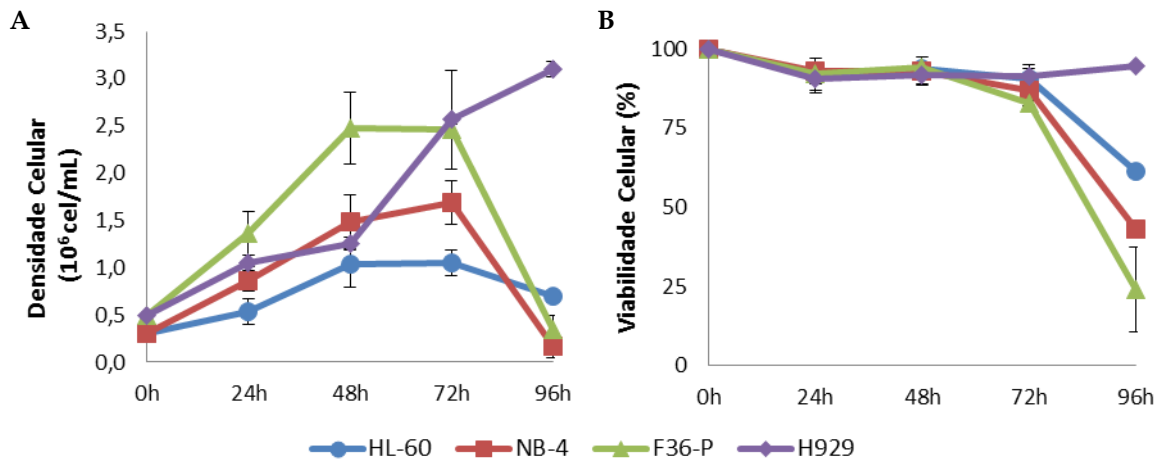




### 3.1 - Caracterização das linhas celulares

Neste estudo foram utilizadas quatro linhas celulares de neoplasias hematológicas humanas. As células HL-60 e as NB-4 são ambas modelos *in vitro* de LPA, apresentando como principal diferença a ausência da translocação PML-RAR $\alpha$  na primeira em relação à segunda. As células F36-P são modelo *in vitro* de Síndrome Mielodisplásica e as células H929 são modelo *in vitro* de Mieloma Múltiplo.

As quatro linhas celulares crescem em suspensão, quando mantidas em cultura num meio nutritivo, sendo que no caso das células F36-P necessitam de um suplemento de IL-3. As células necessitam também de uma temperatura de 37°C, numa atmosfera humedecida, com 5% de CO<sub>2</sub>. O crescimento e a viabilidade celular de cada linha celular encontram-se representados na Figura 9-A e 9-B, respetivamente. As características principais de crescimento, como o tempo de duplicação das células e o seu crescimento máximo, estão representadas na Tabela 2.



**Figura 9 - Curvas de crescimento e de viabilidade celular das linhas celulares HL-60, NB-4, F36-P e H929.** Em (A) está representada a curva de densidade celular das quatro linhas celulares, incubadas nas condições ótimas de crescimento descritas na secção de Material e Métodos. Em (B) está representada a curva de viabilidade das quatro linhas celulares, incubadas também nas condições ótimas de cada linha. As células foram incubadas de acordo com o descrito na secção 2.2. A cada 24h, até perfazer 96h, foram retiradas amostras das suspensões celulares e efetuou-se o teste de exclusão com azul de tripano. Os resultados são expressos em 10<sup>6</sup> cel/mL (A) e em percentagem (B) e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 4 ensaios.

Como se pode observar na Figura 9-A e na Tabela 2, as células F36-P apresentam a maior taxa de crescimento, por ser a linha que se duplica mais rapidamente, cerca de 14h de tempo de duplicação, e as HL-60 são as que apresentam menor velocidade de

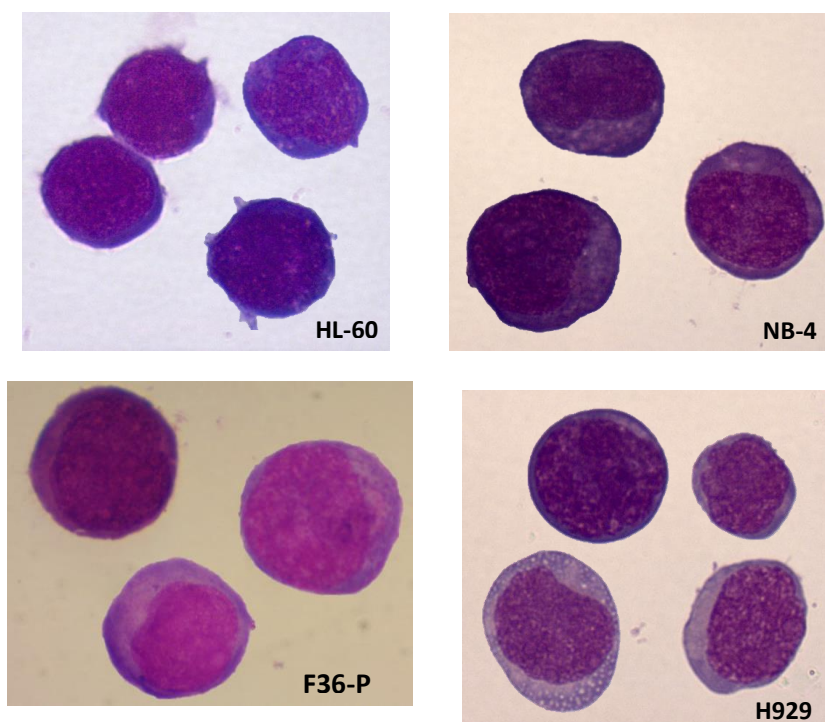
crescimento, aproximadamente 30h para a duplicação. Quanto à viabilidade celular, a análise do gráfico (Figura 9-B) indica que apenas a linha celular H929 mantém a viabilidade celular próxima dos 100% até às 96h de incubação, ao contrário de todas as outras linhas. Além disso, na Figura 9-A, verifica-se também que todas as linhas celulares apresentam a sua fase exponencial de crescimento até às 48h de incubação, ao contrário da linha celular H929, que apresenta esta fase entre as 48h e as 72h de incubação, não se observando decréscimo da densidade celular após 96h de incubação.

Assim, todos os estudos foram realizados até às 72h, exceto no caso da linha de Mieloma Múltiplo, as células H929, em que os estudos foram realizados até às 96h.

**Tabela 2 – Características de crescimento celular das linhas celulares em estudo.**

Linha Celular	Tempo de duplicação celular	Crescimento celular máximo
<b>HL-60</b>	30h	1 x 10 <sup>6</sup> cél/mL
<b>NB-4</b>	20h	1,5 x 10 <sup>6</sup> cél/mL
<b>F36-P</b>	14h	2,5 x 10 <sup>6</sup> cél/mL
<b>H929</b>	23h	3 x 10 <sup>6</sup> cél/mL

Na Figura 10 estão representadas as características morfológicas das células. Como se pode observar, as células HL-60 e as células NB-4 apresentam características morfológicas típicas de LPA, nomeadamente células com elevada relação núcleo/citoplasma com núcleo largo de margens bem definidas. É também possível observar-se alguns nucléolos, bem como um citoplasma granuloso. As células F36-P apresentam também elevada relação núcleo/citoplasma e nucléolos bem visíveis, no entanto apresentam algumas protuberâncias citoplasmáticas e citoplasma basófilo. Quanto às células H929, sendo de uma linhagem linfóide/plasmocitóide, apresentam algumas diferenças como a ausência de grânulos e a presença de vacúolos citoplasmáticos, bem como acentuada basófilia citoplasmática por presença de imunoglobulinas. Estas células apresentam também uma elevada relação núcleo/citoplasma.



**Figura 10 - Aspectos morfológicos das células em estudo.** Os esfregaços das células foram corados com solução de May-Grünwald-Giemsa e observados ao microscópio ótico de acordo com o descrito na secção Material e Métodos (Ampliação de 500x).

### 3.1.1 - Avaliação da expressão proteica de Metaloproteinases da Matriz

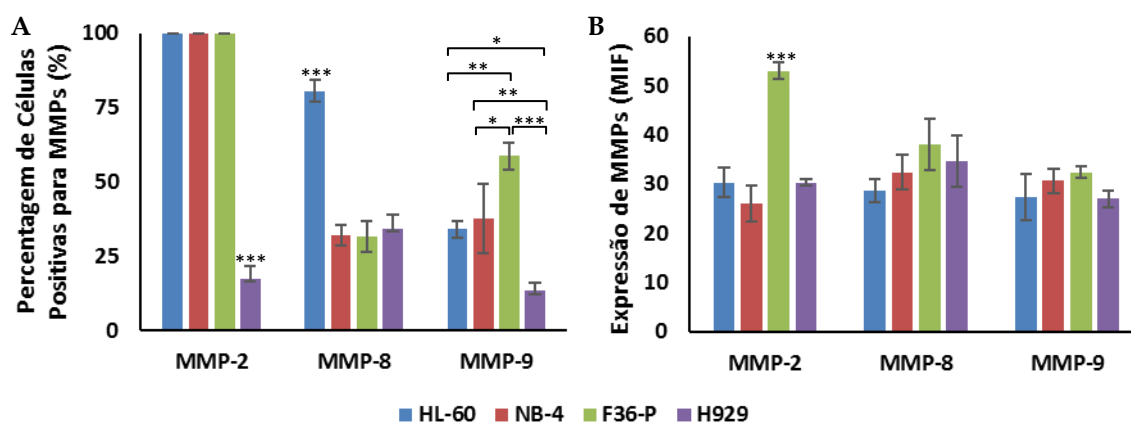
Antes dos ensaios com o inibidor das MMPs, verificaram-se os níveis de expressão basal destas proteínas nas diferentes linhas celulares.

Na figura 11 estão representados os níveis de expressão proteica das MMP-2, -8 e -9 nas quatro linhas celulares. A análise desta figura mostra-nos que todas as linhas celulares expressam as três proteínas existindo diferenças entre a percentagem de células e da expressão. De uma forma geral verifica-se que todas as células das linhas HL-60, NB-4 e F36-P expressam MMP-2, enquanto que apenas 20% das células da linha celular H929 expressam esta proteína (Figura 11-A). No entanto, e apesar de todas as linhas celulares apresentam níveis de expressão semelhante, a linha F36-P é a que expressa níveis mais elevados, apresentando uma expressão 1,7 vezes superior às restantes, sendo esta diferença estatisticamente significativa (Figura 11-B).

Em relação à MMP-8, a linha celular HL-60 é a que apresenta um maior número de células a expressar esta proteína (cerca de 80% da população), enquanto que em todas as

outras linhas esta MMP é expressa por aproximadamente 30% da população (Figura 11-A).

No caso da MMP-9, a linha celular H929 apresenta a menor percentagem de células positivas para esta MMP, com valores a rondar os 15%, seguida das linhas celulares HL-60 e NB-4, com valores perto dos 30%, sendo as células F36-P as que apresentam maior percentagem de células a expressar MMP-9, chegando a cerca de 60% da população. Quanto à expressão de MMP-8 e MMP-9 por célula, não existem diferenças estatisticamente significativas entre as linhas celulares, apresentando níveis de expressão entre os 35 e os 30 MIFs, respetivamente.



**Figura 11 - Avaliação da expressão basal das metaloproteínases da matriz por citometria de fluxo em linhas celulares de neoplasias hematológicas.** As linhas celulares HL-60, NB-4, F36-P e H929 foram marcadas segundo o procedimento descrito na secção de material e métodos. Os resultados apresentados encontram-se expressos em % de células marcadas positivamente para os anticorpos anti-MMPs (A) e em Média de Intensidade de Fluorescência (MIF totais), sendo estes diretamente proporcionais à expressão (B), e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efetuada utilizando o teste de Tukey, sendo \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.2 - Avaliação do potencial terapêutico do inibidor das Metaloproteínases da Matriz, Batimastat, em linhas celulares de neoplasias hematológicas

Para avaliar o potencial terapêutico do inibidor das MMPs em neoplasias hematológicas, estudou-se o efeito do Batimastat (BB-94) na viabilidade e na proliferação das linhas celulares HL-60, NB-4, F36-P e H929. Para além disto, avaliou-se também o tipo de morte celular, através de citometria de fluxo, com o auxílio da dupla marcação

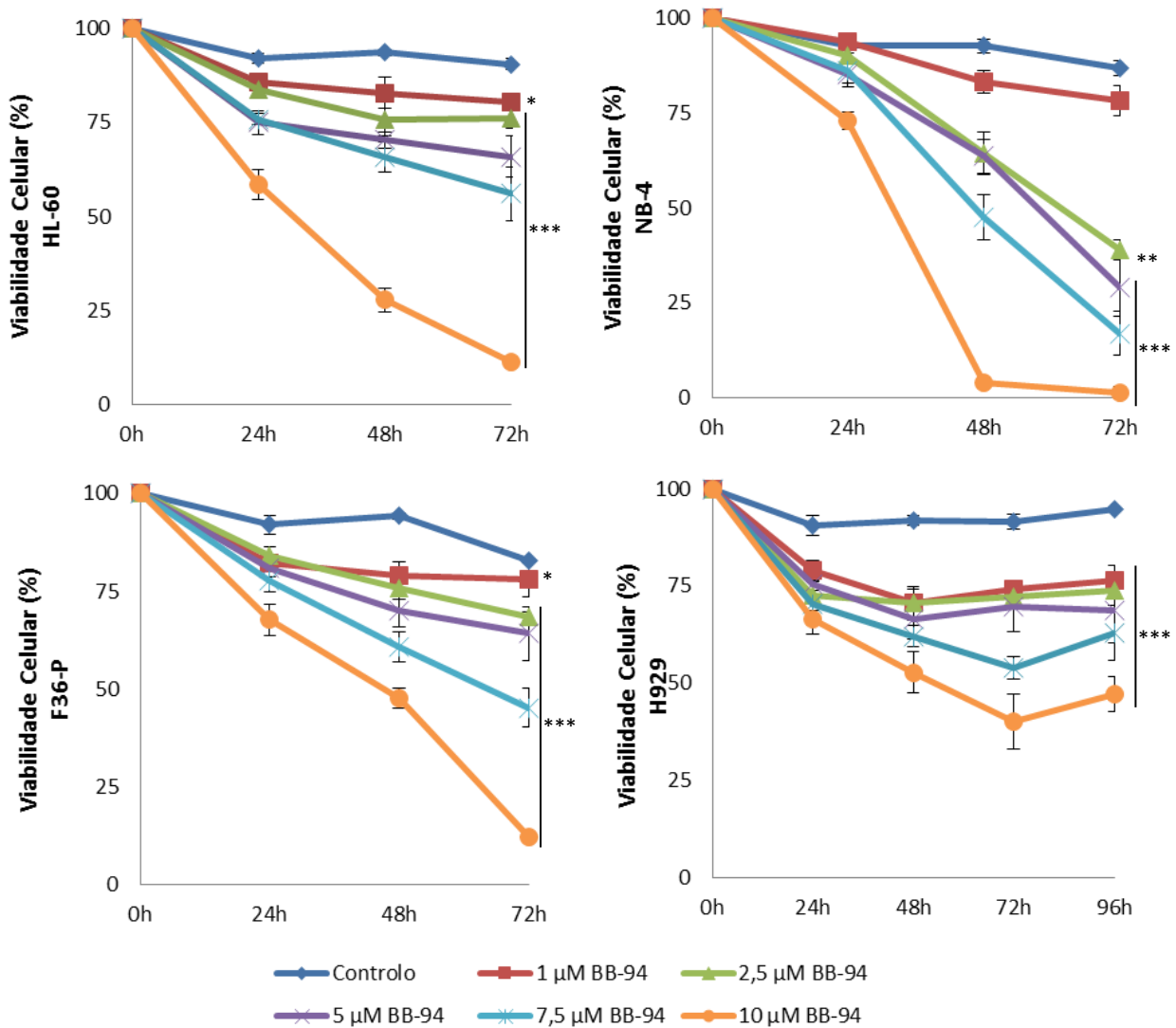
com anexina V e iodeto de propídeo, e das características morfológicas por microscopia ótica. A ativação de caspases foi também avaliada por citometria de fluxo, com o auxílio da sonda ApoStat. Finalmente, foi avaliado o efeito no ciclo celular, por citometria de fluxo, através da marcação com iodeto de propídeo.

### 3.2.1 - Curvas de Viabilidade e Proliferação celular

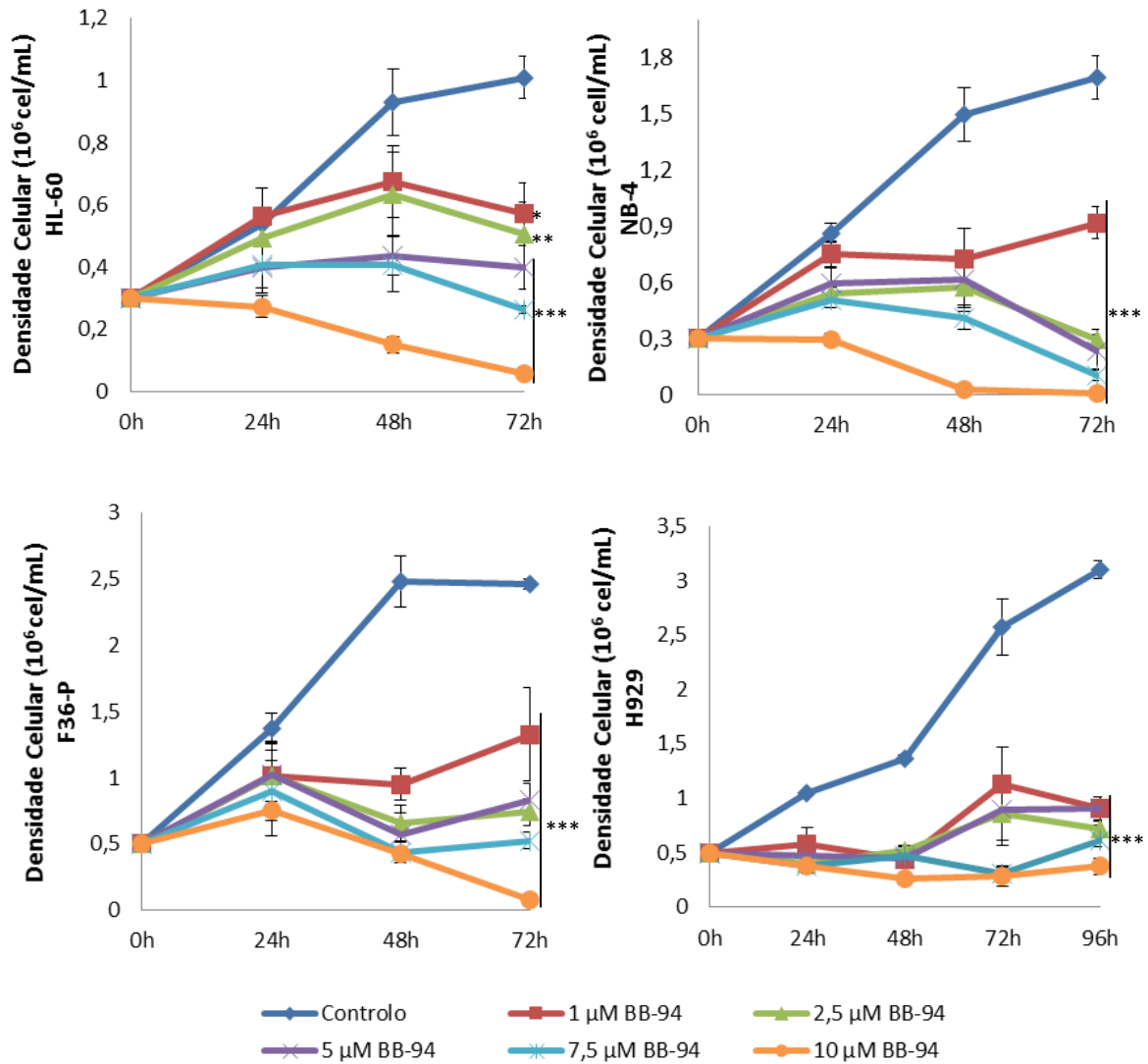
Na figura 12 pode-se observar os efeitos citotóxicos do BB-94 nas diferentes linhas celulares em estudo. Como se pode observar nesta figura, o BB-94 induz uma diminuição da viabilidade celular de uma forma dependente da concentração do fármaco, do tempo de exposição e da linha celular, sendo o seu efeito estatisticamente significativo e mais acentuado a partir das 48h de incubação. Tendo estes fatores em conta, a linha celular NB-4 mostrou-se a mais sensível ao fármaco e as H929 as menos sensíveis.

De facto, observa-se redução da viabilidade celular das células NB-4 para valores próximos de 50% ( $IC_{50}$ ) nas células tratadas com 7,5  $\mu$ M de BB-94 durante 48h, enquanto para as linhas HL-60 e F36-P, o  $IC_{50}$  foi entre 7,5 e 10  $\mu$ M, respetivamente. Além disso, não se observa redução significativa da viabilidade celular após incubação com doses baixas do fármaco durante 72h. Nas células H929, o  $IC_{50}$  é atingido mais tardiamente, após 72h de incubação, na presença de concentrações de BB-94 entre os 7,5 e os 10  $\mu$ M. No entanto, observa-se uma ligeira reversão dos efeitos do fármaco após 96h de incubação.

Na figura 13 estão representados os efeitos citostáticos do fármaco nas células HL-60, NB-4, F36-P e H929. Estes efeitos antiproliferativos são também dependentes da concentração, do tempo de exposição e da linha celular. Quanto à dose, as linhas celulares HL-60, NB-4 e F36-P, apresentam efeitos dependentes da dose, especialmente às 72h, sendo as diferenças observadas estatisticamente significativas. No entanto, a linha celular H929 apresenta efeito muito semelhante entre doses, sendo então o efeito citostático deste fármaco independente da dose administrada.



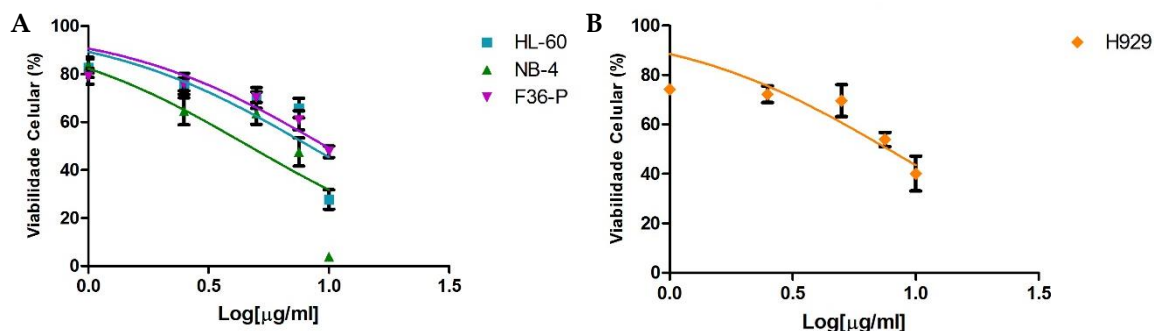
**Figura 12 - Efeito do Batimastat (BB-94) na viabilidade das células HL-60, NB-4, F36-P e H929.** As células foram incubadas de acordo com o descrito na secção 2.2. A cada 24h, durante um período de tempo de 72h, ou 96h no caso da linha celular H929, foram retiradas amostras das suspensões celulares e efetuou-se o teste de exclusão com azul de tripano. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 a 4 ensaios independentes e estão expressos em percentagem. A análise estatística foi efetuada por comparação à condição não tratada (Controlo) utilizando o teste de Dunnet, sendo \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Figura 13 – Efeito do Batimastat (BB-94) na proliferação das células HL-60, NB-4, F36-P e H929.** As células foram incubadas de acordo com o descrito na secção 2.2. A cada 24h, durante um período de tempo de 72h, ou 96h no caso da linha celular H929, foram retiradas amostras das suspensões celulares e efetuou-se o teste de exclusão com azul de tripano. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 4 ensaios independentes e estão expressos em número de células (10<sup>6</sup> cel/mL). A análise estatística foi efetuada por comparação à condição não tratada (Controlo) utilizando o teste de Dunnet, sendo \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

Para determinar com maior exatidão o IC<sub>50</sub> ao final de 48h de incubação nas linhas celulares HL-60, NB-4 e F36-P, e ao final de 72h de incubação na linha celular H929, efetuou-se a regressão linear do Log da concentração ( $\mu$ M) em função da percentagem de viabilidade celular (Figura 14 e Tabela 3). Analisando a Tabela 3, verifica-se que a concentração de BB-94 necessária para reduzir a viabilidade celular a 50% é 1,8 vezes

superior nas células HL-60 (8,31  $\mu\text{M}$ ), 2,1 vezes nas células F36-P (9,69  $\mu\text{M}$ ), em comparação com as células mais sensíveis, as NB-4 (4,66  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 14 - Regressão logarítmica do IC<sub>50</sub> do Batimastat nas linhas celulares de neoplasias hematológicas.** A figura representa a regressão logarítmica do IC<sub>50</sub> do Batimastat nas linhas celulares HL-60, NB-4 e F36-P, às 48h de incubação (A), e da linha H929, às 72h de incubação (B). Após a incubação foi avaliada a viabilidade celular pelo teste de exclusão por azul de tripano. Os resultados representam média  $\pm$  desvio padrão de 4 ensaios independentes.

**Tabela 3 - Análise do IC<sub>50</sub> do Batimastat nas linhas celulares de neoplasias hematológicas.**

Linha Celular	IC <sub>50</sub> BB-94
HL-60	8,31 $\mu\text{M}$
NB-4	4,66 $\mu\text{M}$
F36-P	9,69 $\mu\text{M}$
H929	7,73 $\mu\text{M}$

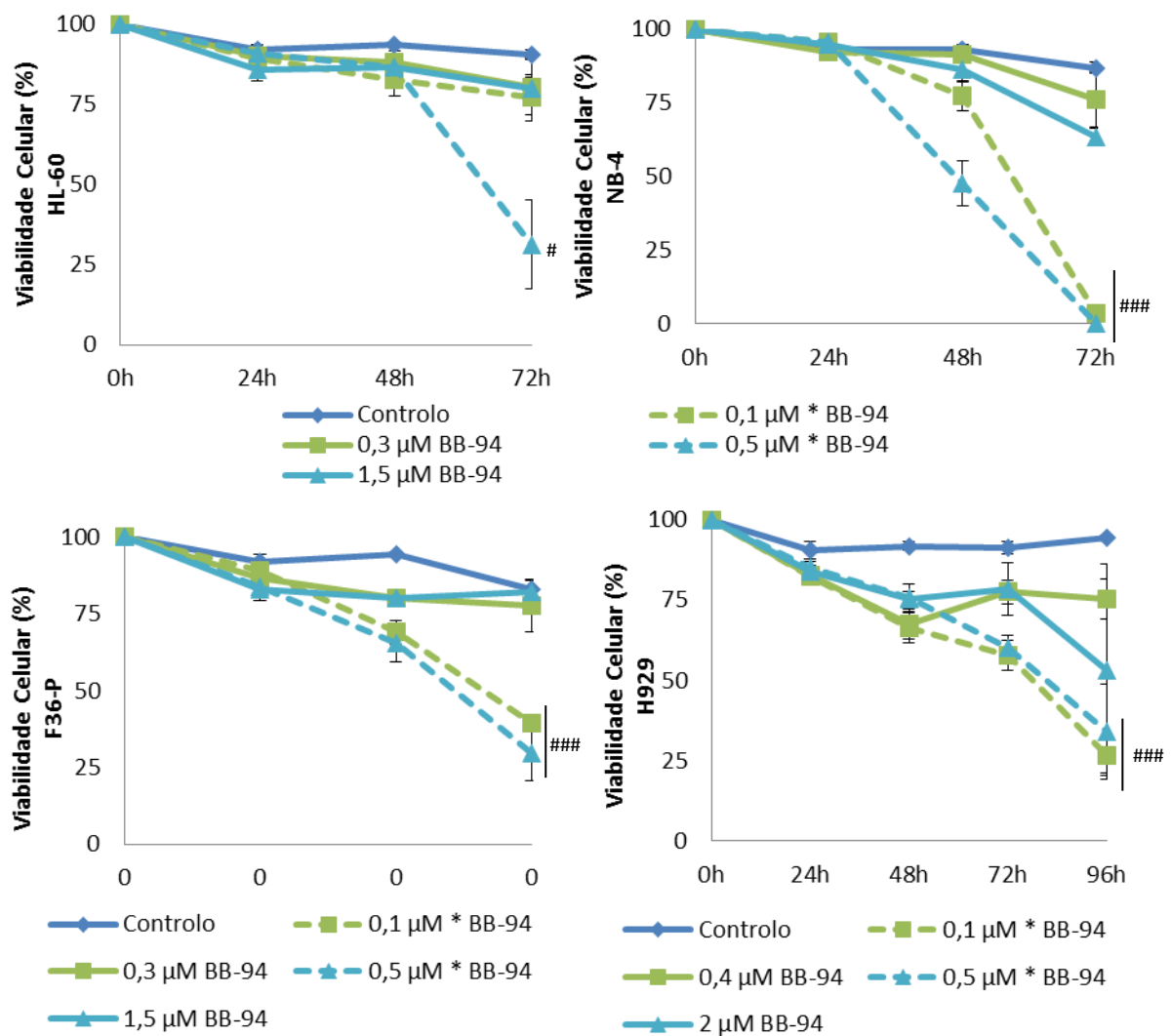
IC<sub>50</sub>, concentração de fármaco necessária para induzir morte em 50% das células em estudo; BB-94, Batimastat.

Uma vez que o efeito citostático e citotóxico observado nas linhas celulares em estudo diminuía ao longo do tempo, e no caso específico das células H929 se observa mesmo reversão destes efeitos, avaliou-se se o modo de administração deste fármaco tinha influência nos efeitos citotóxicos e citostáticos nas células. Assim, o Batimastat foi adicionado à cultura, a cada 24h, em concentrações inferiores às utilizadas em administração única. Os efeitos deste modo de administração podem ser observados nas Figuras 15 e 16.

Assim, pode-se observar que há uma diminuição acentuada da viabilidade das células quando tratadas com pequenas doses em administração diária comparativamente com as doses equivalentes em toma única, após 72h de incubação.



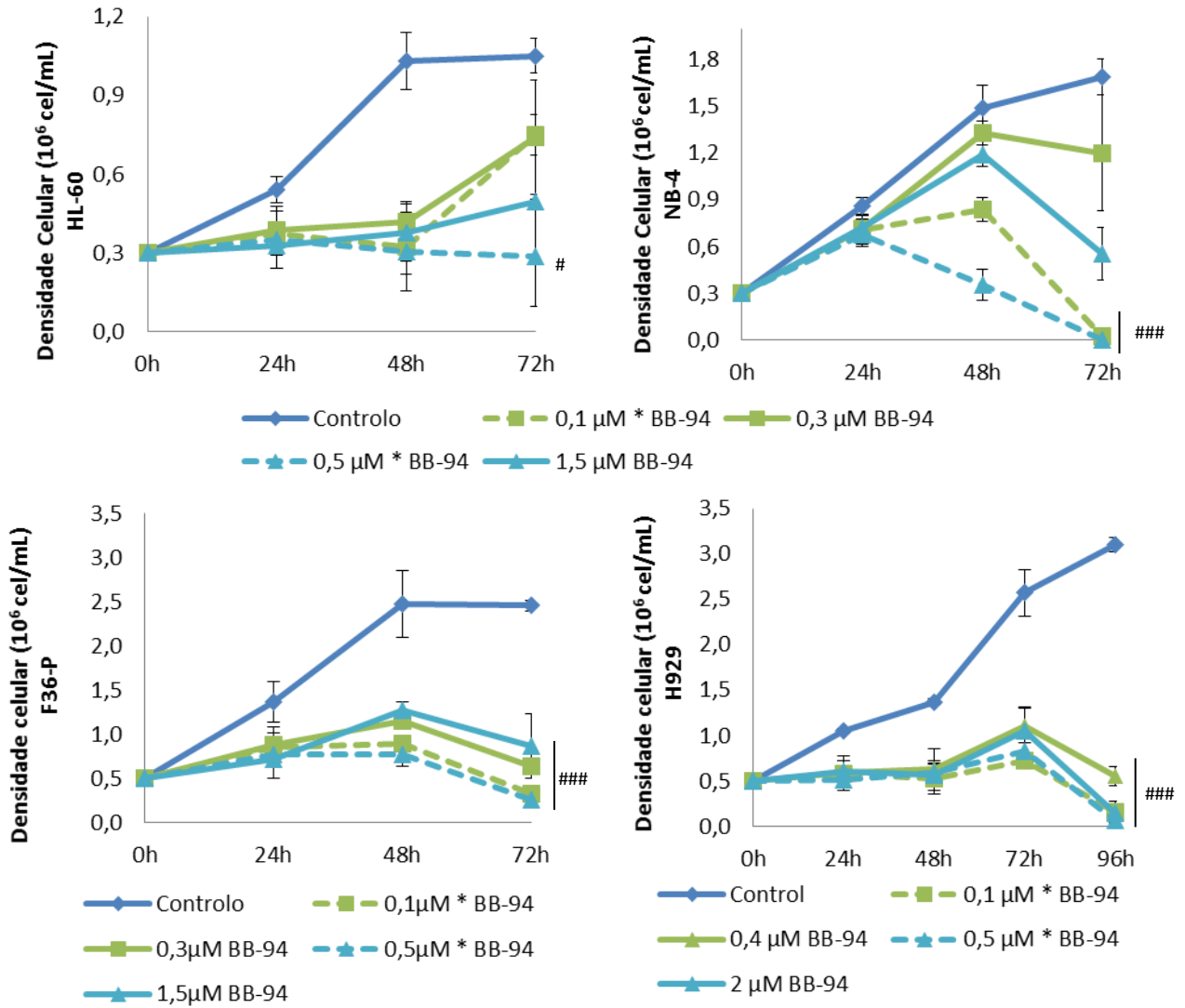
Relativamente às células HL-60 e H929, observa-se aumento de cerca de 50% do efeito citotóxico na administração diária de (0,5  $\mu\text{M}$ ) comparativamente com a dose única de BB-94 (1,5 e 2,0  $\mu\text{M}$ , respetivamente), sendo estas diferenças estatisticamente significativas. Este efeito foi mais acentuado nas linhas F36-P e NB-4, observando-se uma redução de aproximadamente 40-50% nas células F36-P e de cerca de 70% nas células NB-4, quer para a dose total de 0,3  $\mu\text{M}$  como na dose de 1,5  $\mu\text{M}$  de BB-94, sendo as diferenças observadas significativas (Figura 15). O mesmo efeito é também observado na proliferação celular, em que as maiores diferenças entre doses fracionadas e únicas são observadas também nas linhas celulares NB-4 e F36-P.



**Figura 15 - Efeito do Batimastat (BB-94) em administração fracionada na viabilidade das células HL-60, NB-4, F36-P e H929.** A figura representa o efeito do Batimastat na viabilidade nas linhas celulares em estudo. As células foram incubadas segundo as condições descritas na secção Material e Métodos. Após a incubação foi avaliada a viabilidade celular pelo teste de exclusão por

azul de tripano. Os resultados representam média  $\pm$  erro padrão de 4 ensaios independentes. \* - dose em administração diária. A análise estatística foi efetuada por comparação à condição não tratada (Controlo) utilizando o teste de Dunnet, e por comparação entre administrações fracionadas e únicas sendo #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$ .

No caso dos efeitos do BB-94 na proliferação celular, quando comparadas com a condição controlo, todas as linhas celulares apresentam diferenças significativas às 72h de incubação nas condições de administração fracionada e na condição com a concentração mais elevada de fármaco em administração única, exceto as células HL-60, em que as únicas diferenças significativas são entre a condição controlo e a dose fracionada de 0,5  $\mu\text{M}$ , às 72h de incubação. Fazendo a comparação entre a condição em administração fracionada com a dose equivalente em toma única, a diferença entre a dose fracionada de 0,1  $\mu\text{M}$  e a dose única de 0,3  $\mu\text{M}$  encontra-se apenas às 72h de incubação, e entre a dose fracionada de 0,5  $\mu\text{M}$  e a dose única de 1,5  $\mu\text{M}$  às 48h de incubação, ambas na linha celular NB-4 (Figura 16).



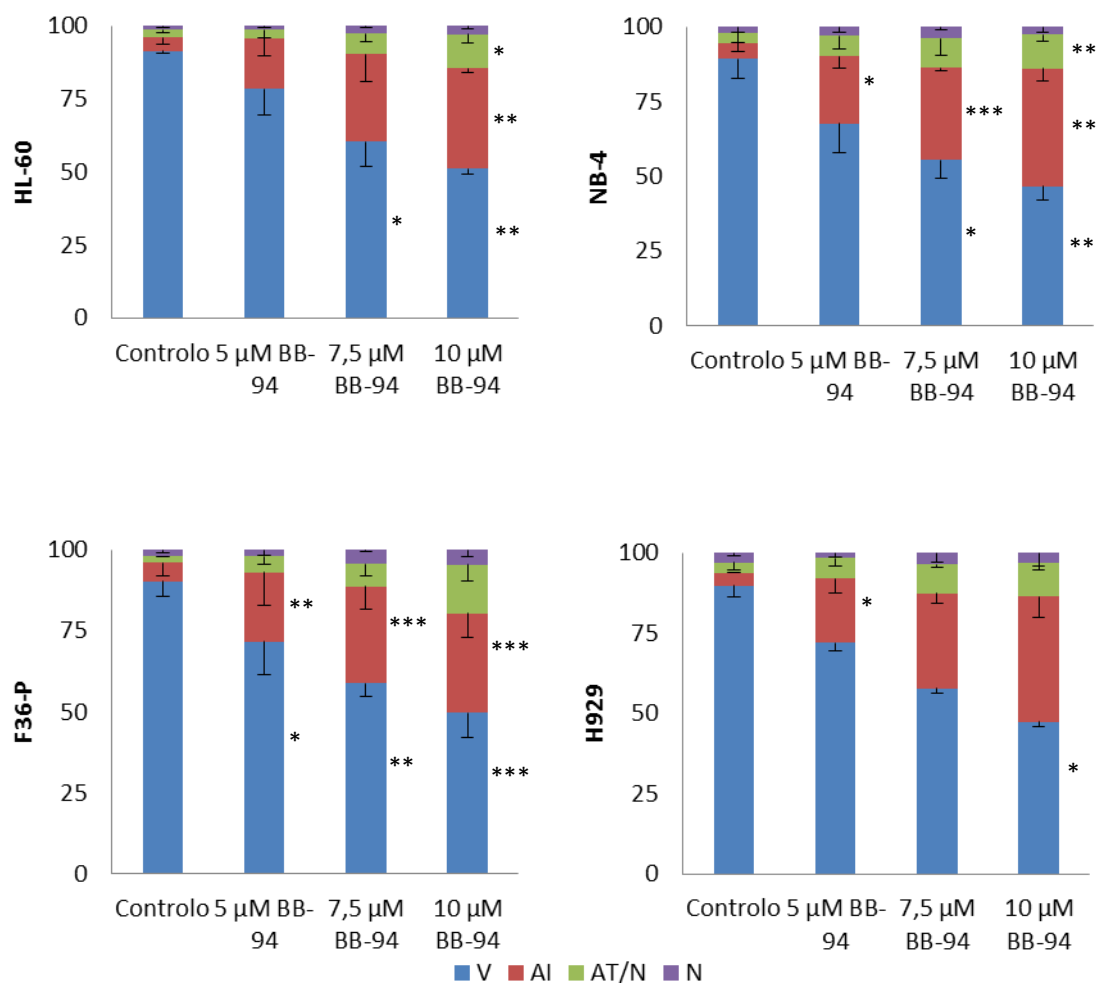
**Figura 16 - Efeito do Batimastat (BB-94) em administração fracionada na proliferação das células em estudo.** A figura representa o efeito do Batimastat nas linhas celulares em estudo. As células foram incubadas segundo as condições descritas na secção Material e Métodos. Após a incubação foi avaliada a viabilidade celular pelo teste de exclusão por azul de tripano. Os resultados representam média  $\pm$  erro padrão de 4 ensaios independentes. \* - dose em administração fracionada. A análise estatística foi efetuada por comparação à condição não tratada (Controlo) utilizando o teste de Dunnet, e por comparação entre administrações fracionadas e únicas sendo #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$ .

### 3.2.2 - Avaliação do efeito citotóxico induzido pelo Batimastat por citometria de fluxo

Os efeitos citotóxicos do inibidor das MMPs foram avaliados por citometria de fluxo com recurso à dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo. Esta técnica

permite distinguir as células viáveis das mortas, bem como o tipo de morte celular predominante induzido pelo composto.

Na Figura 17 estão representados o efeito do BB-94 na viabilidade celular e o tipo de morte induzido pelas diferentes concentrações de Batimastat nas linhas celulares em estudo. Como se pode observar, o Batimastat induz morte celular predominantemente por apoptose, sendo a percentagem de células em morte celular dependente da concentração do fármaco a que as células são submetidas. A análise estatística confirma esta dependência da dose e da linha celular.

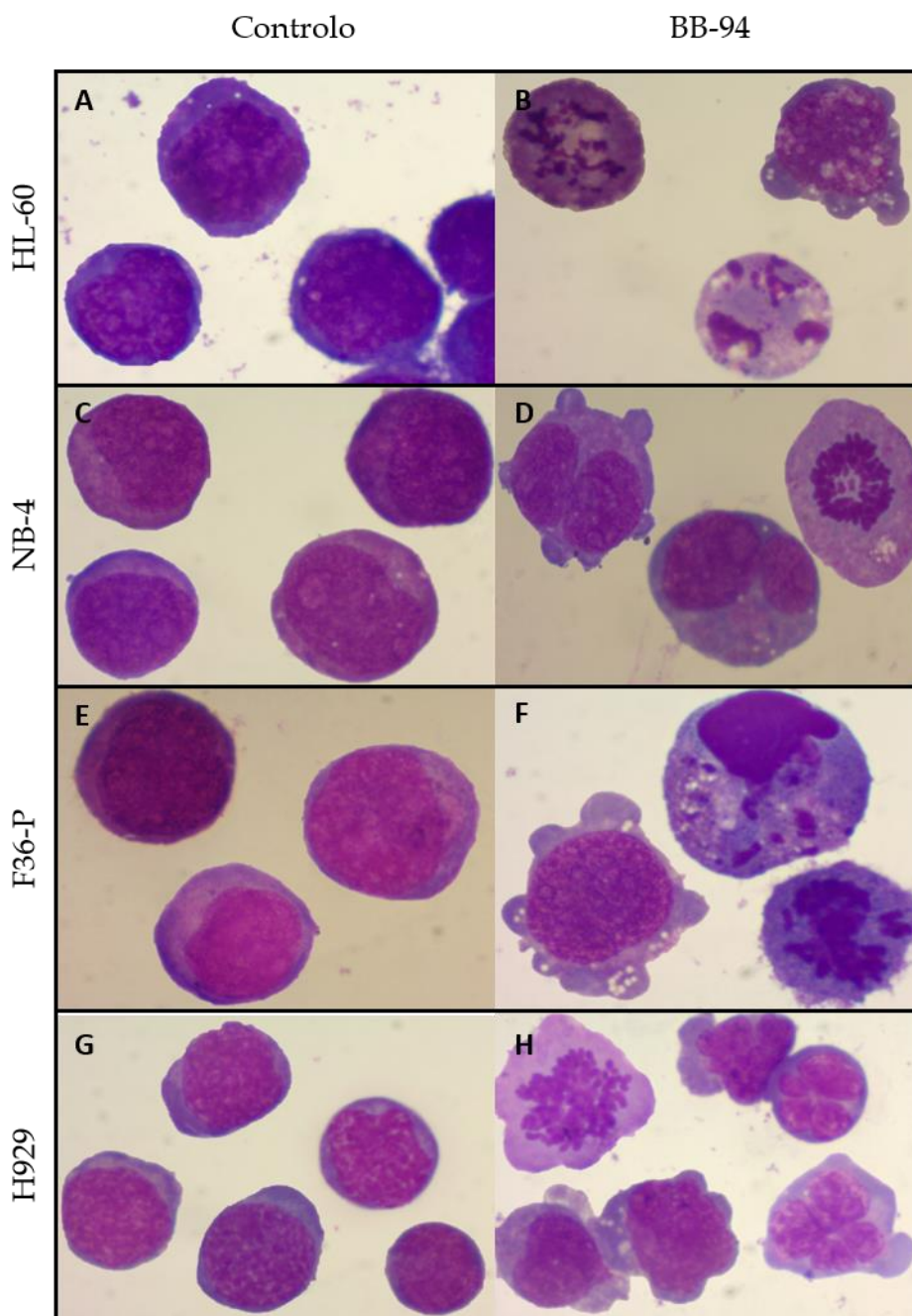


**Figura 17 - Avaliação do efeito citotóxico do Batimastat nas linhas celulares HL-60, NB-4, F36-P e H929.** As linhas celulares foram incubadas com o fármaco de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos, nas concentrações indicadas na legenda. Posteriormente, foi realizada a marcação das células com anexina V e iodeto de propídeo, tal como descrito também na secção de materiais e métodos. Os resultados apresentados são expressos em percentagem (%) e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efetuada por comparação à condição não tratada (Controlo) utilizando o teste de Tukey, sendo \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . V, células viáveis (azul); AI, células em apoptose inicial (vermelho); AT/N, células em apoptose tardia/necrose (verde); N, células em necrose (roxo).

### 3.2.3 - Análise do tipo de morte celular induzida pelo Batimastat por microscopia óptica

O efeito citotóxico induzido pelo Batimastat nas linhas celulares de neoplasias hematológicas foi também caracterizado pela análise dos aspectos morfológicos, por microscopia ótica, das células na ausência e na presença do composto, após a realização de esfregaços corados com a solução de May-Grünwald-Giemsa.

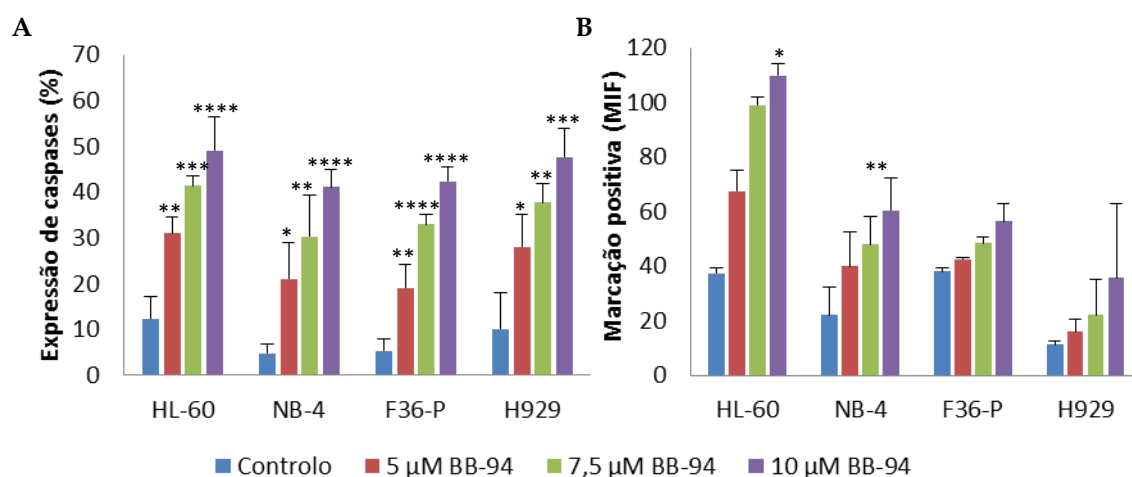
É possível observar na Figura 18, que a incubação com o Batimastat induz alterações morfológicas nas células que são características do processo de morte celular por apoptose. Comparando as células tratadas com o BB-94 com as não tratadas, pode verificar-se que em todas as linhas celulares há a formação de *blebbings*, ou seja, evaginações da membrana celular que englobam organelos celulares e fragmentos do núcleo, que posteriormente se destacam das células formando os corpos apoptóticos. Outra característica morfológica da apoptose é a contração e posterior fragmentação nuclear, sendo possível observar estes processos também na figura 18. A maioria dos esfregaços das quatro linhas celulares tratadas com Batimastat apresentam células com vacúolos no citoplasma, que podem dever-se quer a toxicidade induzida pelo fármaco, quer ao início do processo autofágico ou lisossômico. Pode também observar-se nestes esfregaços a presença de mitoses catastróficas, que representam paragem bloqueio do ciclo celular. De notar que as células das linhas celulares HL-60 e NB-4 apresentam uma morfologia bastante semelhante, quer em condições normais, quer sob o tratamento com Batimastat, o que seria de esperar tendo em conta que são células da mesma patologia (Leucemia Promielocítica Aguda).



**Figura 18 - Aspeto morfológico das diferentes linhas celulares de neoplasias hematológicas na ausência (controlo) e após o tratamento com Batimastat (BB-94).** A Figura representa os aspetos morfológicos característicos das linhas celulares em estudo na ausência de (A, C, E e G) e após tratamento com BB-94 (B, D, F e H). As linhas celulares foram incubadas durante 48h na ausência, HL-60 (A), NB-4 (C), F36-P (E) e H929 (G) e na presença do BB-94 nas concentrações referidas na Figura, 5  $\mu$ M (B), 7,5  $\mu$ M (D) e 10  $\mu$ M (F e H). Após o período de incubação, efetuaram-se esfregaços de células, que foram corados com a solução de May-Grünwald-Giemsa de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos. As células foram observadas ao microscópio ótico a uma ampliação de 500x.

### 3.2.4 - Avaliação da expressão de caspases por citometria de fluxo

Para confirmar o processo de morte celular por apoptose, foram também avaliados os níveis de expressão e activação de caspases por citometria de fluxo, com recurso à marcação com a sonda ApoStat. Os resultados representados na figura 18 indicam que nas células tratadas com Batimastat há aumento da expressão de caspases comparativamente às condições controlo (Figura 19-A), bem como da percentagem de células com marcação positiva para esta sonda (Figura 19-B), sendo as diferenças estatisticamente significativas. Este aumento é diretamente proporcional à dose de Batimastat administrada, resultado confirmado pela análise estatística.



**Figura 19 - Avaliação da expressão de caspases por citometria de fluxo em células de neoplasias hematológicas tratadas com Batimastat (BB-94).** As linhas celulares, HL-60, NB-4, F36-P e H929, foram incubadas, com BB-94 nas concentrações indicadas na legenda, de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos. Posteriormente, foi realizada a marcação das células com a sonda ApoStat. Os resultados apresentados são expressos em % de células marcadas positivamente para a sonda (A) e em níveis de expressão expressos em MIF totais, os quais são diretamente proporcionais ao número de anticorpos associados ao alvo, na população total (B), e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes. A análise estatística foi efetuada por comparação à condição não tratada (Controlo) utilizando o teste de Dunnet, sendo \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 3.2.5 - Avaliação do efeito do Batimastat no Ciclo Celular

Para avaliar se o efeito citostático do Batimastat é devido à ativação de *check-points* celulares, induzindo assim o bloqueio do ciclo celular, foi analisada por citometria de fluxo, a distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular. Analisou-se então

o conteúdo de ADN após marcação das células com solução de iodeto de propídeo/RNase, de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos.

A Tabela 4 apresenta a distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular. Como se pode verificar, quando as células HL-60 são incubadas com Batimastat, observa-se aumento da percentagem de células que se encontram na fase  $G_0/G_1$ , sendo este efeito menos visível na dose mais elevada do fármaco. Nas células H929, o bloqueio é também na mesma fase do ciclo, no entanto, o efeito é mais visível quando as células são incubadas com concentrações mais elevadas de BB-94. No caso das células NB-4, observa-se aumento significativo da percentagem de células na fase S (bloqueio em fase S), sendo este efeito mais acentuado nas células tratadas com a concentração de 7,5  $\mu\text{M}$ . Nas células F36-P, observa-se tendência para um ligeiro bloqueio em fase  $G_2/M$ .

**Tabela 4 - Análise do efeito do Batimastat (BB-94) na distribuição das células pelas fases do ciclo celular.**

		Pico pré- $G_1$	$G_0/G_1$	S	$G_2/M$
HL-60	Controlo	2,7 $\pm$ 1,2	43,0 $\pm$ 1,7	47,0 $\pm$ 2,6	10,0 $\pm$ 4,4
	5 $\mu\text{M}$ BB-94	12,7 $\pm$ 3,5	53,0 $\pm$ 1,0 **	36,3 $\pm$ 2,1	10,0 $\pm$ 1,0
	7,5 $\mu\text{M}$ BB-94	17,7 $\pm$ 6,1	53,0 $\pm$ 1,0 **	40,0 $\pm$ 2,6	7,0 $\pm$ 2,0
	10 $\mu\text{M}$ BB-94	21,7 $\pm$ 11,2 *	48,0 $\pm$ 3,6	45,7 $\pm$ 8,5	6,0 $\pm$ 5,0
NB-4	Controlo	0,0 $\pm$ 0,0	53,3 $\pm$ 2,3	36,7 $\pm$ 3,1	10,0 $\pm$ 5,3
	5 $\mu\text{M}$ BB-94	7,0 $\pm$ 2,0 **	48,3 $\pm$ 1,5	49,0 $\pm$ 1,7 ***	2,7 $\pm$ 3,1
	7,5 $\mu\text{M}$ BB-94	7,7 $\pm$ 2,1 **	44,3 $\pm$ 2,1 **	51,3 $\pm$ 1,5 ****	4,3 $\pm$ 0,6
	10 $\mu\text{M}$ BB-94	14,0 $\pm$ 1,7 ****	46,0 $\pm$ 1,7 **	47,3 $\pm$ 0,6 ***	6,7 $\pm$ 1,5
F36-P	Controlo	0,3 $\pm$ 0,5	55,8 $\pm$ 3,2	37,0 $\pm$ 4,4	7,3 $\pm$ 3,3
	5 $\mu\text{M}$ BB-94	3,5 $\pm$ 1,7	53,8 $\pm$ 5,6	36,0 $\pm$ 6,1	10,3 $\pm$ 2,6
	7,5 $\mu\text{M}$ BB-94	7,8 $\pm$ 4,9	53,0 $\pm$ 4,8	34,8 $\pm$ 4,9	12,0 $\pm$ 1,8
	10 $\mu\text{M}$ BB-94	13,3 $\pm$ 9 *	48,3 $\pm$ 3,4	39,5 $\pm$ 5,3	12,3 $\pm$ 7,5
H929	Controlo	1,8 $\pm$ 2,9	46,0 $\pm$ 2,4	40,3 $\pm$ 1,7	13,8 $\pm$ 4,1
	5 $\mu\text{M}$ BB-94	5,5 $\pm$ 3,1	49,0 $\pm$ 1,6	37,3 $\pm$ 1,0	13,8 $\pm$ 2,5
	7,5 $\mu\text{M}$ BB-94	9,5 $\pm$ 4,2 *	50,0 $\pm$ 1,6	37,8 $\pm$ 1,3	11,8 $\pm$ 1,7
	10 $\mu\text{M}$ BB-94	11,0 $\pm$ 2,7 **	51,3 $\pm$ 3 *	36,8 $\pm$ 2,6	11,8 $\pm$ 1,7

Os resultados apresentados são expressos em % de células presentes em cada fase do ciclo, e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 4 ensaios independentes. A análise estatística foi

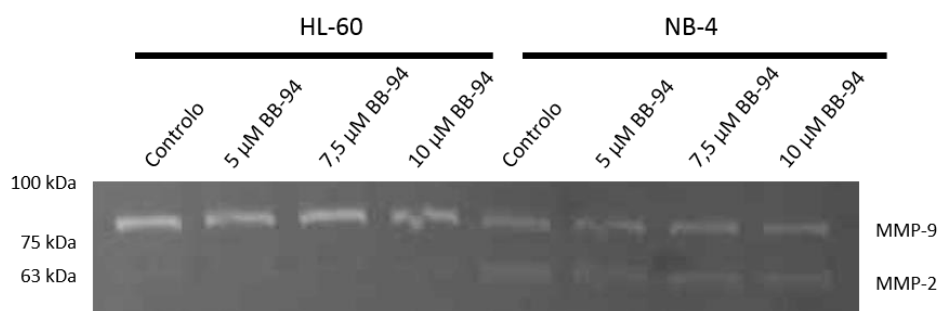


efetuada por comparação à condição não tratada (Controlo) utilizando o teste de Dunnet, sendo \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 3.3 - Avaliação da atividade das metaloproteinasas da matriz por zimografia de gelatina

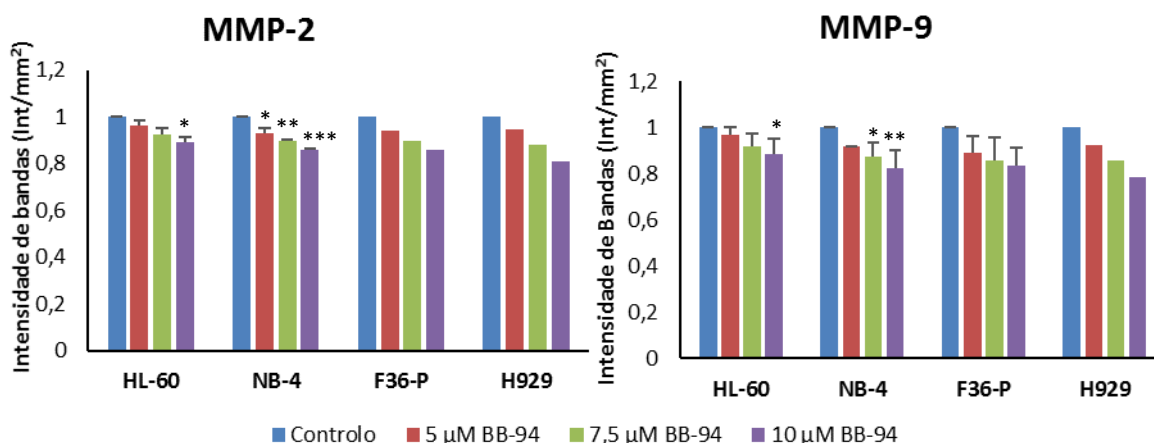
Para confirmar os efeitos do Batimastat na atividade das MMPs nas diferentes linhas celulares de neoplasias hematológicas, foram usados meios de cultura condicionados em zimografia de gelatina. As células foram incubadas previamente com o fármaco durante 48h, num meio de cultura sem soro bovino fetal. No final deste período de incubação, procedeu-se à recolha do meio celular, sendo estes posteriormente utilizados numa electroforese em gel enriquecido com gelatina, segundo o procedimento descrito na secção de material e métodos.

Através da análise dos géis (Figura 20) é possível identificar a presença de duas bandas por amostra, uma com um peso molecular entre os 75 e os 100 kDa, que corresponde à MMP-9 (com um peso molecular de 82 kDa), e outra banda com um peso molecular de 63 kDa, correspondendo à MMP-2, por ser o peso exato desta enzima. Neste gel é possível distinguir diferentes densidades das bandas entre as linhas celulares, sendo as células HL-60 as que apresentam níveis basais de atividade das enzimas mais elevados.



**Figura 20 - Gel representativo de zimografia em gelatina para avaliar a influência do Batimastat (BB-94) na atividade das Metaloproteinasas da Matriz. Após incubação das células HL-60 e NB-4 com o fármaco durante 48h, foi recolhido o meio celular e os extratos das várias condições foram obtidos, como descrito na secção de material e métodos**

Quando as células são tratadas com diferentes concentrações de BB-94, observar-se inibição da atividade enzimática da MMP-2 e MMP-9 em todas as linhas celulares, de modo dependente da dose, sendo as diferenças estatisticamente significativas. Concentrações crescentes do fármaco induzem maior inibição da atividade enzimática, como representado na Figura 21.



**Figura 21 - Efeito do Batimastat na atividade enzimática das gelatinases.** Após zimografia em gelatina, o gel foi analisado com o programa Quantity One®, obtendo assim os valores da densidade das bandas em intensidade (Int)/mm<sup>2</sup>, que foram posteriormente normalizados ao controlo. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efetuada por comparação à condição não tratada (Controlo) utilizando o teste de Dunnet, sendo \* p<0,05, \*\* p<0,01 e \*\*\* p<0,001. BB-94, Batimastat.

### 3.4 - Análise da ação do Batimastat na expressão das proteínas ERK 1/2 e AKT por *western blotting*

De forma a verificar alguns dos mecanismos envolvidos no efeito antiproliferativo e/ou citotóxico do BB-94 fomos avaliar por *western blotting* a expressão e ativação de proteínas envolvidas em diferentes vias de sinalização intracelular, como a ERK e AKT, na ausência e após tratamento das células com 5μM de BB-94 durante 48h.

Como se pode observar na figura 22, a presença de BB-94 induz um aumento da expressão de ERK 1/2 fosforilada nas linhas celulares HL-60 e F36-P, não se observando grandes alterações desta proteína nas linhas celulares NB-4 e H929 (Figura 22- A e C). O aumento de expressão é mais visível na linha celular HL-60, observando-se aumento da

proteína na sua forma fosforilada cerca de duas vezes superior quando comparado com a condição controlo (Figura 22- A e C).

Relativamente à proteína AKT, observa-se aumento da expressão na linha celular HL-60 quando comparado com a condição controlo, enquanto na linha celular H929 se observa diminuição da expressão desta proteína para valores próximos de 50%, quando comparado com os níveis controlo da mesma. Na linha celular NB-4 e F36-P não se observam alterações na expressão desta proteína (Figura 22- B e D).

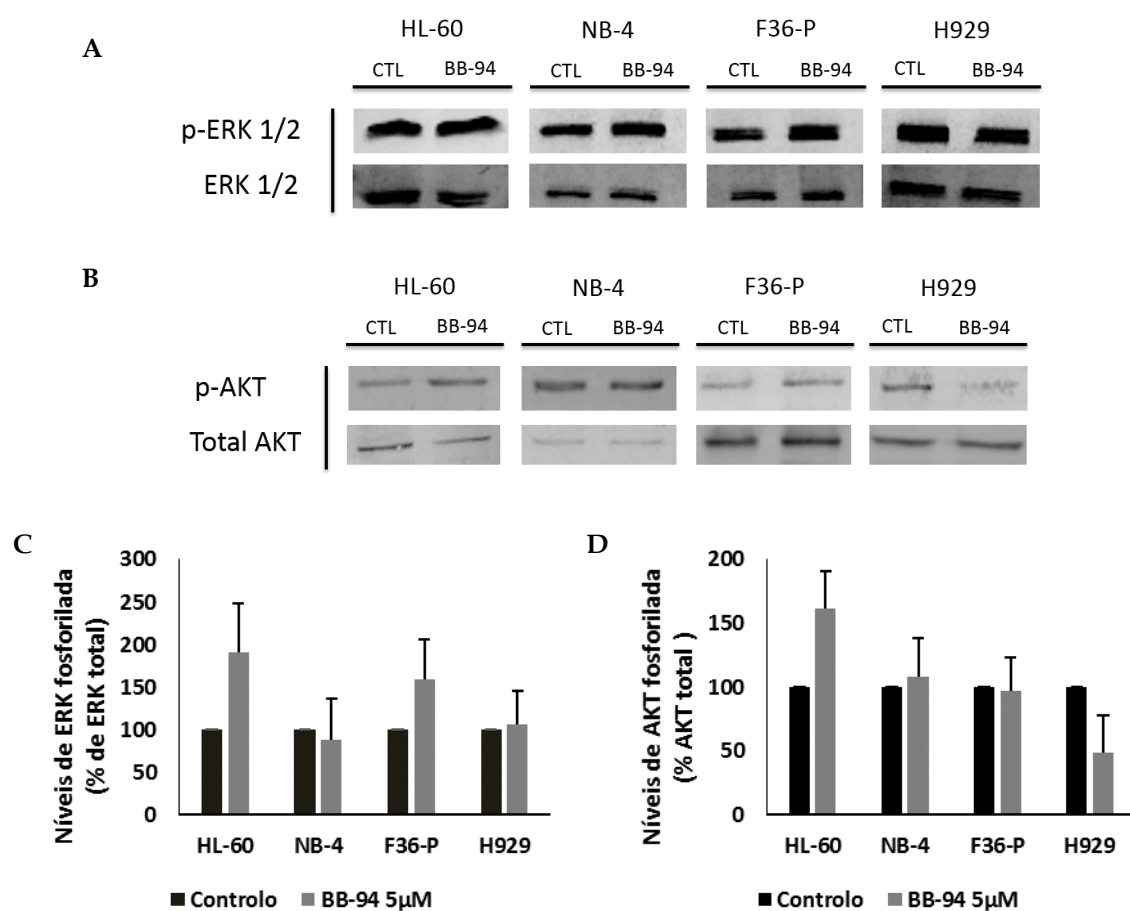
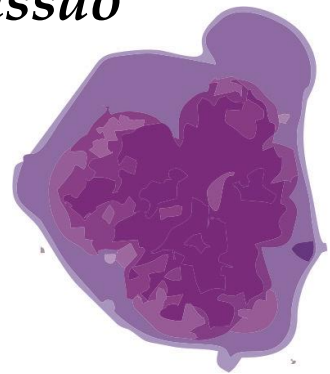


Figura 22 - Análise do efeito do Batimastat nos níveis das proteínas ERK 1/2 e AKT fosforiladas por *western blot* nas células HL-60, NB-4, F36-P e H929. As linhas celulares foram incubadas na ausência e na presença de 5 µM de Batimastat durante 48h. No final deste período, as células foram lisadas e preparadas como descrito na secção de materiais e métodos, recorrendo a anticorpos específicos para as proteínas em estudo.



## *4. Discussão*





## **4.1 - Avaliação do potencial terapêutico de um inibidor das Metaloproteinases da Matriz em modelos *in vitro* de neoplasias hematológicas**

Apesar de existirem inúmeras terapêuticas disponíveis para as diferentes neoplasias hematológicas, alguns doentes continuam a apresentar falência da terapêutica aos tratamentos convencionais e recaídas, por exemplo, devido ao desenvolvimento de mecanismos de resistência. Assim, torna-se de elevada importância a exploração de novas áreas de intervenção terapêutica nestas patologias.

Durante a hematopoiese normal, o microambiente medular é o principal responsável pela regulação de inúmeros processos relacionados com as CEHs, tais como a proliferação, diferenciação e migração celular. Os vários componentes deste microambiente cooperam entre si para que haja uma regulação restrita destas células, com participação das células do estroma medular, de citocinas e outros fatores de crescimento e das proteínas da matriz extracelular.

Vários estudos comprovaram já a existência de MMPs no tecido normal da medula óssea, principalmente de gelatinases (MMP-2 e MMP-9) nas células mieloides, nos megacariócitos e nos eritroblastos, e de MMPs transmembranares em precursores eritroides, mieloides e megacariocíticos (Yu e Han, 2006). As MMPs apresentam também algumas funções importantes neste ambiente. Por exemplo, sabe-se que estas proteínas têm um papel fundamental na reconstituição da medula depois de transplantes medulares. As MMPs estão também envolvidas nos processos de trombopoiese, visto serem produzidas e libertadas pelos megacariócitos, estimulando assim a libertação de plaquetas (Yu e Han, 2006).

Em suma, as MMPs têm um papel fundamental ao longo de todo o processo hematopoiético ao modularem a proliferação, a diferenciação, a migração de células estaminais ou progenitoras de diferentes linhagens, através da proteólise da matriz extracelular e da libertação de citocinas e fatores de crescimento. As citocinas e os factores de crescimento que estão presentes na matriz extracelular e que são libertados/ativados pelas MMPs, estão envolvidos em processos como a angiogénese, a inflamação, o crescimento, a invasão, a metastização e a sobrevivência celular. Deste modo, a mais pequena desregulação na produção ou mesmo na atividade das MMPs

pode contribuir para o desenvolvimento do cancro, em particular de neoplasias hematológicas.

Nos últimos anos, as MMPs têm sido foco de inúmeros grupos de investigação, estando já bem definida a sua importância no desenvolvimento cancerígeno bem como possíveis marcadores moleculares nas mais variadas patologias, tanto neoplásicas como não-neoplásicas (Sbardella *et al*, 2012). Os inibidores das MMPs já foram usados em vários ensaios clínicos, tendo a maioria deles conseguido avançar até à terceira fase (Coussens *et al*, 2002). No entanto, existem poucos estudos em que tenha sido explorado o potencial terapêutico destas moléculas em neoplasias hematológicas. A maioria dos doentes alvo nestes ensaios clínicos são doentes com cancro do pâncreas ou com cancro do pulmão de não-pequenas células, e os fármacos que chegaram às fases mais avançadas são fármacos com alvos mais específicos, como é o caso do prinomastat e do tanomastat que são inibidores específicos das gelatinases (MMP-2 e MMP-9), sendo pouco eficientes nas outras MMPs.

Neste estudo foi usado o Batimastat, um inibidor peptidomimético das MMPs, que possui um largo espectro de ação, ao ser capaz de inibir um elevado número de MMPs. O Batimastat foi introduzido em ensaios clínicos em 1996, por Wojtowicz-Praga e colaboradores, e um ano depois, Parsons e colegas concluíram que o Batimastat pode ser bastante útil a controlar a ascite neoplásica. Estes estudos foram continuados em 1998, por Beattie e Smyth, os quais reforçaram a utilização do Batimastat no tratamento desta patologia. Mais tarde, em 2001, Krüger e colegas verificaram alguns efeitos secundários a nível hepático devido ao uso de Batimastat, sendo necessário mais estudos para que este fármaco possa ser usado no tratamento de doentes oncológicos.

Existem várias linhas celulares como modelos de várias neoplasias hematológicas, no entanto, neste estudo foram usadas quatro linhas representativas de três neoplasias hematológicas: as linhas de Leucemia Promielocítica Aguda, HL-60 e NB-4, sem e com a translocação PML-RAR $\alpha$ , respetivamente, a linha de Síndrome Mielodisplásica, F36-P, e a linha de Mieloma Múltiplo, H929.

A maioria dos estudos *in vitro* com este fármaco são realizados em linhas celulares de tumores sólidos, e uma grande parte deles avalia a influência do Batimastat na proliferação e na migração celular. Os estudos realizados nas mais variadas patologias demonstraram que este fármaco possui efeitos citostáticos (Watson



*et al*, 1995; Low *et al*, 1996; Jimenez *et al*, 2000; Darmoul *et al*, 2004; Mucha *et al*, 2007), sendo que poucos indicaram os seus efeitos citotóxicos. Jimenez e os seus colaboradores (2000) explicaram que os resultados de citotoxicidade com este fármaco não se deve a uma toxicidade celular direta, pois os inibidores das MMPs afetam apenas a capacidade das células mudarem a matriz extracelular para facilitar a invasão e o crescimento (Jimenez *et al*, 2000). Zang e colaboradores (2000) publicaram um dos poucos estudos com modelos de neoplasias hematológicas, no entanto este estudo estava mais direcionado para capacidade de migração celular (Zang *et al*, 2000).

Os resultados do presente estudo indicam que o Batimastat induz um efeito citotóxico e citostático em células de neoplasias hematológicas. No entanto, o efeito observado é dependente do tipo de linha celular. As linhas celulares que se mostraram mais sensíveis ao fármaco foram as que representam a Leucemia Promielocítica Aguda, as células as NB-4 e HL-60, visto serem as que necessitam de menor quantidade de fármaco para induzir 50% de morte celular (IC<sub>50</sub>). A linha celular F36-P apresenta um comportamento semelhante à HL-60, sendo necessária uma dose ligeiramente superior de fármaco às 48h de incubação para induzir 50% de morte celular. A linha celular H929 é aquela em que o efeito do fármaco é obtido mais tardiamente, sendo o IC<sub>50</sub> atingido apenas após 72h de incubação com uma concentração entre os 7,5 e os 10 µM. A partir das 72h de incubação é possível observar-se uma ligeira reversão do efeito nas doses mais elevadas, sugerindo a eventual necessidade de reforço da dose administrada. Além do efeito citotóxico, o Batimastat possui um efeito antiproliferativo (citostático), sendo as linhas F36-P e H929, aquelas em que o efeito é mais acentuado quando comparado com o controlo. Estes resultados foram confirmados pela análise do ciclo celular, tendo-se verificado um bloqueio na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> e/ou na fase S, dependendo da linha celular

Tendo em conta os resultados do presente trabalho, pode-se verificar que o fármaco tem um comportamento diferente em diferentes modelos de tumores hematológicos, sendo dependente de fatores como o tempo de incubação, a dose administrada e a linha celular. Dentro de linhas celulares do mesmo modelo neoplásico verificam-se algumas diferenças, o que se pode dever à presença ou não da proteína de fusão PML-RAR $\alpha$ , sendo que a presença desta proteína parece tornar as células mais sensíveis ao fármaco. A linhagem afetada pela doença parece ser um fator também importante na sensibilidade ao Batimastat, sendo a linhagem mieloide a mais sensível,

representada nas células HL-60, NB-4 e F36-P. O único modelo representativo de uma patologia linfóide, as células H929, foi o que revelou ser o menos sensível ao fármaco.

Além do efeito do Batismat em toma única, fomos verificar se a administração de doses inferiores do fármaco de uma forma fracionada potencia o seu efeito. Existem estudos que indicam que o uso de um esquema terapêutico de compostos anti-tumorais em administração fracionada pode induzir aumento do efeito dos mesmos (Sarmiento-Ribeiro, 2000; Gonçalves, 2008). Este modo de administração do fármaco revelou-se mais eficaz em reduzir a viabilidade e a proliferação celular, apesar de serem utilizando doses mais baixas do que quando administrado em toma única, na qual se utiliza concentrações mais elevadas. Este efeito é dependente da dose e da linha celular, sendo mais uma vez a linha celular NB-4 a mais sensível, seguida da F36-P. A utilização deste esquema terapêutico, ao utilizar menor concentração do fármaco, poderá reduzir os problemas de toxicidade relacionada com a dose.

Os nossos resultados mostram também que o Batimastat induz morte celular predominantemente por apoptose, confirmada pela morfologia celular e por citometria de fluxo, assim como pelo aparecimento de um pico pré-G<sub>1</sub> na análise do ciclo celular, e que o aumento da dose correlaciona-se com o aumento da morte celular por apoptose. Este aumento é acompanhado por aumento da ativação de caspases, o que explica este tipo de morte celular. Os resultados são consistentes nas quatro linhas celulares, concordando com a maioria da literatura, apesar de existirem alguns trabalhos que reportam morte celular por necrose, como descrito por Jimenez e colegas (2000) num modelo de cancro pancreático.

Burke e colegas, em 1997, verificaram que a associação terapêutica de Batimastat com Interferão- $\gamma$  induz bloqueio do ciclo celular e apoptose em células de cancro do ovário. Este estudo serviu como base para estudos posteriores, como foi o caso de Erba (1999) e Daniel e colaboradores (2001). Estes autores utilizando outros inibidores das MMPs em células do cancro do ovário e mesangiais glomerulares verificaram que estes induziam o mesmo efeito que o observado no nosso estudo. No entanto, os mecanismos celulares ativados observados por Daniel em 2001, eram diferentes dos observados por Erba em 1999. Erba verificou que as células de cancro do ovário não tinham a proteína p53, o que implica um bloqueio no ciclo celular independente desta proteína. Porém, Daniel verificou que o bloqueio no ciclo celular nas células mesangiais se devia à indução do p53. Outro estudo conduzido por Mucha em 2007,

revelou que o uso do Batimastat em ratos com adenomas da pituitária também induz morte celular por apoptose.

O papel do Batimastat na apoptose não se encontra bem definido na literatura, pois os resultados divergem consoante as condições experimentais. No entanto, está confirmado que na maioria dos tumores torna-se mais importante inibir a proliferação celular do que aumentar a taxa de células em apoptose, tendo o Batimastat essa capacidade, como já acima indicado.

A avaliação da progressão no ciclo celular permite concluir que o bloqueio no ciclo celular induzido pelo Batimastat está dependente da patologia e das características genéticas. Os resultados indicam que o fármaco induz bloqueio na fase  $G_0/G_1$  do ciclo celular nas linhas HL-60 e H929, na fase S na linha NB-4 e, apesar de não se confirmar estatisticamente, bloqueio na fase  $G_2/M$  na linha F36-P.

Vários grupos de trabalho (Burke *et al*, 1997; Erba *et al*, 1999) investigaram o papel do Batimastat no ciclo celular, verificando que normalmente existe bloqueio na fase  $G_0/G_1$ , em células de cancro do ovário (Burke *et al*, 1997; Erba *et al*, 1999). Também foi avaliado o efeito de outros inibidores das MMPs na progressão do ciclo celular, com conclusões semelhantes. Por exemplo, Daniel e colaboradores, em 2001, observaram bloqueio na fase  $G_0/G_1$  em células mesangiais glomerulares. Assim, os efeitos do Batimastat observados neste trabalho nas linhas celulares HL-60 e H929 encontram-se de acordo com o que está descrito na literatura.

A diferença observada nas linhas celulares modelos de Leucemia Promielocítica Aguda (HL-60 e NB-4) pode ser justificada pela presença da translocação na linha NB-4 e da proteína de fusão daí resultante, característica da doença, a proteína PML-RAR $\alpha$ . Está descrito que uma das propriedades desta proteína de fusão é a interação com os alvos da proteína PML, quando esta se encontra funcional (Puccetti e Ruthardt, 2004). Um destes alvos é a proteína p53 que tem funções importantes no controlo do ciclo celular, na transição de  $G_1$  para a fase S, por ativação da proteína p21, no controlo da apoptose e na reparação do ADN (Novák *et al*, 2002). Na presença da proteína de fusão PML-RAR $\alpha$ , a p53 é capturada o que torna a célula protegida da apoptose e permite a progressão do ciclo celular (Puccetti e Ruthardt, 2004). A administração de Batimastat poderá alterar este tipo de ligação da PML-RAR $\alpha$  com a p53, induzindo bloqueio das

células na fase S do ciclo celular e indução de apoptose. No entanto, para confirmar esta hipótese serão necessários estudos posteriores.

Os resultados obtidos da análise do ciclo celular na linha celular F36-P são contraditórios relativamente ao descrito na literatura. Em 2001, Kawasaki juntamente com a sua equipa, observaram na linha celular F36-P aumento da expressão da proteína STK15 na fase G<sub>2</sub>/M do ciclo celular, (Kawasaki *et al*, 2001). Esta proteína está envolvida na entrada mitótica, na separação dos centríolos e no alinhamento dos cromossomas na metafase, sendo por isso um importante regulador do ciclo celular. A elevada expressão desta proteína encontra-se associada a vários tumores (cancro da mama, carcinoma hepatocelular, carcinoma das células escamosas do esófago, cancro pancreático) e em muitos deles está a ser estudada a possibilidade de ser um alvo terapêutico (Kollareddy *et al*, 2008). Gao e seus colaboradores verificaram em 2008, que ao inibirem a STK15 induziam bloqueio do ciclo celular em fase G<sub>2</sub>/M nas células de carcinoma hepatocelular, bem como a entrada na apoptose, diminuindo assim a proliferação celular (Gao *et al*, 2008). Tendo em conta os estudos de Wang em 2012, que indicam uma relação entre a expressão de STK15 e de MMP-2 (Wang *et al*, 2012), a administração de Batimastat nesta linha celular pode estar a induzir bloqueio em fase G<sub>2</sub>/M por inibição da proteína STK15. No entanto, mais uma vez, seriam necessários estudos posteriores para confirmar esta hipótese, nomeadamente a avaliação dos níveis de STK15 nas células F36-P antes e após a incubação com Batimastat.

## **4.2 - Avaliação do efeito do Batimastat na atividade das Metaloproteinases da Matriz**

De forma a confirmar a atividade inibitória das MMPs pelo Batimastat, fomos realizar um ensaio zimográfico, cujo objetivo foi observar a atividade das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) num gel de acrilamida suplementado com gelatina.

Os resultados deste trabalho indicam que as quatro linhas celulares expressam gelatinases, sendo a intensidade das bandas concordantes com os resultados obtidos da expressão basal de MMPs. Os estudos de citometria de fluxo mostram que as células da linha F36-P são as que expressam maiores quantidades de MMPs, enquanto as células da linha H929 são as que expressam menores quantidades de MMPs, o que poderá contribuir para a diferença de sensibilidade destas linhas ao Batimastat. Além disso,

após a administração de Batimastat observou-se diminuição da atividade das gelatinases, sendo esta diminuição proporcional à dose administrada. Estes resultados estão de acordo com o que está já descrito na literatura, como é o caso do estudo conduzido por Low e os seus colaboradores, em 1996, que observaram o efeito inibitório do Batimastat em células de cancro da mama (Low *et al*, 1996). De igual modo, Zang e os seus colaboradores, em 2000, observaram também um bloqueio da atividade gelatinolítica nas células NB-4 induzido pelo Batimastat (Zang *et al*, 2000).

### **4.3 - Avaliação do efeito do Batimastat na regulação de proteínas intracelulares**

A via das MAPK e da PI3K são duas vias de sinalização celular com um papel fundamental no controlo de processos celulares como o crescimento, a proliferação e a migração celular, exercendo também controlo na transcrição, na tradução e na progressão do ciclo celular. Assim, fomos avaliar se o efeito antiproliferativo e/ou citotóxico estava relacionado com o efeito do Batimastat nestas vias de sinalização. Para tal, foram avaliadas a expressão e a ativação de duas proteínas envolvidas nesta via, a ERK 1/2 e a AKT.

Sabe-se que existem inúmeras formas da via das MAPK ser ativada, entre elas através da ativação de recetores de tirosina cinases, recetores acoplados a proteínas G, ou simplesmente por citocinas, fatores de crescimento ou produção de espécies reativas de oxigénio (Cargnello e Roux, 2011). Uma das vias que está melhor descrita na literatura é a via que envolve a ativação do fator de crescimento epidermal (EGFR). Vários estudos realizados com o Batimastat indicam que as MMPs, ao serem inibidas pelo fármaco, não libertam o fator de crescimento necessário à ativação do recetor, não ocorrendo a ativação da via das MAPK (Dong *et al*, 1999; Prenzel *et al*, 2001; O-Charoenrat *et al*, 2002; Langlois, 2007). Os resultados deste trabalho demonstraram que a administração do Batimastat induz aumento da proteína no seu estado fosforilado nas linhas celulares HL-60 e F36-P, não se observando diferenças significativas nas linhas celulares NB-4 e H929. Estes dados indicam-nos que, possivelmente, as MMPs não estão diretamente envolvidas nas vias de ativação da ERK nas linhas celulares NB-4 e H929, pois não há qualquer alteração quando se administra o Batimastat. Por outro lado, as linhas HL-60 e F36-P parecem possuir um mecanismo de ativação da via em

resposta ao inibidor das MMPs independente destas, tendo em conta o aumento da proteína fosforilada quando se compara as células tratadas com as células controlo.

No entanto, a morte celular por apoptose nestas linhas celulares pode ser explicada pela ativação desta proteína, tendo em conta que a ativação da via de sinalização RAS/RAF/ERK foi já associada a este processo (Cagnol e Chambard, 2010). Alguns estudos mostram que a ativação da ERK estava associada a marcadores clássicos da apoptose, como é o caso da ativação da caspase-3 e da PARP (do inglês, *Poly (ADP-ribose) Polymerase*), e que, dependendo do tipo celular e da lesão, ocorria uma ativação da via intrínseca da apoptose, mediada pela ativação da caspase-9, ou da via extrínseca, mediada pela ativação da caspase-8. A ativação desta via pode também promover um aumento dos recetores de morte à superfície celular, ou por outro lado, pode afetar a estabilidade mitocondrial, conduzindo à libertação do citocromo-c e, conseqüentemente à apoptose. A atividade da ERK pode também mediar a sobre regulação da proteína p53 (Cagnol e Chambard, 2010).

Apesar da via mais conhecida de ativação da AKT ser através dos recetores de tirosinas cinases, pela PI3K, também neste caso existem várias formas da AKT ser ativada. Um estudo numa linha celular de cancro da mama, conduzido por Formigué em 2003, demonstrou que o uso do Batimastat originava diminuição da fosforilação da AKT (Formigué *et al*, 2003). No entanto, a equipa de Takino em 2006, verificou que a administração de Batimastat induzia a ativação da AKT, em células de fibrossarcoma (Takino *et al*, 2008). Em 2009, Singh e colegas verificaram que a administração de um inibidor das MMPs em células de cancro da pele conduzia à ativação da via da PI3K, com subsequente ativação da AKT (Singh *et al*, 2009). Mais tarde, Lu e os seus colaboradores, em 2011, verificaram o mesmo efeito, mas neste caso com um inibidor natural das MMPs, o TIMP-1 em fibroblastos (Lu *et al*, 2011). Tendo em conta estes trabalhos, a literatura indica que no caso da AKT, a administração de Batimastat pode ter diferentes efeitos na sua ativação, o que vai ao encontro dos resultados obtidos neste trabalho. Os nossos resultados mostram que quando se administra Batimastat os níveis desta proteína no seu estado fosforilado aumentam na linha celular HL-60, diminuem na linha celular H929 e mantêm-se constantes nas linhas celulares NB-4 e F36-P, quando comparado com a condição controlo.

Foi demonstrado que tanto a ativação, como a inibição da AKT, podem conduzir ao processo de morte celular programada. Em 2003, Luo e colegas observaram que a

desativação da AKT se encontrava associada a morte celular, quer de forma dependente ou independente de caspases. Estes autores observaram que a AKT quando ativa possuía um efeito protetor dos efeitos citotóxicos que as células poderiam sofrer, ao fosforilar proteínas envolvidas no processo de morte celular, como é o caso da BAD, da MDM2 e da NF- $\kappa$ B. A utilização de agentes que promovam o *stress* celular podem desativar a AKT, eliminando este efeito protetor (Luo *et al*, 2003). Por outro lado, em 2011, Kuznetsov e colegas, observaram em linhas celulares de Leucemia Linfoblástica Aguda que a sobrerregulação da AKT conduzia ao *stress* do retículo endoplasmático, e conseqüentemente à morte celular. Esta equipa concluiu também que as diferenças entre o efeito pro-apoptótico e a manutenção da sobrevivência originada por esta proteína poderia estar dependente do momento do contexto de sinalização celular em que a célula se encontrava no momento da lesão induzida pelo fármaco (Kuznetsov *et al*, 2011). Estas constatações podem explicar como é que os diferentes resultados obtidos nas várias linhas celulares conduzem ao mesmo efeito de morte celular.





## ***5. Conclusão***





De seguida apresentam-se as principais conclusões obtidas após a análise deste trabalho que se focou no potencial das Metaloproteinasas da Matriz como novo alvo terapêutico em neoplasias hematológicas.

✓ A administração do Batimastat, um inibidor das MMPs, em modelos *in vitro* de neoplasias hematológicas induz efeito citotóxico, bem como efeito citostático, dependente da linha celular, das alterações genéticas, do tempo de exposição ao fármaco e da dose administrada.

✓ A utilização de um esquema terapêutico em administração fracionada parece ser mais vantajoso, visto que este tipo de administração diminui a viabilidade e a proliferação de forma mais eficiente quando comparado com a administração única. Para além disto, ao serem administradas doses mais baixas poder-se-á diminuir os potenciais efeitos tóxicos secundários induzidos por doses elevadas de fármaco.

✓ A inibição das MMPs origina ativação da morte celular programada, apoptose, dependente da ativação de caspases em todas as linhas celulares, sendo este processo também dependente da dose administrada.

✓ A progressão no ciclo celular é também afetada com este tipo de fármacos ao ser observado um bloqueio em todas as linhas celulares, confirmando o efeito citostático do Batimastat. No entanto, este bloqueio pode ocorrer em diferentes fases do ciclo celular, sendo dependente da linha celular e da dose administrada.

✓ A administração do inibidor das MMPs bloqueia efetivamente a atividade gelatinolítica das enzimas, sendo este bloqueio dependente da linha celular e da dose administrada. No entanto este não é o único mecanismo de ação deste composto.

✓ As vias de sinalização celular RAS/MAPK e PI3K/mTOR que controlam a maioria dos processos na célula, como a proliferação celular, o crescimento, a migração, o controlo do ciclo e da morte celular são afetadas por este fármaco, apesar deste efeito estar dependente da linha celular.

Em conclusão, os resultados apresentados neste trabalho sugerem que o Batimastat poderá constituir uma potencial nova abordagem terapêutica no tratamento de neoplasias hematológicas. Apesar da eficácia terapêutica estar dependente do tipo celular, das características genéticas da neoplasia e do esquema terapêutico usado, este

## Conclusão

estudo atribui às MMPs uma importância como potencial alvo terapêutico até agora pouco considerado no tratamento de neoplasias hematológicas.

## *5. Bibliografia*



## Bibliografia

- Alberts, B., *et al* (2007). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science. 5ª edição. 1450-1462.
- Allegra, A., *et al.* (2013). *Monoclonal antibodies: potential new therapeutic treatment against multiple myeloma*. *European Journal of Haematology*, 90: 441-468.
- Alves, R. (2011). *Avaliação molecular dos mecanismos envolvidos na sensibilidade e resistência ao Imatinib independente do BCR-ABL em Leucemia Mielóide Crónica*. Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra.
- Bauvois, B. (2012). *New facets of matrix-metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1825: 29-36.
- Beattie, G. J., Smyth, J. F. (1998). *Phase I study of intraperitoneal metalloproteinase inhibitor BB94 in patients with malignant ascites*. *Clinical Cancer Research*, 4: 1899-1902.
- Blau, O. (2011). *Bone Marrow Microenvironment in the Pathogenesis of AML in Myeloid Leukemia – Basic Mechanisms of Leukemogenesis*. Editado por Koschmieder, S. e Krug, U. da Editora InTech. 185-196.
- Brown, M., Wittwer, C. (2000). *Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology*. *Clinical Chemistry*, 48(8): 1221-1229.
- Burke, F., *et al.* (1997). *Interferon Gamma Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in a Model of Ovarian Cancer: Enhancement of Effects by Batimastat*. *European Journal of Cancer*, 33(7): 1114-1121.
- Cagnol, S., Chambard, J.C. (2010). *ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death – apoptosis, autophagy and senescence*. *The FEBS Journal*, 277: 2-21.
- Cargnello, M., Roux, P. P. (2011). *Activation and Function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1): 50-83.
- Celso, C. L., Scadden, D. T. (2011). *The haematopoietic stem cell niche at a glance*. *Journal of Cell Science*, 124: 3529-3535.
- Chiba, S., *et al* (1991). *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*. *Blood*, 78(9): 2261-2268.
- Chotinantakul, K., Leeanansaksiri, W. (2012). *Hematopoietic Stem Cell Development, Niches, and Signaling Pathways*. *Bone Marrow Research*, doi: 10.1155/2012/270425.
- Collins, S. *et al* (1977). *Continuous growth and differentiation of human myeloid leukemic cells in suspension culture*. *Nature*, 270: 347-349.
- Coussens, L. M., Fingleton, B., Matrisian, L. M. (2002). *Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations*. *Science*, 295: 2387-2392.
- Daniel, C., *et al.* (2001). *Matrix metalloproteinases inhibitors cause cell cycle arrest and apoptosis in glomerular mesangial cells*. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 297: 57-68.

- Darmoul, D., et al. (2004). *Activation of Proteinase-Activated Receptor 1 Promotes Human Colon Cancer Cell Proliferation Through Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation*. *Molecular Cancer Research*, 2: 514-522.
- Dong, J., et al. (1999). *Metalloprotease-mediated ligand release regulated autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 6235-6240.
- Drexler, H. G. et al (1995). *Leukemia cell lines: in vitro models for the study of acute promyelocytic leukemia*. *Leukemic Research*, 19(10): 681-691.
- Durkin, W. J., Ghanta, V. K., & Balch, C. M. (1979). *A Methodological Approach to the Prediction of Anticancer Drug Effect in Humans*. *Cancer Research*, 39: 402-407.
- Erba, E., et al. (1999). *The metalloproteinase inhibitor batimastat BB-94 causes cell cycle phase perturbations in ovarian cancer cells*. *Annals of Oncology*, 10: 589-591.
- Foran, J. M., Shammo, J. M. (2012). *Clinical Presentation, Diagnosis, and Prognosis of Myelodysplastic Syndromes*. *The American Journal of Medicine*, S6-S13.
- Fromigué, O., et al. (2003). *Active Stromelysin-3 (MMP-11) increases MCF-7 survival in three-dimensional matrigel culture via activation of p42/p44 MAP-Kinase*. *Int. J. Cancer*, 106: 355-363.
- Gallagher, R., et al (1979). *Characterization of the continuous, differentiating, myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia*. *Blood*, 54: 713-733.
- Gao, P., et al. (2008). *Hypoxia-inducible enhancer/a-fetoprotein promoter-driven RNA interference targeting STK 15 suppresses proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells*. *Cancer Science*, 99(11): 2209-2217.
- Gazdar, A., et al (1986). *Establishment and Characterization of a Human Plasma Cell Myeloma Culture Having a Rearranged Cellular myc Proto-oncogene*. *Blood*, 67(6 ): 1542-1549.
- Gonçalves, A. C. (2008). *Avaliação do stress oxidativo na síndrome mielodisplásica: papel da mitocôndria e dos agentes antioxidantes*. Master, University of Coimbra.
- He, L. Z., et al. (2000). *Two Critical Hits for Promyelocytic Leukemia*. *Molecular Cell*, 6: 1131-1141.
- Hecht, M., et al (2007). *Osteoblasts promote migration and invasion of myeloma cells through up regulation of matrix metalloproteinases, urokinase plasminogen activator, hepatocyte growth factor and activation of p38 MAPK*. *British Journal of Haematology*, 138: 446-458.
- Hellström-Lindberg, E., Malcovati, L. (2008). *Supportive care, growth factors, and new therapies in myelodysplastic syndromes*. *Blood Reviews*, 75-91.
- Hidalgo, M., Eckhardt, S. (2001). *Development of Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy*. *Journal of the Nation Cancer Institute*, 93(3): 178-193.
- Howen, B. (2000). *Blood Film Preparation and Staining Procedures*. *Laboratory Hematology*, 6(1): 1-7.



- Jensen, E. (2012). *The Basics of Western Blotting*. *The Anatomical Record*, 295: 369-371.
- Jimenez, R. E., et al. (2000). *Effect of matrix metalloproteinase inhibition on pancreatic cancer invasion and metastasis*. *Annals of Surgery*, 231(5): 644-654.
- Jones, D. L., Wagers, A. J. (2008). *No place like home: anatomy and function of the stem cell niche*. *Nature Reviews*, 9: 11-21.
- Kanji, S., Pompili, V., Das, H. (2011). *Plasticity and Maintenance of Hematopoietic Stem Cells During Development*. *Recent Pat Biotechnol*. 5(1): 40-53.
- Kawasaki, A. et al. (2001). *Downregulation of an AIM-1 Kinase Couples with Megakaryocytic Polyploidization of Human Hematopoietic Cells*. *The Journal of Cell Biology*, 152(2): 275-287.
- Klein, G., et al (2004). *The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia*. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 50: 87-100.
- Kollareddy, M., et al. (2008). *Aurora kinases: structure, functions and their association with cancer*. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomuc Czeck Repub*, 152(1): 27-33.
- Konopleva, M., et al. (2009). *Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: mechanisms and approaches*. *Drug Resistance Updates*, 12:103-113.
- Krüger, A., et al. (2001). *Hydroxamate-type matrix metalloproteinase inhibitor Batimastat promotes liver metastasis*. *Cancer Research*, 61: 1272-1275.
- Kuznetsov, J. N., et al. (2011). *AMPK and Akt Determine Apoptotic Cell Death following Perturbations of One-Carbon Metabolism by Regulating ER Stress in Acute Lymphoblastic Leukemia*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10:437-447.
- Langlois, S., et al. (2007). *Membrane-Type 1 Matrix metalloproteinase stimulates cell migration through epidermal growth factor receptor transactivation*. *Molecular Cancer Research*, 5: 569-583.
- Lin, R., et al. (1999). *Molecular Genetics of acute promyelocytic leukemia*. *Trends in Genetics*, 15(5): 179-184.
- Low, J. A., et al. (1996). *The matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) retards human breast cancer solid tumor growth but not ascites formation in nude mice*. *Clinical Cancer Research*, 2: 1207-1214.
- Lu, Y., et al. (2011). *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 promotes NIH3T3 fibroblast proliferation by activating p-AKT and cell cycle progression*. *Molecules and Cells*, 31:225-230.
- Luo, H. R., et al. (2003). *Akt as a mediator of cell death*. *PNAS*, 100(20): 11712-11717.
- Mucha, S. A., et al. (2007). *Inhibition of estrogen-induced pituitary tumor growth and angiogenesis in Fischer 344 rats by the matrix metalloproteinase inhibitor Batimastat*. *Virchows Arch*, 450: 335-441.
- Nimer, S. (2008). *Myelodysplastic syndromes*. *Blood*, 111: 4841-4851.

- Novák, B., Sible, J.C., Tyson, J. J. (2002). *Checkpoints in the Cell Cycle*. Encyclopedia of Life Sciences.
- Nwajei, F., Konopleva, M. (2013). *The Bone Marrow Microenvironment as Niche Retreats for Hematopoietic and Leukemic Stem Cells*. *Advances in Hematology*, doi: 10.1155/2013/953982.
- Oranger, A., et al. (2013) *Cellular Mechanisms of Multiple Myeloma Bone Disorder*. *Clinical and Developmental Immunology*.
- Orlando, S., et al. (1997). *Role of Metalloproteases in the Release of the IL-1 type II Decoy Receptor*. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(50): 31764-31769.
- O-Charoenrat, P., Rhyes-Evans, P., Eccles, S. (2002). *A synthetic matrix metalloproteinase inhibitor prevents squamous carcinoma cell proliferation by interfering with epidermal growth factor receptor autocrine loops*. *International Journal of Cancer*. 100: 527-533.
- Parsons, S. L., Watson, S. A., Steele, R. J. C. (1997). *Phase I/II trial of Batimastat, a matrix metalloproteinase inhibitor, in patients with malignant ascites*. *European Journal of Surgical Oncology*, 23: 526-531.
- Prenzel, N., et al. (2001). *The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification*. *Endocrine-Related Cancer*, 8: 11-31.
- Puccetti, E., Ruthardt, M. (2004). *Acute Promyelocytic leukemia: PML/RAR $\alpha$  and the leukemic stem cell*. *Leukemia*, 18: 1169-1175.
- Rasmussen, H., McCann, P. (1997). *Matrix Metalloproteinase Inhibition as a Novel Anticancer Strategy: A Review with Special Focus on Batimastat and Marimastat*. *Pharmacol. Ther.*, 75(1): 69-75.
- Raza, A., Galili, N. (2012). *The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes*. *Nature Reviews*, 12: 849-859.
- Sarmento-Ribeiro, A. B. (2000). *Alterações fenotípicas da célula tumoral e a sua relação com a resistência à quimioterapia*. PhD, University of Coimbra.
- Sbardella, D., et al (2012). *Human matrix metalloproteinases: An ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes*. *Molecular Aspects of Medicine*. 33: 119-208.
- Schofield, R. (1978). *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. *Blood Cells* 4, 7-25.
- Shackleton, M. (2010). *Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different*. *Seminars in Cancer Biology*, 20: 85-92.
- Singh, B., et al. (2009). *UV-induced EGFR signal transactivation is dependent on proligand shedding by activated metalloproteases in skin cancer cell lines*. *International Journal of Cancer*, 124: 531-539.
- Smith, P. K., et al. (1985). *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Analytical Biochemistry*, 150(1): 76-85.

- Suárez-Álvarez, B., López-Vázquez, A., López-Larrea, C. (2012). *Mobilization and Homing of Hematopoietic Stem Cells in Stem Cell Transplantation*. Editado por López-Larrea, C., López-Vázquez, A. e Suárez-Álvarez, B. da editora Springer.
- Takino, T., et al. (2006). *Membrane-type 1 matrix metalloproteinase modulates focal adhesion stability and cell migration*. *Experimental Cell Research*, 312: 1381-1389.
- Tefferi, A., Vardiman, J. W. (2009). *Myelodysplastic Syndromes*. *The New England Journal of Medicine*, 361: 1872-1885.
- Thé, H., et al. (2012). *Acute Promyelocytic Leukemia, arsenic and PML bodies*. *Journal of Cell Biology*, 198(1) 11-21.
- Toth, M., et al. (2012). *Assessment of gelatinases (MMP-2 e MMP-9) by Gelatin Zymography in Metastasis Research Protocols*. Editado por Dweck, M., et al. 8: 121-135.
- Uchiyama-Tanaka, Y., et al. (2002). *Involvement of HB-EGF and EGF receptor transactivation in TGF- $\beta$ -mediated fibronectin expression in mesangial cells*. *Kidney International*, 62: 799-808.
- van Engeland, M., et al (1998). *Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection system Based on Phosphatidylserine Exposure*. *Cytometry*, 31: 1-9.
- Vardiman, J. W., et al. (2009). *The 2008 Revision of the WHO Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia: Rationale and Important Changes*. *Blood*, 114: 937-951.
- Wang, J., Dick, J. (2005). *Cancer Stem Cells: lessons from leukemia*. *Trends in Cell Biology*. 15(9).
- Wang, X., et al. (2012). *Overexpression of Aurora-A Enhances Invasion and Matrix Metalloproteinase-2 Expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells*. *Molecular Cancer Research*, 10: 588-596.
- Wang, Z.-Y., Chen, Z. (2008). *Acute Promyelocytic Leukemia: from highly fatal to highly curable*. *Blood*, 111(5): 2505-2515.
- Watson, S. A., et al. (1995). *Inhibition of organ invasion by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) in two human colon carcinoma metastasis models*. *Cancer Research*, 55: 3629-3633.
- Wojtowicz-Praga, S., et al. (1996). *Phase I Trial of a novel matrix metalloproteinase inhibitor Batimastat (BB-94) in patients with advanced cancer*. *Investigational New Drugs*, 14: 193-202.
- Yu, X. F., Han, Z. C. (2006). *Matrix metalloproteinases in bone marrow: roles of gelatinases in physiological hematopoiesis and hematopoietic malignancies*. *Histology and Histopathology*. 21: 519-531.
- Zang, C., et al. (2000). *Enhanced migration of the acute promyelocytic leukemia cell line NB4 under in vitro conditions during short-term all-trans-retinoic acid treatment*. *Journal of Cancer Research in Clinical Oncology*, 126: 33-40.