

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho além de refletir o meu trabalho ao longo do mestrado, tem também um bocadinho de cada um de vocês...

Começo por agradecer à Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro por me ter acolhido no seu laboratório, e orientar-me nesta tese de mestrado, transmitindo-me os conhecimentos necessários.

À Doutora Ana Cristina Gonçalves pela partilha de sabedoria, pela paciência e por toda a sua flexibilidade no laboratório.

Ao meu orientador interno, Professor Doutor António Portugal, pelas suas palavras encorajadoras, recetividade, todo apoio e ajuda que, desde o primeiro momento, foram enormes e importantes.

Ao Professor Doutor Paulo Santos, por toda a ajuda prestada durante toda a minha vida académica em Coimbra. Ainda à Professora Doutora Paula Veríssimo, pelo apoio e auxílio na documentação necessária ao mestrado em Bioquímica.

Agradeço à Doutora Ilda do laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra pela amabilidade de me receber no laboratório e mostrar-se disponível para esclarecimento de dúvidas.

Às minhas colegas do laboratório Raquel, Joana, Ana, Joana F., a vocês Saras e à Mariana. Obrigada pela vossa disponibilidade para me ajudar no laboratório e no que fosse surgindo.

Ao meu pessoal da licenciatura, Tânia, Andreia, Andreia F., Fifty, Cátia, Andreia e Carina. Vila Real não teria sido tão brilhante e espetacular sem vocês. Obrigada por me acompanharem!

Aos meus amigos de Coimbra, Joana, Márcia, Helga, Filipa, Faim, Márcia M., Diana e Andreia, pelos 2 anos maravilhosos nesta “Coimbra dos amores”.

Ainda ao pessoal de Mogadouro, Juliana, Pedro, Rute, Ana, Igor, Rosalina, Zé, Ivo, Anabela, Matilde, Bárbara por todos os momentos de farra e trabalho musical! Sois sem dúvida alguma excelentes amigos.

<html>

<body> <p> Um profundo e orgulhoso agradecimento ao meu namorado, que sempre me ouviu, me acalmou, motivou e mimou! Obrigada também por me teres resolvido os problemas informáticos! </p></body>

</html>

A vocês: D. Gina e Sr. João, agradeço-lhes por todo o apoio e carinho que me têm dado. Obrigada por fazerem parte da minha vida!

Por fim, agradeço à minha mãe, irmão, cunhada, padrinho e São, à minha madrinha por todo o apoio incondicional, por me terem educado estes anos todos, por todas as opiniões, sugestões e conselhos. Ao meu pai, a minha precoce estrelinha, que me ilumina e guia no bom sentido. Esta tese é também para ti! O que sou hoje, a vocês o devo, obrigada!

A todos um bem-haja! A todos o meu agradecimento!

## RESUMO

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma neoplasia complexa e heterogênea da célula progenitora hematopoiética, cujas características incluem desregulação da diferenciação, proliferação clonal e acumulação na medula óssea de células mieloides imaturas. A leucemia promielocítica aguda é um subtipo raro de LMA em que existe acumulação de promielócitos na medula óssea. A maioria dos casos está associado a uma translocação recíproca t(15;17) (q24.1;q21.2) envolvendo os genes PML/RAR $\alpha$ .

Apesar dos bons resultados da terapêutica com o ácido *all-trans* retinóico (ATRA), um indutor da diferenciação, alguns doentes desenvolvem efeitos secundários (ex. síndrome do ATRA) e/ou resistência à terapêutica. Neste sentido, tornou-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Sabendo que as células tumorais estão geralmente, hipermetiladas na zona do promotor de genes supressores tumorais, o que conduz ao seu silenciamento epigenético, foi relevante a partir desta característica desenvolver novas terapias dirigidas a alvos moleculares. Assim surgiu a terapia epigenética através de moduladores epigenéticos, nomeadamente os agentes hipometilantes e os inibidores das desacetilases das histonas.

Os hipometilantes como a 5-azacitidina (AZA) e a 2'-deoxy-5-decitabina (DAC) estão atualmente aprovados para o tratamento de algumas neoplasias hematológicas, incluindo leucemias mieloides agudas e síndromes mielodisplásicas.

A eficácia da terapia epigenética depende da capacidade de transporte do fármaco para o tecido alvo, entre outros mecanismos. Alterações na atividade e/ou expressão dos transportadores de influxo e efluxo, e ainda em enzimas de metabolismo como a UDP (uridina difosfato) glucuronosil transferase família 1 membro A1 (UGT1A1), podem influenciar a eficiência farmacológica dos fármacos hipometilantes.

O objetivo deste trabalho consistiu em avaliar alguns mecanismos moleculares envolvidos na resistência a moduladores epigenéticos (hipometilantes), em particular o envolvimento dos transportadores de efluxo da família ABC e das proteínas *vault*, na leucemia mieloide aguda.

Para a realização do trabalho experimental foi utilizada uma linha celular de LMA/LPA (sem a translocação PML/RAR $\alpha$ ), a linha celular HL-60, e uma sublinha

resistente ao fármaco azacitidina, as células HL-60AZA, (previamente estabelecida no Laboratório de Oncobiologia e Hematologia (LOH) da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra). Ambas as linhas celulares foram incubadas com doses crescentes de azacitidina e decitabina durante 72h. A proliferação e viabilidade celulares foram avaliadas através do teste de exclusão azul de tripano e o tipo de morte celular por microscopia ótica (morfologia celular) após coloração das células com May-Grünwald-Giemsa.

Os níveis de expressão génica do transportador membranar *ABCG2* (gene que codifica a proteína BCRP), assim como do gene da enzima *UGT1A1*, foram determinados por PCR em tempo real. Os níveis de expressão proteica dos transportadores membranares da família ABC, glicoproteína-P (P-gp), MRP1 e da proteína transportadora nuclear *major vault* (MVP ou LRP), foram avaliados recorrendo à técnica de citometria de fluxo. Por fim, através da técnica de MS-MLPA (*Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), analisou-se o perfil de metilação de vários genes supressores tumorais (*TP73, MSH6, VHL, RAR $\beta$ , ESR1, CDKN2A, PAX5, KLLN, MGMGT, PAX6, WT1, CD44, GSTP1, ATM, CADM1, CHF3, BRCA2, RB1, THBS1, PYCARD, CDH13, TP53, BCRA1, STK11, GATA5*) nas duas linhas celulares em estudo.

Em termos de resultados observou-se um efeito citostático (dependente da concentração do fármaco e da linha celular) e citotóxico (dependente da concentração, do tempo de incubação e da linha celular) induzidos pela azacitidina. Estes efeitos foram mais evidentes na linha HL-60 do que na linha resistente, HL-60AZA. O IC<sub>50</sub> da linha HL-60AZA foi de 187,1  $\mu$ M e o da linha HL-60 de 58,5  $\mu$ M, o que demonstra que as células HL-60AZA são cerca de 3,2 vezes mais resistentes à azacitidina relativamente às células parentais sensíveis. De igual modo, a decitabina induziu um efeito citostático e citotóxico dependentes da concentração de fármaco, do tempo de incubação e da linha celular, superiores na linha celular sensível, comparativamente à linha resistente. No entanto, a concentração de decitabina necessária para atingir o IC<sub>50</sub> foi inferior à da azacitidina. A sublinha celular HL-60AZA (cujo IC<sub>50</sub> foi de 5195  $\mu$ M) revelou ser resistente 110,8 vezes superior, comparativamente à linha celular sensível (cujo IC<sub>50</sub> foi de 46,9  $\mu$ M).

No presente trabalho observou-se resistência cruzada à decitabina nas células resistentes à azacitidina, indicando, que em caso de resistência a um análogo de nucleósido, haverá resistência a fármacos da mesma família.

Morfologicamente, as células HL-60 incubadas durante 72h com 5  $\mu$ M de azacitidina apresentam menor razão núcleo-citoplasma, comparativamente à situação controle e às células HL-60AZA incubadas nas mesmas condições. A avaliação dos perfis de metilação e do número de cópias dos genes estudados, não revelou diferenças entre a linha celular HL-60AZA e a linha parental HL-60. No entanto, nas células resistentes observou-se um aumento estatisticamente significativo dos níveis de expressão proteica dos transportadores da família ABC, glicoproteína-P e MRP1, e de MVP e uma tendência para aumento dos níveis de expressão dos genes *ABCG2* e *UGT1A1*.

Em conclusão, os resultados sugerem o envolvimento dos transportadores glicoproteína-P, MRP1 e MVP no desenvolvimento de resistência à azacitidina na leucemia mieloide aguda.

**Palavras-chave:**

- Leucemia mieloide aguda
- Azacitidina
- Decitabina
- Transportadores membranares, nuclear e enzima de metabolismo
- Resistência farmacológica



## ABSTRACT

The acute myeloid leukaemia (AML) is a complex and heterogeneous neoplasia of the hematopoietic parental cell that is characterized by disruption of differentiation, clonal proliferation and bone marrow accumulation of immature myeloid cells. The acute promyelocytic leukaemia is a rare subtype of AML characterised by accumulation of promyelocytes in the bone marrow. Most cases are associated with a reciprocal translocation t(15;17) (q21.4;q21.2) involving the PML/RAR $\alpha$  genes.

Despite the good results of the treatment using *all-trans* retinoic acid (ATRA), a differentiation inductor, some patients develop side effects (i.e. ATRA syndrome) and/or resistance to therapy. So, novel treatment strategies are deemed as necessary. The knowledge that cancer cells are, generally, hypermethylated in the tumoural suppressor genes' promotor zone, which causes its epigenetic silencing, was used to develop new therapies with molecular targets. Therefore, the epigenetic therapy through epigenetic modulators has emerged, namely using hypomethylation agents and histone deacetylase inhibitors.

Hypomethylants like 5-azacitidine (AZA) and 2'-deoxy-5-decitate (DAC) are currently approved for treatment of haematological neoplasia, including acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome.

Epigenetic therapy efficiency depends on the efficacy of transport of the pharmaceuticals into the intended tissue, among other factors. Changes in the activity and/or expression of influx/outflux transporters, and also metabolism enzymes like UDP (uridine diphosphate) glucuronosyltransferase family 1 member A1 (UGT1A1), can influence the pharmaceutical efficiency of hypomethylant pharmaceuticals.

The objective of the present work was to evaluate the mechanisms responsible for molecular resistance to epigenetic modulators (hypomethylants), in particular the involvement of outflux transporters of the ABC family and the *vault* proteins, in acute myeloid leukaemia (AML).

In this study there were used cell lines of AML/APL (without the PML/RAR $\alpha$ ), HL-60 cell line and azacitidine-resistant cell line (HL-60AZA; previously developed at the Hematology and Oncobiology Laboratory (HOL), Faculty of Medicine, University of Coimbra. Both cell lines were incubated with increasing dosages of azacitidine and decitabine in a period of 72h. The proliferation

and cell viability were evaluated using the trypan blue exclusion assay and the type of cellular death was evaluated through optical microscopy (cell morphology) after coloration via *May-Grünwald-Giemsa* dyeing.

Expression levels of membrane transporters *ABCG2* (gene that transcodes the BCRP protein), and of the metabolism enzyme *UGT1A1* were determined through real time PCR. The protein expression levels of the membrane transporters of the ABC family, P-glycoprotein (P-gp), MRP1 and the *major vault* nuclear transporter (MVP, also known as LPR) were determined using flow cytometry. Finally, the MS-PLPA (*Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) technique was used to evaluate the methylation profile of the various tumour suppressor genes (*TP73, MSH6, VHL, RAR $\beta$ , ESRI, CDKN2A, PAX5, KLLN, MGMGT, PAX6, WT1, CD44, GSTP1, ATM, CADM1, CHF3, BRCA2, RB1, THBS1, PYCARD, CDH13, TP53, BCRA1, STK11, GATA5*) in the two studied cellular lines.

The results show that there was a cytostatic (depending on the drug concentration and the cell line) and cytotoxic (depending on the concentration, the incubation time and the cell line) effect induced by the azacitidine. These conclusions were more evident on the HL-60 cell line rather than the resistant line, HL-60AZA. The  $IC_{50}$  at the HL-60AZA cell line was of 187,1  $\mu$ M and at the HL-60 line was of 58,5  $\mu$ M, which demonstrates that the HL-60AZA cells are about 3.2 times more resistant to azacitidine relative to the sensitive parental cell line. There were also observed cytostatic and cytotoxic effects varying on the drug concentration, the incubation time and the cell line, in the decitabine incubations, that were higher in the sensitive line relative to the resistant cell line. However, the decitabine concentration necessary to reach  $IC_{50}$  is inferior to that of the azacitidine. The HL-60AZA (which  $IC_{50}$  was 5195  $\mu$ M) revealed to be 110.8 times more resistant, when compared to the sensitive cell line (that had an  $IC_{50}$  of 46.9  $\mu$ M).

The present work it can be observed that there was developed cross resistance to the decitabine in the azacitidine resistant cells, which indicates that in case of resistance to an analogous nucleoside, there will be resistance to drugs of the same family.

Morphologically, the HL-60 cell line incubated in 72h with 5  $\mu$ M of azacitidine show an inferior nucleus-cytoplasm structural ratio, when compared with the control line and to the HL-60AZA cell line in the same incubation conditions. As of the methylation profiles and number of copies of the studied genes, there was no



difference between the HL-60AZA cell subline and the parental HL-60 line. However, in the resistant cells a statistically relevant increase of the proteic expression levels of the ABC family, P-glycoprotein, MRP1 and MVP transporters was observed, as well as a tendency of increasing the expression levels of the *ABCG2* and *UGT1A1* genes.

In conclusion, the results suggest the evolvement of P-glycoprotein, MRP1 and MVP transporters in the developing of resistance to azacitidine in acute myeloid leukaemia.

**Key words:**

- Acute myeloid leukaemia
- Azacitidine
- Decitabine
- Membrane and nuclear transporters and metabolism enzyme
- Drug resistance



## INDICE

CAPITULO I -INTRODUÇÃO.....	23
1.1. O Cancro e neoplasias hematológicas.....	23
1.2. Leucemia Promielocítica Aguda – considerações gerais.....	24
1.2.1. Tratamento.....	25
1.3. Epigenética.....	26
1.3.1. Metilação do DNA.....	26
1.4. Moduladores epigenéticos.....	28
1.4.1. Azacitidina (AZA).....	29
1.4.2. Decitabina (DAC).....	30
1.4.3. Metabolismo intracelular da azacitidina e decitabina.....	32
1.5. Mecanismos moleculares de resistência a moduladores epigenéticos.....	33
1.5.1. Transportadores proteicos.....	34
1.5.1.1 Transportadores da família ABC.....	34
1.5.1.2 Major vault protein (MVP).....	36
1.5.2. UDP glucuronosiltransferase (UGT1A1).....	37
CAPITULO II -OBJETIVOS.....	41
2.1. Objetivos.....	41
CAPITULO III -MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1. Descrição das linhas celulares.....	45
3.1.1. Linha celular HL-60.....	45
3.2. Cultura celular.....	46
3.3. Indução de resistência.....	46
3.4. Avaliação do crescimento e viabilidade celulares.....	47
3.5. Análise da morfologia por microscopia ótica.....	48
3.6. Extração e quantificação do DNA genómico.....	49

3.7. Extração e quantificação de RNA.....	50
3.7.1. Conversão do RNA a cDNA.....	51
3.8. Avaliação dos mecanismos moleculares de resistência à azacitidina e decitabina.....	53
3.8.1. Curvas dose-resposta .....	53
3.8.2. Análise da expressão génica do transportador <i>ABCG2</i> e da enzima <i>UGT1A1</i> por qRT-PCR .....	53
3.8.3. Análise da expressão proteica dos transportadores P-gp, MRP1 e MVP por citometria de fluxo .....	55
3.8.4. Análise do perfil de metilação de genes nas linhas celulares HL-60 e HL-60AZA por MS-MLPA .....	56
3.9. Análise estatística.....	58
CAPITULO IV -RESULTADOS .....	61
4.1. Caracterização da linha celular HL-60 e da sublinha celular resistente HL-60AZA61	
4.2. Avaliação do efeito citostático e citotóxico da azacitidina e decitabina na proliferação e viabilidade das células HL-60 e HL-60AZA .....	63
4.3. Avaliação do efeito da azacitidina na morfologia celular.....	68
4.4. Análise dos transportadores e enzima.....	70
CAPITULO V -DISCUSSÃO .....	75
5.1. Efeito da azacitidina e decitabina num modelo <i>in vitro</i> de leucemia mieloide aguda	75
5.2. Análise da expressão dos transportadores ( <i>ABCB1</i> , <i>ABCC1</i> , <i>ABCG2</i> , MVP) e da enzima de metabolismo <i>UGT1A1</i> .....	77
5.3. Análise dos perfis de metilação de genes supressores tumorais .....	80
CAPITULO VI -CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS .....	83
CAPITULO VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	87

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Metilação do DNA.** A adição de grupos metilo corre no carbono 5 da citosina, originando a 5-metilcitosina. A metilação é realizada pela DNA metiltransferase (DNMT). ..... 26
- Figura 2: Padrões de metilação em células normais e em células cancerígenas.** Os círculos brancos representam as citosinas não metiladas. Os círculos a vermelho representam as citosinas metiladas. A seta representa a transcrição do promotor do gene que, no caso de células cancerígenas, é inibida. Adaptado de Einav Nili *et al*, (2008). ..... 27
- Figura 3: Mecanismo de ação dos hipometilantes.** Os fármacos hipometilantes atuam por inibição das DNMTs, inibindo a metilação nas citosinas. Adaptado de Baylin (2005). ..... 28
- Figura 4: Estrutura química da citidina (A) e da 5-azacitidina (B).** Estes dois compostos diferem no azoto (N) do carbono 5 do anel de pirimidina. .... 29
- Figura 5: Embalagem do fármaco azacitidina (Vidaza)** aprovado para uso clínico de síndrome mielodisplásica e algumas leucemias pela FDA. .... 30
- Figura 6: A. Estrutura química da citidina. B. Estrutura química da 5-aza-2'-deoxicidina.** Estes dois compostos diferem no azoto (N) do carbono 5 do anel de pirimidina. .... 30
- Figura 7: Embalagem do fármaco decitabina (Dacogen).** Este fármaco está atualmente aprovado para o uso clínico no tratamento da síndrome mielodisplásica e algumas leucemias. .... 31
- Figura 8: Transporte membranar e metabolismo intracelular da azacitidina e decitabina.** A azacitidina (5-aza-CR) e a decitabina (5-aza-dCR) são transportados essencialmente por proteínas transportadoras da família SLC15, SLC22, SLC28A, SLC29A e ABC. Intracelularmente sofrem fosforilações sucessivas, sendo a forma trifosfato do fármaco (5-aza-CTP e 5-aza-dCTP) metabolicamente ativa. Urd-Cyd – uridina citidina cinase, dCyd – deoxicidina cinase. Adaptado de Stresemann & Lyko (2008). ..... 32
- Figura 9: Modelo representativo da estrutura da glicoproteína-P.** Os domínios transmembranares estão localizados na bicamada lipídica. Os dois domínios de ligação do nucleótido estão representados a vermelho. Adaptado de Sorrentino (2002). ..... 35

**Figura 10: Estrutura das proteínas *major vault*.** As proteínas *major vault* têm uma forma cilíndrica, oca, com duas saliências nas extremidades. Adaptado de Mossink *et al* (2003). ..... 36

**Figura 11: Possível mecanismo de transporte dos transportadores membranares da família ABC, do transportador nuclear *major vault protein* (MVP) e da enzima de metabolismo UGT1A1.** As proteínas *major vault* (representada a vermelho), presentes na membrana nuclear efetuam o transporte de substâncias do núcleo para o citoplasma. O efluxo do fármaco poderá realizar-se através dos transportadores P-gp, MRP1 ou BCRP (representados a verde). A roxo está representada a enzima de metabolismo responsável pela excreção de substâncias. Adaptado de Scheffer *et al* (2000)..... 38

**Figura 12: A. Células HL-60 no microscópio invertido. B. Esfregaço de medula de um doente antes da quimioterapia, com promielócitos leucémicos.** Coloração com Wright-Giemsa. Adaptado de Gallagher *et al* (1979). ..... 45

**Figura 13: Visualização de células no hemocítmetro/câmara de Neubauer pelo teste de exclusão azul de tripano.** As células viáveis encontram-se translúcidas. As células inviáveis encontram-se coradas a azul. .... 47

**Figura 14: A. Hemocítmetro ou câmara de Neubauer. B. Grelha de contagem do hemocítmetro.** A suspensão celular com o corante azul de tripano deve ser inserida na superfície do hemocítmetro e colocar uma lamela por cima. De seguida faz-se a contagem de células ao microscópio. A contagem das células deve ser feita em “L”. Adaptado de <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAezrAAC/tecnica-camara-neubauer>..... 48

**Figura 15: Aspectos morfológicos das células HL-60 (A) e HL-60AZA (B).** Os esfregaços das células foram corados com solução de *May-Grünwald-Giemsa* e observados ao microscópio ótico de acordo com o descrito no ponto 3.5 (ampliação de 500x). ..... 61

**Figura 16: Perfis de metilação de vários genes supressores tumorais nas linhas celulares HL-60 e HL-60AZA.** A preto estão representados os genes hipermetilados (cujos níveis de metilação se encontram entre os 60 - 100%, a cor cinza os genes parcialmente metilados (15-59%) e, a branco os genes desmetilados (0 – 14%). Os resultados representam a média de 3 ensaios independentes. .... 62

**Figura 17: Efeito da azacitidina (AZA) na proliferação das células HL-60 e HL-60AZA** ..... 63

<b>Figura 18: Efeito da azacitidina (AZA) na viabilidade celular na linha HL-60 e HL-60AZA</b> .....	64
<b>Figura 19: Regressão logarítmica do IC<sub>50</sub> da azacitidina nas linhas HL-60 e HL-60AZA.</b> O gráfico representa a regressão logarítmica do IC <sub>50</sub> da azacitidina nas linhas celulares HL-60 e HL-60AZA às 72h de incubação. A cada 24h foram retiradas alíquotas da suspensão celular e realizou-se o teste de exclusão azul de tripano. Os resultados, expressos em percentagem (%) representam a média ± erro padrão de 5 a 14 ensaios independentes. A análise estatística foi efetuada utilizando a regressão não linear. ....	65
<b>Figura 20: Efeito da decitabina (DAC) na proliferação das células HL-60 e HL-60AZA</b> .....	66
<b>Figura 21: Efeito da decitabina (DAC) na viabilidade celular na linha HL-60 e HL-60AZA</b> .....	67
<b>Figura 22: Regressão logarítmica do IC<sub>50</sub> da decitabina nas linhas HL-60 e HL-60AZA.</b> O gráfico representa a regressão logarítmica do IC <sub>50</sub> da decitabina nas linhas celulares HL-60 e HL-60AZA às 72h de incubação. A cada 24h foram retiradas alíquotas da suspensão celular e realizou-se o teste de exclusão azul de tripano. Os resultados, expressos em percentagem (%) representam a média ± erro padrão de 5 a 12 ensaios independentes. A análise estatística foi efetuada utilizando a regressão não linear. ....	68
<b>Figura 23: Aspectos morfológicos das células HL-60 após 72h de incubação com azacitidina.</b> A. Condição controlo. B. Incubação com 5 µM de azacitidina. C. Incubação com 50 µM de azacitidina. Os esfregaços das células foram corados com solução de <i>May-Grünwald-Giemsa</i> e observados ao microscópio ótico de acordo com o descrito no ponto 3.5 (ampliação de 500x).....	69
<b>Figura 24: Aspectos morfológicos das células HL-60AZA após 72h de incubação com azacitidina.</b> A. Condição controlo. B. Incubação com 5 µM de azacitidina. C. Incubação com 50 µM de azacitidina. Os esfregaços das células foram corados com solução de <i>May-Grünwald-Giemsa</i> e observados ao microscópio ótico de acordo com o descrito no ponto 3.5 (ampliação de 500x).....	69
<b>Figura 25: Níveis de expressão dos genes <i>ABCG2</i> e <i>UGT1A1</i> na linha celular HL-60 e na sublinha resistente HL-60AZA por qRT-PCR.</b> A expressão dos genes referidos foi efetuada a partir de 3 amostras independentes de DNA. Os resultados representam a média da variação da expressão génica ± erro padrão de 3 amostras	

independentes. A análise estatística foi efetuada utilizando o teste *t de student*, não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas..... 70

**Figura 26: Avaliação da expressão dos transportadores glicoproteína-P, MRP1 e MVP por citometria de fluxo.** A expressão membranar está expressa em média de intensidade de fluorescência (MIF) total nas linhas celulares HL-60 e HL-60AZA. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efetuada por comparação à linha HL-60 utilizando o teste *t de student*, sendo \*\*\*  $p < 0,001$ . ..... 71

**Figura 27: Avaliação da percentagem de células positivas que expressam os transportadores glicoproteína-P, MRP1 e MVP por citometria de fluxo.** Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efetuada por comparação à linha HL-60 utilizando o teste *t de student*, sendo \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . ..... 71

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1: Composição da mistura “annealing reaction” do protocolo de conversão do RNA a cDNA - NZY First-Strand CDNA Syntesis kit da empresa NZYTech.**..... 52

**Tabela 2: Composição da mistura da transcriptase reversa do protocolo de conversão do RNA a cDNA - NZY First-Strand CDNA Syntesis kit da empresa NZYTech.**..... 52

**Tabela 3: Ciclo de temperaturas e tempos de incubação do protocolo de conversão do RNA a cDNA - NZY First-Strand CDNA Syntesis kit da empresa NZYTech.**..... 52

**Tabela 4: Composição da mistura usada no qRT-PCR.**..... 54

**Tabela 5: Primers utilizados na reação de qRT-PCR.** qBCRP-F: *primer forward*; qBCRP-R: *primer reverse* (a mesma nomenclatura foi usada para os restantes primers). ..... 54



## ABREVIATURAS

**3-DU:** 3-deazauridina

**5-aza-CDP:** Azacitidina difosforilada

**5-aza-CMP:** Azacitidina monofosfato

**5-aza-CTP:** Azacitidina trifosfato

**5-aza-dCDP:** Decitabina difosfato

**5-aza-dCMP:** Decitabina monofosfato

**5-aza-dCTP:** Decitabina trifosfato

**ABC:** *ATP binding cassette*

**ABCB1:** *ATP binding cassette subfamily B member 1*

**ABCC1:** *ATP binding cassette subfamily C member 1*

**ABCG2:** *ATP binding cassette subfamily G member 2*

**ATCC:** American Type Culture Collection

**ATO:** Trióxido de arsénio

**ATP:** Adenosina trifosfato

**ATRA:** Ácido *all-trans* Retinóico

**AZA:** Azacitidina

**BCRP:** *Breast cancer resistance protein*

**CADM1:** *Cell adhesion molecule 1*

**CDA:** Citidina desaminase

**CDH13:** *Cadherin 13*

**cDNA:** DNA complementar

**CHFR:** *Checkpoint with forkhead and ring finger domains, E3 ubiquitin protein ligase*

**CpG:** Dinucleótido citosina-fosfato-guanina

**CT:** *Cycle threshold*

**DAC:** Decitabina

**DCK:** Desoxicitidina cinase

**dCTP:** Deoxicitidina trifosfato

**DNA:** Ácido desoxiribonucleico

**DNMT:** DNA metil-transferase

**DNMT1:** DNA metil-transferase 1

**DNMT3A:** DNA metil-transferase 3A

**DNMT3B:** DNA metil-transferase 3B  
**DOX:** Doxorubicina  
**EMA:** *European Medicines Agency*  
**ESR1:** *Estrogen receptor 1*  
**ENT1:** Transportador de nucleósidos equilibrativo 1  
**FAB:** Grupo Cooperativo Franco-Americo-Britânico  
**FCS:** Soro Fetal Bovino do inglês *fetal calf serum*  
**FDA:** U. S. *Food and Drug Administration*  
**FSC:** *Forward Scatter Channel*  
**SSC:** *Side Scatter Channel*  
**GAPDH:** Desidrogenase do Gliceraldeido 3-fosfato  
**GATA5:** *GATA binding protein 5*  
**HDAC:** Histona desacetilase  
**IC<sub>50</sub>:** Dose necessária para reduzir a viabilidade celular a 50%  
**LLA:** Leucemia linfoide aguda  
**LMA:** Leucemia mieloide aguda  
**LPA:** Leucemia promielocítica aguda  
**LRP:** *Lung resistance-related protein*  
**MDR:** *Multidrug resistance*  
**MDR1:** *Multidrug resistance 1*  
**MGMT:** *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*  
**MQ:** água mili-q  
**mRNA:** RNA mensageiro  
**MRP1:** *Multidrug resistance associated protein 1*  
**MS-MLPA:** *Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe*

#### *Amplification*

**MSP:** PCR específico para a metilação  
**MVP:** *Major vault protein*  
**NCI:** Instituto Nacional de Cancro USA  
**OMS:** Organização Mundial de Saúde  
**PAX5:** *Paired-box 5*  
**PAX6:** *Paired-box 6*  
**PBS:** tampão fosfato salino  
**PCR:** Reação da polimerase em cadeia

**P-gp:** glicoproteína-P

**PML:** *Promyelocitic Leukemia*

**qRT-PCR:** PCR em tempo real

**RAR $\alpha$ :** *Retinoic acid receptor  $\alpha$*

**RAR $\beta$ :** *Retinoic acid receptor  $\beta$*

**RNA:** Ácido ribonucleico

**RPMI 1640:** *Roswell Park Memorial Institute 1640*

**SLC:** *Solute carrier transporter*

**SMD:** Síndrome Mielodisplásica

**TEP:** Proteína associada à telomerase

**THBS1:** *Thrombospondin 1*

**TP73:** *Tumor protein p53*

**UCK:** Uridina citidina cinase

**UGT1A1:** UDP (uridina difosfato) glucuronosil transferase familia 1 membro

A1

**UV:** Ultra violeta

**VPARP:** *Poly vault polimerase*



---

## INTRODUÇÃO

---



# CAPITULO I - INTRODUÇÃO

## 1.1. O Cancro e neoplasias hematológicas

O cancro é considerado na atualidade como uma das principais causas de morte a nível mundial (Visvader, 2011; Stewart & Wild, 2014). É uma doença caracterizada pela proliferação anómala e descontrolada de células (Alberts *et al*, 2007; Lodish *et al*, 2008).

Existem diversos fatores que podem influenciar o aparecimento de cancro, nomeadamente fatores exógenos (agentes químicos, físicos e biológicos) e fatores endógenos (ex. inflamação, alteração do sistema imunitário, suscetibilidade genética). Estes agentes carcinogénicos podem induzir modificações genéticas (mutações, translocações, deleções e/ou amplificações) ou epigenéticas (metilação/desmetilação, acetilação/desacetilação) no material genético (Alberts *et al*, 2007; Lodish *et al*, 2008). O cancro poderá envolver a sobre-expressão de oncogenes e/ou inativação de genes supressores tumorais, originando células cancerígenas (Bower & Waxman, 2006).

A hematopoiese é o processo de formação e maturação de células sanguíneas a partir de uma célula indiferenciada pluripotente, a célula estaminal hematopoiética. Como as células sanguíneas têm um curto período de vida é necessária a sua constante produção e maturação. Esta reposição constante implica a acumulação de erros que poderão induzir a carcinogénese (Alberts *et al*, 2007).

As leucemias mieloides são um grupo das neoplasias hematológicas caracterizadas pela proliferação descontrolada das células hematopoiéticas e/ou pelo bloqueio da diferenciação terminal. Estas características vão induzir a acumulação de células imaturas e proliferativas na medula óssea (Yu & Han, 2006).

A classificação do tipo de neoplasias hematológicas engloba o tipo de linhagem afetada, a velocidade de progressão da doença e a presença de alterações genéticas (Alves, 2011).

## 1.2. Leucemia Promielocítica Aguda – considerações gerais

A leucemia promielocítica aguda (LPA), é um subtipo raro de leucemia mieloide aguda (LMA), com rápida evolução espontânea, em que ocorre acumulação na medula óssea de promielócitos (células imaturas granulocíticas) (Siegel & Jemal, 2014).

Existem duas variantes da LPA: hipergranular ou LPA típica (variante M3) e hipogranular ou microgranular ou LPA atípica (variante M3v), pela classificação da FAB (Franco-Americano-Britânico). A variante LPA-M3 compreende cerca de 60 a 70% dos casos de LPA (Thé *et al*, 2012; Adams & Nassiri, 2015). As células da variante atípica não têm a translocação recíproca t(15;17) (q24.1;q21.2). Esta translocação ocorre entre os genes *RARα* (*retinoic acid receptor α*) e *PML* (*Promyelocitic Leukemia*), conduzindo à formação da proteína de fusão PML-RARα (Thé *et al*, 2012; Adams & Nassiri, 2015). A OMS (Organização Mundial de Saúde) classificou a LPA como uma leucemia mieloide aguda com a translocação PML-RARα (Arber *et al*, 2016).

O gene *PML*, localizado no cromossoma 15, está envolvido na organização de domínios nucleares com um papel fundamental no controlo do crescimento celular, na apoptose e na diferenciação mieloide. O gene *RARα* que se encontra no cromossoma 17, codifica para o recetor do ácido retinóico cuja função é a regulação da diferenciação celular e da granulopoiese (Wang & Chen, 2008).

A LPA, foi pela primeira vez descrita em 1957 por Hillestad como uma doença rapidamente fatal com apenas algumas semanas de sobrevivência, presença de promielócitos dominantes e hemorragias severas (Wang & Chen, 2008).

Os sintomas mais frequentes em doentes com leucemia são a fraqueza, desenvolvimento de infeções, leucocitose severa e hemorragias. Dado o elevado risco de coagulopatia, os doentes têm uma média de sobrevivência reduzida. No entanto, se iniciado o tratamento em fases iniciais, pode ser alcançada a remissão completa (Siegel & Jemal, 2014; Adams & Nassiri, 2015).

A leucemia promielocítica aguda, assim como a leucemia mieloide aguda, são doenças mais comuns nos adultos no entanto, podem também ser diagnosticadas ao nível pediátrico (Adams & Nassiri, 2015). Os métodos de diagnóstico incluem testes citogenéticos, testes morfológicos e testes moleculares (Zhang *et al*, 2015).



A taxa de incidência da leucemia aumenta com a idade, pelo contacto com a radiação ionizante e solventes orgânicos (por exemplo o benzeno) (Zhang *et al*, 2015;

<http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/hematology-oncology/acute-myelogenous-leukemia/>). Dados do *Cancer Research* de 2016 indicam uma taxa de incidência de leucemias, no Reino Unido, de 15,8 em 100 000 indivíduos. Em 2012 foram diagnosticados 2,5% novos casos de leucemia na população mundial (<http://publications.cancerresearchuk.org/cancerstats/statsincidence/dtincrates.html>).

### **1.2.1. Tratamento**

O tratamento de neoplasias deve ser iniciado o mais rápido possível dada a severidade da doença. O tratamento mais comumente utilizado em doentes com LPA é a administração do ATRA (Ácido *all-trans* Retinóico) e ATO (trióxido de arsénio). Estes agentes induzem a diferenciação das células sanguíneas assim como reduzem o risco de hemorragias. Esta terapêutica permite atualmente a remissão em cerca de 80 a 90% dos casos diagnosticados (Adams & Nassiri, 2015).

Apesar de uma resposta favorável à terapêutica, alguns doentes desenvolvem resistência à terapêutica convencional, pelo que o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas é fundamental.

Os fármacos hipometilantes, azacitidina e decitabina, estão ambos aprovados pela FDA (U. S. Food and Drug Administration) e/ou EMA (European Medicines Agency), para o tratamento da síndrome mielodisplásica (SMD) e leucemia mielomonocítica crónica (Nimer, 2008; Cortesão, 2010) e, mais recentemente para alguns doentes com LMA, podendo vir a constituir abordagens terapêuticas na LPA.

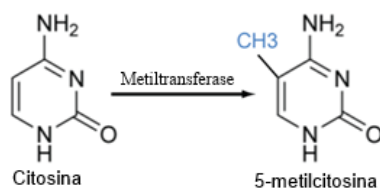
### 1.3. Epigenética

O termo epigenética pode ser definido como a “informação hereditária diferente da própria sequência de DNA” (Feinberg, 2007), ou ainda como as “alterações hereditárias na expressão gênica que não são devidas a modificações na sequência de DNA” (Holliday, 1987). Os eventos epigenéticos dizem respeito às modificações bioquímicas da cromatina sem, no entanto, haver alteração na sequência do DNA. A integridade do genoma e a identidade celular são mantidas durante os eventos epigenéticos (Weber *et al*, 2007).

As alterações epigenéticas influenciam o fenótipo da doença, havendo uma relação com a variação das vias de sinalização envolvidas com o crescimento celular, regulação do ciclo celular e da apoptose (Amaral, 2012). A metilação/desmetilação do DNA, a modificação de histonas (acetilação/desacetilação e metilação/desmetilação) e a remodelação da cromatina constituem as três principais modificações epigenéticas (Einav Nili, *et al*, 2008). A epigenética tem funções importantes na regulação da expressão dos genes, na manutenção da integridade do genoma e na identidade da célula (Weber *et al*, 2007).

#### 1.3.1. Metilação do DNA

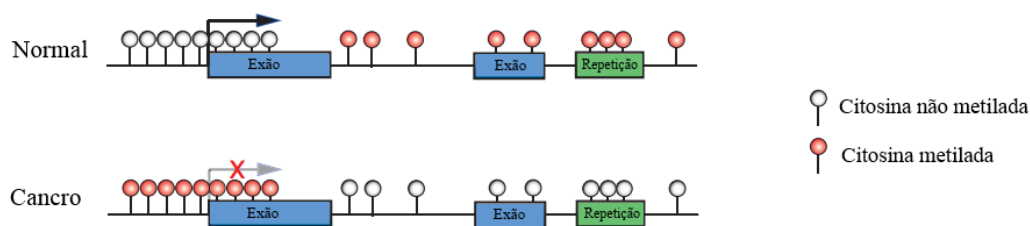
A metilação consiste na adição de grupos metilo ( $\text{CH}_3^-$ ) à cadeia do DNA. Esta adição reversível é catalisada pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs). Existem três principais DNMTs descritas nos mamíferos que têm como função manter os perfis de metilação: DNMT1, DNMT3a e DNMT3b. A metilação ocorre no carbono 5 do anel de pirimidina das citosinas (base pirimídica do DNA), formando a 5-metilcitosina (figura 1) (Kristensen *et al*, 2009).



**Figura 1: Metilação do DNA.** A adição de grupos metilo ocorre no carbono 5 da citosina, originando a 5-metilcitosina. A metilação é realizada pela DNA metiltransferase (DNMT).

As ilhas CpG (citosina-fosfato-guanina) são aglomerados de dinucleótidos CpG onde normalmente ocorre a metilação (Einav Nili *et al*, 2008). Em condições fisiológicas normais grande parte dos promotores génicos estão associados às ilhas CpG. Cerca de 6% dos promotores génicos ficam metilados, durante o desenvolvimento e diferenciação dos tecidos. A metilação das ilhas CpG nos promotores génicos dificulta a ligação dos fatores de transcrição impedindo a transcrição génica (Einav Nili *et al*, 2008; Portela & Esteller, 2010).

Na figura 2, está representado um possível padrão de metilação em células normais e em células cancerígenas. Nas células normais quase todos os dinucleótidos CpG estarão metilados à exceção da zona do promotor do gene supressor tumoral. Nas células cancerígenas há uma frequente hipermetilação na região do promotor génico e uma hipometilação no restante genoma. Assim, a transcrição do promotor metilado é inibida, induzindo o silenciamento génico. A hipermetilação anómala no promotor dos genes é considerada uma “hallmark” do cancro, constituindo uma das alterações epigenéticas mais comuns (Ho *et al*, 2013).



**Figura 2: Padrões de metilação em células normais e em células cancerígenas.** Os círculos brancos representam as citosinas não metiladas. Os círculos a vermelho representam as citosinas metiladas. A seta representa a transcrição do promotor do gene que, no caso de células cancerígenas, é inibida. Adaptado de Einav Nili *et al*, (2008).

Segundo vários autores, os padrões de metilação anormal, como a hipometilação global e hipermetilação localizada dos promotores assim como as modificações da cromatina e a atividade aumentada das desacetilases das histonas estão presentes em vários tipos de cancro. Estas alterações podem conduzir à ativação de proto-oncogenes e à inativação de genes supressores tumorais, contribuindo para a progressão do cancro (Jones & Baylin, 2002; Herman & Baylin, 2003; Lund & van Lohuizen, 2004; Feinberg & Tycko, 2004). Os genes inativados podem ser reativados pela exposição a fármacos hipometilantes (Yoo & Jones, 2006; Esteller, 2007; Herman & Baylin, 2003; Santos *et al*, 2010).

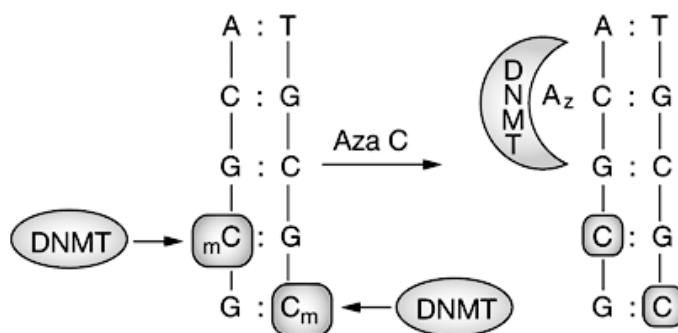
## 1.4. Moduladores epigenéticos

Nos últimos anos, têm sido realizados diversos estudos de forma a desenvolver fármacos que revertam as modificações epigenéticas, os chamados “epi-fármacos” (hipometilantes) (Di Gennaro *et al*, 2004; Altucci *et al*, 2005; Yoo & Jones, 2006).

Recentemente foram desenvolvidas novas estratégias terapêuticas através de moduladores epigenéticos (nomeadamente os hipometilantes) (Santini *et al*, 2014).

Os hipometilantes foram inicialmente descritos por Šorm em 1964 como sendo agentes citotóxicos (Einav Nili *et al*, 2008).

Os moduladores epigenéticos ligam-se covalentemente às DNA metiltransferases (DNMTs), dificultando a metilação das citosinas (figura 3) (Nimer, 2008; Borst, 2012). Assim, há reversão da metilação do DNA e uma reativação da expressão de alguns genes supressores tumorais. No entanto, os hipometilantes são inespecíficos para as células tumorais e podem induzir a instabilidade e a perda da integridade cromossômica, e ainda facilitar a formação de novas mutações (Schmelz *et al*, 2005a; Schmelz *et al*, 2005b; Esteller, 2007).



**Figura 3: Mecanismo de ação dos hipometilantes.** Os fármacos hipometilantes atuam por inibição das DNMTs, inibindo a metilação nas citosinas. Adaptado de Baylin (2005).

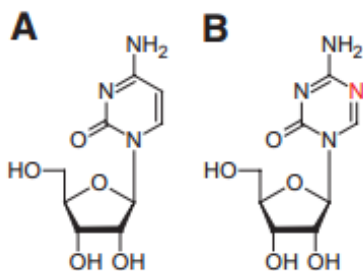
A reversibilidade da metilação, pela ligação irreversível dos hipometilantes às DNMTs, pode explicar o prolongamento do tratamento mesmo na ausência de toxicidade e/ou progressão da doença (Santos *et al*, 2010). A interrupção do tratamento geralmente está associada a uma recaída (Voso *et al*, 2014).

Os fármacos hipometilantes que este estudo inclui são a azacitidina (AZA) e a decitabina (DAC), ambos aprovados pela FDA para o uso clínico em algumas

neoplasias hematológicas, nomeadamente na síndrome mielodisplásica e na LMA (Kantarjian *et al*, 2007; Nimer, 2008; Cortesão, 2010, Diesch *et al*, 2016).

#### 1.4.1. Azacitidina (AZA)

A 5-azacitidina ou apenas azacitidina é um nucleósido hidrofílico (precursor da síntese de ácidos nucleicos), análogo da citidina que promove a desmetilação do DNA. Este fármaco atua por inibição das DNMTs, podendo reativar genes supressores tumorais, como por exemplo alguns genes reguladores do ciclo celular (Kong *et al*, 2004; Cortesão, 2010). A diferença entre a citosina e a 5-azacitidina reside no carbono 5 do anel de pirimidina que foi substituído por um azoto (figura 4).



**Figura 4: Estrutura química da citidina (A) e da 5-azacitidina (B).** Estes dois compostos diferem no azoto (N) do carbono 5 do anel de pirimidina.

Este fármaco de 244,2 Da é injetado subcutaneamente, sendo rapidamente absorvido pelo organismo. A dose mais comumente administrada é de 75mg/m<sup>2</sup>/dia durante 7 dias. A eliminação do fármaco do organismo é maioritariamente feita pela urina (50 – 85%) e a sua meia vida é cerca de 41 minutos (Derissen *et al*, 2013). Estudos indicam que cerca de 80% - 90% da azacitidina é incorporada diretamente no RNA, constituindo um passo limitante da proporção de conversão de ribonucleótidos em desoxirribonucleótidos (Choi *et al*, 2007).

A taxa de resposta completa ao fármaco azacitidina (Vidaza) (figura 5) é cerca de 7%. Em relação à resposta parcial ao fármaco a taxa ronda os 16%. Cerca de 37% dos doentes apresentaram melhorias hematológicas (Nimer, 2008).

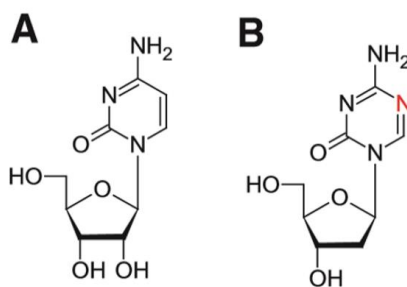


**Figura 5: Embalagem do fármaco azacitidina (Vidaza)** aprovado para uso clínico de síndrome mielodisplásica e algumas leucemias pela FDA.

#### 1.4.2. Decitabina (DAC)

A 2'-deoxy-5-azacitidina, também designada como decitabina, é um fármaco hipometilante que necessita de ser ativado intracelularmente pela enzima desoxicitidina cinase (Silverman *et al*, 2002).

Este fármaco é um análogo da citidina, em que o carbono 5 do anel de pirimidina foi substituído por um azoto (figura 6) (Derissen *et al*, 2013).



**Figura 6: A. Estrutura química da citidina. B. Estrutura química da 5-aza-2'-deoxicidina.** Estes dois compostos diferem no azoto (N) do carbono 5 do anel de pirimidina.

A decitabina, cujo nome comercial é Dacogen (figura 7), tem maior potencial inibidor da metilação do DNA do que a azacitidina, uma vez que a azacitidina atua ao nível do RNA (Stresemann & Lyko, 2008).

O uso de decitabina é segura e tem elevada eficiência, com baixas taxas de mortalidade associada ao fármaco e, um bom perfil de tolerância (Santos *et al*, 2010).



**Figura 7: Embalagem do fármaco decitabina (Dacogen).** Este fármaco está atualmente aprovado para o uso clínico no tratamento da síndrome mielodisplásica e algumas leucemias.

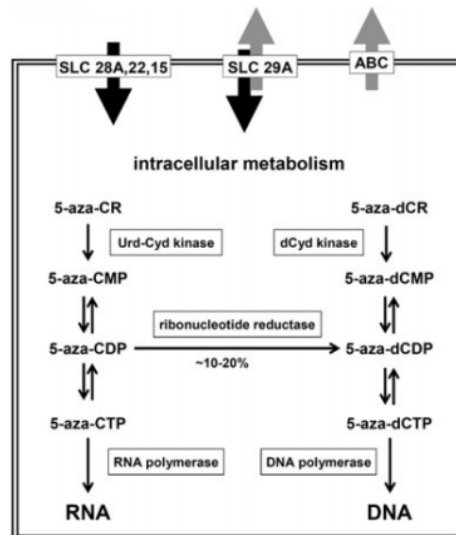
O peso molecular da 2'-deoxy-5-azacitidina é de 228,2 Da sendo administrada por via subcutânea numa concentração de 10 mg/m<sup>2</sup>/dia durante 5-10 dias. É eliminada do organismo principalmente via urina. A sua meia vida é ligeiramente inferior do que da azacitidina, aproximadamente 37 – 47 minutos, pois é rapidamente inativada pela citidina desaminase (Momparker, 2005). A decitabina é incorporada no DNA durante a replicação (Derissen *et al*, 2013).

A taxa de resposta completa à decitabina é de 9%, com uma taxa de 8% de resposta parcial e 18% de melhorias hematológicas (Nimer, 2008).

O uso de decitabina *in vitro* em baixas doses tende a ter maior eficiência do que em doses elevadas. Um potencial obstáculo da terapia com DAC é a presença de citidina desaminase (CDA), uma enzima importante no metabolismo da DAC. A desativação da DAC pela CDA poderá conduzir à resistência por perda da capacidade antineoplásica do fármaco (Stresemann & Lyko, 2008).

### 1.4.3. Metabolismo intracelular da azacitidina e decitabina

O mecanismo intracelular e o transporte membranar da azacitidina e da decitabina estão representados na figura 8. Este mecanismo foi proposto por Stresemann & Lyko (2008).



**Figura 8: Transporte membranar e metabolismo intracelular da azacitidina e decitabina.** A azacitidina (5-aza-CR) e a decitabina (5-aza-dCR) são transportados essencialmente por proteínas transportadoras da família SLC15, SLC22, SLC28A, SLC29A e ABC. Intracelularmente sofrem fosforilações sucessivas, sendo a forma trifosfato do fármaco (5-aza-CTP e 5-aza-dCTP) metabolicamente ativa. Urd-Cyd – uridina citidina cinase, dCyd – deoxicitidina cinase. Adaptado de Stresemann & Lyko (2008).

Os principais transportadores envolvidos no influxo dos fármacos hipometilantes são os transportadores *solute carrier* (SLC15, SLC22, SLC28A, SLC29A) e transportadores da família ABC (Stresemann & Lyko, 2008).

Os fármacos hipometilantes necessitam de ser convertidos metabolicamente, após o seu influxo, para a forma ativa. Só na forma metabolicamente ativa é que induzem a inibição da metilação do DNA. A azacitidina, tal como a decitabina sofrem várias fosforilações sucessivas que as convertem metabolicamente a um derivado trifosfatado (Stresemann & Lyko, 2008).

As enzimas que estão envolvidas na conversão metabólica dos hipometilantes são a uridina citidina cinase (UCK) e a deoxicitidina cinase (DCK). O fármaco azacitidina é fosforilado em azacitidina monofosfato (5-aza-CMP), posteriormente é fosforilado a azacitidina difosforilada (5-aza-CDP). Finalmente obtém-se a azacitidina trifosfato (5-aza-CTP), o composto metabolicamente ativo (Stresemann &



Lyko, 2008). O fármaco vai atuar ao nível do RNA induzindo uma alteração no metabolismo proteico (Valencia *et al*, 2014).

Apenas cerca de 10 a 20% da 5-aza-CDP é convertida pela ribonucleótido reductase, a 5-aza-dCDP, para ser posteriormente incorporada no DNA (Stresemann & Lyko, 2008).

A decitabina (5-aza-dCR) é fosforilada a decitabina monofosfato (5-aza-dCMP), posteriormente a decitabina difosfato (5-aza-dCDP) e finalmente a decitabina trifosfato (5-aza-dCTP), o composto ativo. A forma ativa da azacitidina e da decitabina será incorporada ao nível do RNA e do DNA, respetivamente (Stresemann & Lyko, 2008).

### **1.5. Mecanismos moleculares de resistência a moduladores epigenéticos**

A resistência farmacológica significa que há uma resposta parcial ao fármaco ou mesmo a ausência de resposta. Pode-se classificar a resistência como inata (ausência de resposta logo no início da terapêutica) ou adquirida (surge no decurso da terapêutica). Na resistência adquirida, inicialmente o doente responde favoravelmente ao fármaco, mas como nem todas as células tumorais sofrem apoptose, estas proliferam, levando à recidiva da doença. Consequentemente estas células deixam de responder ao fármaco resultando no desenvolvimento de resistência (Borst, 2012).

Vários mecanismos podem estar na origem da resistência aos fármacos: 1. redução no influxo do fármaco para a célula tumoral, resultante da diminuição da expressão dos transportadores da família *solute carrier* (SLC); 2. aumento da capacidade da célula tumoral realizar o efluxo dos fármacos, através do aumento da expressão de proteínas da família ABC; 3. diminuição da proporção de fármaco ativo *versus* inativo, que pode dever-se a alterações na função/expressão de enzimas responsáveis pela ativação de pro-fármacos ou pela inativação do fármaco. Além destes mecanismos, a resistência a fármacos pode também ser devida à alteração da expressão ou função dos alvos moleculares dos fármacos, o aumento da reparação da lesão do DNA induzida pelo fármaco, o aumento das respostas ao stresse oxidativo, a resistência à apoptose e a alteração no microambiente da célula leucémica (Pires, 2014; Alves, 2015; Gonçalves, 2015; Marin *et al*, 2016).

A terapia epigenética constitui uma ferramenta altamente promissora para o tratamento de diversos cânceres, dada a sua natureza dinâmica e o potencial para reverter as modificações epigenéticas (Einav Nili *et al*, 2008). A eficácia desta terapia depende da capacidade de transporte do fármaco para o tecido/célula alvo e ainda da sua conversão na forma ativa. O transporte é assegurado por transportadores de efluxo e influxo. As alterações na expressão e/ou atividade destes transportadores pode reduzir a eficácia dos fármacos (Choi *et al*, 2007).

### **1.5.1. Transportadores proteicos**

Estão descritos na literatura várias famílias de transportadores envolvidos no influxo e efluxo de fármacos nas células. Os transportadores de nucleósidos têm um importante papel no influxo e efluxo de fármacos análogos de pirimidinas ou purinas (Pastor-Anglada *et al*, 2004; Marcé *et al*, 2006).

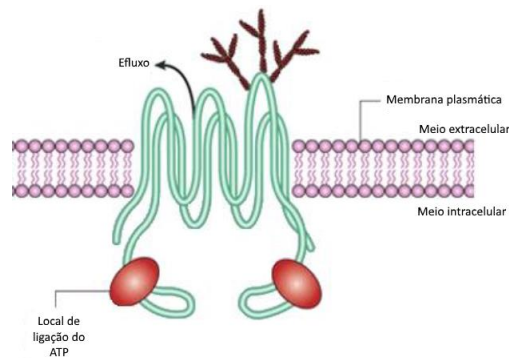
As proteínas envolvidas no transporte da azacitidina e decitabina são essencialmente os transportadores de influxo da família SLC15, SLC22, SLC28A SLC29A, e os transportadores de efluxo da família ABC (Pastor-Anglada *et al*, 2004; Marcé *et al*, 2006). Neste trabalho serão abordados os transportadores da família ABC e ainda o transportador nuclear MVP. Estes transportadores existem naturalmente na célula (Choi *et al*, 2007).

#### **1.5.1.1 Transportadores da família ABC**

Os transportadores de efluxo executam o transporte do meio intracelular para o meio extracelular e são maioritariamente da superfamília de transportadores ABC (*ATP – adenosina trifosfato binding cassette*). Estes são bombas primárias de efluxo ativo, ou seja, para efetuarem o transporte de substâncias dependem da hidrólise do ATP. Os transportadores ABC têm na sua constituição vários domínios e zonas de ligação do ATP. Os domínios variam no número consoante a subfamília de proteínas a que pertencem (Pastor-Anglada *et al*, 2004).

O gene *ABCB1* (*ATP binding cassette subfamily B member 1*), designado por *MDR1* (*multidrug resistance 1*) e localizado no cromossoma 7, codifica a

glicoproteína-P (P-gp) (figura 9). É o gene mais estudado entre os vários transportadores de efluxo, participando na resistência a diversos fármacos em vários tipos de cânceros, incluindo as leucemias (Huang *et al*, 2004; Marin *et al*, 2016). Sabe-se que a sobreexpressão do gene *ABCB1* está relacionado com a resistência a múltiplos fármacos, a *multidrug resistance (MDR)* (Ozben, 2006; Turner *et al*, 2006; Atalay *et al*, 2013).



**Figura 9: Modelo representativo da estrutura da glicoproteína-P.** Os domínios transmembranares estão localizados na bicamada lipídica. Os dois domínios de ligação do nucleótido estão representados a vermelho. Adaptado de Sorrentino (2002).

A glicoproteína-P tem 170 kDa e 1280 resíduos de aminoácidos. É também constituída por 12 domínios transmembranares, 2 domínios de ligação de nucleótidos no lado intracelular, um terminal amino (-N) e um terminal carboxilo (-C), ambos do lado intracelular (Ambudkar *et al*, 2006; Choudhuri & Klaassen, 2006).

O efluxo de substratos do tipo hidrofóbicos e catiónicos, potencialmente prejudiciais ao meio intracelular é um mecanismo de proteção do organismo essencialmente desempenhado pela proteína transportadora P-gp (Marin *et al*, 2016).

O gene *ABCB1* está presente maioritariamente em órgãos excretores com várias funções nomeadamente ao nível da absorção, distribuição e eliminação de vários metabolitos e fármacos (Choudhuri & Klaassen, 2006). Possíveis alterações genéticas e/ou epigenéticas no gene *ABCB1* poderão alterar a expressão e a regulação desta proteína, modificando consequentemente a excreção das substâncias adversas ao organismo (Choudhuri & Klaassen, 2006; Nigam, 2015).

O gene *ABCC1* (*ATP binding cassette subfamily C member 1*), ou *MRP1* (*multidrug resistance associated protein*), localizado no cromossoma 16, codifica uma proteína da superfamília ABC, a MRP1. Esta proteína de 190 kDa é constituída por 1531 resíduos de aminoácidos e 17 domínios transmembranares e está envolvida

na *multidrug resistance* (Choudhuri & Klaassen, 2006). É uma proteína transportadora dependente de ATP que realiza o efluxo de fármacos e ainda de conjugados orgânicos catiónicos, incluindo substâncias intervenientes na excreção de partículas tóxicas ao organismo, como conjugados da glutatona (Fukuda & Schuetz, 2012; Atalay *et al*, 2013).

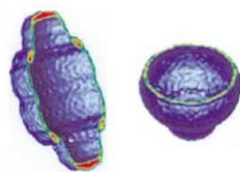
O gene **ABCG2** (*ATP binding cassette subfamily G member 2*), localizado no cromossoma 4, codifica a proteína BCRP (*breast cancer resistance protein*). A proteína BCRP é um transportador polipeptídico com 655 resíduos de aminoácidos e 72 kDa. Este transportador tem dois domínios de ligação a nucleótidos, 6 domínios transmembranares e um terminal amino (-N) (Choudhuri & Klaassen, 2006).

A função do transportador BCRP consiste na prevenção da absorção de substâncias potencialmente tóxicas e na promoção da sua eliminação do organismo (Ross & Nakanishi, 2010). A expressão do gene *ABCG2* pode contribuir para o desenvolvimento e progressão de tumores (Ross & Nakanishi, 2010; Ding *et al*, 2010).

### 1.5.1.2 Major vault protein (MVP)

O gene *MVP* (*major vault protein*), localizado no cromossoma 16, também designado por *LRP* (*lung resistance-related protein*), codifica a proteína *major vault* (MVP), uma ribonucleoproteína citoplasmática de 110 kDa e 55 resíduos de aminoácidos (Li *et al*, 2010; El-Sharnouby *et al*, 2010).

A família das proteínas *vault* (figura 10) são compostas por 3 proteínas: *major vault protein* (MVP), *poly vault polimerase* (VPARP) e pela proteína associada à telomerase (TEP) (Kozlov *et al*, 2006). Têm uma estrutura regular, oca e de forma cilíndrica com duas saliências nas extremidades (Huffman & Corey, 2005, Slesina *et al*, 2005; Li *et al*, 2010; El-Sharnouby *et al*, 2010).



**Figura 10: Estrutura das proteínas *major vault*.** As proteínas *major vault* têm uma forma cilíndrica, oca, com duas saliências nas extremidades. Adaptado de Mossink *et al* (2003).

Esta proteína encontra-se na membrana nuclear das células e medeia a redistribuição de fármacos pelo transporte núcleo-citoplasma, além de participar noutros processos celulares (Huffman & Corey, 2005; Kozlov *et al*, 2006; Oda *et al*, 2007; Li *et al*, 2010; Tian *et al*, 2011).

Um estudo de Kitazono e colaboradores (1999) demonstraram que a MVP tem função de transporte de fármacos quimioterapêuticos, como a doxorubicina na linha celular de cancro do cólon, SW-620.

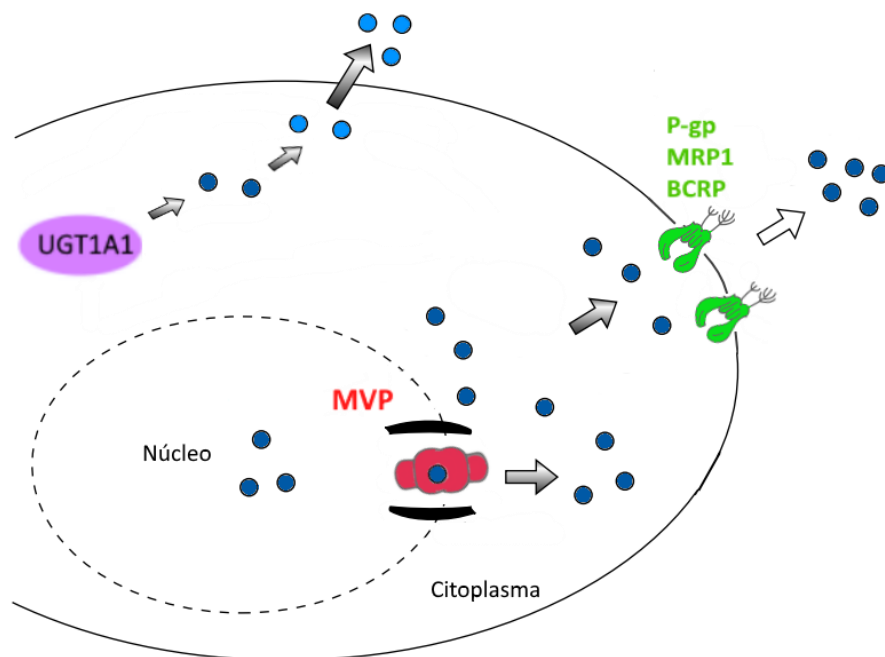
### 1.5.2. UDP glucuronosiltransferase (UGT1A1)

As UDP glucuronosiltransferases (UGT) constituem uma família de enzimas do metabolismo. Estão descritas cerca de 19 enzimas UGT funcionais no Homem, subdivididas em três subfamílias: UGT1A, UGT2A e UGT2B (Cardelli *et al*, 2012; Oda *et al*, 2013).

O gene *UGT1A1* [UDP (uridina difosfato) glucuronosiltransferase família 1 membro A1] codifica a enzima bilirrubina uridina difosfato glucuronosiltransferase (bilirrubina-UGT, também denominada UGT1A1) (Gammal *et al*, 2015).

As enzimas da família UGT têm um papel fundamental na excreção de substâncias lipofílicas endógenas e exógenas. Estas são responsáveis pela conjugação do ácido glucurónico aos substratos, induzindo desta forma a glucuronidação. A enzima UGT1A1 realiza a glucuronização da bilirrubina e de moléculas xenobióticas, incluindo alguns fármacos. Esta conjugação torna as moléculas mais hidrofílicas, o que possibilita a sua excreção renal ou biliar (Gammal *et al*, 2015). A enzima UGT1A1 com uma atividade ausente ou reduzida poderá afetar a eficácia de diversos fármacos induzindo resistência por exposição prolongada (Ohno & Nakajin 2009; Goey & Figg, 2016, Gammal *et al*, 2015).

Na figura 11 está representado um possível mecanismo do transporte núcleo-citoplasma realizado pelas proteínas *major vault* (MVP) e o transporte citoplasma-meio extracelular através das proteínas transportadoras da superfamília ABC: P-gp, MRP1 e BCRP. Está representada ainda a enzima de metabolismo UGT1A1, responsável pela excreção de fármacos e outras substâncias. Este mecanismo foi proposto por Scheffer e colaboradores (2000).



**Figura 11: Possível mecanismo de transporte dos transportadores membranares da família ABC, do transportador nuclear *major vault protein* (MVP) e da enzima de metabolismo UGT1A1.** As proteínas *major vault* (representada a vermelho), presentes na membrana nuclear efetuam o transporte de substâncias do núcleo para o citoplasma. O efluxo do fármaco poderá realizar-se através dos transportadores P-gp, MRP1 ou BCRP (representados a verde). A roxo está representada a enzima de metabolismo responsável pela excreção de substâncias. Adaptado de Scheffer *et al* (2000).

A presença de alterações nos genes que codificam as diversas proteínas transportadoras e enzimas de metabolismo, pode influenciar a sua expressão, a função e as estruturas proteicas, originando alterações na resposta a substâncias endógenas ou exógenas (Huang *et al*, 2004).

---

## **OBJETIVOS**

---





## **CAPITULO II - OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos**

Os mecanismos moleculares de resistência a hipometilantes ainda não estão totalmente clarificados, tendo despertado o interesse no seu estudo, o que permitirá uma melhor seleção dos doentes elegíveis para este tipo de terapêuticas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os mecanismos moleculares de resistência a moduladores epigenéticos, particularmente à azacitidina, na leucemia mieloide aguda, através da caracterização dos níveis de expressão proteica de transportadores de efluxo (glicoproteína-P, MRP1 e MVP) e de expressão génica do transportador BCRP assim como da enzima de metabolismo UGT1A1. Além disso, pretendeu-se também analisar se o desenvolvimento de resistência à azacitidina induz resistência cruzada à decitabina, outro agente hipometilante.



---

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---



## CAPITULO III - MATERIAIS E MÉTODOS

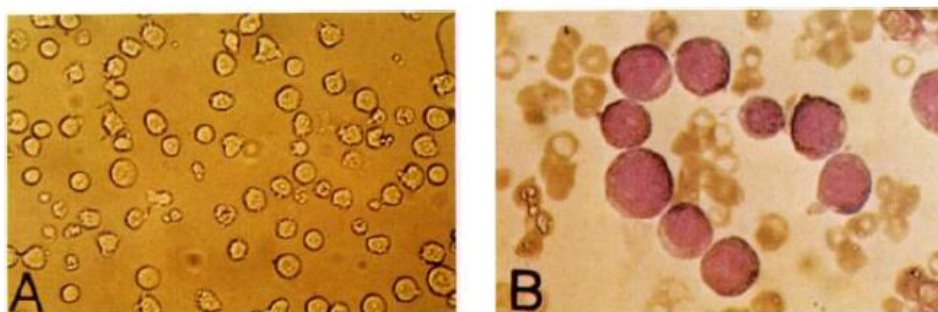
### 3.1. Descrição das linhas celulares

No âmbito deste estudo foi utilizada a linha celular HL-60 e a sublinha HL-60AZA, descritas no ponto 3.1.1. e 3.3 respectivamente.

#### 3.1.1. Linha celular HL-60

A linha celular HL-60, obtida na ATCC (*American Type Culture Collection*), foi originalmente estabelecida a partir de leucócitos do sangue periférico de uma mulher caucasiana com 36 anos de idade, diagnosticada com leucemia promielocítica aguda (LPA). Esta linha celular não tem a translocação - *PML-RAR $\alpha$*  (Birnie, 1988; Gallagher *et al*, 1979). A LPA é caracterizada pelo bloqueio da diferenciação dos promielócitos (Birnie, 1988; Gallagher *et al*, 1979).

A linha celular HL-60 cresce em suspensão, sem aderir às superfícies do frasco de cultura. Em relação à morfologia, as células apresentam características de promielócitos (precursores dos granulócitos), são redondas, com uma elevada razão núcleo-citoplasma e com alguns nucléolos. O citoplasma é basofílico com grânulos azurófilos (figura 12) (Birnie, 1988; Gallagher *et al*, 1979).



**Figura 12:** A. Células HL-60 no microscópio invertido. B. Esfregaço de medula de um doente antes da quimioterapia, com promielócitos leucémicos. Coloração com Wright-Giemsa. Adaptado de Gallagher *et al* (1979).

### 3.2. Cultura celular

A linha celular HL-60 e a sublinha HL-60AZA foram mantidas em cultura com meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute 1640*) (Lonza) a pH 7.4, que contém 2 mM de L-Glutamina, 20 mM de HEPES-Na, 1,5 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Lonza), enriquecido com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Biowest). A densidade celular ótima de crescimento das células é de 0,3 x 10<sup>6</sup> células/mL. Os frascos de cultura foram colocados numa incubadora à temperatura de 37°C, numa atmosfera humidificada contendo 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.3. Indução de resistência

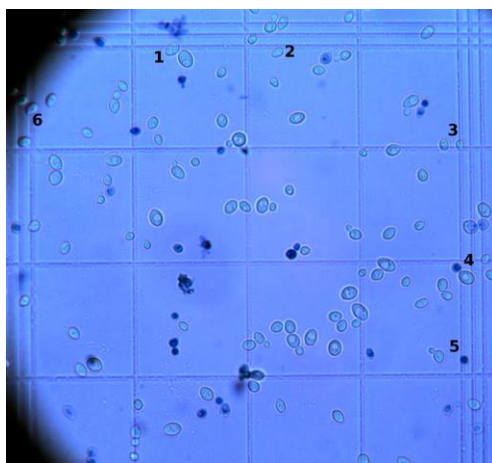
A indução de resistência ao fármaco azacitidina na linha celular HL-60, foi obtida no Laboratório de Oncobiologia e Hematologia (LOH) da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra por exposição das células a concentrações crescentes de fármaco.

Para este efeito, o fármaco azacitidina foi adicionado à suspensão celular a cada 48h. O desenvolvimento de resistência iniciou-se com a administração de 100 nM de azacitidina (Sigma-Aldrich), concentração que induz cerca de 20% de morte celular. Renovou-se o meio a cada 48h por centrifugação da suspensão celular. Esta centrifugação permitiu remover as células mortas, selecionando os clones resistentes. Este procedimento repetiu-se até as células atingirem um valor de IC<sub>50</sub> aproximadamente 3 vezes superior ao das células sensíveis (durante aproximadamente um ano).

A sublinha celular resistente (HL-60AZA) foi mantida em meio RPMI 1640 com 5 µM de azacitidina, de acordo com as condições descritas no ponto 3.2.

### 3.4. Avaliação do crescimento e viabilidade celulares

Os efeitos induzidos pelos fármacos azacitidina e decitabina podem ser observados, por exemplo, através da avaliação do crescimento e da viabilidade celulares. Para o efeito recorreu-se ao teste de exclusão azul de tripano. Este teste baseia-se no facto de o corante azul de tripano permear de forma distinta as células viáveis e as células não viáveis. Nas células viáveis, cuja membrana plasmática se encontra intacta, o corante não vai permear a membrana pelo que não vai corar as células de azul. As células mortas, em que a membrana plasmática se encontra comprometida, vão corar de azul (figura 13) (Durkin *et al*, 1979; Bastidas, 2013).



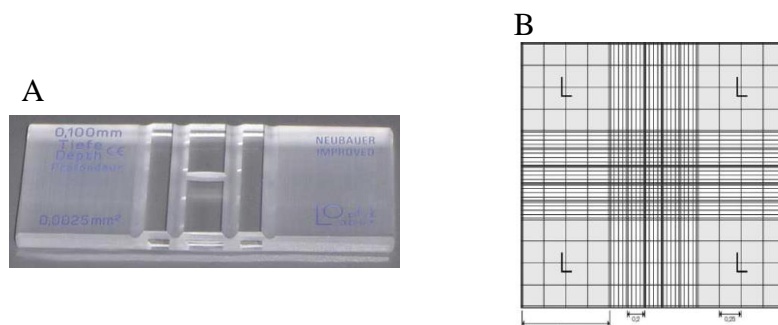
**Figura 13: Visualização de células no hemocítmetro/câmara de Neubauer pelo teste de exclusão azul de tripano.** As células viáveis encontram-se translúcidas. As células inviáveis encontram-se coradas a azul.

Este teste permite aferir sobre o efeito citostático e/ou citotóxico induzidos pelos fármacos em estudo. O efeito citostático é observável pela inibição do crescimento celular. Por outro lado, o efeito citotóxico traduz a diminuição da viabilidade celular.

Após a contagem do número de células viáveis e mortas (figura 14), no microscópio ótico L2000 (Bioval), determinou-se a densidade e a viabilidade celulares, através das seguintes fórmulas:

$$\text{Densidade celular (n}^\circ \text{ células/mL)} = \frac{\Sigma(\text{células vivas})}{\text{n}^\circ \text{ quadrantes}} \times \text{fator diluição} \times 10^4$$

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\Sigma(\text{células vivas})}{\Sigma(\text{células totais})} \times 100$$



**Figura 14: A. Hemocítometro ou câmara de Neubauer. B. Grelha de contagem do hemocítometro.** A suspensão celular com o corante azul de tripano deve ser inserida na superfície do hemocítometro e colocar uma lamela por cima. De seguida faz-se a contagem de células ao microscópio. A contagem das células deve ser feita em “L”. Adaptado de <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAezrAAC/tecnica-camara-neubauer> [http://protocolos3.dominiotemporario.com/page\\_19.html](http://protocolos3.dominiotemporario.com/page_19.html)

As células HL-60 e HL-60AZA foram incubadas durante 72h em placas de 96 poços na ausência de fármaco (controlo) e na presença de várias concentrações dos fármacos azacitidina e decitabina (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  para ambos os fármacos e 200  $\mu\text{M}$  apenas para a azacitidina, Sigma-Aldrich). Foram retirados 20  $\mu\text{L}$  da suspensão celular, após homogeneização, e colocou-se no hemocítometro com igual alíquota do corante azul de tripano (Sigma-Aldrich).

### 3.5. Análise da morfologia por microscopia ótica

A avaliação da morfologia celular da linha celular HL-60 e da sublinha HL-60AZA, foi analisada por microscopia ótica após a realização de esfregaços das células e respetiva coloração de May-Grünwald-Giemsa (Sigma-Aldrich). Esta coloração cora as diferentes estruturas celulares em função do seu pH (Houwen, 2001).

Para a realização dos esfregaços recolheram-se cerca de  $0,5 \times 10^6$  células/mL incubadas na ausência e na presença de 5  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  do fármaco azacitidina durante 72h. Após incubação, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas durante 5 minutos a 300 xg. Para que as células aderissem melhor à lâmina, foram ressuspensas numa pequena quantidade de FBS e fizeram-se os esfregaços.

Depois de secos, os esfregaços foram corados durante 3 minutos com a solução de May-Grünwald. Colocou-se a mesma quantidade de água bidestilada e deixou-se reagir durante 1 minuto. Inverteram-se as lâminas para retirar o excesso de



corante. Seguidamente adicionou-se a solução de Giemsa (diluído na proporção de 1:8 com água destilada, aquando da utilização) durante 15 minutos.

Os esfregaços foram lavados em água destilada e, após secagem, foram analisados ao microscópio ótico. Usou-se um microscópio ótico Eclipse 80i (Nikon) acoplado a uma câmara digital “Digital Camera DXm 1200F” (Nikon), que permitiu a aquisição de imagens e o seu processamento no programa *NIS-Elements Microscope Imaging Software v4.3* (Nikon).

### 3.6. Extração e quantificação do DNA genómico

A extração de DNA das linhas celulares HL-60, HL-60AZA e de sangue periférico foi realizada através do kit de extração de DNA (GRS Genomic DNA Kit – Blood & Cultured Cells, Grisp). As amostras de sangue periférico foram obtidas de três indivíduos saudáveis, com a finalidade de usar como controlos na técnica MS-MLPA.

Para a extração de DNA de sangue periférico transferiram-se 300 µL de sangue para um *ependorf*, adicionaram-se 900 µL de “*red blood cell lysis buffer*” e misturou-se por inversão do *ependorf*. Após uma incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, centrifugou-se durante 5 minutos a 300 xg e removeu-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o *pellet* em 100 µL de “*red blood cell lysis buffer*” e 200 µL do tampão BC1.

Para a extração de DNA das linhas celulares adicionaram-se 200 µL do tampão BC1 ao *pellet* de células previamente lavado com PBS, e misturou-se no vórtex. Os seguintes passos foram realizados nas mesmas condições para ambas as extrações.

Incubaram-se os *ependorfs* com as amostras de sangue periférico (após tratamento com o “*red blood cell lysis buffer*”) e das linhas celulares (após adição do tampão BC1 e lavado com PBS) durante 10 minutos a 70°C. De seguida adicionaram-se 5 µL de RNase A (10mg /mL), misturou-se no vórtex e incubou-se durante 5 minutos à temperatura ambiente. De seguida adicionaram-se 200 µL de etanol absoluto e misturou-se no vórtex. Esta mistura foi transferida para uma coluna (*genomic DNA mini spin column*) inserida num tubo coletor. Centrifugou-se durante 5 minutos a 15000 xg. Descartou-se o tubo coletor e colocou-se a coluna num novo

tubo. Adicionaram-se 400  $\mu\text{L}$  de “*Wash buffer 1*” e centrifugou-se durante 1 minuto a 15000 xg. Descartou-se o conteúdo do tubo coletor. Adicionaram-se 600  $\mu\text{L}$  de “*Wash buffer 2*” na coluna e centrifugou-se durante 1 minuto a 15000 xg.

Descartou-se o sobrenadante do tubo coletor, colocou-se novamente a coluna no tubo e centrifugou-se 3min a 15000 xg, para secar a membrana da coluna. Por fim transferiu-se a coluna para um *eppendorf* e adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de tampão de eluição previamente aquecido. Incubou-se à temperatura ambiente durante 5 minutos. Finalmente centrifugou-se a 15000 xg durante 1 minuto. Descartou-se a coluna e armazenou-se o DNA a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Através do recurso a um espectrofotômetro de fluorescência, *Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific), realizou-se a avaliação quantitativa e qualitativa do DNA extraído. Este método baseia-se na absorção de luz UV dos ácidos nucleicos nos comprimentos de onda de 250 nm a 280 nm, sendo máxima a 260 nm (comprimento de onda de absorção máxima do DNA). A razão entre a leitura de absorvância a 260/280 nm permite estimar a pureza da amostra. Se a razão se encontrar no intervalo 1,8 – 1,9 o DNA encontra-se puro. Valores superiores indicam presença de RNA e valores inferiores indicam contaminações com proteínas, fenóis e/ou outros compostos (Thermo Scientific, 2013).

A amostra foi pipetada no suporte de medição do Nanodrop procedendo-se à medição de absorvância recorrendo ao *software* ND-1000 V3.5.2 (Thermo Scientific). Entre amostras limpou-se o suporte com água destilada de forma a evitar possíveis contaminações. As amostras foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.7. Extração e quantificação de RNA**

Foi realizada extração do RNA total da linha celular HL-60 e da sublinha HL-60AZA de acordo com o protocolo de extração de RNA total usando NZYol (NZYtech). O RNA foi necessário para a conversão para cDNA, essencial para avaliar a expressão génica dos transportadores através de PCR em tempo real.

Para extrair o RNA das células lavou-se a suspensão celular com PBS, adicionou-se 1 mL de NZYol por cada  $5 \times 10^6$  células, homogeneizou-se por pipetagem várias vezes e transferiu-se para *eppendorfs* novos. Congelou-se a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

No dia seguinte, incubaram-se os *ependorfs* durante 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionaram-se 200 µL de clorofórmio por cada mL de NZYol adicionado. Misturou-se bem no vórtex e incubou-se durante 3 minutos à temperatura ambiente. De seguida centrifugou-se a 12000 xg durante, 15 minutos e a 4°C. Esta centrifugação permitiu separar a amostra em 3 fases: uma fase orgânica de cor verde contendo DNA e proteínas, uma interfase fenol-clorofórmio e uma fase translúcida, a fase aquosa que contém o RNA. Transferiu-se a fase aquosa cuidadosamente para um *ependorf* e adicionaram-se 500 µL de isopropanol por mL de NZYol. Incubaram-se as amostras à temperatura ambiente durante 10 minutos. De seguida centrifugou-se a 12000 xg, durante 10 minutos e a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, lavou-se o *pellet* em 1 mL de etanol a 70% por mL de NZYol. Misturou-se no vórtex e centrifugou-se a 7500 xg durante 5 minutos a 4°C. Removeu-se o sobrenadante e deixou-se secar o *pellet* à temperatura ambiente. Depois da secagem do *pellet*, ressuspendeu-se em água RNase free.

O RNA foi quantificado no *Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific) e armazenou-se a -80°C. A quantificação pelo Nanodrop permite uma avaliação quantitativa e qualitativa do RNA extraído. Este método baseia-se na absorção de luz UV dos ácidos nucleicos nos comprimentos de onda de 250 nm a 280 nm, sendo máxima a 260 nm. A razão entre a leitura de absorvância a 260 e 280 nm permite estimar a pureza da amostra. Se o valor da razão 260/280 se encontrar próximo de 2,0 o RNA encontra-se puro (Thermo Scientific, 2013).

### **3.7.1. Conversão do RNA a cDNA**

Para realizar a conversão do RNA a cDNA recorreu-se ao kit comercial *NZY First-Strand CDNA Syntesis kit* da empresa NZYTech, de acordo com as instruções do fabricante.

Iniciou-se o protocolo por fazer a mistura “*annealing reaction*”, em gelo, cujos componentes estão descritos na tabela 1.

**Tabela 1: Composição da mistura “annealing reaction” do protocolo de conversão do RNA a cDNA - NZY**  
First-Strand CDNA Syntesis kit da empresa NZYTech.

Componente	Volume
<i>Oligo(dT)<sub>18</sub> primer mix (50 μM), or random hexamer mix (50ng/ μL)</i>	1 μL
<i>10 x Annealing buffer</i>	1 μL
<i>Nuclease-free water</i>	Até 8 μL

De seguida, distribuiu-se a mistura por tubos de 0,2 mL e adicionou-se o RNA. Misturou-se no vórtex e incubou-se a 65°C durante 5min.

Posteriormente fez-se a mistura da transcriptase reversa, em gelo, e adicionou-se a mistura dos componentes descritos na tabela 2.

**Tabela 2: Composição da mistura da transcriptase reversa do protocolo de conversão do RNA a cDNA - NZY**  
First-Strand CDNA Syntesis kit da empresa NZYTech.

Componente	Volume
<i>NZYRT 2x Master mix, no oligos</i>	10 μL
<i>NZYRT Enzime mix</i>	2 μL
Volume final	20 μL

Esta mistura foi distribuída pelos *ependorfs* e fez-se o ciclo de temperaturas no termociclador *T100* da Bio-Rad, descrito na tabela 3:

**Tabela 3: Ciclo de temperaturas e tempos de incubação do protocolo de conversão do RNA a cDNA - NZY**  
First-Strand CDNA Syntesis kit da empresa NZYTech

Temperatura	Tempo
50°C	30 minutos
85°C	5 minutos

De seguida adicionou-se 1 μL de NZY RNase H (*E. Coli*) e incubou-se a 37°C durante 20 minutos. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C.

### **3.8. Avaliação dos mecanismos moleculares de resistência à azacitidina e decitabina**

#### **3.8.1. Curvas dose-resposta**

Para a avaliação do efeito da azacitidina e da decitabina na linha celular HL-60 e na sublinha HL-60AZA, realizaram-se plaqueamentos das células com diferentes concentrações de fármaco.

As células HL-60 e HL-60AZA foram plaqueadas em placas de 96 poços com as doses 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  dos fármacos azacitidina e decitabina, e ainda com 200  $\mu\text{M}$  de azacitidina. Mantiveram-se em cultura durante 72h. A cada 24h foi retirada uma alíquota para o teste de exclusão azul de tripano (como descrito no ponto 3.4.). Os dados foram reunidos para calcular a densidade e viabilidade celulares e assim obter as curvas dose-resposta.

#### **3.8.2. Análise da expressão génica do transportador *ABCG2* e da enzima *UGT1A1* por qRT-PCR**

A descoberta e caracterização do perfil de expressão de genes supressores tumorais, permite uma relação com a *multidrug resistance* e assim, prever uma falha ou não de resposta ao tratamento e auxiliar na seleção da melhor escolha farmacológica direcionada para cada doente.

A avaliação da expressão génica do transportador *ABCG2* e do gene *UGT1A1* foi realizada recorrendo ao PCR em tempo real, qRT-PCR. Utilizou-se o termociclador *CFX96 Touch™ detection system C1000* da *Bio-Rad Laboratories*.

A PCR (*polymerase chain reaction*) é uma técnica que permite amplificar o DNA. Na reação PCR em tempo real (qRT-PCR) a análise é feita em “tempo real”, ou seja, à medida que a reação está a decorrer, conseguimos detetar/analisar em tempo real o que está a acontecer. A marcação com fluoróforos específicos (por exemplo o SYBR Green ou EvaGreen), permite detetar a fluorescência aquando da amplificação do DNA, sendo o aumento da fluorescência proporcional à quantidade de DNA. Assim, a fluorescência reflete a quantidade do produto amplificado em cada ciclo (Real-Time PCR Applications Guide, 2006).

No qRT-PCR, a eficiência é calculada de forma precisa pelo *software* de leitura *CFX Manager™ Software v3.1* da *Bio-Rad Laboratories*. A especificidade do produto de PCR pode ser efetuada por análise de curva de *melting* e a quantificação do gene alvo por comparação com os níveis de fluorescência obtidos a partir de um gene controlo.

Para a realização do qRT-PCR fez-se inicialmente a mistura cujos componentes e respetivos volumes estão representados na tabela 4. O volume total de cada reação foram 10 µL.

**Tabela 4: Composição da mistura usada no qRT-PCR.**

Componente	Concentração final	Volume final *
5x <i>EvaGreen</i>	1x	2 µL
<i>Primer F</i> (10pmol/µL)	150 nM	0,15 µL
<i>Primer R</i> (10pmol/ µL)	150 nM	0,15 µL
H <sub>2</sub> O	---	6,7 µL
cDNA	---	1 µL

\*Volume final correspondente a uma amostra. *Primer F* (*forward*); *Primer R* (*reverse*).

Na tabela 5 estão identificados os *primers* utilizados na mistura para o qRT-PCR. Os *primers* foram desenhados pelo Laboratório de Oncobiologia e Hematologia (LOH) da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra especificamente para este protocolo, e sintetizados pela Sigma-Aldrich.

**Tabela 5: Primers utilizados na reação de qRT-PCR.** qBCRP-F: *primer forward*; qBCRP-R: *primer reverse* (a mesma nomenclatura foi usada para os restantes *primers*).

<i>Primers</i>	Sequência (5' – 3')
<b>qBCRP-F</b>	GGAACTCAGTTTATCCGTGGTG
<b>qBCRP-R</b>	CCTGGGGATTACCCAGCAAG
<b>qUGT1A1-F</b>	CACTGTATTCTTCTTGCATG
<b>qUGT1A1-R</b>	CGATCCAAAGTAATACATCTG
<b>qGAPDH-F</b>	CCGCTTCGCTCTCTGCTCCT
<b>qGAPDH-R</b>	CCGTCGACTCCGACCTTCACCTT

Foram realizados 3 ensaios independentes, utilizando 3 amostras independentes de DNA obtido da linha celular HL-60 e HL-60AZA. Foram

realizadas curvas *standard* usando diluições seriadas da amostra de DNA, cuja finalidade foi determinar a eficiência da reação. Adicionou-se um controlo negativo (água) a cada placa do qRT-PCR. Os valores de expressão foram normalizados com o gene *housekeeping GAPDH*.

### **3.8.3. Análise da expressão proteica dos transportadores P-gp, MRP1 e MVP por citometria de fluxo**

Os transportadores proteicos envolvidos no efluxo dos fármacos podem ser identificados através da técnica citometria de fluxo. Esta técnica identifica transportadores membranares e transportadores intracelulares, consoante marcação com anticorpos ligados a sondas fluorescentes.

A citometria de fluxo é uma técnica que permite analisar características físicas de células individualizadas. Esta técnica possibilita a distinção de células consoante o tamanho relativo, intensidade de fluorescência relativa e complexidade. As células são encaminhadas numa corrente de fluido. A passagem do feixe contínuo de luz pelas células induz dois tipos de dispersão de luz: a dispersão frontal que avalia o tamanho (*Forward Scatter Channel – FSC*) e a dispersão lateral (*Side Scatter Channel – SSC*) que avalia a complexidade das células. Esta dispersão é captada por lentes que transmitem ao detetor, e este vai produzir sinais elétricos proporcionais ao sinal ótico (Biosciences, 2000).

Para realizar a análise da expressão proteica dos transportadores proteicos, glicoproteína-P, MRP1 e MVP por citometria de fluxo procedeu-se à marcação através de 2 protocolos diferentes. Os transportadores membranares glicoproteína-P, MRP1 foram analisados através de uma marcação de superfície e o transportador MVP, um transportador localizado na membrana nuclear, foi analisado por marcação intracelular.

Inicialmente lavaram-se as células ( $0,5 \times 10^6$  células/mL) com PBS, por centrifugação durante 5 minutos a 300 xg. De seguida adicionaram-se 300 µL de PBS e distribuiu-se pelos tubos de citometria.

Na marcação para o transportador MVP, o sobrenadante foi decantado e o *pellet* foi incubado durante 15 minutos ao abrigo da luz com 100 µL da solução A (*A: fixation solution, Kit Intracell, Immunostep*). De seguida lavou-se o excesso de

solução adicionada com PBS. Decantou-se o sobrenadante, adicionaram-se 100 µL da solução B (*B permeabilization solution, Kit Intracell, Immunostep*) e 1 µg de anticorpo primário (*Mouse monoclonal IgG1, Santa Cruz Biotechnolgy*). Incubou-se novamente durante 15 minutos ao abrigo da luz e lavou-se com PBS. Por fim adicionou-se 1 µg de anticorpo secundário (*Chicken anti-mouse IgG-PE, Santa Cruz Biotechnology*). Incubou-se durante 15 minutos ao abrigo da luz lavou-se e decantou-se o sobrenadante. Por fim ressuspendeu-se o *pellet* em 300 µL de *FACSflow* (BD Biosystems).

Para a marcação dos transportadores glicoproteína-P e MRP1, adicionaram-se 10 µL de anticorpo conjugado com FITC (*mouse Anti-human MRP1 e mouse Anti-human P-gp, BD Pharmingen*) às células com PBS e incubou-se durante 15 minutos ao abrigo da luz. De seguida lavaram-se as células com PBS e decantou-se o sobrenadante. Por fim ressuspendeu-se o *pellet* em 300 µL de *FACSflow* (BD Biosystems). Foi realizada a análise de 3 ensaios independentes no citómetro de fluxo FACScalibur (BD Biosystems) equipado com um laser de árgon. Os comprimentos de onda de excitação dos fluorocromos usados foram de 525 nm para a anti-P-gP-FITC, de 640 nm para o anti-BCRP-PE e para o anti-MVP-PE.

Foram adquiridas 10000 células através do programa CellQuest<sup>TM</sup> e os dados analisados com recurso ao programa Paint-a-Gate<sup>TM</sup>, sendo estes apresentados em unidade arbitrária de média de intensidade de fluorescência (MIF) e em percentagem de células positivas para os respetivos transportadores.

#### **3.8.4. Análise do perfil de metilação de genes nas linhas celulares HL-60 e HL-60AZA por MS-MLPA**

A análise do padrão de metilação de diversos genes foi avaliado por MS-MLPA (*Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). Esta técnica, descrita por Nygren e colaboradores (2005), corresponde a uma variação da técnica convencional de MLPA. É um método semi-quantitativo que permite detetar dois parâmetros: a alteração do número de cópias e o padrão de metilação de genes específicos. É um método simples, fiável e necessita de uma quantidade reduzida de amostra (DNA).



As etapas fundamentais do MS-MLPA são: desnaturação do DNA e hibridização das sondas; reação de ligação/digestão pela enzima *HhaI*; reação de PCR e separação dos fragmentos amplificados; e análise dos resultados. A grande diferença entre o MLPA e MS-MLPA é que cada reação de MS-MLPA gera duas amostras: uma não digerida para a detecção do número de cópias e outra digerida para a detecção da metilação (Nygren *et al*, 2005; MS MLPA *General protocol*, 2016).

O painel de sondas utilizado foi “*SALSA MLPA probemix ME002-C1 Tumour Suppressor-2*” da empresa MRC-Holland (Amsterdam, The Netherlands). Este painel de sondas, sequências de nucleótidos com tamanho entre 64 e 105 nt, é específico para 25 genes supressores tumorais (*TP73*, *MSH6*, *VHL*, *RARβ*, *ESR1*, *CDKN2A*, *PAX5*, *KLLN*, *MGMT*, *PAX6*, *WT1*, *CD44*, *GSTP1*, *ATM*, *CADMI*, *CHF3*, *BRCA2*, *RBI*, *THBS1*, *PYCARD*, *CDH13*, *TP53*, *BCRA1*, *STK11*, *GATA5*). Os genes *MGMT* e *RBI* foram analisados com duas sondas diferentes.

Assim, para a análise do perfil de metilação usaram-se 5 µL das amostras com aproximadamente 100 ng de DNA. Recorreu-se a um termociclador ABI 2720 (Applied Biosystems) para auxiliar os vários passos do protocolo. A endonuclease sensível à metilação utilizada para o estudo do perfil epigenético foi a *HhaI* (Promega).

Inicialmente realizou-se a desnaturação do DNA e a hibridização que permitiram a ligação das sondas ao DNA. Após a hibridização da sonda, as amostras foram divididas em dois tubos: um em que se adicionou uma endonuclease de restrição (*HhaI*) e outro em que não se adicionou a enzima. O que é amplificado nesta técnica são as sondas. No caso de o DNA não estar metilado as sondas ligam-se e são digeridas pela enzima *HhaI*. Se o DNA estiver metilado as sondas ligam-se, e os grupos CH<sub>3</sub> previnem a digestão.

Após a reação de PCR (durante 35 ciclos), procedeu-se à eletroforese capilar de forma a separar os produtos de PCR de acordo com o seu tamanho molecular. Para tal, usaram-se 0,7 µL de produto de PCR e 9,4 µL de uma mistura com ROX e formamida desionizada (Applied Biosystems). A separação das sondas amplificadas por PCR foi realizada num sequenciador genético ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems).

A análise dos resultados foi feita no *software GeneMapper v4.1* (Applied Biosystems) para análise dos eletroferogramas.

Para o cálculo da % de metilação e dos níveis de alteração do número de cópias recorreu-se ao *software Coffalyser.Net* (MRC-Holland).

A determinação do intervalo de percentagem de metilação foi realizada com base na análise das amostras controlo (três indivíduos saudáveis). Um gene foi considerado metilado quando a sua percentagem de metilação revelou ser igual ou superior a 15% (Moelans *et al*, 2011; Verschuur-Maes *et al*, 2012; Chmelarova *et al*, 2012).

### **3.9. Análise estatística**

Para o tratamento estatístico dos resultados obtidos recorreu-se ao programa GraphPad Prism *version* 6. Procedeu-se à análise de variância estatística de dois ou mais grupos em simultâneo pelo teste *one-way* ANOVA, tendo-se utilizado o teste de *Friedman* e teste *t* de *student*. A análise estatística das curvas dose-resposta foi feita recorrendo à regressão não-linear de 5 a 14 ensaios independentes nas curvas dose-resposta. Os resultados apresentaram-se sobre a forma de média  $\pm$  erro padrão de 3 ensaios independentes nos resultados relativos ao qRT-PCR e citometria de fluxo. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para um valor de  $p < 0.05$ .

---

## RESULTADOS

---



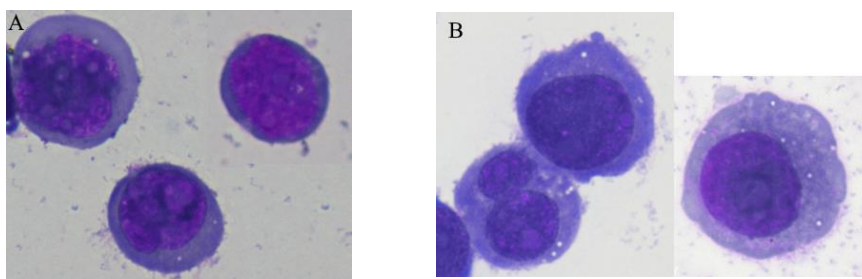
## CAPITULO IV - RESULTADOS

### 4.1. Caracterização da linha celular HL-60 e da sublinha celular resistente HL-60AZA

Para a realização deste estudo recorreu-se à linha celular HL-60 e à sublinha resistente ao fármaco azacitidina HL-60AZA. A linha celular HL-60 é um modelo *in vitro* de LMA/LPA, sem a translocação *PML-RAR $\alpha$* .

Com o objetivo de perceber se a resistência ao fármaco azacitidina induziu alteração na morfologia celular, as células foram observadas ao microscópio ótico, após coloração de May-Grünwald-Giemsa (figura 15).

Os resultados referentes à linha celular HL-60 e HL-60AZA, estão representados na figura 15 e revelaram características típicas de promielócitos. As células HL-60 são redondas, com uma elevada razão núcleo-citoplasma e com presença de 2-3 nucléolos no núcleo e têm citoplasma basofílico. As células resistentes à azacitidina são redondas, parecem ter uma relação núcleo-citoplasma mais baixa e maior quantidade de vacúolos.



**Figura 15: Aspectos morfológicos das células HL-60 (A) e HL-60AZA (B).** Os esfregaços das células foram corados com solução de *May-Grünwald-Giemsa* e observados ao microscópio ótico de acordo com o descrito no ponto 3.5 (ampliação de 500x).

Seguidamente, analisou-se o perfil de metilação de 25 genes supressores tumorais (*TP73*, *MSH6*, *VHL*, *RAR $\beta$* , *ESR1*, *CDKN2A*, *PAX5*, *KLLN*, *MGMGT*, *PAX6*, *WT1*, *CD44*, *GSTP1*, *ATM*, *CADM1*, *CHF3*, *BRCA2*, *RBI*, *THBS1*, *PYCARD*, *CDH13*, *TP53*, *BCRA1*, *STK11*, *GATA5*), das linhas celulares HL-60 e HL-60AZA. O objetivo desta técnica foi perceber se a resistência induziu alteração nos perfis de metilação das células HL-60AZA.

Consideraram-se os genes metilados cuja percentagem de metilação foi igual ou superior a 15%. A apresentação dos resultados da metilação dos genes supressores tumorais estudados é feita em níveis de metilação: genes hipermetilados (intervalo de metilação entre 60 a 100%) e genes parcialmente metilados (cujo intervalo de metilação se situa entre 15 a 59%). A figura 16 representa os perfis de metilação respetivos de cada gene, em cada linha celular.

<b>Genes</b>	<b>HL-60</b>	<b>HL-60AZA</b>
<i>TP73</i>		
<i>MSH6</i>		
<i>VHL</i>		
<i>RAR<math>\beta</math></i>		
<i>ESR1</i>		
<i>CDKN2A</i>		
<i>PAX5</i>		
<i>KLLN</i>		
<i>MGMT</i>		
<i>MGMT</i>		
<i>PAX6</i>		
<i>WT1</i>		
<i>CD44</i>		
<i>GSTP1</i>		
<i>ATM</i>		
<i>CADM1</i>		
<i>CHFR</i>		
<i>BRCA2</i>		
<i>RB1</i>		
<i>RB1</i>		
<i>THBS1</i>		
<i>PYCARD</i>		
<i>CDH13</i>		
<i>TP53</i>		
<i>BRCA1</i>		
<i>STK11</i>		
<i>GATA5</i>		

**Figura 16: Perfis de metilação de vários genes supressores tumorais nas linhas celulares HL-60 e HL-60AZA.** A preto estão representados os genes hipermetilados (cujos níveis de metilação se encontram entre os 60 - 100%, a cor cinza os genes parcialmente metilados (15-59%) e, a branco os genes desmetilados (0 – 14%). Os resultados representam a média de 3 ensaios independentes.

Não se verificaram diferenças significativas na percentagem de metilação entre a sublinha resistente e a linha sensível. Ou seja, as células resistentes à azacitidina não sofreram alterações a nível da metilação quer dos genes metilados como dos genes com ausência de metilação estudados. Como representado na figura

16 as linhas celulares parental e resistente observou-se hipermetilação dos genes *TP73*, *RARβ*, *ESR1*, *MGMT*, *CADM1*, *CHFR*, *THBS1*, *CDH13* e *GATA5*. Os genes *PAX5*, *PAX6* e *WT1* encontravam-se parcialmente metilados em ambas as linhas celulares. Os genes *MSH6*, *VHL*, *CDKN2A (p16)*, *KLLN*, *CD44*, *GSTP1*, *ATM*, *BRCA2*, *RBI*, *PYCARD*, *TP53*, *BRCA1* e *STK11* apresentavam-se desmetilados.

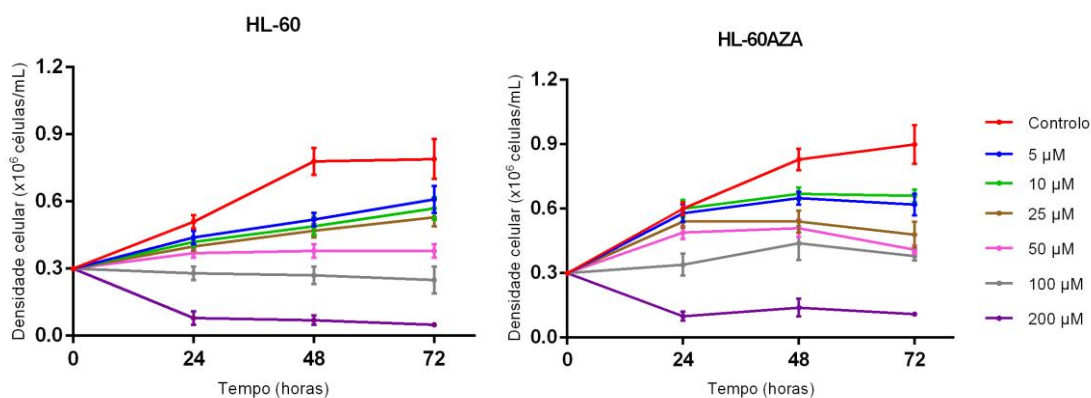
A técnica MS-MLPA permite ainda analisar o número de cópias de cada gene estudado. No presente trabalho não se verificaram diferenças significativas entre a sublinha HL-60AZA e a linha celular parental.

#### 4.2. Avaliação do efeito citostático e citotóxico da azacitidina e decitabina na proliferação e viabilidade das células HL-60 e HL-60AZA

A análise das curvas de densidade e viabilidade celular obtidas para cada linha celular, quando incubadas na ausência e na presença de fármaco, fornecem informações sobre o efeito dos fármacos em estudo na proliferação e viabilidade celulares.

A densidade e a viabilidade celulares de cada linha celular em estudo (HL-60 e HL-60AZA) foram determinadas recorrendo ao teste de exclusão azul de tripano como descrito no ponto 3.4.

A figura 17 representa a densidade celular das linhas HL-60 e HL-60AZA, respetivamente, sem tratamento (controlo), e após tratamento com o fármaco azacitidina em várias concentrações durante 72 horas.



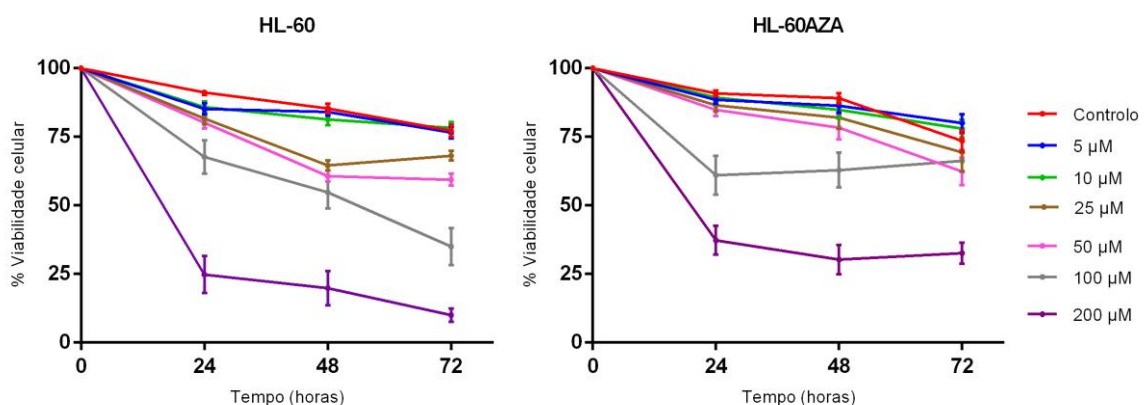
**Figura 17: Efeito da azacitidina (AZA) na proliferação das células HL-60 e HL-60AZA.**

As células foram incubadas de acordo com o descrito no ponto 3.2. A cada 24h foram retiradas alíquotas da suspensão celular e realizou-se o teste de exclusão azul de tripano. Os resultados, expressos em 10<sup>6</sup> células/mL, representam a média ± erro padrão de 5 a 14 ensaios independentes. A análise estatística foi efetuada utilizando o teste *t de student*, sendo \*\*  $p < 0,01$ .

Como podemos observar na figura 17, o perfil de crescimento da linha sensível e da resistente é ligeiramente diferente. Quando as células HL-60 foram incubadas 72h com doses crescentes de fármaco, verifica-se uma redução da proliferação, relativamente ao controlo. Após a incubação de 72h com 200  $\mu\text{M}$  de azacitidina, verificou-se uma diferença significativa (\*\* $p = 0,0062$ ) entre a densidade celular da linha HL-60 ( $0,05 \times 10^6$  células/mL  $\pm 0,01$ ) e da HL-60AZA ( $0,11 \times 10^6$  células/mL  $\pm 0,01$ ). A azacitidina induziu um efeito citostático que é dependente da dose (\*\* $p = 0,0062$ ) e da linha celular.

No entanto, nas células HL-60AZA a redução da densidade celular não é tão acentuada como nas células HL-60. Embora a azacitidina tenha induzido uma diminuição da densidade celular na linha celular HL-60AZA comparativamente ao controlo, esta diminuição foi menor do que a observada na linha celular parental em todas as concentrações testadas, sendo mais evidente para as concentrações inferiores ou iguais a 100  $\mu\text{M}$ .

A viabilidade celular da linha HL-60 e HL-60AZA correspondente a cada dose de fármaco e tempo de incubação (24h, 48h e 72h) estão representados na figura 18.



**Figura 18: Efeito da azacitidina (AZA) na viabilidade celular na linha HL-60 e HL-60AZA**

As células foram incubadas de acordo com o descrito no ponto 3.2. A cada 24h foram retiradas alíquotas da suspensão celular e realizou-se o teste de exclusão azul de tripano. Os resultados, expressos em percentagem (%) de viabilidade, representam a média  $\pm$  erro padrão de 5 a 14 ensaios independentes. A análise estatística foi efetuada utilizando o teste *t de student*, sendo \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

A diminuição da densidade celular das células HL-60 é acompanhada por uma diminuição da viabilidade celular. Como se pode observar na figura 18, a azacitidina induz uma diminuição da viabilidade celular da linha sensível, dependente da concentração do fármaco (\*\* $p = 0,0083$ ), do tempo de incubação (\*\* $p = 0,0002$ ) e do tipo de linha celular. Doses mais elevadas de



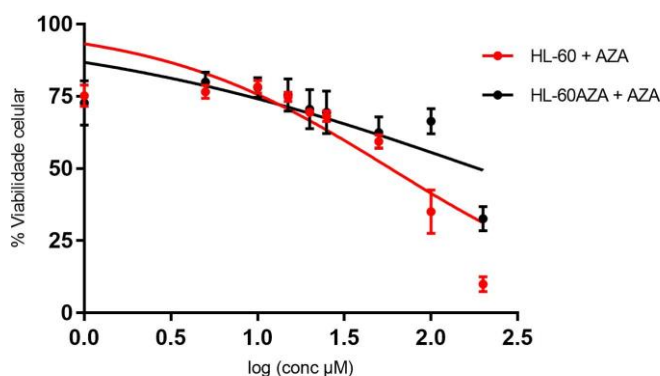
fármaco induzem maior diminuição da viabilidade da linha HL-60 comparando com a linha HL-60AZA.

Observou-se maior efeito citotóxico nas células HL-60 incubadas 72h com 50  $\mu\text{M}$ , cuja viabilidade observada ( $59,4\% \pm 2,14$ ), revelou valores inferiores em comparação com as células HL-60AZA ( $62,4\% \pm 5,06$ ).

As células HL-60 incubadas 72h com 200  $\mu\text{M}$  de azacitidina revelaram uma viabilidade de aproximadamente  $10\% \pm 2,34$ , enquanto que na sublinha resistente a viabilidade revelou valores superiores ( $32,6\% \pm 3,83$ ). Na linha celular HL-60 este efeito citotóxico observou-se com a dose 100  $\mu\text{M}$  de azacitidina, cuja viabilidade observada foi de  $35\% \pm 6,73$  na linha HL-60 (na sublinha resistente a viabilidade determinada foi de  $66,3\% \pm 4,02$ ).

Considerando estes resultados, a linha HL-60 mostrou ser mais sensível à azacitidina do que a linha HL-60AZA. A linha celular HL-60AZA apresentou algum grau de resistência à azacitidina.

Para determinar o  $\text{IC}_{50}$  (dose necessária para reduzir a viabilidade celular a 50%) com maior precisão, no final das 72 horas de incubação das células HL-60 e HL-60AZA com o fármaco azacitidina, efetuou-se a regressão não linear do logaritmo (Log) da concentração ( $\mu\text{M}$ ) em função da % de viabilidade celular (figura 19).

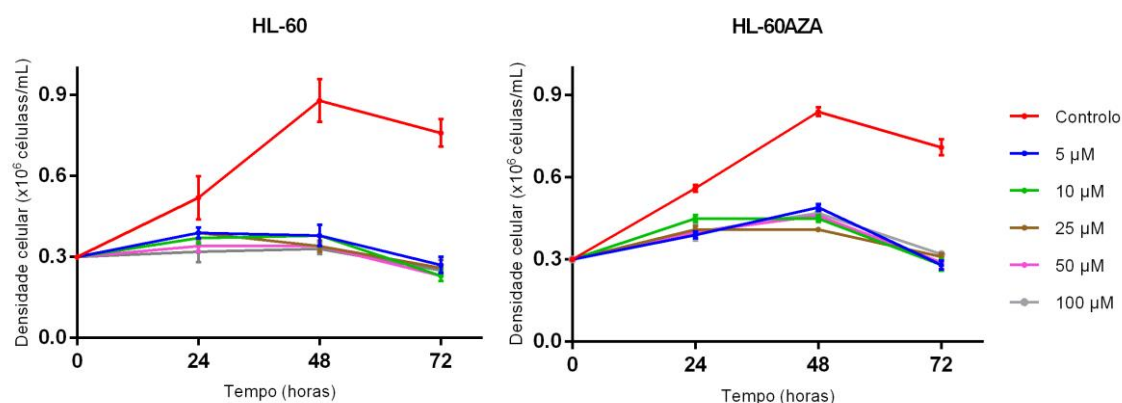


**Figura 19: Regressão logarítmica do  $\text{IC}_{50}$  da azacitidina nas linhas HL-60 e HL-60AZA.** O gráfico representa a regressão logarítmica do  $\text{IC}_{50}$  da azacitidina nas linhas celulares HL-60 e HL-60AZA às 72h de incubação. A cada 24h foram retiradas alíquotas da suspensão celular e realizou-se o teste de exclusão azul de tripano. Os resultados, expressos em percentagem (%) representam a média  $\pm$  erro padrão de 5 a 14 ensaios independentes. A análise estatística foi efetuada utilizando a regressão não linear.

O  $\text{IC}_{50}$  estimado de azacitidina após 72h de incubação foi de aproximadamente  $58,5 \mu\text{M}$  para a linha HL-60 e  $187,1 \mu\text{M}$  para a linha HL-60AZA. Uma vez que o nível de resistência pode ser quantificado pela comparação entre o

IC<sub>50</sub> da linha HL-60 e HL-60AZA, calculou-se o número de vezes que é necessário aumentar a dose de fármaco na linha resistente, em relação à linha sensível para se atingir o mesmo efeito. Assim, as células HL-60AZA necessitaram de uma dose de azacitidina 3,2 vezes superior às células HL-60.

A figura 20 representa a densidade celular ( $\times 10^6$  células/mL) da linha HL-60 e HL-60AZA, respetivamente, a cada tempo de incubação (24h, 48h e 72h) com o fármaco decitabina. O objetivo de realizar incubações com a decitabina nas células resistentes e nas células sensíveis foi determinar a resistência cruzada dos fármacos e perceber se a decitabina induz um efeito citostático e citotóxico distinto da azacitidina, ou seja, se constitui uma melhor abordagem terapêutica nos quadros de resistência à azacitidina.

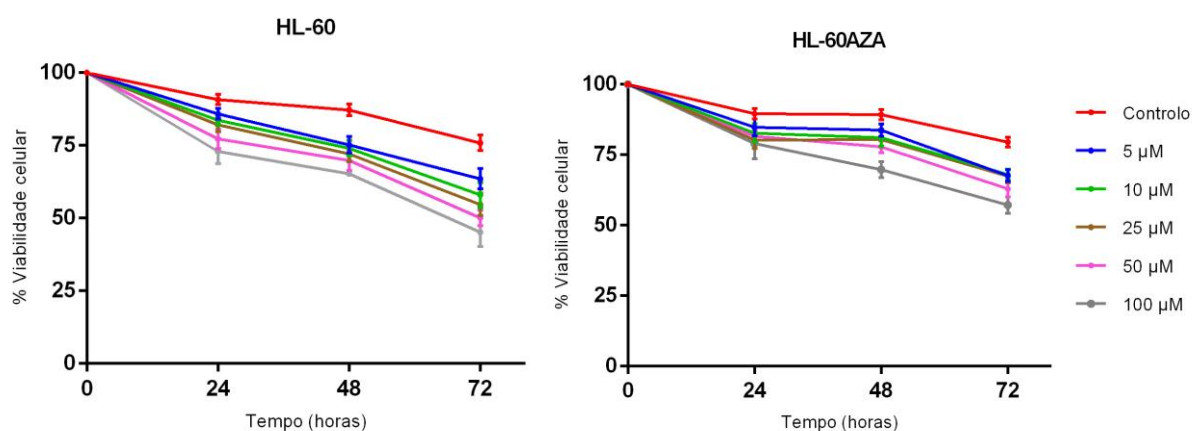


**Figura 20: Efeito da decitabina (DAC) na proliferação das células HL-60 e HL-60AZA.**

As células foram incubadas de acordo com o descrito no ponto 3.2. A cada 24h foram retiradas alíquotas da suspensão celular e realizou-se o teste de exclusão azul de tripano. Os resultados, expressos em  $\times 10^6$  células/mL, representam a média  $\pm$  erro padrão de 5 a 12 ensaios independentes. A análise estatística foi efetuada utilizando o teste *t de student*, sendo \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . O efeito citostático é dependente da concentração (HL-60: \* $p = 0,0262$ ; HL-60AZA: \* $p = 0,0313$ ), do tempo de incubação (HL-60: \*\* $p = 0,0015$ ; HL-60AZA: \*\* $p = 0,0020$ ).

Verifica-se pela análise da figura 20, que a decitabina induziu um decréscimo da proliferação das células HL-60 e HL-60AZA, relativamente ao controlo. O efeito citostático induzido pela decitabina revelou ser dependente da concentração do fármaco e do tipo de linha celular, sendo mais significativo às 72h de incubação, e nas células HL-60. De facto, observa-se uma maior proliferação das células HL-60AZA ( $0,32 \times 10^6$  células/mL  $\pm 0,02$ ) em comparação com a linha celular sensível ( $0,25 \times 10^6$  células/mL  $\pm 0,02$ ) quando ambas tratadas com a dose máxima utilizada, ou seja 100  $\mu$ M de decitabina. A decitabina induziu um efeito citostático superior nas células sensíveis HL-60 em relação às células resistentes.

Na figura 21 está representado o efeito da decitabina na viabilidade celular das linhas HL-60 e HL-60AZA, respetivamente, durante 72 horas de incubação.



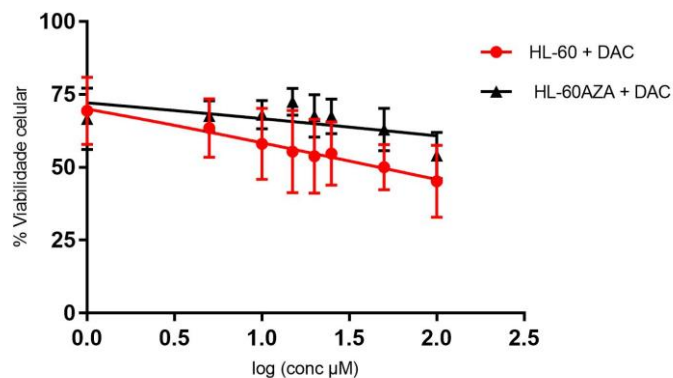
**Figura 21: Efeito da decitabina (DAC) na viabilidade celular na linha HL-60 e HL-60AZA**

As células foram incubadas de acordo com o descrito no ponto 3.2. A cada 24h foram retiradas alíquotas da suspensão celular e realizou-se o teste de exclusão azul de tripano. Os resultados, expressos em percentagem (%) de viabilidade, representam a média  $\pm$  erro padrão de 5 a 14 ensaios independentes. O efeito citotóxico da decitabina foi dependente do tempo (HL-60: \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; HL-60AZA: \* $p = 0,0142$ ). A análise estatística foi efetuada utilizando o teste *t de student*, sendo \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Pela análise da figura 21 é possível observar uma diminuição superior da viabilidade celular nas células HL-60 comparativamente com as células HL-60AZA, e para a mesma concentração de fármaco. Aquando da incubação de 72h com 50  $\mu\text{M}$  de decitabina, as células HL-60 apresentaram uma viabilidade inferior (50,1%  $\pm$  2,72), em comparação com as células HL-60AZA (62,9%  $\pm$  2,91). A viabilidade das células HL-60 incubadas 72h com 100  $\mu\text{M}$  de decitabina revelou valores inferiores (45,2 %  $\pm$  4,91) comparativamente às células HL-60AZA (54  $\pm$  2,95).

A decitabina induziu um efeito citotóxico em ambas as linhas celulares dependente do tempo e linha celular. O efeito citotóxico revelou ser dependente da concentração de fármaco nas células HL-60 (\* $p = 0,0104$ ) e nas células HL-60AZA (\* $p = 0,0313$ ).

Tal como para a azacitidina, o  $\text{IC}_{50}$  da decitabina foi estimado recorrendo a uma regressão não linear do Log da concentração ( $\mu\text{M}$ ) em função da % de viabilidade celular, no final das 72h de incubação das linhas celulares HL-60 e HL-60AZA (figura 22).



**Figura 22: Regressão logarítmica do IC50 da decitabina nas linhas HL-60 e HL-60AZA.** O gráfico representa a regressão logarítmica do IC50 da decitabina nas linhas celulares HL-60 e HL-60AZA às 72h de incubação. A cada 24h foram retiradas alíquotas da suspensão celular e realizou-se o teste de exclusão azul de tripiano. Os resultados, expressos em percentagem (%) representam a média  $\pm$  erro padrão de 5 a 12 ensaios independentes. A análise estatística foi efetuada utilizando a regressão não linear.

A dose de decitabina necessária para reduzir a viabilidade celular a 50% (IC<sub>50</sub>), após 72h de exposição, é de aproximadamente 46,9  $\mu$ M para a linha HL-60 e 5195  $\mu$ M para a linha HL-60AZA. Assim, a sublinha celular HL-60AZA revelou ser 110,8 vezes mais resistente, comparativamente à linha celular sensível, sugerindo a presença de resistência cruzada. A decitabina parece ser uma opção terapêutica mais eficaz nas células HL-60, comparativamente à azacitidina, uma vez que os mesmos efeitos citotóxicos e citostáticos são obtidos com concentrações mais baixas.

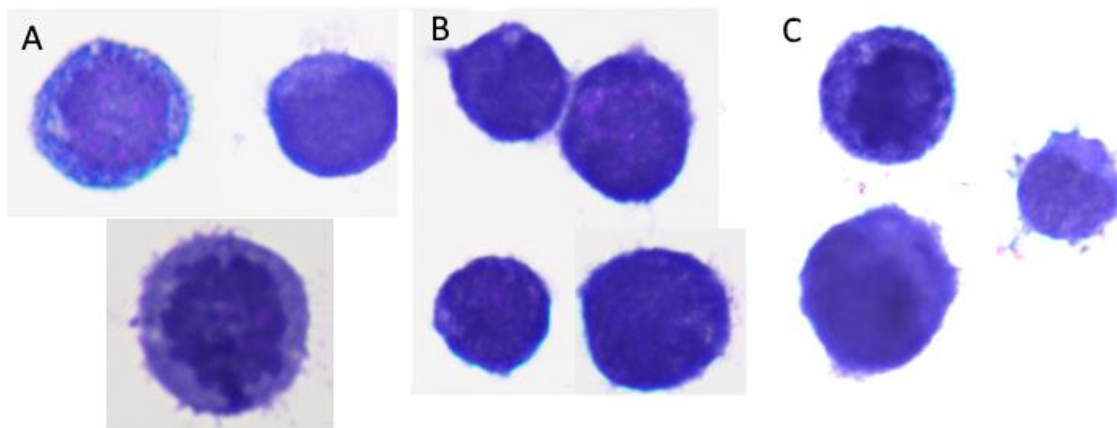
#### 4.3. Avaliação do efeito da azacitidina na morfologia celular

De seguida avaliou-se a morfologia celular em ambas as células após 72h de incubação com 5  $\mu$ M e 50  $\mu$ M de azacitidina. A dose de 5  $\mu$ M de azacitidina foi a dose em que as células resistentes foram mantidas em cultura. A dose de 50  $\mu$ M foi escolhida pois revelou ser a dose mais elevada sem induzir muita morte celular. O objetivo consistiu em analisar a morfologia nas células HL-60 e HL-60AZA após incubação. Os resultados estão representados nas figuras 23 e 24.

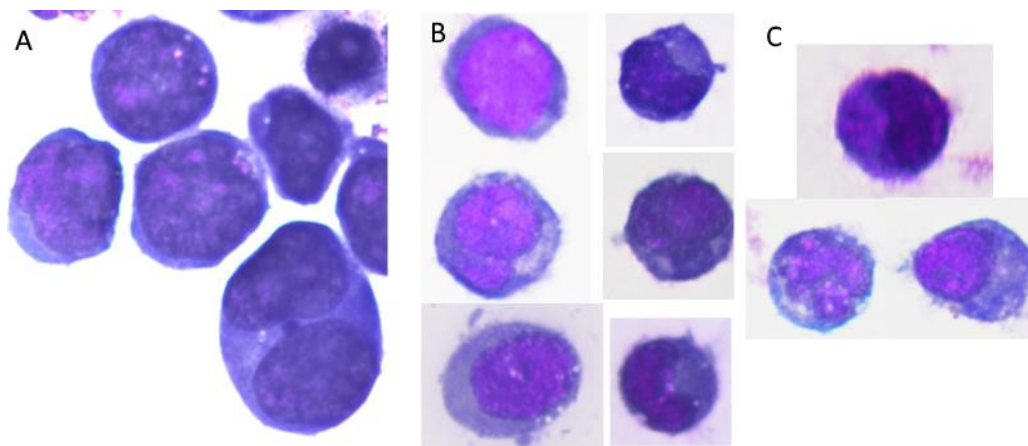
Na situação controlo (figuras 23A e 24A) observaram-se as características de promielócitos: elevada razão núcleo-citoplasma, presença de nucléolos e citoplasma basofílico. Observou-se também a presença de alguns vacúolos nas células HL-

60AZA (figura 24A), que se explica pelo facto de as células HL-60AZA, na situação controlo, cresceram na ausência de fármaco.

As células resistentes, HL-60AZA incubadas 72h com 5  $\mu$ M de azacitidina apresentaram uma morfologia com menor vacuolização do que as células HL-60AZA controlo (sem incubação de fármaco) (figura 24). As células HL-60 incubadas 72h com 5  $\mu$ M de azacitidina apresentaram uma estrutura com menor razão núcleo-citoplasma, comparativamente à situação controlo (figura 23B) e às células HL-60AZA incubadas nas mesmas condições (figura 24B). Na incubação de 50  $\mu$ M de azacitidina (figuras 23C e 24C), em ambas as células HL-60 e HL60AZA se observou maior vacuolização e comprometimento da membrana celular.



**Figura 23: Aspectos morfológicos das células HL-60 após 72h de incubação com azacitidina.** A. Condição controlo. B. Incubação com 5  $\mu$ M de azacitidina. C. Incubação com 50  $\mu$ M de azacitidina. Os esfregaços das células foram corados com solução de *May-Grünwald-Giemsa* e observados ao microscópio ótico de acordo com o descrito no ponto 3.5 (ampliação de 500x).

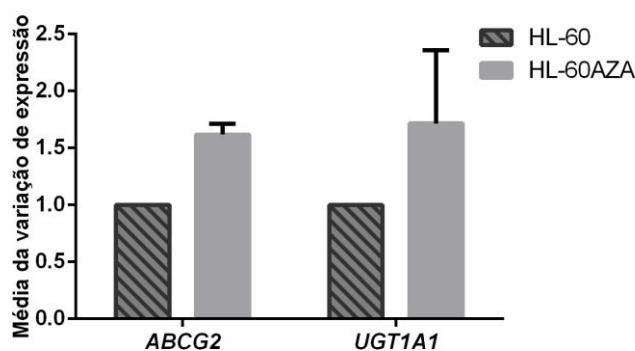


**Figura 24: Aspectos morfológicos das células HL-60AZA após 72h de incubação com azacitidina.** A. Condição controlo. B. Incubação com 5  $\mu$ M de azacitidina. C. Incubação com 50  $\mu$ M de azacitidina. Os esfregaços das células foram corados com solução de *May-Grünwald-Giemsa* e observados ao microscópio ótico de acordo com o descrito no ponto 3.5 (ampliação de 500x).

#### 4.4. Análise dos transportadores e enzima

A resistência à quimioterapia é frequentemente associada a alterações no perfil de expressão de transportadores membranares e nucleares envolvidos no transporte de inúmeros fármacos, e ainda em enzimas do metabolismo, de que é exemplo, a UGT1A1, uma enzima envolvida na metabolização dos fármacos hipometilantes utilizados no presente trabalho.

A avaliação dos níveis de expressão dos genes *ABCG2* e *UGT1A1* foi determinada recorrendo ao método qRT-PCR (figura 25) e normalizada à linha celular HL-60.



**Figura 25: Níveis de expressão dos genes *ABCG2* e *UGT1A1* na linha celular HL-60 e na sublinha resistente HL-60AZA por qRT-PCR.** A expressão dos genes referidos foi efetuada a partir de 3 amostras independentes de DNA. Os resultados representam a média da variação da expressão génica  $\pm$  erro padrão de 3 amostras independentes. A análise estatística foi efetuada utilizando o teste *t de student*, não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas.

Como podemos observar na figura 25, a média de variação da expressão génica do gene *ABCG2*, na sublinha HL-60AZA é 1,6x superior à da linha HL-60. O mesmo se verificou para a enzima UGT1A1, em que na sublinha HL-60AZA a expressão foi 1,7x superior à da linha sensível HL-60. No entanto, estas diferenças não são estatisticamente significativas.

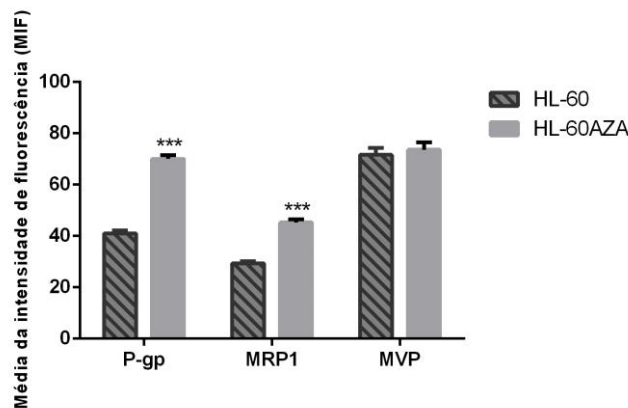
Os níveis de expressão proteica e a percentagem de células que expressam os transportadores membranares glicoproteína-P e MRP1, bem como o transportador da membrana nuclear MVP, foram avaliados recorrendo à técnica citometria de fluxo (figuras 26 e 27, respetivamente).

Relativamente à glicoproteína-P, observou-se um aumento significativo (\*\*\*)  $p = 0,0001$ ) da expressão desta proteína nas células resistentes ( $70 \pm 1,25$  MIF) em comparação com as células sensíveis HL-60 ( $41 \pm 0,94$  MIF) (figura 26). No mesmo

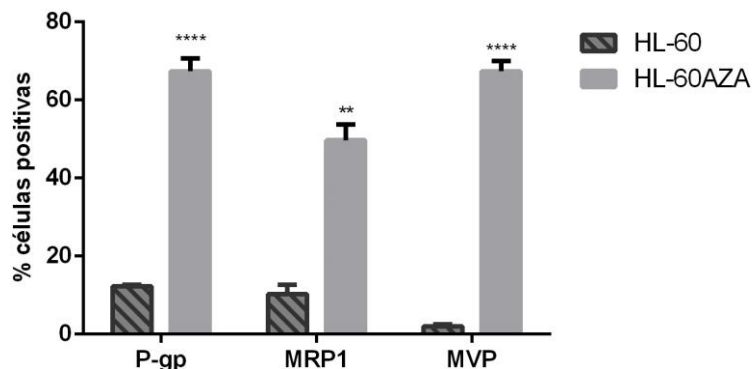
sentido, detetou-se uma maior percentagem de células HL-60AZA a expressar P-gp ( $67,3\% \pm 2,72$ ;  $****p < 0,0001$ ) comparativamente às células HL-60 ( $12,3\% \pm 0,27$ ) (figura 27).

O mesmo se observou para o transportador MRP1, cuja expressão nas células HL-60AZA foi significativamente superior ( $45 \pm 0,98$  MIF;  $***p = 0,0004$ ) em relação às células sensíveis ( $29,3 \pm 0,72$  MIF) (figura 26); e um aumento na percentagem de células com o transportador ( $53\% \pm 1,89$ ;  $**p = 0,0011$ ), comparativamente às células HL-60 ( $12,3\% \pm 0,27$ ;  $10,3\% \pm 1,91$ ) (figura 27).

Em relação ao transportador MVP, encontrou-se uma maior percentagem de células que expressam o transportador nas células resistentes ( $67,3\% \pm 2,13$ ;  $****p < 0,0001$ ) em comparação com as células sensíveis ( $2\% \pm 0,47$ ) (Figura 27). No entanto estes 2% de células expressam o transportador MVP com intensidade semelhante em ambas as populações celulares (HL-60:  $71,7 \pm 2,13$  MIF; HL-60AZA:  $73,7 \pm 2,37$  MIF).



**Figura 26: Avaliação da expressão dos transportadores glicoproteína-P, MRP1 e MVP por citometria de fluxo.** A expressão membranar está expressa em média de intensidade de fluorescência (MIF) total nas linhas celulares HL-60 e HL-60AZA. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efetuada por comparação à linha HL-60 utilizando o teste *t de student*, sendo  $*** p < 0,001$ .



**Figura 27: Avaliação da percentagem de células positivas que expressam os transportadores glicoproteína-P, MRP1 e MVP por citometria de fluxo.** Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efetuada por comparação à linha HL-60 utilizando o teste *t de student*, sendo  $** p < 0,01$ ,  $*** p < 0,001$ .





---

## DISCUSSÃO

---



## CAPITULO V - DISCUSSÃO

### 5.1. Efeito da azacitidina e decitabina num modelo *in vitro* de leucemia mieloide aguda

A azacitidina e a decitabina são dois fármacos hipometilantes que estão aprovados pela FDA e/ou EMA (European Medicines Agency) para o tratamento da SMD e de alguns subtipos de LMA. No entanto, alguns doentes são resistentes a este tipo de fármacos, não sendo totalmente conhecidos os mecanismos envolvidos na resistência que conduzem à falência da terapêutica (Kantarjian *et al*, 2007; Nimer, 2008; Stresemann & Lyko, 2008; Qin *et al*, 2009; Cortesão, 2010, Qin *et al*, 2011, Sarmiento-Ribeiro *et al*, 2012). Neste sentido, no presente trabalho, avaliaram-se alguns dos possíveis mecanismos moleculares envolvidos na resistência à azacitidina, em particular avaliaram-se os níveis de expressão proteica de transportadores de efluxo (glicoproteína-P, MRP1 e MVP) e de expressão génica do transportador *ABCG2* assim como da enzima de metabolismo *UGT1A1*. Além disso, pretendeu-se também analisar se o desenvolvimento de resistência à azacitidina induz resistência cruzada à decitabina, outro agente hipometilante.

Para a realização deste trabalho experimental foi utilizada uma linha celular de um subtipo de leucemia mieloide aguda, as células HL-60 e estabelecida uma sublinha resistente ao fármaco azacitidina, as células HL-60AZA.

Nos testes de densidade e viabilidade celulares, a azacitidina induziu maior efeito citostático nas células sensíveis à azacitidina, HL-60, do que nas células resistentes, HL-60AZA, sendo este efeito dependente da concentração do fármaco e do tipo de linha celular. Este efeito citostático foi menos acentuado na linha celular HL-60AZA para concentrações inferiores a 100  $\mu\text{M}$ . Avaliando a viabilidade celular verificou-se que para além do efeito citotóxico ser dependente da concentração de azacitidina, do tempo de incubação e da linha celular, o  $\text{IC}_{50}$  da linha HL-60AZA foi de 187,1  $\mu\text{M}$  e o da linha HL-60 de 58,5  $\mu\text{M}$ , o que demonstra que as células HL-60AZA são cerca de 3,2 vezes mais resistentes à azacitidina relativamente às células parentais sensíveis.

Quando as células foram tratadas com decitabina observou-se um efeito citostático e citotóxico dependente da concentração do fármaco, do tempo de

incubação e da linha celular. O IC<sub>50</sub> da decitabina na linha HL-60AZA foi de 5195 µM e o na linha HL-60 de 46,9 µM, demonstrando que as células HL-60AZA são 110,8 vezes mais resistentes à decitabina (comparativamente à linha parental), sugerindo a presença de resistência cruzada. Uma vez que o presente estudo sugere que as células HL-60 são mais sensíveis à decitabina do que à azacitidina (IC<sub>50</sub> da decitabina corresponde a 46,9 µM comparativamente ao da azacitidina que corresponde a 58,5 µM), a decitabina parece ser uma opção terapêutica mais eficaz nas células HL-60, mas não indicada para as células resistentes HL-60AZA.

Em alguns estudos os autores referem que a azacitidina (cujas doses variaram entre 0,02 µM a 50 µM) induziu um efeito citostático dependente da dose em linhas celulares de LMA (SKM-1, HL-60 e THP-1) (Hollenbach *et al.*, 2010; Kimura *et al.* 2012). Um estudo de Cortesão (2012), em que foi testado o efeito da decitabina numa linha celular de LMA secundária, a síndrome mielodisplásica (células F36P), revelou igualmente um efeito citotóxico dependente do tempo e da concentração do fármaco. No entanto, o IC<sub>50</sub> foi superior (aproximadamente de 500 µM) ao obtido no nosso trabalho, confirmando que o efeito do fármaco é dependente da linha celular em estudo. Os autores sugerem ainda que a DAC poderá constituir uma nova abordagem terapêutica na SMD, podendo ser administrado num esquema terapêutico diário em baixas concentrações com diminuição da toxicidade secundária do fármaco. Num estudo de Ren e colaboradores (2015), em que foi avaliado o potencial terapêutico da DAC em monoterapia em células HL-60, os autores verificaram que a inibição da proliferação induzida por este composto foi dependente do tempo de exposição e da dose de fármaco.

Vários autores estudaram o efeito da decitabina em linhas celulares de leucemia, linfoma e mieloma (HL-60, Raji, ML-1, Jurkat, ARH-77, HS-Sultan, OPM-2 e RPMI 8226) e observaram um efeito citostático dependente da dose, cujos valores de IC<sub>50</sub> determinados foram entre 0,2 µM e 1,2 µM (nas primeiras quatro linhas celulares referidas) e 4,9 x 10<sup>-2</sup> µM a 2,1 x 10<sup>-2</sup> µM (nas restantes) (Lavelle *et al.*, 2003, Qin *et al.*, 2007). Estes valores de IC<sub>50</sub> são diferentes dos obtidos no presente trabalho experimental uma vez que as linhas celulares dos estudos são diferentes e o período de incubação foi superior (96h).

Num estudo em linhas celulares de leucemia mieloblástica aguda (SKM-1 e MOLM-13) resistentes à azacitidina, os autores determinaram um valor de IC<sub>50</sub> 10x superiores nas linhas resistentes do que nas linhas parentais. Os mesmos autores após

incubação das linhas celulares resistentes com os fármacos citarabina e gemcitabina (antimetabolitos análogos de nucleósidos) demonstraram a presença de resistência cruzada (Murase *et al*, 2016).

Um estudo realizado por Sarmiento-Ribeiro e colaboradores (2012), em linhas celulares de leucemia linfoblástica aguda T, uma sensível (CEM) e outra resistente à azaguanina (CM3), refere igualmente um efeito citostático e citotóxico dependentes da dose, do tempo de incubação e da linha celular. O valor de IC<sub>50</sub> da azaguanina nas células CEM foi aproximadamente 10 µM, às 48h, não tendo sido atingido nas células resistentes com as doses testadas. Este valor é diferente do obtido no presente trabalho uma vez que as linhas celulares e o fármaco usados são diferentes. Observaram ainda uma ausência de resistência cruzada entre os análogos de nucleósidos e antraciclinas e alcaloides da vinca, sugerindo alternativas terapêuticas em casos de resistência farmacológica.

No presente trabalho observou-se resistência cruzada à decitabina nas células resistentes à azacitidina, indicando, em conjunto com os dados da literatura científica, que em caso de resistência a um análogo de nucleósido, haverá resistência a fármacos da mesma família. Neste caso específico, o tratamento com decitabina não será benéfico após o desenvolvimento de resistência à azacitidina.

## **5.2. Análise da expressão dos transportadores (ABCB1, ABCC1, ABCG2, MVP) e da enzima de metabolismo UGT1A1**

A falência da terapêutica está relacionada a maioria das vezes com o desenvolvimento de resistência aos fármacos no decurso do tratamento ou pela presença de resistência inata. Sabe-se, até à data, que a amplificação da expressão do gene *ABCG2* (que codifica a glicoproteína-P), responsável pelo efluxo de fármacos, e a diminuição do transportador *SLC29A1* (que codifica o transportador de influxo ENT1), estão envolvidos na *multidrug resistance*. No entanto a resistência a múltiplos fármacos é multifatorial, podendo estar envolvidos outros mecanismos, como por exemplo, outros transportadores, enzimas, alterações da composição da membrana da célula tumoral, formação de espécies reativas de oxigénio e/ou a libertação de substâncias antioxidantes e alterações na expressão de genes envolvidos

na regulação da morte celular por apoptose (Sarmiento-Ribeiro, 2002; Qin *et al*, 2007; Qin *et al*, 2009; Sarmiento-Ribeiro *et al*, 2012; Alves, 2015).

Neste trabalho analisou-se a expressão de vários transportadores relacionados com os fármacos em estudo, assim como de uma enzima envolvida no metabolismo dos azanucleósidos, de modo a aferir o seu papel na resistência à azacitidina. Para tal, avaliou-se a expressão génica do transportador membranar *ABCG2* e da enzima *UGT1A1* e a expressão proteica dos transportadores P-gp, MRP1 e MVP.

Os nossos resultados mostram que as células resistentes à azacitidina, HL-60AZA, apresentam níveis de expressão mais elevados dos genes *ABCG2* e *UGT1A1* (cerca de 1,6 vezes e 1,7 vezes, respetivamente) relativamente à linha parental HL-60, o que pode contribuir para o desenvolvimento de resistência e consequente falência da terapêutica. No entanto, as diferenças observadas não evidenciaram ser estatisticamente significativas.

A expressão do gene *ABCG2* foi reportada em diversos tipos de cancro, como é o exemplo das leucemias (Chigaev, 2015). No entanto, a bibliografia científica é contraditória, quer no que diz respeito aos níveis de expressão (aumento ou diminuição da expressão em LMA e leucemia linfoblástica aguda (LLA)), e à importância clínica deste gene (Abbott *et al*, 2002; Steinbach *et al*, 2002; Sauerbrey *et al*, 2002; Plasschaert *et al*, 2003). Alguns autores referem uma elevada expressão do gene *ABCG2* e/ou da proteína codificada por este gene, a proteína BCRP, em linhas celulares de leucemias e melanoma (HL-60, RF-10, K562-RD e K562-RC, K562/DOX, AR230) resistentes a fármacos inibidores da tirosina cinase (imatinib e nilotinib, flavopiridol) e doxorubicina (DOX) (Mahon *et al*, 2003; Nakanishi *et al*, 2006; Brendel *et al*, 2007; Alves, 2011).

A inativação génica e/ou proteica, ou mesmo uma alteração na atividade da enzima UGT1A1, poderão estar associados à ausência de excreção dos fármacos. No entanto, a exposição prolongada aos fármacos pode levar ao desenvolvimento de resistência (Ohno & Nakajin 2009; Gammal *et al*, 2016; Goey & Figg, 2016). Alguns autores referem em doentes com LMA e em linhas celulares de adenocarcinoma da mama resistentes a fármacos (citarabina, ribavirina e etoposido) elevada expressão do gene *UGT1A1* (Ross *et al*, 2000; Van den Heuvel-Eibrink *et al*, 2002; Benderra *et al*, 2005; Marques & Ikediobi, 2010; Borden, 2014; Marin *et al*, 2016). Estes estudos indicam que a enzima de metabolismo UGT1A1 poderá ter um papel essencial no desenvolvimento de resistência aos azanucleósidos.

Além do aumento da expressão dos genes *ABCG2* e *UGT1A1*, observou-se também que a sublinha resistente à azacitidina apresentou um aumento acentuado dos níveis de expressão e da percentagem de células que expressam os transportadores membranares, glicoproteína-P e MRP1, comparativamente à linha celular sensível ao fármaco. Em relação ao transportador MVP apesar de se ter observado maior percentagem de células resistentes que a expressam, os níveis de expressão são elevados em ambas as linhas celulares. Estes resultados podem indicar que o aumento de expressão destes transportadores poderá estar relacionado com a resistência ao fármaco.

Em alguns estudos observaram-se elevados níveis de expressão do gene *ABCB1* e da proteína P-gp em células resistentes a antraciclina (daunorubicina) e a um inibidor de tiroina cinase (imatinib) em doentes com leucemia e em linhas celulares de leucemia (Ross *et al*, 2000; Van den Heuvel-Eibrink *et al*, 2002; Benderra *et al*, 2005; Alves, 2011). Um estudo de Benderra e colaboradores (2005), em células HL-60 resistentes à daunorubicina, revelou valores superiores da expressão do transportador MRP1 relativamente às células sensíveis à antraciclina. Um estudo de Momparler (2005) em que foram avaliados os níveis de expressão génica, por qRT-PCR, não se observaram diferenças significativas dos transportadores *MDR1*, *hENT1*, *hENT2*, *DCK* e *CDA*, no momento do diagnóstico e após recaída em doentes com SMD. Referem ainda, de acordo com os seus resultados, que doentes com resistência à decitabina poderão beneficiar do tratamento com azacitidina. Um aumento de expressão do transportador MRP1 pode induzir um aumento do efluxo dos fármacos. Assim, a concentração de fármaco intracelularmente é reduzida, podendo ter influência no desenvolvimento de resistência farmacológica.

Por fim, o transportador MVP diminui a eficácia dos fármacos citotóxicos por regulação do transporte núcleo-citoplasma destes compostos para fora do núcleo ou mesmo por aprisionamento em vesículas exocíticas, demonstrado o seu papel na resistência à vincristina, doxorubicina e etoposido. Este transportador parece ter um papel importante no desenvolvimento de resistência à azacitidina (Schroeijers *et al*, 2000; Meschini *et al*, 2002; Kozlov *et al*, 2006; Yasunami *et al*, 2007; El-Sharnouby *et al*, 2010).

### 5.3. Análise dos perfis de metilação de genes supressores tumorais

Sabe-se que doentes com diversas leucemias apresentam várias alterações epigenéticas e genéticas no seu genoma. É deveras importante fazer a associação dessas modificações com o prognóstico, possibilitando a longo prazo um prognóstico preciso e personalizado, possibilitando a seleção dos doentes que poderão ou não responder à terapêutica com os fármacos hipometilantes. Será importante também para o desenvolvimento de terapias moleculares mais eficazes e dirigidas.

Deste modo, neste trabalho realizou-se a análise da metilação nas células HL-60 e HL-60AZA de forma a perceber se a resistência induziu alteração na metilação de alguns genes supressores tumorais. Não se observaram diferenças na metilação entre a linha celular HL-60AZA e HL-60. Alguns autores referem, após o tratamento com azacitidina e decitabina na linha celular HL-60, assim como em doentes com LMA e leucemia mieloide crónica com a combinação terapêutica de azacitidina, ácido valpróico e ATRA, uma hipometilação nos genes *p16*, *DAPK* e *MGMT* (Yang *et al*, 2006; Soriano *et al*, 2007; Su *et al*, 2012).

Vários estudos têm associada a hipermetilação génica (genes *MGMT*, *p15*, *HIC1*, *CDH1*, *ER*, *p53*, *CDH13*) ao desenvolvimento de neoplasias hematológicas (Johan *et al*, 2005; Aggerholm *et al*, 2006; Jiang *et al*, 2009; Valencia *et al*, 2011).

Um estudo de Qin e colaboradores (2011) em que foi avaliada a metilação global do gene *CDH13*, entre outros, em doentes nos estádios iniciais de leucemia mieloide crónica, referem que a metilação do DNA não está envolvida na resistência farmacológica. O estudo sugere que um dos mecanismos de resistência farmacológica adquirida é a ausência de hipermetilação no momento da recaída.

No entanto, o presente trabalho foi o primeiro a comparar o perfil de metilação de genes supressores tumorais em linhas celulares sensíveis e resistentes a agentes hipometilantes. Os resultados deste trabalho indicam que a resistência não está relacionada com a metilação dos genes supressores tumorais estudados.



---

## **CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS**

---



## CAPITULO VI - CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Este trabalho sugere que a resistência à azacitidina num modelo *in vitro* de leucemia mieloide aguda/leucemia promielocítica aguda induz resistência cruzada a outro hipometilante, a decitabina. No entanto, este hipometilante parece ser uma melhor opção terapêutica neste subtipo de leucemia aguda uma vez que os mesmos efeitos citotóxicos e citostáticos são obtidos com concentrações mais baixas. Além disso, verificou-se que a resistência à azacitidina é dependente do aumento dos níveis de expressão dos transportadores membranares glicoproteína-P, MRP1, BCRP e do transportador nuclear MVP.

Como perspectivas futuras sugiro expandir este trabalho a outras linhas celulares de outras leucemias e síndrome mielodisplásica, assim como em doentes com as mesmas patologias.

Seria deveras importante analisar a atividade dos transportadores membranares e nuclear, uma vez que, estes transportadores podem ter alterações da sua função de transporte. A atividade da enzima UGT1A1 pode estar igualmente afetada numa situação de resistência farmacológica, portanto seria importante avaliar a sua atividade metabólica.

As enzimas metabólicas responsáveis pela ativação da azacitidina e decitabina intracelularmente, através de fosforilações consecutivas, podem influenciar o desenvolvimento de resistência à azacitidina. Nomeadamente refiro as enzimas deoxicitidina cinase (DCK), uridina-citidina cinase (UCK) e citidina desaminase (CDA), sendo fundamental avaliar os níveis de expressão destas enzimas e atividade enzimática, uma vez que a alteração destas enzimas poderá correlacionar-se com o desenvolvimento de resistência.

Por outro lado, seria também importante avaliar outras abordagens terapêuticas que potencialmente possam ultrapassar a resistência à azacitidina. A 3-deazauridina (3-DU) é um agente com potencial de superar a resistência aos hipometilantes, constituindo assim uma terapêutica a testar. Este composto poderá ser particularmente importante no caso de resistência associada a perda de DCK uma vez que células leucémicas que não possuem esta proteína são muito sensíveis à ação citotóxica da 3-DU (Raynal *et al*, 2011).



---

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



## CAPITULO VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, B. L., Colapietro, A. M., Barnes, Y., Marini, F., Andreeff, M., & Sorrentino, B. P. (2002). Low levels of ABCG2 expression in adult AML blast samples. *Blood*, 100(13), 4594-4601.
- Adams, J., & Nassiri, M. (2015). Acute promyelocytic leukemia: a review and discussion of variant translocations. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 139(10), 1308-1313.
- Aggerholm, A., Holm, M. S., Guldborg, P., Olesen, L. H., & Hokland, P. (2006). Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *European journal of haematology*, 76(1), 23-32.
- Alberts, B., et al (2007). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science. 5ª edição. 1450-1462
- Altucci, L., Clarke, N., Nebbioso, A., Scognamiglio, A., & Gronemeyer, H. (2005). Acute myeloid leukemia: therapeutic impact of epigenetic drugs. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(9), 1752-1762.
- Alves, R. (2011). Avaliação molecular dos mecanismos envolvidos na sensibilidade e resistência ao Imatinib independente do BCR-ABL em Leucemia mielóide crônica. Dissertação de Mestrado. Coimbra
- Alves, R., Fonseca, A. R., Goncalves, A. C., Ferreira-Teixeira, M., Lima, J., Abrantes, A. M., ... & Carreira, I. M. (2015). Drug transporters play a key role in the complex process of Imatinib resistance in vitro. *Leukemia research*, 39(3), 355-360.
- Amaral, S. I. D. (2012). Um olhar sobre a biologia e a clínica das síndromes mielodisplásicas. Dissertação de doutoramento, Coimbra.
- Ambudkar, S. V., Kim, I. W., & Sauna, Z. E. (2006). The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *European journal of pharmaceutical sciences*, 27(5), 392-400.
- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., ... & Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, blood-2016.
- Atalay, C., Demirkazik, A., & Gunduz, U. (2013). Role of ABCB1 and ABCC1 gene induction on survival in locally advanced breast cancer. *Journal of chemotherapy*.
- B. D. Biosciences, "Introduction to flow cytometry: A learning guide," Becton, Dickinson and Company, Vols. 1 Manual Part, (11-11032), 01, 2000.
- Bastidas, O. (2013). Cell counting with Neubauer chamber, basic hemocytometer usage. *Celeromics*.
- Baylin, S. B. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature clinical practice Oncology*, 2, S4-S11.
- Benderra, Z., Faussat, A. M., Sayada, L., Perrot, J. Y., Tang, R., Chaoui, D., ... & Legrand, O. (2005). MRP3, BCRP, and P-glycoprotein activities are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia. *Clinical cancer research*, 11(21), 7764-7772.
- Birnie, G. D. (1988). The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation. *The British journal of cancer. Supplement*, 9, 41.
- Borden, K. L. (2014). When will resistance be futile?. *Cancer research*, 74(24), 7175-7180.
- Borst, P. (2012). Cancer drug pan-resistance: pumps, cancer stem cells, quiescence, epithelial to mesenchymal transition, blocked cell death pathways, persists or what?. *Open biology*, 2(5), 120066.
- Bower & Waxman (2006). *Compêndio de Oncologia*, Instituto Piaget, 71.

- Brendel, C., Scharenberg, C., Dohse, M., Robey, R. W., Bates, S. E., Shukla, S., ... & Boudriot, U. (2007). Imatinib mesylate and nilotinib (AMN107) exhibit high-affinity interaction with ABCG2 on primitive hematopoietic stem cells. *Leukemia*, 21(6), 1267-1275.
- Cardelli, M., Marchegiani, F., Corsonello, A., Lattanzio, F., & Provinciali, M. (2012). A review of pharmacogenetics of adverse drug reactions in elderly people. *Drug safety*, 35(1), 3-20.
- Chigae, A. (2015). Does aberrant membrane transport contribute to poor outcome in adult acute myeloid leukemia?. *Frontiers in pharmacology*, 6.
- Chmelarova, M., Krepinska, E., Spacek, J., Laco, J., Nekvindova, J., & Palicka, V. (2012). Methylation analysis of tumour suppressor genes in ovarian cancer using MS-MLPA. *Folia biologica*, 58(6), 246.
- Choi, S. H., Byun, H. M., Kwan, J. M., Issa, J. P. J., & Yang, A. S. (2007). Hydroxycarbamide in combination with azacitidine or decitabine is antagonistic on DNA methylation inhibition. *British journal of haematology*, 138(5), 616-623.
- Choudhuri, S., & Klaassen, C. D. (2006). Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *International journal of toxicology*, 25(4), 231-259.
- Constantinides PG, Jones PA, Gevers W. 1977. Functional striated muscle cells from nonmyoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature* 267:364–66
- Cortês, E. N. B. R. (2010). Nutrição e alterações epigenéticas na síndrome mielodisplásica. Dissertação de doutoramento, Coimbra.
- Derissen, E. J., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. (2013). Concise drug review: azacitidine and decitabine. *The oncologist*, 18(5), 619-624.
- Di Gennaro, E., Bruzzese, F., Caraglia, M., Abruzzese, A., & Budillon, A. (2004). Acetylation of proteins as novel target for antitumor therapy: review article. *Amino acids*, 26(4), 435-441.
- Diesch, J., Zwick, A., Garz, A. K., Palau, A., Buschbeck, M., & Götze, K. S. (2016). A clinical-molecular update on azanucleoside-based therapy for the treatment of hematologic cancers. *Clinical Epigenetics*, 8(1), 71.
- Ding, X. W., Wu, J. H., & Jiang, C. P. (2010). ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy. *Life sciences*, 86(17), 631-637.
- Durkin, W. J., Ghanta, V. K., Balch, C. M., Davis, D. W., & Hiramoto, R. N. (1979). A methodological approach to the prediction of anticancer drug effect in humans. *Cancer research*, 39(2 Part 1), 402-407.
- Einav Nili, G. Y., Saito, Y., Egger, G., & Jones, P. A. (2008). Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy. *Annu. Rev. Med.*, 59, 267-280.
- El-Sharnouby, J. A., El-Enein, A. M. A., El Ghannam, D. M., El-Shanshory, M. R., Hagag, A. A., Yahia, S., & Elashry, R. (2010). Expression of lung resistance protein and multidrug resistance-related protein (MRP1) in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 16(3), 179-188.
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics*, 8(4), 286-298.
- Feinberg, A. P., & Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews Cancer*, 4(2), 143-153.
- Feinberg, A. P. (2007). Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*, 447(7143), 433-440.
- Fukuda, Y., & Schuetz, J. D. (2012). ABC transporters and their role in nucleoside and nucleotide drug resistance. *Biochemical pharmacology*, 83(8), 1073-1083.
- Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., ... & Gallo, R. (1979). Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 54(3), 713-733.



- Galmarini, C. M., Mackey, J. R., & Dumontet, C. (2001). Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia* (08876924), 15(6).
- Gammal, R. S., Court, M. H., Haidar, C. E., Iwuchukwu, O. F., Gaur, A. H., Alvarells, M., ... & Ratain, M. J. (2015). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for UGT1A1 and Atazanavir Prescribing. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*.
- Goey, A. K., & Figg, W. D. (2016). UGT genotyping in belinostat dosing. *Pharmacological research*, 105, 22-27.
- Gonçalves, A.C. (2015). Oxidative stress versus epigenetic. *Dissertação de doutoramento*, Coimbra.
- Herman, J. G., & Baylin, S. B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *New England Journal of Medicine*, 349(21), 2042-2054.
- Ho, A. S., Turcan, S., & Chan, T. A. (2013). Epigenetic therapy: use of agents targeting deacetylation and methylation in cancer management. *OncoTargets and therapy*, 6, 223
- Hollenbach, P. W., Nguyen, A. N., Brady, H., Williams, M., Ning, Y., Richard, N., ... & MacBeth, K. J. (2010). A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. *PloS one*, 5(2), e9001.
- Holliday, R. (1987). The inheritance of epigenetic defects. *Science*, 238(4824), 163-170.
- Houwen, B. (2001). "The differential cell count." *Laboratory Hematology* 7(2): 89-100.
- Hu, C., Li, H., Li, J., Zhu, Z., Yin, S., Hao, X., ... & Gu, J. (2008). Analysis of ABCG2 expression and side population identifies intrinsic drug efflux in the HCC cell line MHCC-97L and its modulation by Akt signaling. *Carcinogenesis*, 29(12), 2289-2297.
- Huang, Y., Anderle, P., Bussey, K. J., Barbacioru, C., Shankavaram, U., Dai, Z., ... & Sadée, W. (2004). Membrane Transporters and Channels Role of the Transportome in Cancer Chemosensitivity and Chemoresistance. *Cancer research*, 64(12), 4294-4301.
- Huffman, K. E., & Corey, D. R. (2005). Major vault protein does not play a role in chemoresistance or drug localization in a non-small cell lung cancer cell line. *Biochemistry*, 44(7), 2253-2261. ISO 690
- Issa, J. P. (2010). Epigenetic changes in the myelodysplastic syndrome. *Hematology/oncology clinics of North America*, 24(2), 317-330.
- Jiang, Y., Dunbar, A., Gondek, L. P., Mohan, S., Rataul, M., O'Keefe, C., ... & Maciejewski, J. P. (2009). Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood*, 113(6), 1315-1325.
- Johan, M. F., Bowen, D. T., Frew, M. E., Goodeve, A. C., & Reilly, J. T. (2005). Aberrant methylation of the negative regulators RASSF1A, SHP-1 and SOCS-1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology*, 129(1), 60-65.
- Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews genetics*, 3(6), 415-428.
- Kantarjian, H., Oki, Y., Garcia-Manero, G., Huang, X., O'Brien, S., Cortes, J., ... & Ferrajoli, A. (2007). Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*, 109(1), 52-57.
- Kimura, S., Kuramoto, K., Homan, J., Naruoka, H., Ego, T., Nogawa, M., ... & Naito, H. (2012). Antiproliferative and antitumor effects of azacitidine against the human myelodysplastic syndrome cell line SKM-1. *Anticancer research*, 32(3), 795-798.
- Kitazono, M., Sumizawa, T., Takebayashi, Y., Chen, Z. S., Furukawa, T., Nagayama, S., ... & Akiyama, S. I. (1999). Multidrug resistance and the lung resistance-related protein in human colon carcinoma SW-620 cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(19), 1647-1653.
- Kong, W., Engel, K., & Wang, J. (2004). (Section A: Molecular, Structural, and Cellular Biology of Drug Transporters) *Mammalian Nucleoside Transporters. Current drug metabolism*, 5(1), 63-84.

- Kozlov, G., Vavelyuk, O., Minailiuc, O., Banville, D., Gehring, K., & Ekiel, I. (2006). Solution structure of a two-repeat fragment of major vault protein. *Journal of molecular biology*, 356(2), 444-452.
- Kristensen, L. S., Nielsen, H. M., & Hansen, L. L. (2009). Epigenetics and cancer treatment. *European journal of pharmacology*, 625(1), 131-142.
- Lavelle, D., DeSimone, J., Hankewych, M., Kousnetzova, T., & Chen, Y. H. (2003). Decitabine induces cell cycle arrest at the G1 phase via p21 WAF1 and the G2/M phase via the p38 MAP kinase pathway. *Leukemia research*, 27(11), 999-1007.
- Li, J., Li, Z. N., Yu, L. C., Bao, Q. L., Wu, J. R., Shi, S. B., & Li, X. Q. (2010). Association of expression of MRP1, BCRP, LRP and ERCC1 with outcome of patients with locally advanced non-small cell lung cancer who received neoadjuvant chemotherapy. *Lung Cancer*, 69(1), 116-122.
- Lin, J., Yao, D. M., Qian, J., Wang, Y. L., Han, L. X., Jiang, Y. W., ... & Chen, Z. X. (2008). Methylation status of fragile histidine triad (FHIT) gene and its clinical impact on prognosis of patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia research*, 32(10), 1541-1545.
- Lodish, H., A. Berk, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, A. Bretscher, H. Ploegh and P. Matsudaira (2008). *Cancer. Molecular cell biology*. New York, WH Freeman and Company: 1107-1150.
- Lund, A. H., & van Lohuizen, M. (2004). Epigenetics and cancer. *Genes & development*, 18(19), 2315-2335.
- Mahon, F. X., Belloc, F., Lagarde, V., Chollet, C., Moreau-Gaudry, F., Reiffers, J., ... & Melo, J. V. (2003). MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood*, 101(6), 2368-2373.
- Mahon, F. X., Belloc, F., Lagarde, V., Chollet, C., Moreau-Gaudry, F., Reiffers, J., ... & Melo, J. V. (2003). MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood*, 101(6), 2368-2373.
- Marcé, S., Molina-Arcas, M., Villamor, N., Casado, F. J., Campo, E., Pastor-Anglada, M., & Colomer, D. (2006). Expression of human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) and its correlation with gemcitabine uptake and cytotoxicity in mantle cell lymphoma. *haematologica*, 91(7), 895-902.
- Marin, J. J., Briz, O., Rodríguez-Macias, G., Díez-Martín, J. L., & Macias, R. I. (2016). Role of drug transport and metabolism in the chemoresistance of acute myeloid leukemia. *Blood reviews*, 30(1), 55-64.
- Marques, S. C., & Ikediobi, O. N. (2010). The clinical application of UGT1A1 pharmacogenetic testing: gene-environment interactions. *Human genomics*, 4(4), 1.
- Meschini, S., Marra, M., Calcabrini, A., Monti, E., Gariboldi, M., Dolfini, E., & Arancia, G. (2002). Role of the lung resistance-related protein (LRP) in the drug sensitivity of cultured tumor cells. *Toxicology in vitro*, 16(4), 389-398.
- Moelans CB, Verschuur-Maes AH, van Diest PJ. Frequent promoter hypermethylation of BRCA2, CDH13, MSH6, PAX5, PAX6 and WT1 in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *The Journal of pathology*. 2011;225(2):222-231.
- Momparler RL (2005) Pharmacology of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin Hematol* 42: S9-16.
- Montalban-Bravo, G., & Garcia-Manero, G. (2015). Novel drugs for older patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 29(4), 760-769.
- Mossink, M. H., van Zon, A., Scheper, R. J., Sonneveld, P., & Wiemer, E. A. (2003). Vaults: a ribonucleoprotein particle involved in drug resistance?. *Oncogene*, 22(47), 7458-7467.
- MS MLPA General protocol, MRC Holland. MSP-v005; last update 30 MAY 2016
- Murase, M., Iwamura, H., Komatsu, K., Saito, M., Maekawa, T., Nakamura, T., ... & Shimada, Y. (2016). Lack of cross-resistance to FF-10501, an inhibitor of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, in

- azacitidine-resistant cell lines selected from SKM-1 and MOLM-13 leukemia cell lines. *Pharmacology research & perspectives*, 4(1).
- Nakanishi, T., Shiozawa, K., Hassel, B. A., & Ross, D. D. (2006). Complex interaction of BCRP/ABCG2 and imatinib in BCR-ABL-expressing cells: BCRP-mediated resistance to imatinib is attenuated by imatinib-induced reduction of BCRP expression. *Blood*, 108(2), 678-684.
- Nigam, S. K. (2015). What do drug transporters really do?. *Nature reviews Drug discovery*, 14(1), 29-44.
- Nimer, S. D. (2008). Myelodysplastic syndromes. *Blood*, 111(10), 4841-4851.
- Nygren, A. O., Ameziane, N., Duarte, H. M., Vijzelaar, R. N., Waisfisz, Q., Hess, C. J., ... & Errami, A. (2005). Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic acids research*, 33(14), e128-e128.
- Oda, S., Fukami, T., Yokoi, T., & Nakajima, M. (2013). Epigenetic regulation is a crucial factor in the repression of UGT1A1 expression in the human kidney. *Drug Metabolism and Disposition*, 41(10), 1738-1743.
- Ohno, S., & Nakajin, S. (2009). Determination of mRNA expression of human UDP-glucuronosyltransferases and application for localization in various human tissues by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(1), 32-40.
- Ozben, T. (2006). Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS letters*, 580(12), 2903-2909.
- Pastor-Anglada, M., Molina-Arcas, M., Casado, F. J., Bellosillo, B., Colomer, D., & Gil, J. (2004). Nucleoside transporters in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*, 18(3), 385-393.
- Pennycooke, M., Chaudary, N., Shuralyova, I., Zhang, Y., & Coe, I. R. (2001). Differential expression of human nucleoside transporters in normal and tumor tissue. *Biochemical and biophysical research communications*, 280(3), 951-959.
- Pires, A. (2014). Avaliação da inibição de metaloproteinases da matriz como alvo terapêutico em neoplasias hematológicas. Dissertação de Mestrado, Coimbra.
- Plasschaert, S. L., van der Kolk, D. M., de Bont, E. S., Kamps, W. A., Morisaki, K., Bates, S. E., ... & de Vries, E. G. (2003). The role of breast cancer resistance protein in acute lymphoblastic leukemia. *Clinical cancer research*, 9(14), 5171-5177.
- Portela, A., & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology*, 28(10), 1057-1068.
- Qin, T., Youssef, E. M., Jelinek, J., Chen, R., Yang, A. S., Garcia-Manero, G., & Issa, J. P. J. (2007). Effect of cytarabine and decitabine in combination in human leukemic cell lines. *Clinical Cancer Research*, 13(14), 4225-4232.
- Qin, T., Jelinek, J., Si, J., Shu, J., & Issa, J. P. J. (2009). Mechanisms of resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine in human cancer cell lines. *Blood*, 113(3), 659-667.
- Qin, T., Castoro, R., El Ahdab, S., Jelinek, J., Wang, X., Si, J., ... & Kantarjian, H. M. (2011). Mechanisms of resistance to decitabine in the myelodysplastic syndrome. *PloS one*, 6(8), e23372.
- Raynal NJ, Momparler LF, Rivard GE, Momparler RL. 3-Deazauridine enhances the antileukemic action of 5-aza-2-deoxycytidine and targets drug-resistance due to deficiency in deoxycytidine kinase. *Leuk Res*. 2011; 35(1):110-118
- Real-Time PCR Applications Guide 2006. Bio-Rad Laboratories
- Ren, J., Yao, J., Guo, X., Guo, X., & Cai, S. (2015). The Effect of Decitabine Combined with Arsenic Trioxide on DAPK Gene and HL-60 Cell Proliferation and Apoptosis. *Journal of Cancer Therapy*, 6(15), 1229.
- Sarmento-Ribeiro (2002). Alterações fenotípicas da célula tumoral e a sua relação com a resistência à quimioterapia. Dissertação de doutoramento, Coimbra.

- Rius, M., Stresemann, C., Keller, D., Brom, M., Schirmmacher, E., Keppler, D., & Lyko, F. (2009). Human concentrative nucleoside transporter 1-mediated uptake of 5-azacytidine enhances DNA demethylation. *Molecular cancer therapeutics*, 8(1), 225-231.
- Ross, D. D., Karp, J. E., Chen, T. T., & Doyle, L. A. (2000). Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia. *Blood*, 96(1), 365-368
- Ross, D. D., & Nakanishi, T. (2010). Impact of breast cancer resistance protein on cancer treatment outcomes. *Multi-Drug Resistance in Cancer*, 251-290.
- Santini, V., Prebet, T., Fenaux, P., Gattermann, N., Nilsson, L., Pfeilstöcker, M., ... & List, A. F. (2014). Minimizing risk of hypomethylating agent failure in patients with higher-risk MDS and practical management recommendations. *Leukemia research*, 38(12), 1381-1391.
- Santos, F. P., Kantarjian, H., Garcia-Manero, G., Issa, J. P., & Ravandi, F. (2010). Decitabine in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Expert review of anticancer therapy*, 10(1), 9-22.
- Sarmiento-Ribeiro, A. B., Dourado, M., Paiva, A., Freitas, A., Silva, T., Regateiro, F., & Oliveira, C. R. (2012). Apoptosis deregulation influences chemoresistance to azaguanine in human leukemic cell lines. *Cancer investigation*, 30(5), 331-342
- Sauerbrey, A., Sell, W., Steinbach, D., Voigt, A., & Zintl, F. (2002). Expression of the BCRP gene (ABCG2/MXR/ABCP) in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology*, 118(1), 147-150.
- Scheffer, G. L., Schroeijers, A. B., Izquierdo, M. A., Wiemer, E. A., & Scheper, R. J. (2000). Lung resistance-related protein/major vault protein and vaults in multidrug-resistant cancer. *Current opinion in oncology*, 12(6), 550-556.
- Schmelz, K., Sattler, N., Wagner, M., Lübbert, M., Dörken, B., & Tamm, I. (2005a). Induction of gene expression by 5-Aza-2'-deoxycytidine in acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) but not epithelial cells by DNA-methylation-dependent and-independent mechanisms. *Leukemia*, 19(1), 103-111.
- Schmelz, K., Wagner, M., Dörken, B., & Tamm, I. (2005b). 5-Aza-2'-deoxycytidine induces p21WAF expression by demethylation of p73 leading to p53-independent apoptosis in myeloid leukemia. *International journal of cancer*, 114(5), 683-695.
- Schroeijers, A. B., Siva, A. C., Scheffer, G. L., de Jong, M. C., Bolick, S. C., Dukers, D. F., ... & Rome, L. H. (2000). The Mr 193,000 vault protein is up-regulated in multidrug-resistant cancer cell lines. *Cancer research*, 60(4), 1104-1110.
- Scientific, T. (2013). Assessment of nucleic acid purity. T042-Technical Bulletin Nano Drop Spectrophotometers, nanodrop. com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometer-Nucleic-Acid-Purity-Ratios. pdf. Accessed 20th November.
- Segura-Pacheco, B., Perez-Cardenas, E., Taja-Chayeb, L., Chavez-Blanco, A., Revilla-Vazquez, A., Benitez-Bribiesca, L., & Duenas-González, A. (2006). Global DNA hypermethylation-associated cancer chemotherapy resistance and its reversion with the demethylating agent hydralazine. *Journal of translational medicine*, 4(1), 1.
- Siegel, R., Jemal, A., 2014. *Cancer Facts & Figures*. Am. Cancer Soc.
- Silverman, L. R., Demakos, E. P., Peterson, B. L., Kornblith, A. B., Holland, J. C., Odchimar-Reissig, R., ... & Holland, J. F. (2002). Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *Journal of Clinical oncology*, 20(10), 2429-2440.
- Slesina, M., Inman, E. M., Rome, L. H., & Volkandt, W. (2005). Nuclear localization of the major vault protein in U373 cells. *Cell and tissue research*, 321(1), 97-104.

- Soriano, A. O., Yang, H., Faderl, S., Estrov, Z., Giles, F., Ravandi, F., ... & Pierce, S. (2007). Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood*, 110(7), 2302-2308.
- Šorm, F., Piskala, A., Čihák, A., & Veselý, J. (1964). 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 20(4), 202-203.
- Sorrentino, B. P. (2002). Gene therapy to protect haematopoietic cells from cytotoxic cancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 431-441.
- Steinbach, D., Sell, W., Voigt, A., Hermann, J., Zintl, F., & Sauerbrey, A. (2002). BCRP gene expression is associated with a poor response to remission induction therapy in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 16(8), 1443-1447.
- Stephan, L., & Momparler, R. L. (2015). Combination chemotherapy of cancer using the inhibitor of DNA methylation 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *J Cancer Res Ther*, 3(5), 56-65.
- Stewart, B.W., Wild, C.P., 2014. World Cancer Report 2014, World Health Organization: Geneva. doi:9283204298
- Stresemann, C., & Lyko, F. (2008). Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *International journal of cancer*, 123(1), 8-13.
- Su, W. C., Chang, S. L., Chen, T. Y., Chen, J. S., & Tsao, C. J. (2000). Comparison of in vitro growth-inhibitory activity of carboplatin and cisplatin on leukemic cells and hematopoietic progenitors: the myelosuppressive activity of carboplatin may be greater than its antileukemic effect. *Japanese journal of clinical oncology*, 30(12), 562-567.
- Su, Y., Xu, H., Xu, Y., Yu, J., Xian, Y., & Luo, Q. (2012). Azacytidine inhibits the proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by demethylation of MGMT, DAPK and p16 genes. *Hematology*, 17(1), 41-46.
- Sugatani, J. (2013). Function, genetic polymorphism, and transcriptional regulation of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 28(2), 83-92.
- Thé, H., Le Bras, M., & Lallemand-Breitenbach, V. (2012). Acute promyelocytic leukemia, arsenic, and PML bodies. *The Journal of cell biology*, 198(1), 11-21.
- Tian, B., Liu, J., Liu, B., Dong, Y., Liu, J., Song, Y., & Sun, Z. (2011). p53 suppresses lung resistance-related protein expression through Y-box binding protein 1 in the MCF-7 breast tumor cell line. *Journal of cellular physiology*, 226(12), 3433-3441.
- Turner, J. G., Gump, J. L., Zhang, C., Cook, J. M., Marchion, D., Hazlehurst, L., ... & Sullivan, D. M. (2006). ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma. *Blood*, 108(12), 3881-3889.
- Valencia, A., Cervera, J., Such, E., Ibañez, M., Gómez, I., Luna, I., ... & Sanz, G. F. (2011). Aberrant methylation of tumor suppressor genes in patients with refractory anemia with ring sideroblasts. *Leukemia research*, 35(4), 479-483.
- Valencia, A., Masala, E., Rossi, A., Martino, A., Sanna, A., Buchi, F., ... & Santini, V. (2014). Expression of nucleoside-metabolizing enzymes in myelodysplastic syndromes and modulation of response to azacytidine. *Leukemia*, 28(3), 621-628.
- Van den Heuvel-Eibrink, M. M., Wiemer, E. A., Prins, A., Meijerink, J. P., Vossebeld, P. J., van der Holt, B., ... & Sonneveld, P. (2002). Increased expression of the breast cancer resistance protein (BCRP) in relapsed or refractory acute myeloid leukemia (AML). *Leukemia*, 16(5), 833-839.
- Verschuur-Maes AH, de Bruin PC, van Diest PJ. Epigenetic progression of columnar cell lesions of the breast to invasive breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2012;136(3):705-715.

- Visvader, J. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* 469: 314-22.
- Voso, M. T., Santini, V., Fabiani, E., Fianchi, L., Criscuolo, M., Falconi, G., ... & Leone, G. (2014). Why methylation is not a marker predictive of response to hypomethylating agents. *haematologica*, 99(4), 613-619.
- Wang, Z. Y., & Chen, Z. (2008). Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood*, 111(5), 2505-2515.
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M. B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M., & Schübeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature genetics*, 39(4), 457-466.
- Yang, A. S., Doshi, K. D., Choi, S. W., Mason, J. B., Mannari, R. K., Gharybian, V., ... & Kantarjian, H. M. (2006). DNA methylation changes after 5-aza-2'-deoxycytidine therapy in patients with leukemia. *Cancer research*, 66(10), 5495-5503.
- Yasunami, T., Wang, Y. H., Tsuji, K., Takanashi, M., Yamada, Y., & Motoji, T. (2007). Multidrug resistance protein expression of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia research*, 31(4), 465-470.
- Yoo, C. B., & Jones, P. A. (2006). Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nature reviews Drug discovery*, 5(1), 37-50.
- 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
- Zhang, L., Samad, A., Pombo-de-Oliveira, M. S., Scelo, G., Smith, M. T., Feusner, J., ... & Metayer, C. (2015). Global characteristics of childhood acute promyelocytic leukemia. *Blood reviews*, 29(2), 101-125.
- [http://protocolos3.dominiotemporario.com/page\\_19.html](http://protocolos3.dominiotemporario.com/page_19.html) acedido a 10/2015, revisto a 2012
- <http://publications.cancerresearchuk.org/cancerstats/statsincidence/dtincrates.html> acedido a 08/2016
- [http://www.cancer.gov/types/myeloproliferative/hp/myelodysplastic-treatment-pdq#link/\\_291\\_toc](http://www.cancer.gov/types/myeloproliferative/hp/myelodysplastic-treatment-pdq#link/_291_toc) acedido a 11/2016, revisto a 2/04/2015
- <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/hematology-oncology/acute-myelogenous-leukemia/> acedido a 08/2016
- <http://www.ebah.com.br/content/ABAAezrAAC/tecnica-camara-neubauer> acedido a 10/2015, revisto a 08/2011
- <http://www.who.int/> acedido a 09/2016
- [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-240.aspx?geo\\_country=pt](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-240.aspx?geo_country=pt) acedido a 01/2016