



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Tânia Patrícia Santos Garcia Gaspar

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE
MODULADORES EPIGENÉTICOS NA LEUCEMIA LINFOCÍTICA
CRÓNICA

Dissertação no âmbito do Mestrado de Química Medicinal, orientada pela Professora Doutora Ana Bela Sarmento Ribeiro e coorientada pela Doutora Raquel Alves e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra

Setembro de 2021



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Tânia Patrícia Santos Garcia Gaspar

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE
MODULADORES EPIGENÉTICOS NA LEUCEMIA LINFOCÍTICA
CRÓNICA

Dissertação no âmbito do Mestrado de Química Medicinal, orientada pela Professora Doutora Ana Bela Sarmento Ribeiro e coorientada pela Doutora Raquel Alves e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra

Setembro de 2021

Agradecimentos

A dissertação de mestrado é um projeto individual, no entanto, não seria possível sem o apoio e a ajuda de algumas pessoas a quem quero agradecer:

À professora Doutora Ana Bela Sarmento Ribeiro pela orientação desta dissertação, pela disponibilidade, pelo apoio, pelas sugestões dadas ao longo deste percurso e, acima de tudo, pela confiança e paciência.

À professora Doutora Ana Cristina Gonçalves pela orientação deste projeto, pela disponibilidade constante e por todas as sugestões dadas tanto a nível laboratorial como a nível de escrita e, sobretudo, pela confiança e paciência demonstrada ao longo deste projeto.

À Doutora Raquel Alves, à Mestre Joana Jorge, Mestre Beatriz Lapa e Mestre Maria Inês Costa por todas as aprendizagens que me proporcionaram, pela enorme ajuda que me deram ao longo deste processo, pela paciência, pelo apoio e pela disponibilidade constante.

Aos meus colegas de laboratório, pelo companheirismo, pela ajuda e pelo bom ambiente que sempre houve no laboratório ao longo deste percurso.

À minha amiga Nisa Magalhães, pelo apoio e pelo incentivo nos momentos em que eu própria duvidava de mim, pela paciência e pela disponibilidade para me ajudar quando fosse necessário, assim como, pelos momentos de descontração que me proporcionou.

Às minhas amigas Mara Alves e Beatriz Figueiredo, que apesar de já não passarmos tanto tempo juntas sempre me apoiaram e sempre estiveram também prontas ajudar quando era necessário.

Às minhas amigas Marta Gomes e Tânia Ramalho, pelo apoio e incentivo que me deram ao longo deste percurso, pelos momentos de descontração que me proporcionaram e pela paciência que tiveram nos momentos menos bons.

E por fim, às pessoas que eu sei que me apoiarão sempre e estarão sempre presentes para dar uma palavra de conforto, carinho e apoio: aos meus pais, sem o grande esforço que fizeram não era possível percorrer este trajeto, pela confiança que tiveram em mim, pelo apoio e incentivo constantes e pelo amor incondicional.

Por tudo isto e muito mais,

Muito obrigada por tudo!

Resumo

A leucemia linfocítica crônica (LLC) é uma neoplasia linfoproliferativa de células B maduras, caracterizada pela acumulação de linfócitos B neoplásicos no sangue, na medula óssea e nos tecidos linfoides secundários.

Na LLC estão presentes diversas alterações genéticas como alterações cromossômicas, mutações, mas também epigenéticas como alterações na expressão de miRNAs, modificações da acetilação das histonas e da metilação do DNA. As alterações cromossômicas mais frequentes incluem a deleção 13q, a deleção 17p, a deleção 11q e a trissomia do cromossoma 12. Além disso, os miRNAs 15a e 16-1 podem estar ausentes, por exemplo, na deleção 13q, ou ser regulados negativamente ou alterados em aproximadamente 60% dos casos de LLC e são disfuncionais em casos de LLC familiar. Outras alterações epigenéticas incluem a alteração da metilação do DNA e a modificação das histonas, sendo que esta metilação anômala poderá corresponder ao evento inicial desta patologia. As modificações nas histonas determinam a natureza da cromatina sendo estas alterações as responsáveis pelo empacotamento da cromatina e o acesso à informação genética. Como consequência, da desacetilação das histonas e da hipermetilação do DNA, ocorre o silenciamento de diversos genes com consequente aumento de viabilidade e resistência à apoptose características das células cancerígenas da LLC.

Assim, neste trabalho foi avaliado o potencial terapêutico de moduladores epigenéticos [agentes hipometilantes (azacitidina e decitabina) e inibidores das desacetilases das histonas (vorinostat e panobinostat)] numa linha celular de LLC. Neste sentido, a linha celular HG3 foi incubada durante 72h na ausência e na presença dos moduladores epigenéticos em monoterapia e em combinação terapêutica. Procedeu-se à avaliação da atividade metabólica recorrendo ao ensaio metabólico da resazurina. O ciclo celular foi analisado através de citometria de fluxo por marcação com iodeto de propídio (PI)/RNase. O tipo de morte celular foi avaliado também por citometria de fluxo por marcação com Anexina V e 7-Aminoactinomicina D (7-AAD) e por microscopia ótica, através da análise morfológica recorrendo à coloração de Giemsa.

Na avaliação da atividade metabólica, os resultados demonstraram que no caso da azacitidina, do vorinostat e do panobinostat a diminuição da atividade metabólica é dependente do tempo e da dose de fármaco, enquanto que, no caso da decitabina a diminuição da atividade metabólica é dependente apenas do tempo. Neste ensaio, no tempo de incubação de 72h, o IC₅₀ da azacitidina foi de 2,135 µM, da decitabina de 2,948 µM, do vorinostat de 0,4709 µM e do panobinostat foi de 5,486 nM. Além disso

verificou-se que, a azacitidina, a decitabina e o panobinostat demonstram ter um efeito citotóxico, enquanto o vorinostat levou a um aumento não significativo da morte celular. Além do efeito citotóxico, a azacitidina revelou um efeito citostático com bloqueio das células em fase G_0/G_1 . De um modo semelhante, a decitabina e o vorinostat induziram bloqueio do ciclo celular em fase G_0/G_1 e G_2/M . Por outro lado, o panobinostat não induziu efeitos muito significativos a nível do ciclo celular.

No caso das combinações terapêuticas, em todas ocorreu uma maior redução da atividade metabólica em comparação com a monoterapia, tendo sido observado um efeito sinérgico de adição. Nas células tratadas com combinações terapêuticas com decitabina observou-se uma maior percentagem de células em morte celular por apoptose, enquanto que, nas combinações com azacitidina não ocorreu um aumento significativo de morte celular. Todas as combinações terapêuticas induziram bloqueio do ciclo celular em fase G_0/G_1 e G_2/M , revelando um efeito citostático. No entanto, a associação da azacitidina com vorinostat não revelou efeitos significativos no ciclo celular.

Em suma, podemos concluir que os moduladores epigenéticos estudados em monoterapia ou em combinação podem constituir uma abordagem terapêutica para o tratamento da leucemia linfocítica crónica.

Palavras Chave:

- ❖ Leucemia Linfocítica Crónica
- ❖ Azacitidina
- ❖ Decitabina
- ❖ Vorinostat
- ❖ Panobinostat

Abstract

The chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a mature B cell lymphoproliferative neoplasm characterized by the accumulation of neoplastic B lymphocytes in the blood, bone marrow and secondary lymphoid tissues.

In CLL, are present several genetic alterations, such as chromosomal alterations, mutations, and epigenetic alterations, such as alterations in the expression of miRNAs, changes in histone acetylation and DNA methylation. The most frequent chromosomal alterations include the 13q deletion, the 17p deletion, the 11q deletion and chromosome 12 trisomy. Furthermore, miRNAs 15a and 16-1 may be absent, for example, in the 13q deletion, or be down-regulated or altered in approximately 60% of CLL cases and are dysfunctional in familiar CLL cases.

Other epigenetic alterations include the alteration of DNA methylation and the modification of histones, and this anomalous methylation may correspond to the initial event of this pathology. Histone modifications determine the nature of chromatin, and these alterations are responsible for chromatin packaging and access to genetic information. As a consequence of histone deacetylation and DNA hypermethylation, several genes are silenced, with a consequent increase in the viability and resistance to apoptosis, characteristic of CLL cancer cells.

Thus, this work, evaluated the therapeutic potential of epigenetics modulators [hypomethylating agents (azacytidine and decitabine) and histone deacetylases inhibitors (vorinostat and panobinostat)] in a CLL cell line. In this sense, the HG3 cell line was incubated for 72 hours in the absence and presence of epigenetic modulators in monotherapy and in therapeutic combination. The metabolic activity was evaluated using the resazurin metabolic assay. The cell cycle was analyzed by flow cytometry by labeling with propidium iodide (PI)/RNase. The type of cell death was also evaluated by flow cytometry using labeling Annexin V and 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) and by optical microscopy, through morphological analysis using Giemsa staining. In the evaluated of metabolic activity, the results demonstrated that, in the case of azacytidine, vorinostat and Panobinostat, the decrease in metabolic activity is time- and dose- dependent, while in the case of decitabine the decrease in metabolic activity is dependent only of time. In this assay, at an incubation time of 72 hours, the IC_{50} of azacytidine was 2.135 μ M, decitabine 2.948 μ M, vorinostat of 0.4709 μ M and Panobinostat of 5.486 nM. Furthermore, azacytidine, decitabine and panobinostat were found to have a cytotoxic effect, whereas vorinostat led to a non-significant increase in cell death. In addition to the cytotoxic effect, azacytidine revealed a cytostatic effect with blocking of cells the

G₀/G₁ phase. Similarly, decitabine and vorinostat induced cell cycle blockage in G₀/G₁ and G₂/M phase. For the other side, panobinostat did not lead to very significant effects at the cell cycle level.

In the case of therapeutic combinations, in all of them there was a greater reduction in metabolic activity compared to monotherapy, and a synergistic addition effect was observed. In cells treated with therapeutic combinations with decitabine, a higher percentage of apoptotic cells was observed, while in combinations with azacytidine there was not significant increase in cell death. All therapeutic combinations induced a arrest in G₀/G₁ and G₂/M phases, revealing a cytostatic effect. However, the combination of azacytidine with vorinostat did not show significant effects on the cell cycle.

In summary, we can conclude that epigenetic modulators in monotherapy or in combination can constitute a therapeutic approach for the treatment chronic lymphocytic leukemia.

Key words:

- ❖ Chronic Lymphocytic Leukemia
- ❖ Azacytidine
- ❖ Decitabine
- ❖ Vorinostat
- ❖ Panobinostat

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Abreviaturas	ix
1. Introdução	1
1.1. Leucemia Linfocítica Crônica	3
1.1.1. Incidência e Epidemiologia.....	3
1.1.2. Estadiamento Clínico	4
1.1.3. Diagnóstico	6
1.1.4. Prognóstico	7
1.2. Epigenética e LLC	10
1.2.1. Metilação do DNA	10
1.2.2. Modificações epigenéticas das histonas e LLC	14
1.3. Tratamento	17
1.3.1. Agentes hipometilantes	20
1.3.1.1. Azacitidina.....	22
1.3.1.2. Decitabina	24
1.3.2. Inibidores das desacetilases das histonas	25
1.3.2.1. Vorinostat	26
1.3.2.2. Panobinostat	28
1.4. Objetivo	30
2. Materiais e Métodos	32
2.1. Caracterização da linha celular e condições de cultura	34
2.2. Avaliação da proliferação e viabilidade celulares.....	35
2.3. Incubação das células de LLC (HG3) com azacitidina, decitabina, vorinostat e panobinostat	36
2.4. Avaliação do ciclo celular	38
2.5. Avaliação do tipo de morte celular.....	39
2.6. Avaliação da morfologia celular	40

2.7. Análise estatística	41
3. Resultados	42
3.1. Determinação da densidade ótima da linha celular HG3	43
3.2. Avaliação dos moduladores epigenéticos, azacitidina, decitabina, vorinostat e panobinostat, como novas estratégias terapêuticas na LLC.....	45
3.2.1. Efeito dos moduladores epigenéticos, azacitidina, decitabina, vorinostat e panobinostat na atividade metabólica.....	45
3.2.1.1. Monoterapia	45
3.2.1.2. Combinações terapêuticas	48
3.2.2. Avaliação do ciclo celular	51
3.2.3. Avaliação do tipo de morte celular induzida pelos moduladores epigenéticos azacitidina, decitabina, vorinostat e panobinostat em monoterapia e em combinação	53
4. Discussão	57
4.1. Avaliação do potencial terapêutico dos moduladores epigenéticos, azacitidina, decitabina, vorinostat e panobinostat na LLC.....	59
5. Conclusão	69
6. Referências	73

Abreviaturas

AKT, do inglês “protein kinase B”
ARID1A, do inglês “AT-rich interactive domain containing protein 1A”
ATM, do inglês “ataxia-telangiectasia-mutated”
AZA, Azacitidina
BAFF, do inglês “B-cell activating factor”
BCMA, do inglês “B-cell maturation antigen”
BIRC3, do inglês “Baculoviral IAP repeat-containing protein 3”
BR, bendamustina, rituximab
BTKi, do inglês “ Bruton tyrosine kinase inhibitors”
CDK, cinase dependente de ciclina
CDK1, cinase dependente de ciclina 1
CDK2, cinase dependente de ciclina 2
CDK4, cinase dependente de ciclina 4
CDK6, cinase dependente de ciclina 6
CD5, do inglês, “cluster of differentiation 5”
CD11c, do inglês, “cluster of differentiation 11c”
CD14, do inglês, “cluster of differentiation 14”
CD25, do inglês, “cluster of differentiation 25”
CD26, do inglês, “cluster of differentiation 26”
CD31, do inglês, “cluster of differentiation 31”
CD36, do inglês, “cluster of differentiation 36”
CD38, do inglês, “cluster of differentiation 38”
CD39, do inglês, “cluster of differentiation 39”
CD44, do inglês, “cluster of differentiation 44”
CD49d, do inglês, “cluster of differentiation 49d”
CD52, do inglês, “cluster of differentiation 52”
CD54, do inglês, “cluster of differentiation 54”
CD69, do inglês, “cluster of differentiation 69”
CD95, do inglês, “cluster of differentiation 95”
CD150, do inglês, “cluster of differentiation 150”
CHD, do inglês “Chromodomain Helicase DNA-binding”
CLL-IPI, do inglês “ CLL International Prognostic Index”
COBLL1, do inglês “Cordon-Bleu WH2 repeat protein like 1”
CpG, do inglês “ 5'-C-phosphate-G-3”

DAC, Decitabina

DAPK1, proteína cinase 1 associada à morte

Del 11q, do inglês “deletions of the long arm of chromosome 11”

Del 13q, do inglês “deletions of the long arm of chromosome 13”

Del 16q, do inglês “deletions of the long arm of chromosome 16”

Del 17p, do inglês “ deletions of the short arm of chromosome 17”

DLEU7, do inglês “Deleted In Lymphocytic Leukemia 7”

DNMT, do inglês “DNA (cytosine-5)-methyltransferase”

DNMT1, do inglês “ DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1”

DNMT3A, do inglês “ DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A”

DNMT3B, do inglês “DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3B”

DSMZ, do inglês “German Collection of Microorganisms and Cell Cultures”

EBV, do inglês “Epstein-Barr Virus”

EMA, Agência Europeia do Medicamento

ERB-A1, do inglês “ erythroblastic leukemia viral oncogene A1”

EZH2, do inglês “Enhancer of zeste homolog 2”

E2F, do inglês “E2 factor”

FAS, recetor CD95

FBS, soro bovino fetal

FCR, do inglês “ Fludarabine, cyclophosphamide and rituximab”

FDA, do inglês “Food and Drug Administration”

FSC, do inglês “Forward Scatter”

GCLLSG, do inglês “German chronic lymphocyte leukemia study group”

HATs, histonas acetiltransferases

Hb, hemoglobina

HDACs, desacetilases das histonas

HDACi, inibidor das desacetilases das histonas

HIF1 α , do inglês “ hypoxia-inducible factor 1-alpha”

HOX4A, do inglês “ Homeobox protein Hox-4A”

H-ras, do inglês “transforming protein p21”

hTERT, transcriptase reversa da telomerase humana

IGHV, do inglês “Immunoglobulin Heavy Variable”

IKZF3, do inglês “Ikaros family zinc finger protein 3”

INO80, do inglês “Inositol requiring 80”

ISWI, do inglês “Imitation of Switch”

IWCLL, do inglês “International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukaemia”

LLC, leucemia linfocítica crónica
LPL, do inglês “lipoprotein lipase”
MCL1, do inglês “ Induced myeloid leukemia cell differentiation protein”
MDACC, do inglês “MD Anderson Cancer Center”
miRNA, microRNA
mir15a, microRNA 15a
mir16-1, microRNA, 16-1
M-LLC, células de leucemia linfocítica crónica que expressam o gene IGHV mutado
mRNA, RNA mensageiro
MYD88, do inglês “Myeloid differentiation primary response 88”
NAD, dinucleótido de nicotinamida e adenina
NCI-WG, do inglês “ National Cancer Institute – Working Group”
NOTCH1, do inglês “Notch homolog 1, translocation-associated”
PANO, Panobinostat
PBS, do inglês “phosphate buffered saline”
PI, iodeto de propídio
Plt, plaquetas
POT1, do inglês “Protection of telomeres protein 1”
p15, proteína supressora de tumor 15
p21, proteína supressora de tumor 21
p21^{WAF1}, do inglês “cyclin-dependent kinase inhibitor 1”
p53, proteína tumoral 53
Rb, do inglês “ retinoblastoma protein”
RPMI 1640, do inglês “ Roswell Park Memorial Institute 1640”
RPS15, do inglês “40S ribossomal protein S15”
SAHA, Vorinostat
SAM, S-Adenosilmetionina
SF3B1, do inglês “Splicing factor 3B subunit 1”
SIRT, do inglês “Sirtuin”
SSC, do inglês “Side Scatter”
STAT3, do inglês “ Signal Transducer and Activator of Transcription 3”
SWI/SNF, do inglês “Switch/Sucrose”
TERT, transcriptase reversa da telomerase
TMCI, do inglês “ Transmembrane activator and CAML interactor”
TNF, do inglês “ tumor necrosis factor”
TRAIL, do inglês “ TNF-related apoptosis-inducing ligand”

TLR, do inglês “Toll-like receptor”

tRNA, RNA de transferência

TWIST2, do inglês “Twist Family BHLH Transcription Factor 2”

U-LLC, células da leucemia linfocítica crônica que expressam o gene IGHV não mutado

WHO, do inglês “World Health Organization”

ZAP70, proteína cinase 70 associada à cadeia zeta

ZMYM3, do inglês “Zinc finger MYM-type protein 3”

ZNF292, do inglês “Zinc finger protein 292”

7-AAD, 7-aminoactinomicina D

1. Introdução

1.1 – Leucemia Linfocítica Crônica

Segundo a classificação da *World Health Organization (WHO)* ^[1] a leucemia linfocítica crônica (LLC) é uma neoplasia linfoproliferativa maligna das células B maduras onde ocorre acumulação de pequenos linfócitos neoplásicos de aparência madura no sangue, na medula óssea e tecidos linfoides secundários, podendo manifestar-se clinicamente com linfocitose, adenopatias e esplenomegalia. Os linfócitos B da LLC são linfócitos clonais caracterizados imunofenotipicamente por serem normalmente CD19 positivos, possuir CD20 de baixa expressão e co-expressarem CD5 e CD23. ^[2, 3]

1.1.1 – Incidência e Epidemiologia

A LLC é a leucemia mais comum em adultos nos países ocidentais, sendo que, a taxa de incidência é praticamente a mesma na Europa e nos Estados Unidos, variando entre 4 a 6 casos por cada 100 000 indivíduos. A incidência desta patologia aumenta com a idade, tendo aproximadamente 70% dos doentes uma idade superior a 65 anos. No entanto, a idade média de diagnóstico está compreendida entre os 70 e 72 anos, mas nas últimas décadas esta patologia tem sido diagnosticada em indivíduos mais jovens pois aproximadamente 15% dos doentes tem uma idade de cerca de 55 anos. ^[2, 3]

O fator de risco crucial para o desenvolvimento da LLC é o histórico familiar de neoplasias hematológicas, no caso desta leucemia, indivíduos com familiares que tenham esta patologia possuem um risco 2 a 8 vezes maior quando comparados com a população geral. Aproximadamente 9 a 10% dos casos desta doença têm dois ou mais familiares com LLC, sendo que, partilham do mesmo perfil clínico e biológico dos restantes casos desta patologia. No entanto, familiares de 1º grau de doentes com LLC possuem um risco de cerca de 8,5 vezes maior de vir a desenvolver esta patologia. ^[2,3,4,5,6] Vários estudos propuseram uma ligação entre o risco de desenvolver a LLC e o estilo de vida e a ocupação dos indivíduos pois indivíduos que vivem ou trabalham na agricultura possuem um maior risco de vir a desenvolver esta patologia, enquanto que, a exposição solar possui um papel protetor. ^[2,4] Em indivíduos do sexo masculino o risco de desenvolver esta doença é aproximadamente 2 vezes maior, quando comparado com indivíduos do sexo feminino. ^[3]

1.1.2 – Estadiamento clínico

Os sistemas de estadiamento clínico mais conhecidos nos doentes com LLC têm por objetivo definir a gravidade da doença e a indicação para o tratamento, sendo estes: o sistema de Binet ^[9] e o sistema de Rai ^[10]. Estes dois sistemas de estadiamento clínico baseiam-se apenas em dados clínicos e laboratoriais (contagem das células sanguíneas e no exame físico do doente, nomeadamente na presença ou ausência de adenopatias e/ou organomegalias) e apesar de serem considerados bons indicadores para o prognóstico, não são suficientes, pois não entram em linha de conta com as alterações moleculares. Assim, podem ocorrer falhas na identificação de alguns casos mais agressivos da doença, apesar de poderem possuir nos sistemas tradicionais de estadiamento um baixo risco.

O sistema de estadiamento de Rai (Tabela 1) proposto em 1975 divide os doentes em 5 grupos de risco, indicando um tempo de sobrevivência média progressivamente mais pequeno, enquanto que, o sistema de estadiamento de Binet (Tabela 2) define três categorias de risco.

Tabela 1 - Sistema de estadiamento de Rai

Estádio	Características	Mediana de sobrevivência
0	Apenas linfocitose no sangue periférico e infiltração na medula óssea	> 150 meses
I	Presença de linfadenopatias	101 meses
II	Presença de hepatoesplenomegalia	71 meses
III	Presença de anemia (definida como Hb < 11 g/dl)	19 meses
IV	Presença de trombocitopenia (Plt < 100,000/mm ³)	19 meses

(Adaptado de Scarfò et al., 2016)

O sistema de Rai é mais utilizado nos Estados Unidos, enquanto que, o sistema de Binet é mais frequentemente usado na Europa. Estes sistemas de estadiamento clínico reconhecem a importância da função da medula óssea e definem a doença como

sendo de estágio avançado, ou de alto risco, através da presença de anemia ou trombocitopenia pronunciadas. [2, 3, 22]

Tabela 2 - Sistema de estadiamento de Binet

Estádio	Características
Baixo risco	Ausência de anemia (Hb > 10 g/dl) ou trombocitopenia (Plt > 100.000/ mm ³) podendo estar até 2 cadeias ganglionares atingidas.
Risco intermédio	Ausência de anemia (Hb > 10 g/dl) ou trombocitopenia (Plt > 100.000/ mm ³) podendo estar mais de 2 cadeias ganglionares atingidas.
Risco elevado	Presença de anemia (Hb < 10 g/dl) e/ou trombocitopenia (Plt < 100.000/ mm ³), não tendo em conta as cadeias ganglionares atingidas.

(Adaptado de Scarfò et al., 2016)

Para além destes dois sistemas de estadiamento clínico e do nomograma “MD Anderson Cancer Center” (MDACC) e do modelo de “German chronic lymphocyte leukemia study group” (GCLLSG), existe também o modelo prognóstico mais recente “CLL International Prognostic Index (CLL-IPI). No CLL-IPI é utilizada uma classificação ponderada dos seguintes fatores de prognóstico: mutação e/ou deleção de *TP53*, a ausência ou a presença de mutações no gene de região variável de cadeia pesada de imunoglobulina (*IGHV*), a idade, o estágio clínico e o soro β 2-microglobulina. Assim, o CLL-IPI faz uma separação dos doentes em 4 grupos distintos, tal como descrito na tabela 3. O CLL-IPI identifica de uma forma mais precisa os doentes com LLC que não requerem tratamento que correspondem aos doentes que possuem uma patologia de baixo risco e/ou assintomática. [68,102]

Tabela 3 – Modelo prognóstico CLL- IPI

Categoria CLL-IPI	Sobrevivência global em 5 anos	Potencial consequência clínica
Baixo risco	93,2%	Ausência de tratamento
Risco intermédio	79,3%	Ausência de tratamento, exceto se a patologia for sintomática
Risco elevado	63,3%	Tratamento recomendado, exceto no caso de a patologia ser assintomática
Risco muito elevado	23,3%	Se existir necessidade de tratamento devem ser utilizados novos agentes ou tratamentos em estudos clínicos e não deve ser realizada quimioterapia

(Adaptado de Hallek et al., 2019)

1.1.3 - Diagnóstico

Conforme o *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukaemia (IWCLL) 2018*^[16] que corresponde a uma atualização do *IWCLL 2008*^[17] adaptado das recomendações do *National Cancer Institute-Working Group (NCI-WG) 1996*^[18], o diagnóstico da LLC deve de obedecer aos seguintes critérios:

- i) Presença de pelo menos 5×10^9 linfócitos B/L no sangue periférico;
- ii) Perfil imunofenotípico peculiar mostrando restrição da cadeia leve clonal (cadeia kappa ou lambda), expressão de CD5, CD19 e CD23 e baixos níveis de CD20, CD79b e expressão de imunoglobulina de superfície. Nas células de LLC a imunoglobulina encontra-se em baixos níveis quando comparadas com linfócitos B normais.

Para o diagnóstico da LLC basta ocorrer a expressão de CD19, CD5, CD20, CD23 e a restrição das cadeias lambda e kappa.^[16,68]

1.1.4 – Prognóstico

O percurso clínico dos doentes com LLC é heterogêneo e a sobrevivência a esta patologia varia entre alguns meses a várias décadas. Os doentes que têm uma sobrevivência de várias décadas, podem não necessitar de tratamento, tendo apenas acompanhamento ao longo do tempo. Em contrapartida, aproximadamente um terço dos doentes apresentam uma patologia muito agressiva com anemia, trombocitopenia e/ou linfadenopatias volumosas e/ou esplenomegalia, tendo uma sobrevivência de apenas alguns meses a 2-3 anos mesmo com o tratamento. Atualmente os tratamentos disponíveis para a LLC têm apenas como objetivo induzir a mitigação desta patologia pois a LLC continua a ser considerada uma doença incurável na maioria dos casos.

Hoje em dia, não existem fatores prognósticos que sejam capazes de distinguir os doentes que necessitam de tratamento daqueles que não necessitam de tratamento. No entanto, existem fatores prognósticos que são amplamente utilizados como os sistemas de estadiamento de Binet e Rai e o tempo de duplicação dos linfócitos para indicação do tratamento.

Além disso, foram identificados alguns marcadores biológicos tais como: as alterações genéticas mais comumente encontradas, as mutações no gene *IGHV*, mutação no gene *TP53* e outras novas mutações genéticas.^[2]

Aproximadamente 80% dos doentes têm pelo menos 1 das 4 alterações cromossômicas mais comuns, em vários casos estas alterações envolvem a perda ou o ganho de material genético, em contrapartida, as translocações são eventos raros nesta patologia.^[11]

As alterações genéticas mais comuns como fatores prognósticos incluem: a del-(13q), a del-(17p), a del-(11q) e a trissomia do cromossoma 12. A alteração cromossômica mais comum é a del-(13q) que está presente em mais de 50% dos doentes e geralmente, quando isolada, encontra-se associada a um prognóstico favorável e estes doentes apresentam melhor prognóstico do que aqueles que possuam um cariótipo normal, apresentando também uma melhor resposta à terapia. ^[2, 3, 12,22]

A alteração cromossômica menos comum é a del-(17p) que está presente em aproximadamente 7% dos casos de LLC. No entanto, a sua prevalência é mais elevada em casos refratários e ao longo do curso da doença (aproximadamente 30%), estando esta deleção relacionada com a perda do gene supressor tumoral *TP53*. Esta alteração cromossômica normalmente encontra-se ligada a resistência ao tratamento, ao reaparecimento precoce da doença e a uma evolução clínica desfavorável. ^[2, 3, 13, 19]

Os indivíduos portadores da del-(11q), encontrada em aproximadamente 5–20% dos casos, geralmente possuem linfadenopatias volumosas e um pior percurso clínico, com uma expectativa de vida mais reduzida. O gene supressor de tumor *ATM* encontra-se localizado nesta região, sendo afetado por esta deleção e, conseqüentemente, esta deleção está associada a alterações neste gene que codifica uma proteína envolvida na reparação do DNA. [2, 3, 14]

Por fim, a trissomia do cromossoma 12 é encontrada sensivelmente em 10–20% dos casos de LLC, tendo sido classificada segundo o modelo de prognóstico hierárquico original por Dohner et al., 2000 [15] como um marcador prognóstico intermediário. [15,102] Esta alteração cromossômica geralmente encontra-se associada a uma expectativa de vida um pouco mais curta. [2,3]

As mutações ou a ausência de mutações no gene *IGHV* também constituem um fator prognóstico.

A LLC pode ser classificada em dois subtipos que diferem entre si pelo facto das células leucémicas expressarem o gene *IGHV* mutado (M-LLC) ou não mutado (U-LLC). A origem das células leucémicas que expressam o gene *IGHV* não mutado é uma célula B naïve que não sofreu diferenciação nos centros germinativos, enquanto que, as células leucémicas que possuem o gene *IGHV* mutado têm origem numa célula B de memória do centro pós-germinativo que expressa imunoglobulina que sofreu uma hipermutação somática podendo sofrer também uma troca de isótipo de imunoglobulina. Estudos recentes indicam que doentes que sejam portadores do gene *IGHV* mutado possuem um maior período de tempo para o primeiro tratamento e uma expectativa de vida superior à dos doentes que sejam portadores do gene *IGHV* não mutado. Assim, os doentes que possuem o gene *IGHV* não mutado apresentam uma patologia mais agressiva quando comparados com os doentes que possuem este gene mutado. [3,22]

Um terceiro aspeto que é também considerado como fator prognóstico nesta patologia é a mutação no gene *TP53*. A mutação neste gene, na maioria dos casos, encontra-se associada à del-(17p), no entanto, aproximadamente 5% dos doentes que necessitam de tratamento possuem esta mutação na ausência da del-(17p). Para além das mutações neste gene também foram identificadas mutações em outros genes que poderão constituir fatores prognóstico, como por exemplo, o gene *NOTCH1* onde as mutações neste gene mostraram ter um efeito negativo na sobrevivência global dos doentes e estão relacionadas a uma maior probabilidade de ocorrência da transformação de Richter, ou seja, uma maior probabilidade da transformação da LLC em mieloma múltiplo, leucemia pró-linfocítica, leucemia linfoblástica, linfoma não-Hodgkin ou linfoma de Hodgkin; mutações no gene *SF3B1* que também estão

associadas a menor sobrevivência global e, por fim, mutações no gene *BIRC3* que estão associadas a um prognóstico semelhante ao de doentes que possuem mutações no gene *TP53* [2, 20, 21].

Para além dos fatores prognósticos mencionados anteriormente, atualmente, são considerados também outros fatores de prognóstico que se encontram referidos na tabela 4.

Tabela 4 – Biomarcadores prognósticos na LLC

Categoria	Biomarcadores prognóstico
Marcadores séricos	Timidina cinase, beta2-microglobulina, desidrogenase láctica, tempo de duplicação de linfócitos, interleucina-6 autócrina, cobre, cadeias leves livres, lipoproteína lípase, proteína de reação c, BAFF, TACI, APRIL, BCMA, EZH2
Marcadores imunofenotípicos	CD38, ZAP70, CD49d, CD26, CD54, CD44, CD52, CD69, CD25, CD5, CD95, CD39, CD11c, CD36, CD150
Status mutacional do gene <i>IGHV</i>	M-LLC, U-LLC
Alterações cromossómicas	Del13q, del11q, trissomia do cromossoma 12, del17p, del16q, del19p21, del10q23, trissomia total ou parcial dos cromossomas 3, 8, 18, 19 e duplicações em 2p24
Mutações genéticas	TP53, ATM, NOTCH1, BIRC3, MYD88, SF3B1, FBXWY, POT1, CHD2, RPS15, IKZF3, ZNF292, ZMYM3, ARID1A, PRPN11, COBLL1, LPL, ZAP70
RNA não codificantes e outros	Mir-15a, miR-16-1, miR-155, miR-29a, miR-29b, miR-34a, miR125a, miR-155, miR-181b, l-tRF-GlyCCC

(Adaptado de Yun et. al., 2020)

1.2 – Epigenética e LLC

A epigenética corresponde a uma área da biologia que descreve modificações hereditárias num cromossoma, como sendo alterações no DNA e nas histonas, afetando a atividade transcricional sem que ocorra alteração da sequência primária de nucleótidos deste ácido nucleico. As alterações epigenéticas em células normais são importantes para o seu desenvolvimento adequado. No entanto, em células cancerígenas estas modificações atuam de uma forma descontrolada culminando em alterações na estrutura da cromatina, proporcionando a regulação positiva de genes promotores de tumor (oncogenes), a regulação negativa de genes supressores de crescimento (genes supressores tumorais) e instabilidade nuclear, levando assim, ao descontrolo da proliferação e à expansão celulares. As alterações na estrutura da cromatina estão associadas à regulação do ciclo celular, morte celular, lesão e reparação do DNA, replicação do DNA e estabilidade geral do genoma. Entre as modificações epigenéticas mais conhecidas, a metilação do DNA e as modificações pós-traducionais das proteínas histónicas, na forma de acetilação/desacetilação, metilação, ubiquitinação e fosforilação são alterações hereditárias que influenciam a estrutura da cromatina. [8, 22]

1.2.1 – Metilação do DNA

A metilação do DNA é uma reação enzimática onde ocorre a adição de um grupo metilo (CH_3) ao carbono 5 do anel de citosina dando origem a uma 5-metilcitosina, sendo esta reação mediada pelas DNA metiltransferases (DNMT) (Figura 1).

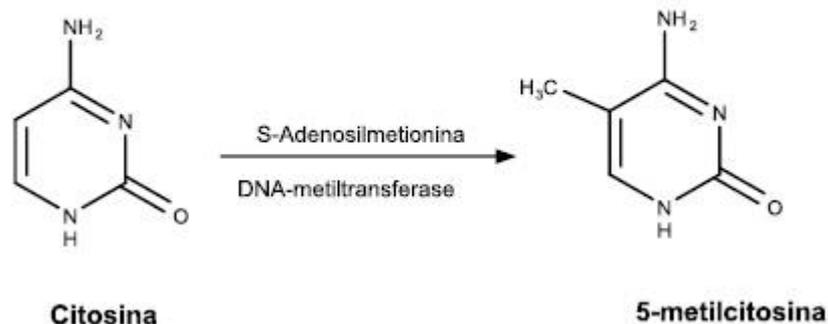


Figura 1 - Reação de metilação no nucleotídeo citosina do DNA. Adição de um grupo metilo (CH_3) ao carbono número 5 da citosina dando origem a 5-metilcitosina. Esta reação é mediada pela DNA metiltransferase que é responsável pela adição deste grupo químico. A S-adenosilmetionina (SAM) é o grupo dador de CH_3 .

A metilação do DNA ocorre geralmente em resíduos de citosina dando origem a 5-metilcitosinas (Figura 1), como mencionado. No entanto, com o envelhecimento dos doentes é observada a diminuição da 5-metilcitosina. O dador endógeno do grupo metilo é a S-adenosilmetionina (SAM), sendo que, os níveis deste dador podem sofrer variações entre indivíduos em consequência de alterações, por exemplo, na ingestão alimentar. Esta reação enzimática geralmente encontra-se envolvida na expressão génica dos tecidos, no *imprinting* genómico e na embriogénese. Os dinucleotídeos CpG, que se encontram distribuídos por todo o genoma, são o local onde ocorre a maior parte da metilação do DNA. Estes dinucleotídeos podem ser localizados em exões, intrões ou em promotores, no entanto, a sua maioria encontra-se localizada nas regiões não codificantes dos cromossomas, designadas por elementos repetitivos, que possuem um elevado nível de metilação. Pelo contrário, sequências que possuem 500 pares de bases ou mais, designadas por ilhas CpG geralmente não são metiladas, estando localizadas no promotor ou no primeiro exão de aproximadamente 50% dos genes. Em contraste, as células cancerígenas demonstram a ausência de uma grande parte das citosinas metiladas em todo o genoma (figura 2), resultando em instabilidade genética. Em contrapartida, os promotores das ilhas CpG, nestas células, são hipermetilados culminando no silenciamento do gene. [7,8,22]

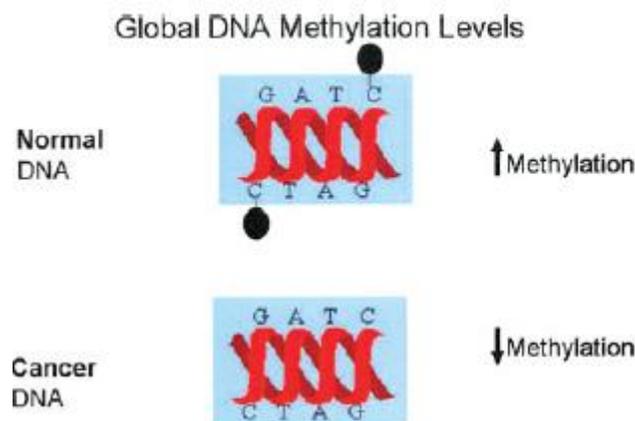


Figura 2 – As células cancerígenas revelam um menor grau de metilação do DNA quando comparadas com células saudáveis. (Adaptado de Yu et al., 2006)

A metilação do DNA é um processo que conduz à inibição da atividade de transcrição de vários genes através de diversos mecanismos. Em patologias cancerígenas, a hipermetilação anómala do DNA conjugada a um processo de hipometilação global, coopera para a inativação de genes supressores de tumor e para a instabilidade genómica. As enzimas responsáveis pela metilação do DNA são as DNMT. Estas enzimas são classificadas em 3 tipos distintos: DNMT1, DNMT3A e DNMT3B. A DNMT1 é responsável principalmente pela metilação do DNA durante o processo de replicação, enquanto que, a DNMT3A e DNMT3B são responsáveis pelo silenciamento de genes nas células cancerígenas. A DNMT1, em conjunto com os processos de reparação de lesões ao DNA, possui um papel de proteção das células para que não ocorram mutações. [8, 69]

No contexto da LLC, os doentes possuem um DNA na sua generalidade metilado quando comparado com células mononucleares saudáveis. A metilação anormal poderá ser um evento inicial desta patologia porque o perfil de metilação do DNA é relativamente estável com o decorrer do tempo e muito semelhante entre o sangue periférico e os gânglios linfáticos. *Lipsanen et al., 1988* descreveu primeiramente que na LLC poderia haver uma desregulação epigenética depois de detetar hipometilação do gene *ornitina descarboxilase* e do oncogene *ERB-A1*. [23] Passado algum tempo *Wahfors et al., 1992* demonstrou que na LLC ocorre uma hipometilação global do DNA, sendo isto, confirmado posteriormente por *Kulis et al., 2012*. [24,25] Por outro lado, foi também referida a hipometilação do gene *H-RAS* na LLC com origem em células B,

assim como, nos genes do fator de necrose tumoral α e β na LLC com origem em células B e T. [74]

A hipometilação pode acelerar o processo leucémico através de dois mecanismos, o primeiro é por meio da re-expressão de oncogenes silenciados e o segundo é através de translocações cromossômicas causadas por instabilidade cromossômica. Por outro lado, uma diminuição da atividade das enzimas responsáveis pela reciclagem da SAM devida a polimorfismos nestas enzimas poderá também induzir hipometilação. [7,8,22]

Relativamente a hipermetilação na LLC, até à data foram apontados diversos genes hipermetilados que incluem genes supressores de tumor, fatores de transcrição, genes relacionados com a sobrevivência e a proliferação, genes com influência no prognóstico e microRNAs. O primeiro evento de hipermetilação detetado na LLC foi a hipermetilação do promotor do gene da transcriptase reversa da telomerase humana (*hTERT*). A transcriptase reversa da telomerase (TERT) corresponde à subunidade catalítica da telomerase que tem como função catalisar a adição de nucleótidos às extremidades dos telómeros de forma a evitar a degradação cromossômica no final da replicação do DNA. No entanto, a hipermetilação do promotor do gene *hTERT* foi relacionada com a diminuição da atividade da telomerase e com maior sobrevivência global. [22]

Outro gene que se encontra silenciado por metilação do DNA na LLC é o gene *TWIST2*, que codifica um fator transcricional crucial ao desenvolvimento da mesoderma embrionária. A metilação do promotor deste gene encontra-se associada ao facto do gene *IGHV* estar ou não mutado, sendo que, a metilação deste promotor é observada principalmente em casos de M-LLC. A metilação do promotor do gene *TWIST2* é vista como um possível mecanismo para a disfunção do gene *TP53* nesta patologia. Sendo esta proteína conhecida como um marcador prognóstico negativo na LLC. A proteína cinase 70 associada à cadeia zeta (*ZAP70*) corresponde a uma tirosina cinase importante na sinalização das células B e T, que possui uma expressão aumentada em doentes de LLC com o gene *IGHV* não mutado. No entanto, a metilação de CpG adicionais no intrão 1 de *ZAP70* estão relacionados com uma diminuição de expressão desta tirosina cinase em doentes com M-LLC. [7,22, 26] O gene *HOX4A* corresponde a outro gene que se encontra anormalmente metilado na LLC, sendo este gene crucial no desenvolvimento embrionário e na proliferação. A elevada metilação deste gene leva a uma diminuição da quantidade de proteína, a um resultado clínico negativo estando associado à U-LLC. Por fim, a hipermetilação do promotor do gene da proteína cinase 1 associada à morte (*DAPK1*), que corresponde a um mediador de apoptose, está relacionada com a regulação negativa da expressão génica na LLC, sugerindo que o

silenciamento anormal de *DAPK1* poderá ser um evento no desenvolvimento desta leucemia.

1.2.2 – Modificações epigenéticas das histonas e LLC

As histonas podem ser alteradas por várias enzimas com capacidade de acetilar/desacetilar, metilar/desmetilar, fosforilar/desfosforilar e ubiquitinar. A natureza da cromatina é definida pela combinação destas modificações pós-traducionais, sendo esta natureza designada como “código de histona”. Desta forma temos a eucromatina, que corresponde à cromatina transcricionalmente ativa, e a heterocromatina que é a cromatina transcricionalmente inerte. As modificações pós-traducionais da cauda das histonas são responsáveis pelo empacotamento da cromatina e pelo acesso à informação genética. A acetilação de histonas corresponde à adição de um grupo acetil (-COCH₃) ao resíduo de lisina da cauda da histona, levando à perda da carga positiva, ou seja, enfraquece a interação entre a histona e o DNA, sendo esta reação mediada pelas histonas acetiltransferases (HATs). A acetilação da histona resulta numa conformação do DNA mais acessível aos fatores de transcrição e ao processo de transcrição. Por outro lado, na desacetilação das histonas ocorre a remoção do grupo acetil e o restabelecimento da carga positiva, resultando numa cromatina compacta. Este processo de desacetilação resulta na inibição do processo de transcrição e é mediado pelas histonas desacetilases (HDACs), tal como ilustrado na figura 3. Em conjunto, as HATs e as HDACs controlam o nível da acetilação proteica. [8, 22,100]

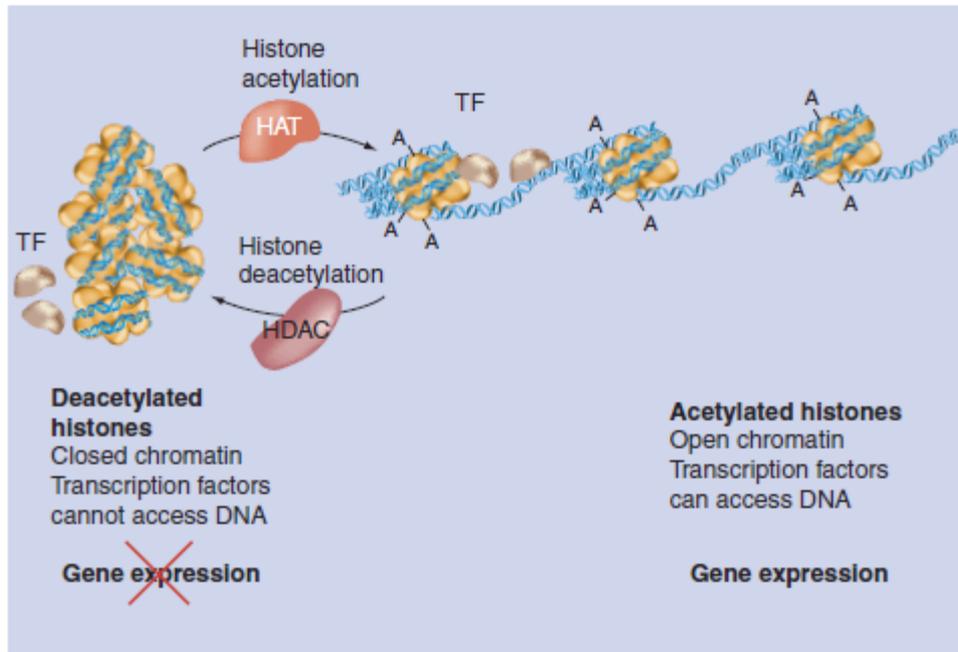


Figura 3 – Controle da atividade transcricional através de alterações na estrutura da cromatina por acetilação. HAT, acetiltransferase das histonas; HDAC, desacetilase das histonas; TF, fator de transcrição. (Adaptado de Prince et al., 2009)

A organização do DNA em nucleossomas (estruturas pertencentes à cromatina) é realizada pelas proteínas histónicas e não histónicas, ou seja, a incorporação ou a extração de grupos funcionais das histonas conduz à alteração da estrutura da cromatina interferindo no acesso ao DNA para o processo da transcrição.

O processo de acetilação é o principal responsável pela regulação de várias funções celulares e de muitas proteínas que se encontram envolvidas em processos como a replicação e reparação do DNA, a progressão do ciclo celular, progressão do gene, degradação de proteínas e reorganização do citoesqueleto. Este processo é realizado principalmente por duas classes de enzimas que são as HATs e HDACs, como mencionado. No geral, a acetilação de histonas encontra-se relacionada com o processo de transcrição do gene, enquanto que, a hipoacetilação/desacetilação de histonas conduz ao silenciamento dos genes.

As HDACs são um alvo promissor nas patologias oncológicas porque nestas patologias ocorre um aumento da expressão destas enzimas. Estas enzimas em conjunto com as HATs possuem a função de regulação da acetilação de proteínas alvo. Atualmente são conhecidas 18 HDACs que se encontram classificadas em quatro classes tendo em conta a sua homologia com as HDACs de levedura, estas são classificadas de acordo com a sua estrutura, especificidade do substrato, localização sub-celular, mecanismo enzimático e expressão específica de tecido. Sendo que, estas

classes diferem entre si apenas pela localização sub-celular das HDACs. As HDACs da classe I incluem as HDACs 1,2,3 e 8 estas encontram-se localizadas no núcleo e nos fatores de transcrição, encontrando-se expressas ubiquamente. As HDACs de classe II são divididas em 2 subclasses, sendo específicas de tecido: HDACs de classe IIa, que possuem um grande terminal carboxílico (C-terminal), incluem as HDACs 4,5,7 e 9 e as HDACs da classe IIb, que possuem 2 domínios de desacetilase, incluem as HDACs 6 e 10, que por sua vez estão localizadas no núcleo sendo transportadas para o citoplasma após sofrerem fosforilação pela proteína cinase C ou D, estas atuam principalmente sob proteínas não histônicas. As HDACs pertencentes às classes I, II e IV necessitam do íon de zinco (Zn^{2+}) e partilham de um domínio catalítico que é semelhante ao usado para a hidrólise de acetil-lisina, por outro lado, as HDACs que pertencem à classe III precisam de um dinucleótido de adenina nicotinamida (NAD) para exercer a sua atividade enzimática. As HDACs de classe III, também conhecidas por sirtuínas (SIRT 1-7), possuem uma sequência homóloga à das histonas de levedura, estas desacetilases são “não clássicas”, contendo um local catalítico conservado. No entanto, é considerada a hipótese de que as HDACs de classe III possuam um papel no metabolismo e na longevidade. Por fim, as HDACs de classe IV possuem características das de classe I e classe II, sendo que, a única HDAC que é conhecida da classe IV é a HDAC 11. [59,60,61,70]

Nas células cancerígenas, de tumores sólidos e hematológicos, a expressão das HDACs é anormalmente elevada, assim, estas têm sido relacionadas com a aquisição de fenótipos cancerígenos na carcinogénese. Por exemplo, as HDACs de classe I potenciam a proliferação e a sobrevivência celular. A apoptose de células cancerígenas pode ser inibida tanto pela HDAC1 como pela HDAC2. Por outro lado, as HDACs 3,4,5 e 8 poderão inibir a diferenciação e as HDACs 4,6,9 e 10 encontram-se relacionadas com a angiogénese do tumor, enquanto que, as HDACs pertencentes à classe IIb (HDACs 6 e 10) conduzem à motilidade celular, levando à metástase.

Estudos apoiam que as modificações das histonas correspondem aos primeiros eventos durante a inibição da transcrição, seguindo-se a metilação do DNA com o objetivo de silenciar um gene, levando a um ambiente de heterocromatina. Por outro lado, muitos estudos apoiam que é a metilação do DNA que é responsável por mediar o silenciamento, sendo seguida pela desacetilação e metilação de histona, seguindo-se alterações da cromatina que não permitem que o processo de transcrição ocorra. [8]

Diversos estudos verificaram que a alteração da regulação das enzimas com capacidade de modificarem as histonas dá uma elevada contribuição para o início e desenvolvimento do cancro. Numa pequena percentagem de doentes com LLC a expressão alterada de *EZH2* e as mutações que provocam lesões nos complexos de

remodelação da cromatina podem estar envolvidos no desenvolvimento desta patologia. No entanto, na LLC as mutações em enzimas que são responsáveis pela regulação do epigenoma são raras. [22, 33,34,35,36,37]

A enzima histona-lisina-N-metiltransferase *EZH2* tem como função a catálise da metilação da histona H3 no resíduo de lisina 27, levando ao silenciamento transcricional. Em doentes com U-LLC foi demonstrado que ocorre um aumento da expressão de *EZH2*. No entanto, estes doentes possuíam poucas mutações no gene *TP53*. Por outro lado, doentes que possuíam baixa expressão de *EZH2* apresentavam diversas mutações no gene *TP53*. A viabilidade das células de LLC aumenta com o aumento da expressão de *EZH2*, enquanto que, o knockdown de *EZH2* leva à apoptose celular. A desregulação de *EZH2* pode ser o resultado de vários mecanismos, podendo ser devida à expressão incomum de miR-101 que tem a capacidade de se ligar ao mRNA de *EZH2* promovendo a sua degradação, podendo também ser devida ao microambiente da patologia em estudo. [22, 38,39]

A LLC também pode ser influenciada por mutações nos constituintes dos complexos que são responsáveis pela remodelação da cromatina. Estes remodeladores da cromatina fazem parte da regulação dos eventos de reparação, replicação e transcrição do DNA. Os remodeladores da cromatina podem ser divididos em 4 famílias consoante a sua estrutura: SWI/SNF (“SWItch/Sucrose”), CHD (“Chromodomain Helicase DNA-binding”), ISWI (“Imitation of SWItch”) e INO80 (“INOsitol requiring 80”). Em aproximadamente 2% dos casos de LLC ocorrem mutações na subunidade ARID1A/BAF250a do complexo de remodelação da cromatina SWI/SNF. Apesar do papel desta subunidade na LLC ainda não tenha sido estudado, especula-se que mutações nesta subunidade possam dar uma vantagem de proliferação às células cancerígenas. [22, 40, 41,42,43,44,45]

Por outro lado, em aproximadamente 5% dos casos de LLC foram identificadas mutações no gene *CHD2* que corresponde a um membro da família de remodeladores da cromatina CHD, sendo que, a maioria destes casos está associada a M-LLC e apresenta um prognóstico favorável.

1.3 - Tratamento

As indicações para o tratamento incluem anemia pronunciada relacionada à patologia ou trombocitopenia, o que corresponde a doentes com patologia em estágio III ou IV de Rai ou patologia em estágio C de Binet, linfadenopatia sintomática e/ou

sintomas que não estão associados à patologia ativa, incluindo suores noturnos, fadiga, perda de peso não intencional ou febre sem evidência de infecção. Outras características essenciais para decidir quais os doentes que necessitam de tratamento são a presença da del-(17p) ou o gene *TP53* mutado. Outras características que influenciam a escolha da terapia são a idade superior a 65 anos, a existência de comorbilidades e os objetivos do tratamento. O status mutacional do gene *IGHV* cada vez mais é considerado como um parâmetro para a escolha da terapia, por exemplo, o tratamento com ibrutinib, destina-se também a doentes com LLC que possuam o gene *IGHV* mutado (figura 4). Em contrapartida, o estágio de Binet ou de Rai não tem influência na escolha da terapia. [2,3]

Os doentes assintomáticos com patologia em estágio inicial ou intermediário, que corresponde ao estágio I ou II de Rai e estágio A ou B de Binet, não são aconselhados para fazer terapia, devendo ficar em vigilância clínica e analítica, a menos que tenham doença sintomática ou evidência de progressão da patologia.

Outrora os doentes com LLC eram divididos em vários grupos consoante as características que apresentavam: num primeiro grupo eram incluídos os doentes que não apresentam comorbilidades e que possuíssem uma função renal normal. Estes doentes se tivessem uma progressão desta patologia eram submetidos a quimioimunoterapia em combinação com fludarabina, ciclofosfamida e rituximab (FCR). [2]

No segundo grupo, estavam os doentes que eram caracterizados por comorbilidade relevante e função renal comprometida, que correspondiam à maioria dos casos de LLC. Na Europa estes doentes eram tratados com o agente alquilante clorambucil em monoterapia. A terapia com este agente alquilante apresentava diversas vantagens como uma boa tolerabilidade e um baixo custo, no entanto, este tratamento resultava numa reduzida taxa de resposta e um aumento da probabilidade de desenvolvimento de mielodisplasia. [2]

No último grupo eram incluídos os doentes que possuíssem a del-(17p) ou mutações no gene *TP53*. A presença destas alterações por si só não é uma indicação para tratamento, no entanto, se estas alterações forem identificadas em doentes que apresentem uma patologia progressiva que requeira tratamento estão relacionadas com um mau prognóstico, não existindo ainda tratamento para estes casos. Contudo, foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e pela *Agência Europeia do Medicamento* (EMA) novos inibidores de cinase (Ibrutinib e Idelalisib) para doentes que tenham a deleção 17p e que não possam realizar quimioimunoterapia. [2,68]

Atualmente, há diversas estratégias para o tratamento da LLC, como um tratamento contínuo com inibidores de tirosina cinase de Bruton (BTKis) como, por exemplo, o ibrutinib assim como a terapia durante um determinado período de tempo com anticorpos CD20. Por outro lado, atualmente foi aprovada pela EMA e pelo FDA a combinação terapêutica do venetoclax com obinutuzumab como sendo um tratamento de primeira linha para a LLC. A figura 4 ilustra resumidamente o tratamento de primeira linha usado na LLC. [101]

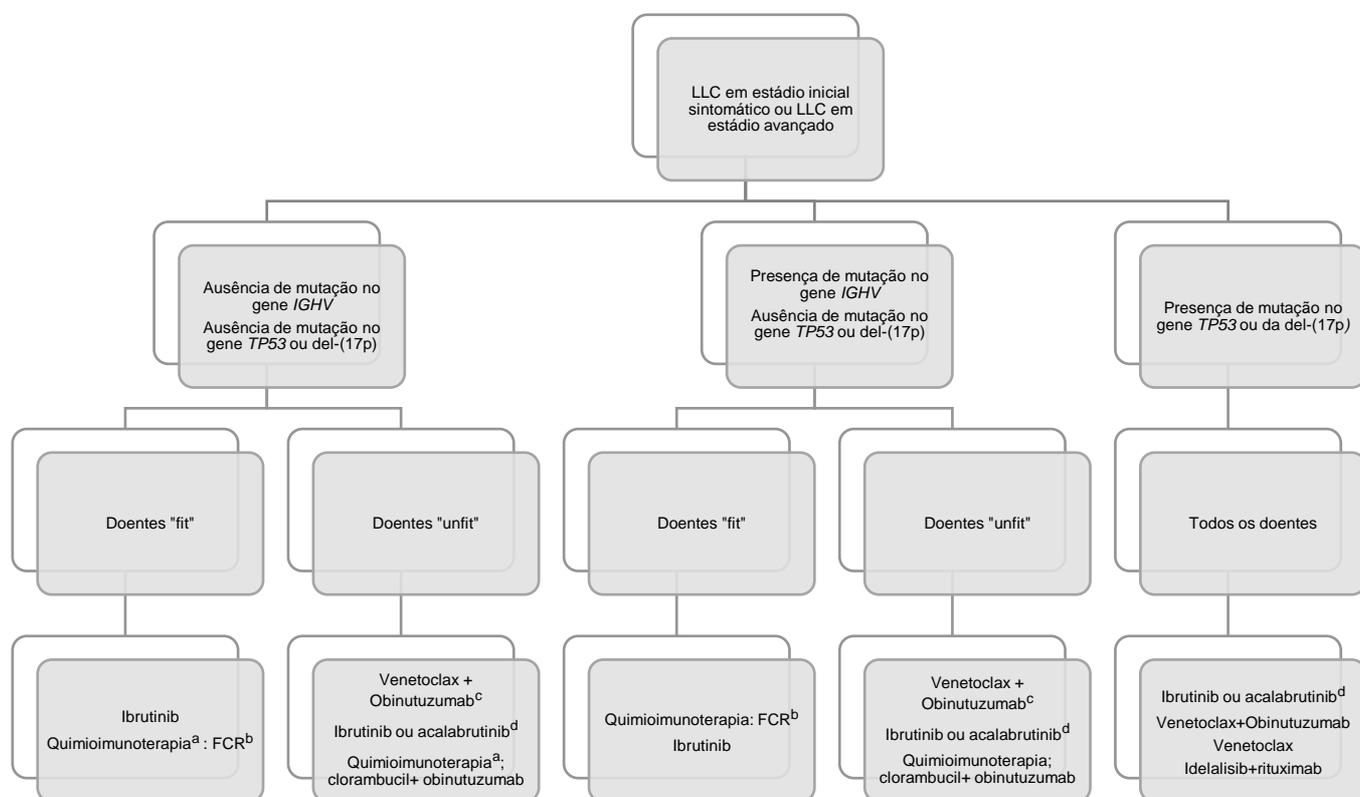


Figura 4 – Terapia de primeira linha para a LLC.

FCR, Fludarabina, ciclofosfamida e rituximab; BR, bendamustina + rituximab

^a Quimioimunoterapia como tratamento alternativo, se a justificção for contra o tratamento com terapias direcionadas ou por indisponibilidade

^b BR poderá ser considerado como tratamento alternativo em doentes com uma idade superior a 65 anos

^c Se disponível

^d Se disponível e aprovado

(Adaptado de Eichhorst et. al., 2021)

A LLC é uma patologia caracterizada por alterações genéticas e epigenéticas, no entanto, as alterações epigenéticas são reversíveis. Assim, esta reversibilidade torna a regulação de uma forma positiva de genes supressores de tumor um alvo atrativo no tratamento desta patologia. A inibição das DNMTs ou de HDACs possui a capacidade de reversão do silenciamento de genes supressores de tumor. Neste sentido, no presente trabalho foi avaliado o potencial de moduladores epigenéticos (agentes hipometilantes e inibidores da desacetilação das histonas) na LLC.

1.3.1. – Agentes hipometilantes

Os agentes hipometilantes são compostos que revertem o silenciamento de genes provocado pela hipermetilação, podendo levar a uma recuperação do controlo da proliferação e da sensibilidade à apoptose. [73]

No presente estudo foram utilizados os agentes hipometilantes azacitidina e a decitabina que são inibidores das DNMTs. Estes azanucleosídeos são definidos como agentes citostáticos com a capacidade de inibir a metilação do DNA, no entanto, podem apresentar efeitos citotóxicos e conduzir à desmetilação do DNA. Estes compostos são captados a nível celular e, posteriormente, tem de ocorrer a sua ativação e a sua conversão metabólica no nucleotídeo ativo, 5-aza-2'-desoxicitidina-5-trifosfato, para que ocorra inibição da metilação do DNA. Esta reação é catalisada por diferentes enzimas, sendo que, no caso da azacitidina é catalisada pela uridina-citidina cinase e no caso da decitabina é catalisada pela desoxicitidina cinase. Estes compostos tornam-se substratos na replicação do DNA podendo, também serem incorporados ao RNA, onde a azacitosina substitui a citosina, após a sua metabolização. O metabolito trifosfatado, que se encontra incorporado no DNA, liga-se à DNMT1 provocando a degradação desta, consequentemente, ocorre hipometilação do DNA.

As DNMTs reconhecem os dinucleótidos azacitosina-guanina como substrato natural, iniciando a reação de metilação por meio de um ataque nucleofílico, dando origem a uma ligação covalente entre o átomo de carbono 6 do anel de citosina e a enzima.

Esta ligação covalente pode ser quebrada recorrendo a uma eliminação β a partir do átomo de carbono 5, no entanto, a reação é bloqueada com azacitosina, onde ocorre a substituição do carbono 5 por um átomo de nitrogénio. Desta forma a enzima vai permanecer ligada covalentemente ao DNA sendo a sua função de DNMT bloqueada.

Para além disto, a funcionalidade do DNA e a ativação da sinalização de lesões ao DNA podem ser comprometidas pela adução da proteína covalente culminando na degradação das DNMTs, conseqüentemente, os vestígios de metilação desaparecem durante o processo de replicação do DNA (Figura 5). [73]

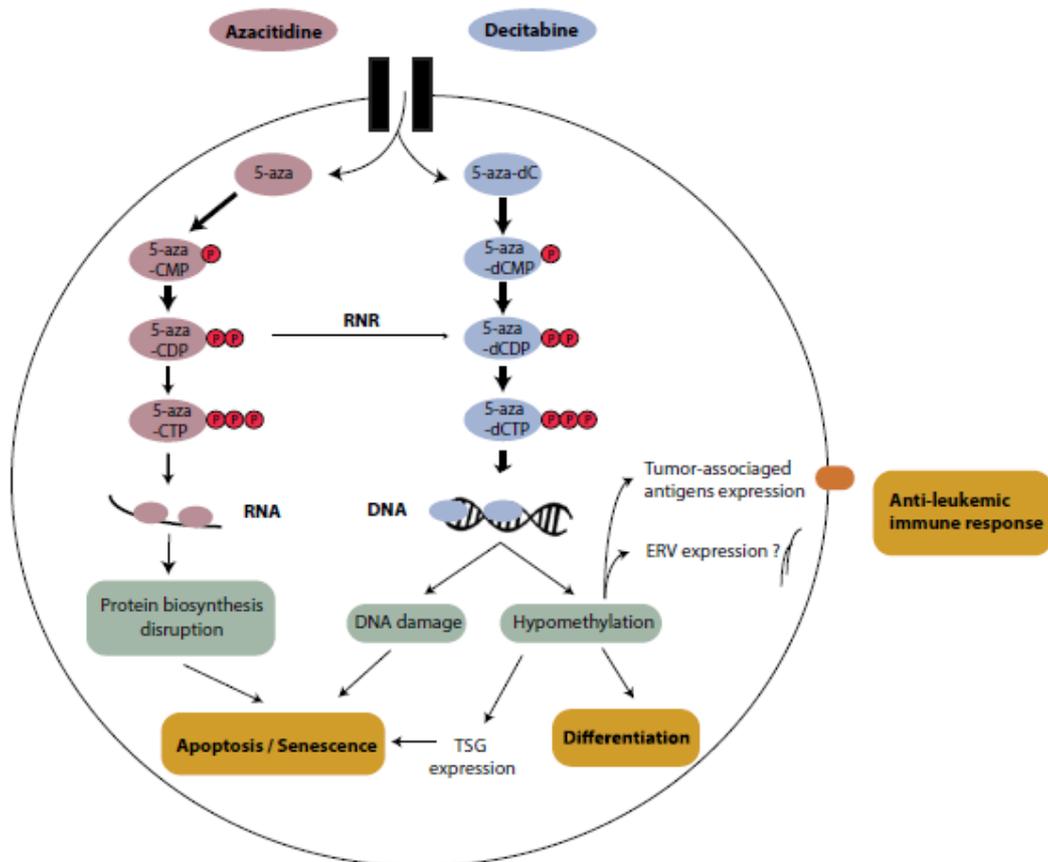


Figura 5 – Mecanismo de ação molecular e celular dos agentes hipometilantes. Após serem absorvidos e captados a nível celular, os agentes hipometilantes são fosforilados por cinases intracelulares, dando origem a um metabólito trifosfatado ativo para a inibição da metilação do DNA, sendo este metabólito incorporado ao DNA durante o ciclo celular. Uma vez incorporado ao DNA, o metabólito trifosfatado liga-se à DNMT1 levando à degradação desta enzima, promovendo, assim, uma hipometilação do DNA. Este processo conduz à ativação de genes supressores de tumor silenciados, culminando em senescência e apoptose. Por outro lado, estes agentes hipometilantes também podem induzir a expressão de antígenos relacionados a tumores, que por sua vez, poderão levar a uma resposta imune anti-tumoral. O metabólito trifosfatado incorporado ao DNA pode também induzir lesão ao DNA. Por outro lado, a incorporação deste metabólito ao RNA pode levar à interrupção da síntese de proteínas podendo também promover a apoptose. (Adaptado de Duchmann et al., 2019)

1.3.1.1 - Azacitidina

A azacitidina (figura 6) é um análogo do nucleosídeo pirimidina, descoberto há aproximadamente 60 anos, sintetizado e caracterizado por Sorm et al., durante a década de 1960 [47,48]. Durante esta década foi feita a investigação da eficácia da 5-azacitidina em doenças neoplásicas, tendo sido descoberto que este composto além de possuir efeitos antimetabólicos também possui uma atividade anticancerígena em doentes com leucemia mieloide aguda e em doentes com síndrome mielodisplásica [49,58]. A atividade de inibição das DNMTs por parte da 5-azacitidina foi descoberta em 1980 por Jones e Taylor [50]. A eficácia clínica, a segurança, o benefício na qualidade de vida do doente e a redução da probabilidade de transformação da síndrome mielodisplásica em leucemia mieloide aguda da 5-azacitidina foram confirmados na década de 1980 [51,52,53,54].

Posto isto, este modulador epigenético foi aprovado nos Estados Unidos da América pela *FDA* em maio de 2004 para ser utilizado no tratamento da síndrome mielodisplásica e na União Europeia pela *EMA* para o tratamento da leucemia mielomonocítica, leucemia mieloide aguda e síndrome mielodisplásica. [55,56]

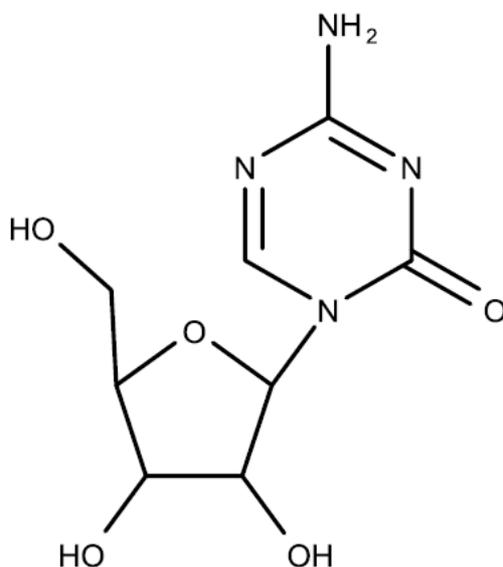


Figura 6 - Estrutura química da azacitidina

Este fármaco, ao contrário da decitabina, possui a capacidade de se integrar tanto no DNA como no RNA conduzindo à inibição da síntese de proteínas, no entanto, necessita de ser convertida num nucleosídeo de trifosfato ativo. [46,58]

A azacitidina possui principalmente dois mecanismos de ação (figura 7) para a sua atividade anticancerígena. O primeiro é através da incorporação desta molécula no RNA levando à interrupção do metabolismo deste ácido nucleico. Após ser absorvida pelas células sofre fosforilação, por ação de diversas cinases, sendo convertida em 5-aza-2'-desoxicitidina e, posteriormente, em trifosfato. A ribonucleotideo redutase, por sua vez, metaboliza a ribose, que faz parte da estrutura da azacitidina, para esta poder ser incorporada ao DNA. Ocorre a formação de um RNA mensageiro (mRNA) modificado, devido à inclusão da azacitidina no mRNA recém sintetizado, este mRNA alterado não codifica para a síntese de proteínas corretamente e, conseqüentemente, esta síntese é inibida. Um RNA de transferência (tRNA) anormal também pode ser um motivo para ocorrer a inibição da síntese de proteínas pois a integração da azacitidina no tRNA, leva à inibição das metiltransferases assim como a uma perturbação na metilação e processamento do tRNA, ocorrendo a formação de um tRNA modificado a nível da sua estrutura e função. [46,49,58]

O segundo mecanismo de ação é através da inibição da metilação do DNA por meio da ligação deste fármaco às DNMTs de um modo irreversível, inibindo a progressão destas enzimas na cadeia dupla de DNA, resultando no término da atividade destas enzimas na célula. Considerando que locais que se encontrem completamente metilados estão relacionados com a supressão da expressão génica e locais que não se encontrem metilados ou que se encontrem hipometilados estão associados à transcrição ativa, então, o DNA não metilado poderá conduzir à transcrição de genes que foram anteriormente silenciados.

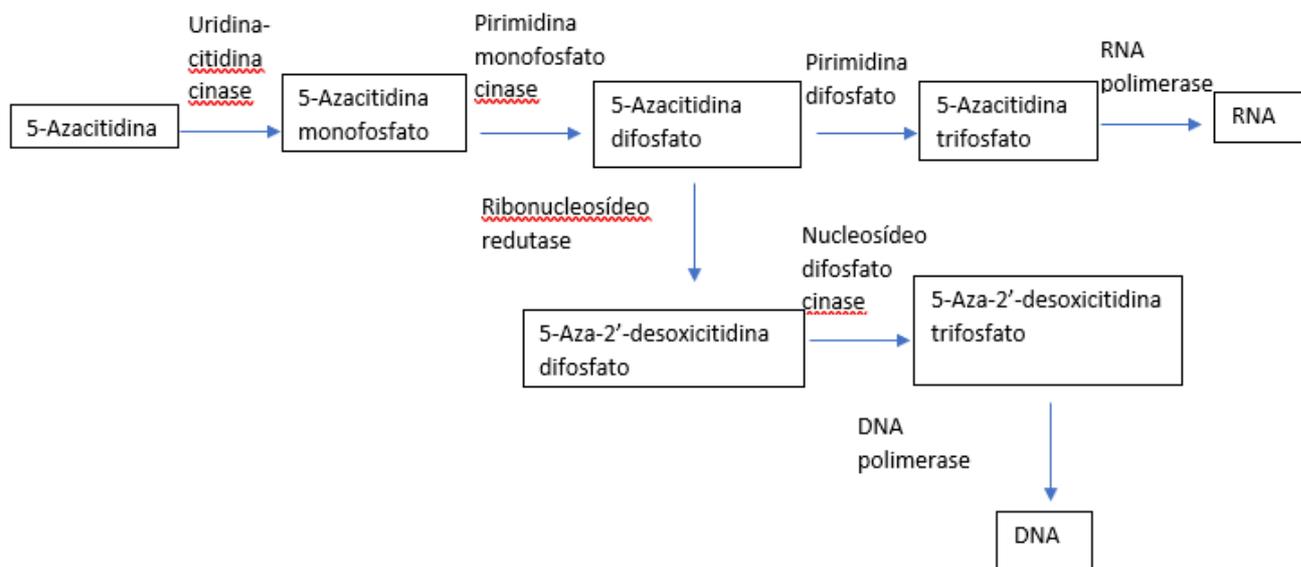


Figura 7 - Mecanismos de ação principais da azacitidina: i) Bloqueio do metabolismo do RNA através da fosforilação e incorporação a este ácido nucleico. II) Integração do DNA através da fosforilação e metabolização pela ribonucleotídeo redutase. (Adaptado de Florek et al., 2010)

Foi descoberto também que a azacitidina poderá inibir a acetilação das histonas, o que corresponde a outro mecanismo que permite controlar o silenciamento de genes. ^[46,57]

1.3.1.2 - Decitabina

A decitabina (5-aza-2'-desoxicitidina, figura 8) corresponde a um análogo de pirimidina, estruturalmente relacionado com a azacitidina, que foi sintetizada na década de 1960 por Sorm *et al.*, como sendo um agente citostático clássico. Este fármaco obteve a aprovação pelo FDA em 2006 para ser utilizado no tratamento de doentes com síndrome mielodisplásica, e pela EMA em 2012 para o uso no tratamento de doentes, com uma idade inferior a 65 anos, com leucemia mieloide aguda.

Ao contrário da azacitidina que possui uma estrutura de ribonucleosídeo, a decitabina apresenta uma estrutura de desoxirribonucleosídeo o que lhe confere um maior poder de inibição da metilação do DNA, quando comparada com a azacitidina. Após a sua captação celular, a decitabina sofre um processo de fosforilação por parte da desoxicitidina cinase, para a sua conversão no seu nucleotídeo ativo para a inibição da metilação do DNA, 5-aza-2'-desoxicitidina-5'-trifosfato. Esta só possui a capacidade

de se incorporar ao DNA e, portanto, após o processo de fosforilação e da sua inserção na cadeia dupla de DNA, ocorre a síntese de novas cadeias de DNA hipometiladas. Posteriormente, a decitabina origina um complexo covalente com a DNMT 1, cessando a atividade enzimática das células. [47,48,58,66,87]

A decitabina em doses inferiores é incorporada no DNA, no entanto, em doses elevadas este fármaco conduz à inibição da proliferação celular através da ligação covalente irreversível à DNMT e do bloqueio da síntese de DNA. Por outro lado, doses mais baixas da decitabina conduzem a hipometilação promovendo processos como a diferenciação celular, re-expressão de genes supressores de tumor, estimulação de mecanismos imunológicos e supressão do crescimento das células cancerígenas. [67]

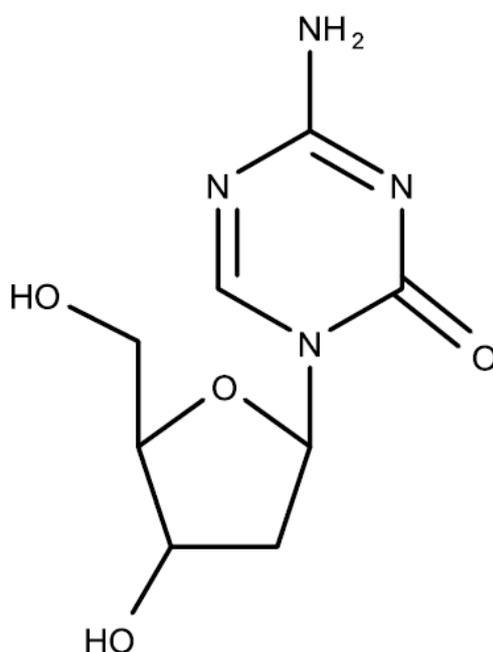


Figura 8 - Estrutura química da decitabina

1.3.2 - Inibidores das desacetilases das histonas

Os inibidores das HDACs (HDACi) são uma promissora estratégia na terapia do cancro. Estes fármacos possuem a capacidade de se ligarem ao local de ligação do ião Zn^{2+} das HDACs de classe I, II e IV. Assim, estes inibidores são classificados como sendo específicos de classe ou como inibidores da pan-desacetilase, sendo também classificados de acordo com a estrutura do grupo através do qual se ligam ao local de

ligação do Zn^{2+} , em ácidos gordos de cadeia curta, ácidos hidroxâmicos, ácidos carboxílicos, benzamidas, peptídeos cíclicos e inibidores da sirtuina e tubacina. Os HDACi possuem a capacidade de induzir a morte celular e provocar uma diminuição da proliferação celular por meio da inibição das histonas e não histonas. Resultando na interrupção do ciclo celular, apoptose pois estes impedem que ocorra a eliminação dos grupos acetilo das histonas no interior dos nucleossomas. Esta classe de fármacos também pode possuir outras funções por meio da indução de lesão oxidativa, modificações no sistema ubiquitina-proteassoma, inibição da função da proteína chaperone e aumento da expressão dos recetores relacionados com a morte celular. [61,70]

Este tipo de fármacos obteve aprovação principalmente no tratamento de linfomas cutâneos de células T (como por exemplo, o vorinostat) e para o tratamento do mieloma múltiplo (como por exemplo, o panobinostat). Assim, são agentes terapêuticos muito promissores para o tratamento de patologias malignas hematológicas, seja em monoterapia ou em combinações com outro tipo de fármacos como, por exemplo, os inibidores das DNMT referidos anteriormente.

1.3.2.1 - Vorinostat

O vorinostat (ácido suberoilânilida hidroxâmico, figura 9) corresponde a um composto de hidroxamato que foi aprovado pelo FDA em outubro de 2006 para o tratamento do linfoma de células T cutâneo, apresentando uma taxa de resposta clínica de cerca de 30%.^[61] Este fármaco conduz à inibição das HDACs de classe I e II levando à acumulação de histonas acetiladas e também de proteínas não histónicas, sendo que, estudos apontam que o vorinostat conduz a uma inibição da proliferação celular que é dependente da dose de fármaco e leva à morte celular. Este modulador epigenético é um forte inibidor das HDACs 1,2,3 e 6, no entanto, tal como outros HDACi, o vorinostat não inibe HDACs de classe III. [61, 62, 70,72]

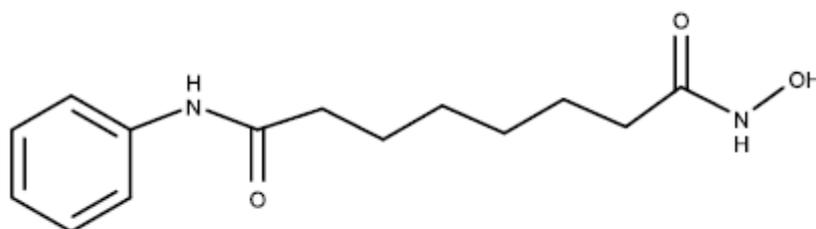


Figura 9 - Estrutura química do vorinostat

O vorinostat apresenta mecanismos de ação que são complexos e ainda não são totalmente conhecidos. Os efeitos inibitórios na proliferação celular induzidos por este fármaco implicam o aumento de histonas acetiladas em consequência da inibição das HDACs, levando a uma cromatina de estrutura aberta e ativação da transcrição. Esta inibição pode ter várias consequências como modificações na transcrição de gene através da acetilação de histonas e fatores de transcrição e inibição da apoptose com a consequente interrupção do ciclo celular. Para a atividade cancerígena podem ser essenciais os efeitos que este fármaco possui sob proteínas não histónicas, que incluem fatores de transcrição que são substratos das HDACs.^[64]

De uma forma semelhante ao que acontece com o panobinostat, a ação do vorinostat resulta da inibição da atividade de HDACs levando à acumulação de proteínas acetiladas, de entre as quais também estão incluídas as histonas. Esta atividade de inibição das HDACs realizada por este fármaco tem algumas consequências ao nível celular, como modificação no processo de transcrição de diversos genes por meio da acetilação de fatores de transcrição e de histonas, tendo também efeitos não transcripcionais como interrupção do ciclo celular por meio da inibição da mitose. A ação anti-cancerígena do vorinostat conduz à repressão de vários genes mas também há indução de outros. Um dos genes que a sua expressão é induzida por este modulador epigenético é o *p21^{WAF1}*, que corresponde a um inibidor do ciclo celular levando ao bloqueio do ciclo celular durante a fase G₁ e S. A indução da expressão deste gene pelo vorinostat pode ser devida a uma elevada taxa de transcrição do gene associado à acetilação das histonas H3 e H4 que se encontram relacionadas com o promotor do gene *p21^{WAF1}*. Por outro lado, este HDACi também provoca a acetilação de vários fatores de transcrição que tal como, a acetilação de histonas, irá culminar numa modificação da expressão de alguns genes. A inibição das HDACs por este fármaco é feita através da ligação deste fármaco ao domínio catalítico da enzima de ligação ao ião zinco. Assim, o vorinostat liga-se ao local catalítico de ligação ao zinco da HDAC através da sua extremidade hidroxâmica na superfície desta enzima. Em suma, podemos concluir que o mecanismo de ação por de trás dos efeitos provocados pelo vorinostat ainda não está totalmente esclarecido, no entanto, é claro que este mecanismo de ação engloba alteração na expressão de genes específicos.

[65,72]

1.3.2.2 - Panobinostat

O panobinostat (figura 10) corresponde a um ácido hidroxâmico que tem atividade de um inibidor da pan-desacetilase com o objetivo de impedir a destruição das proteínas através da perturbação da atividade enzimática das desacetilases. Este HDACi possui a capacidade de, através de mecanismos epigenéticos, alterar a expressão gênica e inibir a degradação de proteínas. O panobinostat obteve aprovação em fevereiro de 2015 para ser utilizado no tratamento do mieloma múltiplo, possuindo uma resposta clínica de aproximadamente 27%.^[61] Este fármaco tem a capacidade de inibir HDACs das classes I (HDAC 1,2,3 e 8), II (HDACs 4,5,6,7,9 e 10) e IV (HDAC 11).
[61,63,71]

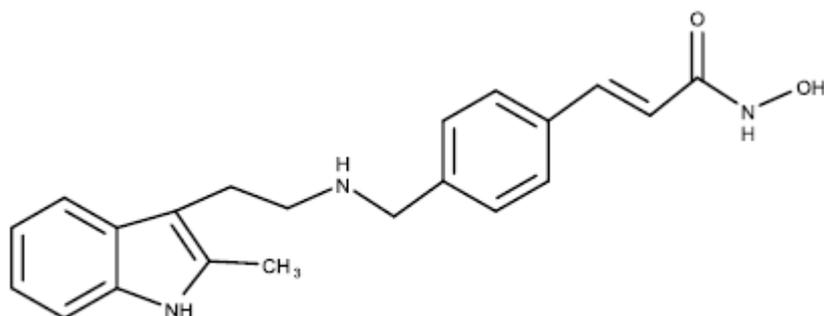


Figura 10 - Estrutura química do panobinostat

Um possível mecanismo de ação para o panobinostat será através da inibição das HDACs de classe I, o que leva à reativação de genes supressores de tumor que sofreram silenciamento epigenético através da desacetilação de histonas. Por outro lado, outro mecanismo de ação provável para este modulador epigenético é a modificação da expressão gênica e a atividade cancerígena através da regulação dos fatores de transcrição. Um possível mecanismo de ação para o panobinostat é que este fármaco mitiga a atividade tumoral através da modulação epigenética da expressão do gene e da inibição do metabolismo da proteína, sendo que, pode ocorrer a reativação de genes supressores de tumor que sofreram silenciamento através da inibição de HDACs de classe I. Podendo também ocorrer, neste caso, a modificação da expressão gênica por inibição de STAT3, AKT e HIF1 α . Este fármaco possui a capacidade inibitória de HDACs de classe I, de classe II e de classe IV, sendo um dos inibidores de HDACs mais poderosos. Por outro lado, o transporte de agregados de proteínas, designados por “aggresomes”, através dos microtúbulos para o autofagossoma permite a degradação pelos lisossomas das proteínas que não foram removidas pelo proteassoma. Para este transporte ser realizado é essencial a interação entre a HDAC6

com a tubulina e a dineína, assim, a inibição desta HDAC conduz a microtúbulos hiperacetilados e uma degradação das proteínas ineficaz. Deste modo, o panobinostat causa a hiperacetilação de proteínas histónicas e não histónicas, fazendo com que ocorra aumento das histonas acetiladas e proteínas não histónicas. Este aumento da acetilação de proteínas histónicas e não histónicas conduz ao bloqueio da via do agressoma e interfere na expressão de genes supressores de tumor, fatores de transcrição e proteínas oncogénicas (figura 11). [59,70,71]

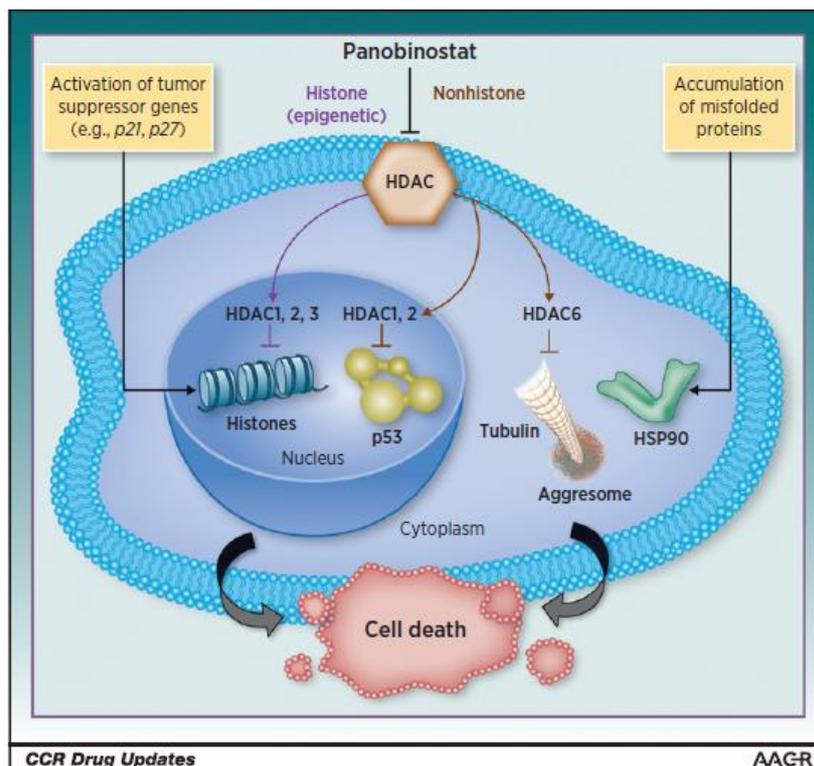


Figura 11 – Mecanismo de ação do panobinostat através da inibição de diversas DACs que têm como alvos proteínas histónicas e não histónicas envolvidas no processo de degradação de proteínas e no processo da desregulação epigenética. (Adaptado de Laubach et al., 2015)

Em suma, o panobinostat realiza a sua atividade anticancerígena através de uma variedade de mecanismos de ação que impedem a degradação de proteínas indesejadas ou que sofreram um processo de folding de uma forma incorreta/incompleta. [59,70,71]

1.4 - Objetivo

A LLC corresponde a uma patologia heterogénea que não possui uma translocação ou mutação na sua origem, com incidência principalmente em pessoas mais velhas, estando a idade de diagnóstico compreendida entre os 70 e 72 anos. A LLC é caracterizada pela presença de modificações genéticas e epigenéticas, sendo estas alterações epigenéticas reversíveis. Assim, a utilização de moduladores epigenéticos que permitam a reversão destas alterações torna-se um alvo atraente na terapia desta patologia.

No presente estudo foi avaliado o potencial terapêutico dos agentes hipometilantes (azacitidina e decitabina) e dos inibidores das desacetilases das histonas (vorinostat e panobinostat) em monoterapia e em combinação terapêutica, num modelo *in vitro* de LLC.

2. Materiais e Métodos

2.1 – Caracterização da linha celular e condições de cultura

A linha celular HG3 é uma linha celular de leucemia crónica com origem em células B leucémicas, estabelecida em 1988 a partir de um homem caucasiano com 70 anos de idade com LLC em estágio II de Rai. Esta linha celular contém o vírus Epstein-Barr (EBV), no entanto, este vírus não se encontra envolvido na etiologia da LLC. A linha celular HG3 apresenta um cariótipo que possui deleções bialélicas do cromossoma 13q14, sendo que os seus genes *IGHV* são semelhantes aos das células de LLC. As deleções bialélicas, referidas anteriormente, incluem a perda genómica de *DLEU7* e de *mir15a* e *mir16-1*. Estes dois micro RNAs podem estar ausentes, alterados ou regulados de uma forma negativa na LLC, na presença ou na ausência da deleção de 13q14, pensando-se que estes miRNAs possam estar envolvidos na regulação da proliferação e apoptose. [2, 3, 12, 22, 75]

A linha celular HG3 expressa o marcador de macrófagos CD14, que se encontra expresso em aproximadamente 89% dos casos de LLC. Este marcador apresenta uma função de recetor de lipossacarídeo, assim como de células apoptóticas e uma função de co-recetor *Toll-Like* (TLR), que também se encontram expressos nas células de LLC. A linha celular também expressa CD31, que tem funções essenciais para a remoção de células apoptóticas, sendo que, a interação entre CD31 e o seu recetor CD38 pode conduzir a proliferação das células de LLC.^[76]

A linha celular HG3 foi obtida da *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* (DSMZ). Estas células foram mantidas em meio *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI-1640), contendo 2 mM de L-glutamina, 10 mM HEPES-Na, 4500 mg/L de glicose, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), 1% de antibiótico (ZellShield) e suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) (Gibco, Invitrogen).

As células foram mantidas em cultura a uma temperatura de 37°C em uma atmosfera húmida que continha 5% de CO₂, tendo sido incubadas a uma densidade ótima de $0,5 \times 10^6$ células/mL.

2.2 - Avaliação da proliferação e viabilidade celulares

A fim de determinar a densidade ótima da linha celular HG3 de LLC recorreu-se ao teste de exclusão de azul tripano. O azul tripano corresponde a um corante diazo onde o seu mecanismo está relacionado com a sua carga negativa, sendo este definido como um corante vital que permite a distinção entre células viáveis e células não viáveis. Este método é baseado na diferença de permeabilidade de membrana, onde as células viáveis possuem uma membrana intacta, enquanto as células não viáveis possuem rupturas de membrana, o que permite a entrada do corante no interior da célula. Assim, as células viáveis apresentam um citoplasma claro, enquanto que, as células não viáveis possuem um citoplasma corado de azul. O número de células viáveis e não viáveis é determinado recorrendo à microscopia de luz como uma percentagem de células não tratadas (controlo). [77, 78]

Neste sentido, as células foram incubadas a densidades crescentes durante 72h, sendo que, a cada 24h foi recolhida uma alíquota da cultura celular que posteriormente foi corada com o mesmo volume de azul tripano (Sigma-Aldrich). Por fim, o número de células viáveis (não coradas) e de células não viáveis (coradas) foi determinado recorrendo a um hemocitómetro (câmara de Neubauer). Posteriormente, foi calculada a densidade celular (fórmula 1) e a viabilidade celular (fórmula 2).

$$Densidade\ celular = \frac{\sum\ células\ viáveis}{número\ de\ quadrantes} \times fator\ de\ diluição \times 10^4 \text{ (Fórmula 1)}$$

$$Viabilidade\ celular = \frac{\sum\ células\ viáveis}{\sum\ células\ viáveis + \sum\ células\ não\ viáveis} \times 100\% \text{ (Fórmula 2)}$$

2.3 - Incubação das células de LLC (HG3) com azacitidina, decitabina, vorinostat e panobinostat

Com o objetivo de avaliar o potencial terapêutico dos quatro moduladores epigenéticos (azacitidina, decitabina, vorinostat e panobinostat), as células foram incubadas com uma densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ células/ml na ausência e na presença de concentrações crescentes de azacitidina (0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 e 20 μM), decitabina (0,5 ; 1 ; 3 ; 5 ; 10 e 15 μM), vorinostat (0,01 ; 0,1 ; 0,25; 0,5; 0,75; 1 e 2,5 μM) e panobinostat (0,01; 0,1; 1; 5; 7,5; 10; 15 e 20 nM) durante 72h nas condições referidas anteriormente. Estas concentrações dos fármacos foram testadas recorrendo ao ensaio metabólico de resazurina. Este ensaio é baseado na redução do corante azul não fluorescente resazurina em resorufina que possui uma coloração rosa fluorescente, tal como se encontra representado na figura 12.

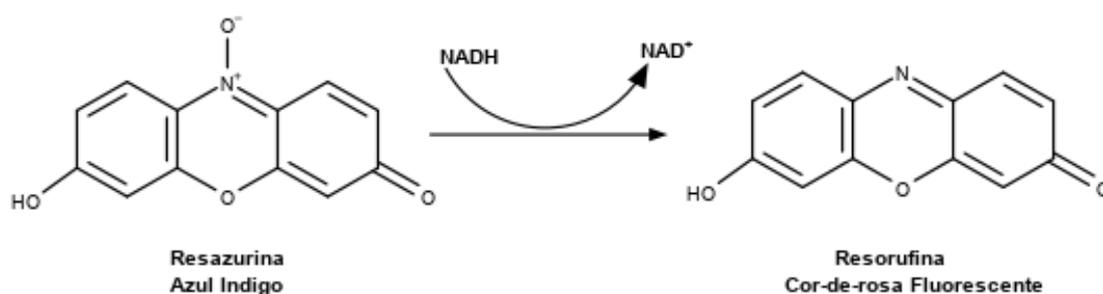


Figura 12 - Reação de redução da resazurina em resorufina. A resazurina, que possui uma coloração azul indigo, é reduzida pelo NADH para resorufina, que contém uma coloração cor-de-rosa fluorescente. Esta reação ainda poderá dar outro composto, designado por dihidroresorufina, através da redução da resorufina pelo NADH. (Adaptado de Präbst et al., 2017)

A resazurina corresponde a um corante que é um indicador redox, ao qual as células são permeáveis, sendo utilizado para determinar o número de células viáveis. Este corante corresponde a um indicador do metabolismo ativo de células em cultura, podendo ser utilizado em finalidades como, o estudo da proliferação e viabilidade celulares assim como estudos de citotoxicidade. Este composto atua como um aceitador de elétrons intermediário na reação representada na figura 12. As células viáveis possuem enzimas capazes de converter de uma forma contínua a resazurina em resorufina, aumentando a fluorescência pois a resazurina é um composto não fluorescente, enquanto que, a resorufina é um composto fluorescente. As enzimas responsáveis por esta redução são maioritariamente as desidrogenases mitocondriais.

No final da reação (figura 12) a quantidade de resorufina produzida é proporcional ao número de células viáveis. A fração de células viáveis foi determinada recorrendo a um espectrofotómetro (Synergy™ Multi-Mode Microplate Reader, Biotek Instruments) equipado com um conjunto de filtros de excitação a 570 nm / emissão de 600 nm. [77, 85]

Este ensaio permitiu-nos obter as curvas de dose-resposta da linha celular tratada com concentrações crescentes de cada um dos fármacos, assim, através da regressão logística obteve-se o valor do IC₅₀ para cada um dos moduladores epigenéticos em estudo. Com base nestes resultados, nos próximos estudos foram utilizadas as concentrações de 0,1 µM e 5 µM para a azacitidina, 0,5 µM e 1 µM para a decitabina, 0,1 µM e 0,5 µM para o vorinostat e 0,1 nM e 5 nM para o panobinostat.

De seguida, foi também avaliado o potencial terapêutico de combinações terapêuticas entre os agentes hipometilantes (azacitidina e decitabina) e os inibidores das desacetilases das histonas (vorinostat e panobinostat). Deste modo, a linha celular HG3 foi incubada na ausência e na presença das seguintes combinações terapêuticas: 0,1 µM de azacitidina + 0,1 µM de vorinostat, 0,1 µM de azacitidina + 0,1 nM de panobinostat, 0,5 µM de decitabina + 0,1 µM de vorinostat e 0,5 µM de decitabina + 0,1 nM de panobinostat. Estes esquemas terapêuticos foram testados em administração simultânea e desfasada, onde os agentes hipometilantes foram adicionados inicialmente à cultura celular e passado 3 horas o inibidor das desacetilases das histonas, e vice-versa. Esta avaliação foi feita recorrendo, mais uma vez, ao ensaio metabólico da resazurina.

Este ensaio permitiu-nos obter as curvas de dose-resposta da linha celular HG3 tratada com cada uma das diferentes combinações terapêuticas. Uma vez que em administração simultânea e desfasada eram sobreponíveis, foram selecionadas as combinações terapêuticas em que os fármacos são adicionados em simultâneo para prosseguir com os estudos.

2.4 - Avaliação do ciclo celular

Para a avaliação do ciclo celular recorreu-se à citometria de fluxo por marcação com a solução de iodeto de propídio (PI)/RNase (Immunostep). O iodeto de propídio corresponde a um composto fluorogénico que possui a capacidade de se ligar estequiometricamente aos ácidos nucleicos (DNA e RNA) sendo, a fluorescência proporcional à quantidade de ácido nucleico presente na célula. O estudo do DNA permite-nos obter diversas informações, tais como, a ploidia celular, a fase do ciclo celular onde se encontra a célula e a quantidade de células apoptóticas através da fragmentação do DNA. A fase do ciclo celular em que a célula se encontra é identificada através das diferenças na quantidade de DNA entre as principais fases do ciclo celular (Sub-G₀/G₁, G₀/G₁, S e G₂/M). Assim, recorrendo à citometria de fluxo com iodeto de propídio foi determinada a percentagem de células que se encontravam em cada uma das fases do ciclo celular. ^[83, 84]

Neste sentido, as células foram incubadas em frascos de cultura com uma área de crescimento de 25 cm² durante 72h. Após este tempo de incubação, foram retiradas alíquotas de cada uma das condições tratadas e foi avaliada a proliferação e viabilidade celulares recorrendo ao teste de exclusão do azul tripano. Posteriormente, um milhão de células foram lavadas com tampão de fosfato (PBS) e procedeu-se a uma centrifugação a 1700 xg durante 5 minutos. De seguida, foram colocados 200 µl de etanol a 70% com o objetivo de fixar as células. Imediatamente após um período de 30 minutos no frigorífico a 4°C, as células voltaram a ser lavadas com PBS por centrifugação a 1700 xg durante 5 minutos e ressuspensas em 300 µl de PI/Rnase (Immunostep), seguindo-se um período de incubação de 15 minutos à temperatura ambiente. Foram adquiridas 50.000 células num citómetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson) através do programa CellQuest™ (Becton Dickinson). A análise do ciclo celular foi feita recorrendo ao software ModFit ^{L-T} (Verity Software House). Os resultados foram expressos em percentagens de células que se encontram na fase Sub-G₁, G₀/G₁, S e G₂/M ± SEM de 5 experiências independentes.

2.5 - Avaliação do tipo de morte celular

A avaliação do tipo de morte de celular foi feita recorrendo à citometria de fluxo por dupla marcação com anexina V e 7-aminoactinomicina D (7-ADD). A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para a análise de diversos parâmetros de células que se encontram em solução, passando estas por diversos lasers. Esta análise é feita quanto à dispersão de luz visível e também quanto a um ou a vários parâmetros de fluorescência. A medição da dispersão da luz visível é feita em duas direções diferentes: a direção que indica o tamanho relativo da célula designada por direção direta (FSC) e a direção que especifica a complexidade e a granularidade da célula, designada por a direção a 90° (SSC). [79]

A apoptose, morte celular programada, é definida por características morfológicas e mecanismos bioquímicos que necessitam de energia. Apoptose corresponde a um mecanismo celular onde a célula em vez de, crescer e dividir-se, entra num processo que culmina na sua morte de uma forma controlada sem que haja derrame do conteúdo celular no ambiente à sua volta. Este tipo de morte celular é um elemento vital para vários processos biológicos, como por exemplo, a renovação celular, manutenção do sistema imunológico, morte celular provocada por substâncias químicas, lesão dependente de hormonas e desenvolvimento embrionário. Enquanto que, a necrose corresponde a uma forma de morte celular não controlada que, geralmente, é induzida por uma lesão externa. Este tipo de morte celular não necessita de energia, culminando com a rutura da membrana celular e, conseqüentemente, ocorre o derrame do conteúdo celular na área envolvente. Sendo que, este processo leva à ativação de uma cascata de inflamação provocando lesões nos tecidos. [80, 81, 86]

A anexina V corresponde a uma proteína com capacidade de ligação a fosfolípidos, nomeadamente à fosfatidilserina. As células viáveis possuem uma distribuição assimétrica dos fosfolípidos e o fosfolípido fosfatidilserina encontra-se localizado no folheto interno da membrana. No entanto, nas células que se encontram em apoptose a fosfatidilserina fica exposta. Na presença de Ca^{2+} a anexina V liga-se preferencialmente à fosfatidilserina, o que nos permite detetar a translocação da fosfatidilserina do folheto interno para o folheto externo da membrana durante a apoptose. [81,82]

A 7- AAD corresponde a um agente com a capacidade de intercalar o DNA e que é utilizado como um corante. A 7-AAD só consegue ligar-se/intercalar com o DNA

quando a membrana perde a sua integridade. Neste sentido, as células viáveis são anexina V e 7-AAD negativas, as células que se encontram em apoptose inicial são anexina V positivas e 7-AAD negativas e as células que se encontram em apoptose tardia e em necrose são anexina V e 7-AAD positivas.^[82]

Assim, para a avaliação do tipo de morte celular as células foram incubadas em frascos de cultura com uma área de crescimento de 25 cm² durante 72h. Passadas 72h, foram retiradas alíquotas de cada uma das condições tratadas com $0,5 \times 10^6$ células/ml. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 1700 xg durante 5 minutos. Seguidamente, foram colocados 100 µl de tampão de ligação da anexina V com o objetivo de fornecer o Ca²⁺ necessário para a ligação da anexina V à fosfatidilserina. Posto isto, foram adicionados 2,5 µl de anexina V (Biolegend) e 5 µl de 7-AAD (Biolegend). Posteriormente, procedeu-se a uma incubação no escuro durante 15 minutos e, por fim, foram adicionados 300 µl de tampão de ligação da anexina V. Foram adquiridas 50.000 células por condição. A avaliação das células foi feita recorrendo a um citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson). Para a aquisição de dados foi utilizado o software CellQuest (Becton Dickinson) e para a análise dos resultados recorreu-se ao software paint-a-gate (Becton Dickinson). Os resultados foram expressos em percentagens de células viáveis, células que se encontram em apoptose inicial, células que se encontram em apoptose tardia/necrose e células que se encontram em necrose ± SEM de 5 experiências independentes.

2.6 - Avaliação da Morfologia Celular

A apoptose é um processo que engloba uma diminuição do tamanho celular, aumento da densidade citoplasmática (citoplasma denso) e uma compactação dos organelos (agrupamento dos organelos). Durante este processo ocorre a formação de corpos apoptóticos que correspondem a citoplasma com organelos compactos podendo ter ou não fragmentos nucleares. As células que se encontram em necrose possuem características como: edema celular, formação de vacúolos e bolhas citoplasmáticas, aglomeração da cromatina em massas mal definidas, aumento do volume dos organelos e, num estágio mais avançado, sofrem uma rutura de membrana e desintegração celular. O núcleo das células, no caso da apoptose, poderá sofrer desintegração em 2 ou mais fragmentos, enquanto que, no caso da necrose, ocorre a fragmentação e dispersão do núcleo no citoplasma, podendo este ficar ausente.^[80, 81,86]

Deste modo, para a avaliação da morfologia da linha celular HG3 recorreu-se à microscopia ótica e à coloração de May-Grunwalds-Giemsa. Para fazer os esfregaços, inicialmente foram recolhidas 1×10^6 células/ml, posteriormente, foram lavadas com PBS por centrifugação a 1200 xg durante 5 min. Em seguida, foi removido o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 10 μ l de soro bovino fetal (FBS), sendo depois distribuídas pelas lâminas de vidro. Após as lâminas terem sido secas à temperatura ambiente, estas foram coradas recorrendo à coloração de May-Grunwalds. Para realizar a coloração, cada esfregaço foi coberto com aproximadamente 2 ml de May-Grunwalds durante 3 minutos, posteriormente, foi colocada a mesma quantidade de gotas de água ultrapura durante 1 minuto. De seguida, verteu-se a solução de May-Grunwalds e a água ultrapura de cada uma das lâminas e, posteriormente, estas foram cobertas com diluição de Giemsa (Sigma-Aldrich), composta por 30 ml de H₂O e 9 ml de Giemsa (3 ml de giemsa / 10 ml de água ultrapura), durante 15 minutos. Por fim, escorreu-se cada uma das lâminas e procedeu-se à sua lavagem com água corrente, tendo sido deixadas secar à temperatura ambiente. Na avaliação da morfologia celular recorreu-se a um microscópio Nikon Eclipse 80i equipado com uma câmara digital Nikon DXm 1200F.

2.7 – Análise Estatística

A análise estatística foi feita recorrendo ao software GraphPad Prism 9 (versão 9,0,0 para Windows). Para efetuar o cálculo do IC₅₀ para cada um dos moduladores epigenéticos na linha celular HG3 após um período de incubação de 72h na presença e na ausência de fármaco, foi feita a regressão logística não linear.

A importância estatística dos resultados obtidos foi determinada através da realização de testes paramétricos e testes não paramétricos. O resultado das curvas dose-resposta e da citometria de fluxo foram submetidos num momento inicial ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. No caso dos resultados obtidos que obedeceram à regra da normalidade, foram posteriormente, submetidos ao teste one-way ANNOVA e, simultaneamente, ao teste das comparações múltiplas de Dunn's. Por outro lado, os resultados que não obedeceram à regra da normalidade foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e simultaneamente ao teste de Friedmann e ao teste das comparações múltiplas de Dunn's.

3. Resultados

3.1 – Determinação da densidade ótima da linha celular HG3

A densidade ótima da linha celular HG3 foi determinada através do teste de exclusão do azul tripano. Procedeu-se à incubação desta linha celular a diferentes densidades celulares ($0,1 \times 10^6$ células/mL; $0,3 \times 10^6$ células/mL; $0,5 \times 10^6$ células/mL; $0,75 \times 10^6$ células/mL; $1,0 \times 10^6$ células/mL; $1,25 \times 10^6$ células/mL e $1,5 \times 10^6$ células/mL) durante 96h, sendo que, a cada 24h era retirada uma alíquota de cada uma das condições mencionadas anteriormente e era feita a contagem das células viáveis e não viáveis ao microscópio eletrónico, recorrendo ao teste de exclusão do azul tripano. Tendo sido posteriormente calculadas as densidades e viabilidades celulares para cada uma das condições, recorrendo à fórmula 1 e fórmula 2, respetivamente, mencionadas nos materiais e métodos. Neste sentido, tendo por base os gráficos representados na figura 13, podemos perceber que, no que diz respeito à viabilidade celular, não ocorreram variações significativas em nenhuma das condições, mantendo-se viabilidades elevadas em todas as condições ao longo do período de incubação. Por outro lado, no contexto da proliferação celular verifica-se que a densidade de $0,5 \times 10^6$ células/ml foi a que teve um comportamento mais estável ao longo do período de incubação de 96h. Ou seja, esta condição permite que a fase exponencial da curva de crescimento não seja demasiado rápida e possuindo uma viabilidade celular elevada. Por outras palavras, durante a incubação de 96h esta densidade celular possibilita um crescimento contínuo sem que as células não entrem rapidamente na fase estacionária da curva de crescimento, onde a morte celular começa a aumentar e o crescimento diminui. Por todos estes motivos, a densidade celular de $0,5 \times 10^6$ células/ml foi a considerada como densidade ótima da linha celular HG3 para este trabalho.

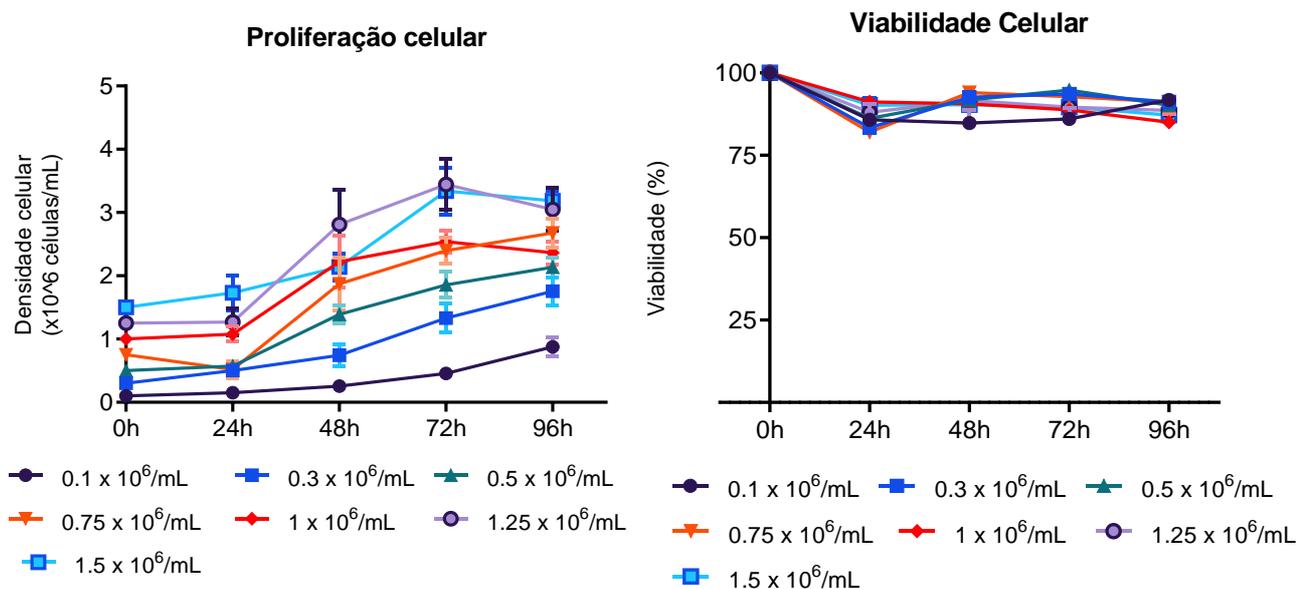


Figura 13 – Avaliação da proliferação e viabilidade celulares da linha celular HG3. As células foram incubadas durante 96h. A densidade e a viabilidade celulares foram determinadas recorrendo ao teste de exclusão do azul tripano, conforme descrito nos materiais e métodos. A viabilidade está expressa em percentagem, normalizada ao controlo. Os resultados estão expressos como média \pm SEM de 5 réplicas independentes.

3.2 – Avaliação dos moduladores epigenéticos, azacitidina, decitabina, vorinostat e panobinostat como novas estratégias terapêuticas na LLC

3.2.1 – Efeito dos moduladores epigenéticos, azacitidina, decitabina, vorinostat e panobinostat na atividade metabólica

3.2.1.1 - Monoterapia

O efeito na atividade metabólica dos moduladores epigenéticos em estudo foi avaliado recorrendo ao ensaio da redução da resazurina. Neste sentido, foi feita uma incubação da linha celular HG3 durante 72h com concentrações crescentes de cada um dos moduladores e também na ausência destes, com o objetivo de determinar a sua influência na atividade metabólica das células a cada 24h. No caso da azacitidina foram avaliadas as concentrações de 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM e 20 μM . Com base no gráfico representado na figura 14A verifica-se que ocorreu uma diminuição da atividade metabólica ao longo das 72h de incubação em todas as condições testadas. No entanto, para as condições de 5, 10 e 20 μM houve uma diminuição mais significativa da atividade metabólica, o que já seria esperado uma vez que correspondem às concentrações mais elevadas de azacitidina. Neste gráfico verifica-se também que a atividade metabólica da linha celular HG3 incubada com azacitidina é dependente do tempo e da dose de fármaco, sendo que, foi obtido um IC_{50} de 2,135 μM para a azacitidina.

Por outro lado, no caso da decitabina foram avaliadas as concentrações de: 0,5 μM , 1 μM , 3 μM , 5 μM , 10 μM e 15 μM . Na figura 14B está representada a curva dose-resposta para a decitabina, onde se pode constatar que para todas as condições de fármaco ocorreu uma diminuição da atividade metabólica ao longo das 72h. No entanto, neste fármaco a atividade metabólica parece ser só dependente do tempo porque em todas as doses de fármaco obteve-se uma diminuição da atividade metabólica semelhante, tendo sido obtido um IC_{50} de 2,948 μM .

Para o vorinostat foram avaliadas as concentrações de 0,01 μM , 0,1 μM , 0,25 μM , 0,50 μM , 0,75 μM , 1 μM e 2,5 μM . O gráfico da figura 14C demonstra que o vorinostat induz igualmente uma diminuição da atividade metabólica das células ao longo das 72h para todas as concentrações deste fármaco, no entanto, a condição de 2,5 μM é a que apresenta um maior decréscimo da atividade metabólica. No caso do

vorinostat, podemos concluir que a diminuição da atividade metabólica está dependente tanto do tempo como da dose de fármaco, sendo que, foi obtido um IC_{50} de 0,4709 μ M.

Por fim, foi avaliada a atividade metabólica da linha celular HG3 quando incubada com concentrações crescentes de panobinostat (0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM, 5nM, 7,5 nM, 10 nM, 15 nM e 20 nM). O gráfico representado na figura 14D mostra que também ocorreu uma diminuição da atividade metabólica durante as 72h de incubação para todas as concentrações deste fármaco, sendo que, para o panobinostat pode-se concluir também que esta diminuição da atividade metabólica está dependente tanto do tempo como da dose de fármaco, tendo sido obtido um IC_{50} de 5,486 nM.

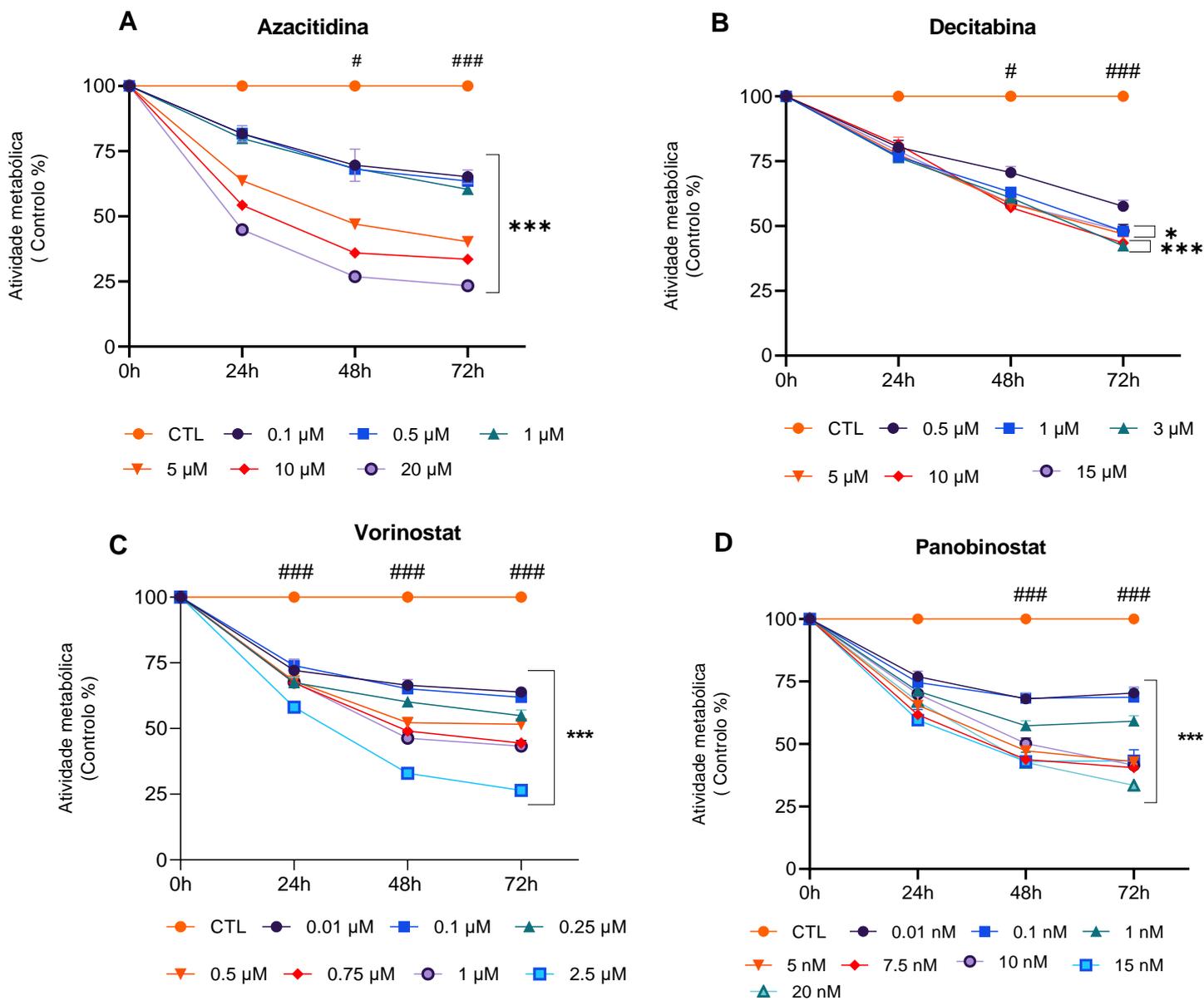


Figura 14 – Curvas dose-resposta da azacitidina, decitabina, vorinostat e panobinostat na linha celular de leucemia linfocítica crônica. A linha celular HG3 foi incubada durante 72 horas na ausência e na presença de concentrações crescentes dos fármacos referidos anteriormente. A atividade metabólica foi determinada recorrendo ao teste da redução da resazurina. Os resultados apresentados correspondem à média \pm SEM obtida de 5 experiências independentes. A análise estatística foi realizada recorrendo ao teste de comparações múltiplas de Dunn's comparando o controlo com as diferentes concentrações de fármaco e pelo teste de Friedman entre os diferentes tempos de incubação, sendo que, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação com o controlo, # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ em comparação com o tempo de incubação 0h.

3.2.1.2– Combinações terapêuticas

Com o objetivo de avaliar o efeito da combinação terapêutica dos agentes hipometilantes com os inibidores das desacetilases das histonas na atividade metabólica das células de LLC procedeu-se ao ensaio de redução da rezasurina. Assim, a linha celular HG3 foi mais uma vez incubada na ausência e na presença das concentrações de cada um dos fármacos em monoterapia e em combinação. Neste sentido foram avaliadas as associações da azacitidina com vorinostat, azacitidina com panobinostat, decitabina com vorinostat e decitabina com panobinostat.

No caso da associação terapêutica entre a azacitidina e o vorinostat, foi avaliada a atividade metabólica quando os dois fármacos eram adicionados em simultâneo à cultura celular, no caso de ser adicionada inicialmente a azacitidina e após um período de 3h ser adicionado o vorinostat e vice-versa. No entanto, não foram verificadas diferenças significativas na diminuição da atividade metabólica das células quando tratadas com os dois fármacos em simultâneo ou de uma forma faseada à cultura celular. O gráfico da figura 15A mostra que ocorreu uma diminuição da atividade metabólica nas 3 condições, no entanto, no caso da associação terapêutica entre a azacitidina e o vorinostat observou-se uma diminuição da atividade metabólica mais significativa (diminuição para aproximadamente 26%) quando comparada com a redução da atividade metabólica quando as células foram tratadas com os fármacos em monoterapia [0,1 μ M de azacitidina (diminuição para aproximadamente 65%) e de 0,1 μ M de vorinostat (diminuição para aproximadamente 62%)].

Por outro lado, para a combinação terapêutica da azacitidina com o panobinostat também não foram observadas diferenças significativas na diminuição da atividade metabólica quando a azacitidina e o panobinostat foram administrados em simultâneo ou de uma forma faseada. Tendo por base o gráfico da figura 15B podemos verificar que também esta combinação induziu diminuição da atividade metabólica significativa ao longo das 72h, sendo que, esta diminuição é mais acentuada (diminuição para aproximadamente 29%) quando comparada com a diminuição da atividade metabólica das condições de 0,1 μ M da azacitidina (diminuição para aproximadamente 65%) e de 0,1 nM do panobinostat (diminuição para aproximadamente 69%).

Na associação terapêutica da decitabina com o vorinostat de uma forma semelhante às anteriores foi avaliada a atividade metabólica de uma condição onde os dois fármacos foram adicionados à cultura celular em simultâneo, uma condição onde a decitabina foi adicionada inicialmente e passado um período de 3h foi adicionado o vorinostat e vice-versa. Nesta combinação também não foram verificadas diferenças

significativas na redução da atividade metabólica entre a adição de estes dois moduladores em simultâneo ou de uma forma faseada. O gráfico relativo a esta associação está representado na figura 15C e verifica-se que ocorreu uma diminuição da atividade metabólica ao longo das 72h de incubação, onde de um modo semelhante às restantes combinações, a diminuição da atividade metabólica da associação da decitabina com o vorinostat é uma diminuição mais acentuada (diminuição para aproximadamente 29%) quando comparada com a diminuição da atividade metabólica verificada nas condições de 0,5 μ M da decitabina (diminuição para aproximadamente 58%) e 0,1 μ M do vorinostat (diminuição para aproximadamente 62%).

Por fim, foi avaliada a atividade metabólica das células tratadas com a combinação da decitabina com o panobinostat não se tendo verificado diferenças significativas em adicionar à cultura celular os fármacos em simultâneo ou de uma forma faseada. Para esta combinação, apartir da figura 15D, podemos verificar que ocorreu uma redução da atividade metabólica para aproximadamente 25% ao longo das 72h de incubação, sendo esta diminuição mais significativa quando comparada com a diminuição da atividade metabólica que ocorre para as concentrações de 0,5 μ M de decitabina (diminuição para aproximadamente 58%) e 0,1 nM de panobinostat (diminuição para aproximadamente 69%).

Por outro lado, em todas as combinações terapêuticas testadas foi observado um efeito sinérgico de adição por comparação das curvas-dose resposta da monoterapia com as curvas dose-resposta destas combinações terapêuticas. Assim, como não se verificaram diferenças significativas em nenhuma das combinações terapêuticas entre os fármacos serem adicionados em simultâneo ou de uma forma faseada, então, nos próximos ensaios os fármacos foram adicionados em simultâneo à cultura celular.

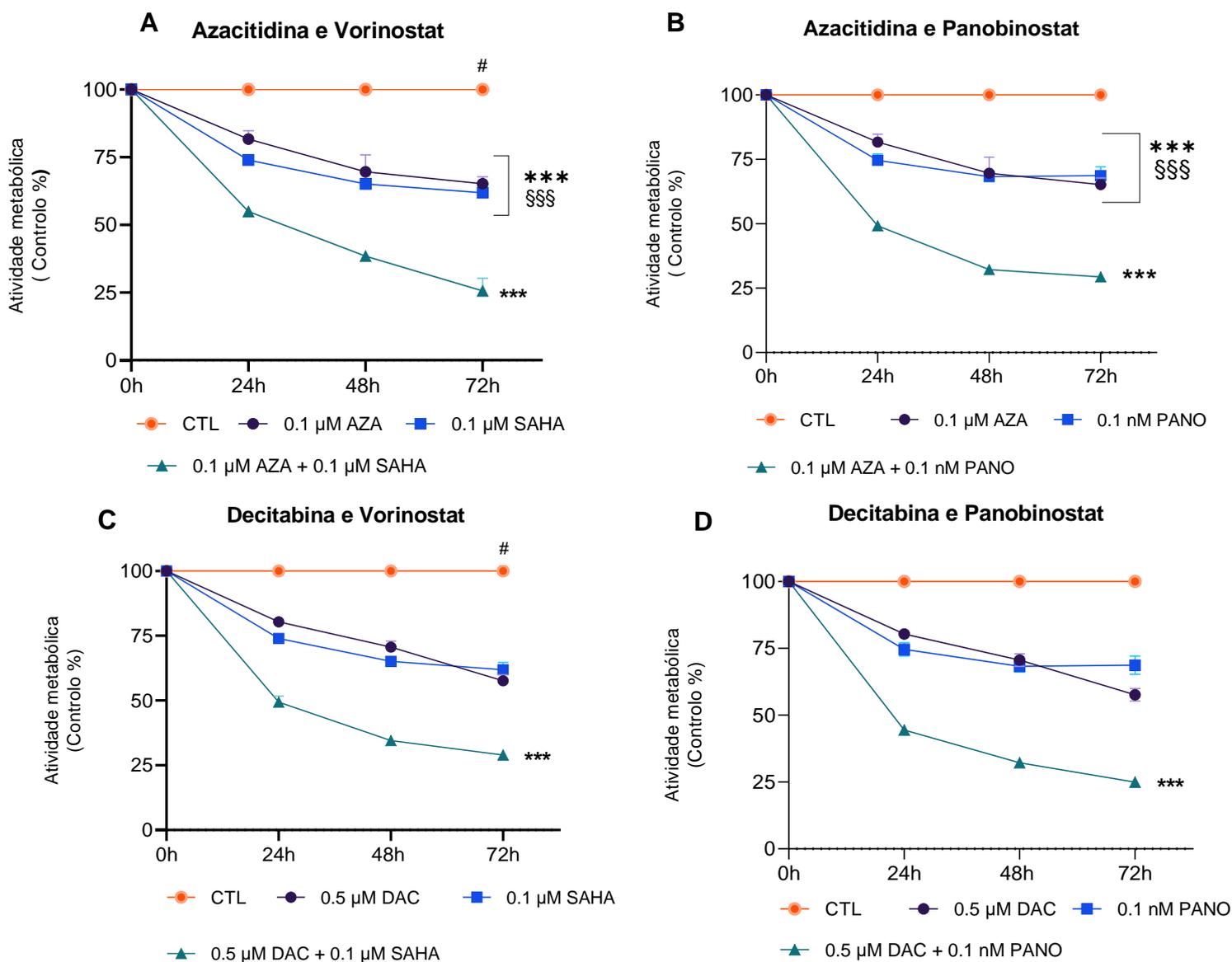


Figura 15 – Curvas dose-resposta das combinações terapêuticas azacitidina/ vorinostat, azacitidina/panobinostat, decitabina/vorinostat e decitabina/panobinostat na linha celular de leucemia linfocítica crónica. A linha celular HG3 foi incubada durante 72 horas na ausência e na presença de concentrações crescentes dos fármacos referidos anteriormente. A atividade metabólica foi determinada recorrendo ao teste da redução da resazurina. Os resultados apresentados correspondem à média ± SEM obtida de 5 experiências independentes. A análise estatística foi realizada recorrendo ao teste de comparações múltiplas de Dunn's comparando o controlo com as diferentes condições e comparando as associações com as concentrações da monoterapia e pelo teste de Friedman entre os diferentes tempos de incubação, sendo que, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação com o controlo, \$ $p < 0,05$; \$\$ $p < 0,01$; \$\$\$ $p < 0,001$ em comparação com as concentrações da monoterapia # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ em comparação com o tempo de incubação 0h. AZA, azacitidina; DAC, decitabina; SAHA, vorinostat; PANO, panobinostat.

3.2.2 – Avaliação do ciclo celular

Para uma melhor compreensão dos efeitos dos moduladores epigenéticos em estudo nas células de LLC, estas células foram incubadas durante 72h na presença e na ausência de fármaco e recorreu-se à citometria de fluxo por marcação com iodeto de propídio (PI)/Rnase para analisar a distribuição destas pelas diferentes fases do ciclo celular. Esta distribuição está representada na tabela 5. Com base nesta tabela pode-se constatar que as células na ausência de fármaco encontram-se principalmente nas fases G_0/G_1 e S do ciclo celular. Quando as células são tratadas com a azacitidina verificou-se aumento da percentagem de células em G_0/G_1 em ambas as condições, no entanto, este aumento foi maior na concentração de 5 μM . Simultaneamente, ocorreu aumento da quantidade de células na fase G_2/M , tendo sido este aumento maior na concentração de 0,1 μM . Relativamente à decitabina observou-se aumento na percentagem de células que se encontram em G_0/G_1 e em G_2/M em ambas as condições testadas. Paralelamente, tanto a azacitidina como a decitabina diminuíram a percentagem de células na fase S do ciclo celular.

Por outro lado, o vorinostat induziu aumento da percentagem de células em G_0/G_1 , tendo sido este aumento mais significativo na concentração de 0,5 μM . O mesmo se verificou para a fase G_2/M , tendo se verificado, também para esta fase do ciclo celular um maior aumento na concentração de 0,5 μM deste fármaco. Enquanto que, relativamente ao panobinostat não ocorreu nenhum aumento significativo em qualquer uma das fases do ciclo celular.

Em relação às combinações terapêuticas, verificou-se aumento na percentagem de células em G_0/G_1 em todas as associações em estudo. No entanto, nas combinações com azacitidina este aumento não foi muito significativo. Por outro lado, nas associações com decitabina observou-se aumento significativo da percentagem de células na fase G_0/G_1 , tendo sido um aumento maior em comparação com o que ocorreu no caso das associações com azacitidina. O aumento das células na fase G_0/G_1 induzido pela combinação da decitabina com o panobinostat foi superior ao observado na associação da decitabina com o vorinostat e na associação da azacitidina com o panobinostat. Juntamente com o aumento de células em G_0/G_1 , ocorreu também um aumento da percentagem de células na fase G_2/M do ciclo celular. Contudo, este aumento da percentagem de células em G_2/M não foi significativo nas associações com azacitidina, enquanto que, no caso das combinações com decitabina este aumento já foi significativo.

A citometria de fluxo permite também determinar a percentagem de células que se encontram em apoptose que é correspondente ao pico Sub-G₀/G₁. Tendo por base a tabela 5 pode-se concluir que tanto na condição não tratada como nas condições tratadas com os moduladores epigenéticos em monoterapia e em combinação encontra-se uma percentagem não significativa de células no pico Sub-G₀/G₁.

Tabela 5 – Avaliação da distribuição das células de leucemia linfocítica crónica pelas diferentes fases do ciclo celular.

	Sub G ₀ /G ₁ (%)	G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)
Controlo	0,20 ± 0,20	55,60 ± 1,08	37,00 ± 1,14	7,40 ± 1,03
AZA 0,1 µM	0,20 ± 0,20	61,80 ± 1,24	28,00 ± 1,58 *	10,20 ± 0,80
AZA 5 µM	0,40 ± 0,24	73,80 ± 2,22 **	18,00 ± 2,78 ***	8,20 ± 1,02
DAC 0,5 µM	0,60 ± 0,24	67,00 ± 1,67	18,40 ± 2,91 ***	14,60 ± 1,66 *
DAC 1 µM	0,40 ± 0,24	72,60 ± 1,33 ***	12,80 ± 2,22 ***	14,60 ± 1,12 **
SAHA 0,1 µM	0,60 ± 0,60	56,80 ± 1,16	33,60 ± 1,89	9,60 ± 0,98
SAHA 0,5 µM	0,40 ± 0,24	68,20 ± 0,97 *	20,80 ± 1,91 ***	11,00 ± 1,09
PANO 0,1 nM	0,00 ± 0,00	57,20 ± 1,20	34,60 ± 0,81	8,20 ± 0,49
PANO 5 nM	0,20 ± 0,20	59,80 ± 2,82	29,20 ± 2,84	9,00 ± 1,00
AZA 0,1 µM + SAHA 0,1 µM	0,20 ± 0,20	59,80 ± 1,16	31,40 ± 2,38	8,80 ± 1,46
AZA 0,1 µM + PANO 0,1 nM	0,20 ± 0,20	62,00 ± 1,67	28,40 ± 1,44	9,60 ± 0,40
DAC 0,5 µM + SAHA 0,1 µM	0,40 ± 0,24	69,40 ± 1,91 *	15,80 ± 2,75 ***	14,80 ± 1,16 **
DAC 0,5 µM + PANO 0,1 nM	0,40 ± 0,24	71,00 ± 1,64 **	15,00 ± 2,10 ***	14,20 ± 0,86 *

*Os resultados são referidos como percentagem de células no pico Sub-G₀/G₁, na fase G₀/G₁, na fase S e na fase G₂/M e correspondem à média ± SEM obtida de 5 experiências independentes. A análise estatística foi realizada recorrendo ao teste de comparações múltiplas de Dunn's em comparação com o controlo, sendo que, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. AZA, azacitidina; DAC, decitabina; SAHA, vorinostat; PANO, panobinostat.*

3.2.3 - Avaliação do tipo de morte celular induzida pelos moduladores epigenéticos azacitidina, decitabina, vorinostat e panobinostat em monoterapia e em combinação

O tipo de morte celular foi analisado recorrendo à citometria de fluxo por marcação com anexina V e 7-AAD e também por microscopia ótica da observação da morfologia das células de LLC na ausência e na presença dos moduladores epigenéticos em monoterapia e em combinação. Assim, a linha celular HG3 foi incubada durante 72h com concentrações crescentes dos fármacos em estudo, conforme descrito nos materiais e métodos.

Os moduladores epigenéticos não demonstraram ter um efeito significativo na morte das células de LLC. Na azacitidina observou-se uma pequena diminuição na percentagem de células viáveis (AZA 0,1 μ M, $85,80 \pm 5,21$ %; AZA 5 μ M, $81,00 \pm 3,77$ %) e, ligeiro aumento da percentagem de células que se encontravam em apoptose inicial (AZA 0,1 μ M, $7,60 \pm 4,20$ %; AZA 5 μ M, $10,60 \pm 3,56$ %), em apoptose tardia/necrose (AZA 0,1 μ M, $4,60 \pm 1,44$ %; AZA 5 μ M, $7,00 \pm 0,71$ %) e em necrose (AZA 0,1 μ M, $2,00 \pm 0,55$ %; AZA 5 μ M, $1,40 \pm 0,68$ %), comparativamente ao controlo (células viáveis, $93,60 \pm 0,68$ %; apoptose inicial, $2,40 \pm 0,40$ %; apoptose tardia/necrose, $3,20 \pm 0,58$ %; necrose, $0,80 \pm 0,20$ %).

A decitabina diminuiu a percentagem de células viáveis (DAC 0,5 μ M, $82,00 \pm 2,95$ %; DAC 1 μ M, $77,00 \pm 2,85$ %), e simultaneamente, aumentou a percentagem de células em apoptose inicial (DAC 0,5 μ M, $7,40 \pm 1,94$ %; DAC 1 μ M, $8,80 \pm 2,44$ %), em apoptose tardia/necrose (DAC 0,5 μ M, $7,60 \pm 1,50$ %; DAC 1 μ M, $10,80 \pm 2,22$ %) e em necrose (DAC 0,5 μ M, $3,00 \pm 1,27$ %; DAC 1 μ M, $3,40 \pm 1,08$ %), em comparação com o controlo.

Relativamente ao vorinostat, este também induziu diminuição da percentagem de células viáveis (SAHA 0,1 μ M, $90,60 \pm 1,33$ %; SAHA 0,5 μ M, $87,80 \pm 1,80$ %) e morte celular por apoptose tardia/necrose na concentração mais baixa do vorinostat (SAHA 0,1 μ M, $2,80 \pm 0,49$ %), e paralelamente aumento da percentagem de células em apoptose inicial (SAHA 0,1 μ M, $3,60 \pm 1,21$ %; SAHA 0,5 μ M, $5,40 \pm 1,08$ %), em apoptose tardia/necrose na concentração mais elevada deste fármaco (SAHA 0,5 μ M, $4,40 \pm 1,08$ %) e em necrose (SAHA 0,1 μ M, $3,00 \pm 1,64$ %; SAHA 0,5 μ M, $2,40 \pm 0,87$ %), em relação ao controlo.

O panobinostat reduziu a percentagem de células viáveis (PANO 0,1 nM, $89,80 \pm 1,16$ %; PANO 5 nM, $87,20 \pm 1,88$ %) e diminuiu, de forma pouco significativa, a percentagem de células em apoptose tardia/necrose na menor concentração do

panobinostat, (PANO 0,1 nM, $3,00 \pm 0,55\%$), ocorrendo em simultâneo aumento da percentagem de células em apoptose inicial (PANO 0,1 nM, $3,20 \pm 1,20\%$; PANO 5 nM, $4,80 \pm 0,86\%$), em apoptose tardia/necrose na concentração mais elevada deste fármaco (PANO 5 nM, $5,20 \pm 0,73\%$) e em necrose (PANO 0,1 nM, $4,00 \pm 1,48\%$; PANO 5 nM, $2,80 \pm 0,66\%$), em comparação com o controlo.

No caso das combinações terapêuticas foi observado um comportamento semelhante. Na combinação da azacitidina com o vorinostat foi observada diminuição não muito significativa da percentagem das células viáveis (AZA 0,1 μM + SAHA 0,1 μM , $91,60 \pm 1,12\%$), sendo que, ocorreu aumento da percentagem de células em apoptose inicial (AZA 0,1 μM + SAHA 0,1 μM , $3,20 \pm 0,58\%$), em necrose (AZA 0,1 μM + SAHA 0,1 μM , $2,00 \pm 0,77\%$). No entanto, a percentagem de células em apoptose tardia/ necrose manteve-se constante (AZA 0,1 μM + SAHA 0,1 μM , $3,20 \pm 0,73\%$), comparativamente ao controlo. Na associação da azacitidina com o panobinostat ocorreu também diminuição pouco significativa da percentagem de células viáveis (AZA 0,1 μM + PANO 0,1 nM, $91,80 \pm 0,86\%$), aumento da percentagem de células em apoptose tardia/ necrose (AZA 0,1 μM + PANO 0,1 nM, $3,60 \pm 0,40\%$) e em necrose (AZA 0,1 μM + PANO 0,1 nM, $2,20 \pm 1,02\%$).

Relativamente à combinação da decitabina com o vorinostat, verificou-se diminuição significativa na percentagem de células viáveis (DAC 0,5 μM + SAHA 0,1 μM , $76,20 \pm 3,99\%$) e aumento significativo da percentagem de células em apoptose inicial (DAC 0,5 μM + SAHA 0,1 μM , $8,00 \pm 2,41\%$), em apoptose tardia/necrose (DAC 0,5 μM + SAHA 0,1 μM , $12,20 \pm 2,27\%$) e em necrose (DAC 0,5 μM + SAHA 0,1 μM , $3,60 \pm 0,24\%$), em comparação com o controlo. Por fim, na combinação da decitabina com o panobinostat observou-se diminuição significativa da percentagem das células viáveis (DAC 0,5 μM + PANO 0,1 nM, $76,80 \pm 3,83\%$) e aumento significativo da percentagem de células em apoptose inicial (DAC 0,5 μM + PANO 0,1 nM, $7,20 \pm 1,24\%$), em apoptose tardia/ necrose (DAC 0,5 μM + PANO 0,1 nM, $10,80 \pm 2,06\%$) e em necrose (DAC 0,5 μM + PANO 0,1 nM, $5,20 \pm 1,72\%$).

O tipo de morte celular induzido pelos moduladores epigenéticos em estudo também foi analisado por microscopia ótica através da observação de esfregaços celulares utilizando a coloração de Giemsa. Através desta análise da morfologia celular verificou-se que ocorria algumas alterações morfológicas nas condições tratadas quando comparadas com o controlo. O tipo de morte celular predominante observado foi a apoptose. A apoptose pode ser observada através da figura 17 onde as células apresentam alterações morfológicas designadas por “blebbings”.

■ Necrose
 ■ Apoptose Tardia / Necrose
 ■ Apoptose Inicial
 ■ Vivas

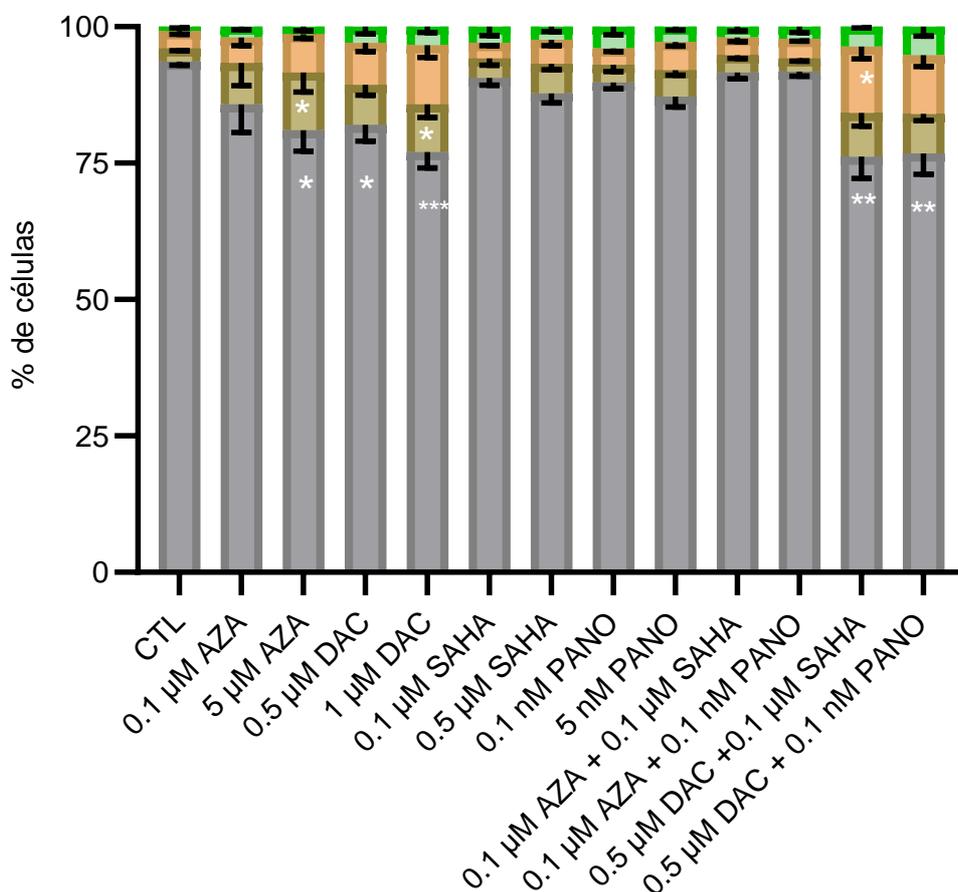


Figura 16 – Análise do tipo de morte celular induzida pela azacitidina, decitabina, vorinostat e panobinostat em monoterapia e em combinação em células de leucemia linfocítica crônica. A linha celular HG3 foi incubada durante um período de 72h na ausência e na presença de concentrações crescentes de azacitidina, decitabina, vorinostat e panobinostat assim como também foi incubada durante 72h com as associações entre azacitidina e vorinostat, azacitidina e panobinostat, decitabina e vorinostat, decitabina e panobinostat. A análise da morte celular foi feita recorrendo à citometria de fluxo por marcação com Anexina V e 7-Aminoactinomicina-D (7-AAD). Os resultados apresentados correspondem à média ± SEM obtida de 5 experiências independentes. A análise estatística foi realizada recorrendo ao teste de comparações múltiplas de Dunn's comparando o controlo com as diferentes concentrações dos fármacos e com as associações, sendo que, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação com o controlo. AZA, azacitidina; DAC, decitabina; SAHA, vorinostat; PANO, panobinostat.

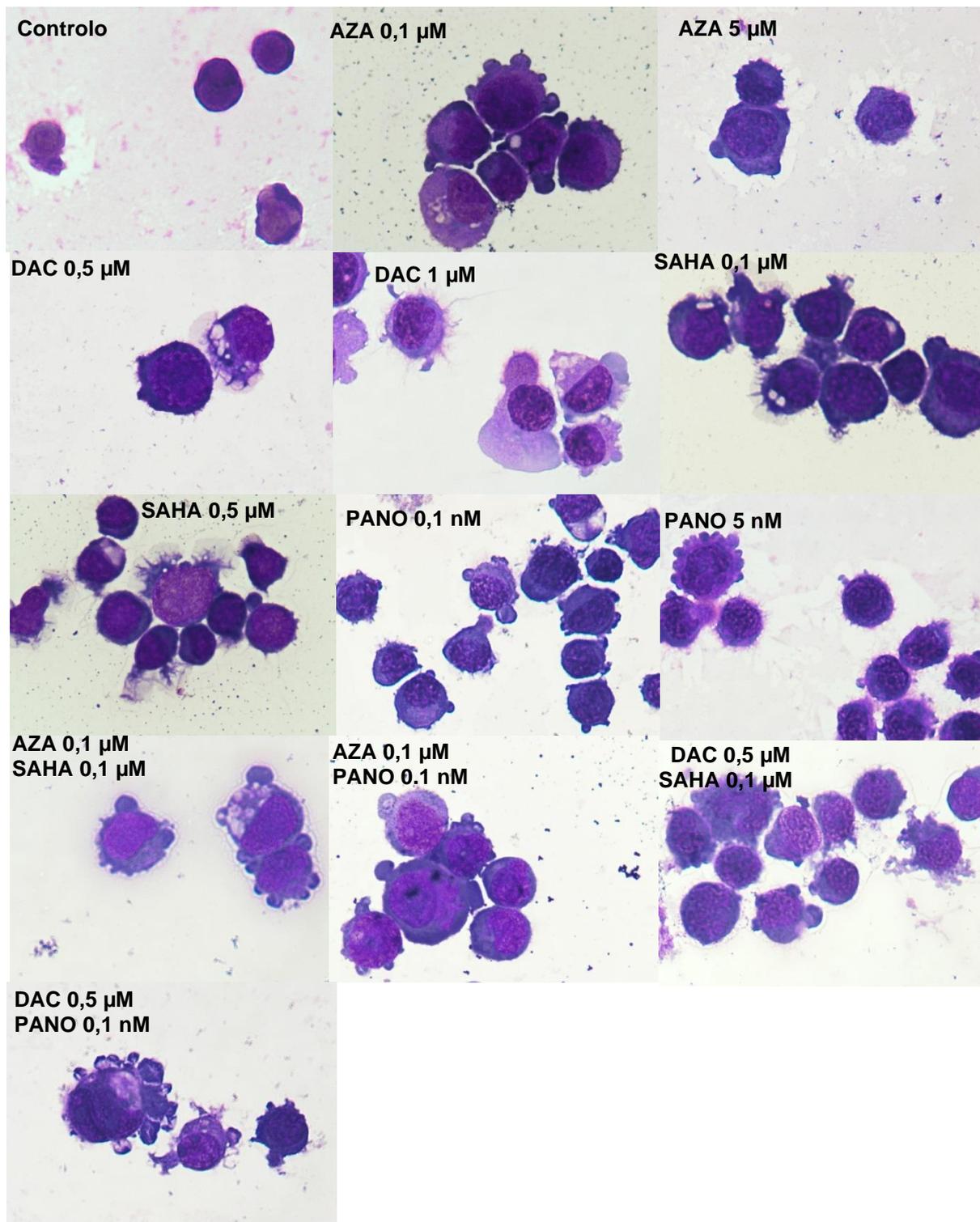


Figura 17 – Análise do tipo de morte celular induzida pelos moduladores epigenéticos azacitidina, decitabina, vorinostat, panobinostat em monoterapia e em combinação. A linha celular HG3 foi incubada com concentrações crescentes de fármaco em monoterapia e em combinação e na ausência de fármaco durante 72h. Os esfregaços celulares foram corados com solução de Giemsa e foram analisados recorrendo a um microscópio eletrónico (ampliação de 1000x). AZA, azacitidina; DAC, decitabina; SAHA, vorinostat; PANO, panobinostat.

4. Discussão

4.1 Avaliação do potencial terapêutico dos moduladores epigenéticos, azacitidina, decitabina, vorinostat e panobinostat na LLC

A LLC corresponde a uma doença heterogênea que é mais frequente em adultos, com uma idade média de diagnóstico compreendida entre os 70 e 72 anos. A gravidade da LLC é definida de acordo com 2 sistemas de estadiamento clínico mais conhecidos (Binet e Rai), podendo os doentes serem encaminhados para tratamento ou não, uma vez que muitos doentes podem permanecer assintomáticos e não necessitarem de tratamento. Esta patologia para além de envolver alterações genéticas também envolve uma metilação anômala do DNA e modificações nas histonas. [2,3,9,10,12,22,23,24,25,74]

Assim, este trabalho teve como objetivo a avaliação do potencial terapêutico de agentes hipometilantes (azacitidina e decitabina) e de inibidores das desacetilases das histonas (vorinostat e panobinostat) numa linha celular de LLC (HG3).

Os agentes hipometilantes possuem a capacidade de reverter o silenciamento de genes causado pela hipermetilação, restaurando o controlo da proliferação celular e a apoptose. A azacitidina e a decitabina correspondem a dois análogos de citidina que mesmo em concentrações baixas possuem uma elevada capacidade de inibição das DNMTs levando a hipometilação do DNA. Estes dois fármacos obtiveram aprovação pelo FDA para o tratamento da síndrome mielodisplásica. A azacitidina foi aprovada pela EMA para o tratamento da leucemia mielomonocítica, leucemia mieloide aguda e síndrome mielodisplásica, enquanto que, a decitabina foi aprovada pela EMA para o tratamento de doentes com leucemia mieloide aguda. Estes agentes hipometilantes necessitam numa primeira etapa de serem convertidos no nucleosídeo ativo para poderem exercer a sua atividade inibitória da metilação do DNA. [27,47,48,49,55,56,58,66,74,87]

Os inibidores das desacetilases das histonas são essenciais para restabelecer o equilíbrio entre os processos de acetilação e desacetilação dos resíduos de lisina das histonas e de proteínas não histónicas, conduzindo à diminuição da proliferação celular e culminando no bloqueio do ciclo celular e apoptose. O vorinostat é um composto de hidroxamato, utilizado para o tratamento do linfoma cutâneo de células T, atuando através da inibição das HDACs de classe I e II. A ação inibitória deste fármaco pode ter consequências como alterações na transcrição de genes e inibição da apoptose com a consequente interrupção do ciclo celular. Por outro lado, o panobinostat é um ácido hidroxâmico que atua como um inibidor da pan-desacetilase. Este fármaco foi aprovado

pelo FDA para o tratamento do mieloma múltiplo, atuando como um inibidor das HDACs I, II e IV. [28,29,61,62,63,70,71,72]

Neste trabalho os resultados demonstram que a azacitidina, vorinostat e panobinostat induzem uma redução da atividade metabólica dependente do tempo e da dose de fármaco, enquanto que, no caso da decitabina esta redução depende apenas do tempo, uma vez que este fármaco teve um comportamento semelhante em todas as concentrações testadas. O IC₅₀ das células de LLC foi atingido às 72h de incubação com as diferentes concentrações dos fármacos.

Relativamente aos agentes hipometilantes em estudo, num estudo em linhas celulares de leucemia mieloide aguda, ocorreu uma redução da viabilidade celular quando estas células foram incubadas com azacitidina e decitabina em concentrações superiores ou iguais a 1 µM. No entanto, a azacitidina em concentrações mais elevadas demonstrou causar uma maior redução da viabilidade celular, quando comparada com a decitabina.^[87] Esta diferença entre a azacitidina e a decitabina poderá ser explicada pelo facto de estes fármacos possuírem um tempo de meia-vida em cultura celular muito reduzido, o que torna necessário ocorrer um tratamento diário para que ocorra uma exposição contínua das células à dose de fármaco desejada. Por outro lado, a azacitidina é um fármaco que atua em qualquer fase do ciclo celular em que a célula se encontre, por meio de incorporação no RNA, enquanto que, a decitabina apenas se incorpora no DNA em células que se encontrem na fase S do ciclo celular, podendo este facto limitar a quantidade de células sobre as quais estes moduladores atuam.^[87] Neste trabalho, verificou-se que de facto a azacitidina provocou uma maior redução da atividade metabólica, atingindo uma atividade metabólica de aproximadamente 25 % às 72h nas concentrações mais elevadas. Por outro lado, a decitabina apenas provocou uma redução da atividade metabólica de aproximadamente 50% às 72h de incubação. No presente estudo, para a azacitidina às 72h obteve-se o valor de IC₅₀ de 2,135 µM, enquanto que, para a decitabina no mesmo tempo de incubação obteve-se o valor de IC₅₀ de 2,948 µM. Por outro lado, num estudo em uma linha celular de leucemia mieloide aguda (MOLM-13), onde esta linha celular foi incubada com concentrações entre 0 e 5 µM de azacitidina e decitabina, para estes dois agentes hipometilantes foi obtido um IC₅₀ de aproximadamente 1 µM. ^[30] Por outro lado, num estudo efetuado em linhas celulares de leucemia linfocítica crónica e leucemia linfoblástica aguda (as células 697 e KOPN8, respetivamente), verificou-se que na linha celular 697 foi obtido um valor de IC₅₀ de 19 µM para a azacitidina e um valor de IC₅₀ de 4 µM para a decitabina, na linha celular KOPN8 obteve-se um valor de IC₅₀ de 38 µM para a azacitidina e de 23 µM para a decitabina. ^[31] Apartir destes resultados podemos constatar que as linhas celulares

KOPN8 e 697 são menos sensíveis a estes dois agentes hipometilantes quando comparadas com a linha celular HG3, no entanto, a linha celular HG3 é menos sensível quando comparada com a linha celular MOLM-13.

O vorinostat conduziu à diminuição da proliferação celular, em concentrações que variam de 0,5 a 10 μM , em linhas celulares de linfoma, mieloma, leucemias e cancro do pulmão, levando a uma redução no crescimento das células de aproximadamente 50%. Por outro lado, no âmbito de um estudo em linhas celulares de leucemias infantis, meduloblastoma e neuroblastoma, este modulador conduziu a uma diminuição da sobrevivência celular de uma forma dependente da concentração de fármaco, sendo que, em concentrações superiores a 1 μM conduziu a uma inibição quase completa do crescimento celular. O efeito inibitório do vorinostat na proliferação celular é dependente da linha celular utilizada, pois este efeito evidenciou diferenças em linhas celulares de linfoma de Burkitt, leucemia linfoblástica aguda de células B, leucemia mieloide crónica, linfoma de grandes células B, leucemia/linfoma de células T do adulto. No entanto, este fármaco também demonstrou reduzir a proliferação de células saudáveis tendo uma maior toxicidade para as células cancerígenas, mostrando ser uma inibição dependente da dose em ambos os tipos de células. ^[72,88] No contexto deste trabalho, este modulador epigenético reduziu a atividade metabólica de uma forma dependente da concentração de fármaco e do tempo, sendo que, ocorreu uma redução mais acentuada nas concentrações mais elevadas do vorinostat, atingindo uma atividade metabólica de cerca de 25% nas 72h de incubação. O IC_{50} obtido para o vorinostat foi de 0,4709 μM às 72h de incubação, no entanto, num estudo em linhas celulares de leucemia linfocítica crónica e de leucemia linfoblástica aguda foi obtido um IC_{50} de 5 nM para a linha celular 697 e um IC_{50} de 34 nM para a linha celular KOPN8. ^[31] Estes resultados indicam que a linha celular usada no presente estudo, possui uma maior sensibilidade ao vorinostat.

No âmbito de um estudo em linhas celulares de osteossarcoma, o panobinostat levou a uma redução da viabilidade celular dependente do tempo e da dose de fármaco. Por outro lado, este fármaco em linhas celulares de linfoma cutâneo de células T, leucemia mieloide aguda, linfoma de Hodgkin, cancro da mama, cancro da próstata, cancro do cólon e cancro do pâncreas, conduziu a uma redução da proliferação celular e a um aumento da citotoxicidade, no entanto, células saudáveis foram resistentes à citotoxicidade deste HDACi o que poderá indicar que o efeito do panobinostat na morte celular pode ser específico das células cancerígenas. ^[70,89] Neste trabalho, o panobinostat também levou a uma diminuição da atividade metabólica dependente do tempo e da dose de fármaco. Este inibidor das desacetilases das histonas revelou um IC_{50} de 5,486 nM às 72h de incubação. No âmbito de outros estudos, o panobinostat

revelou ter um IC₅₀ de 3,8 nM em uma linha celular de leucemia mieloide crônica (K562), enquanto que, para tumores sólidos como, por exemplo, para o cancro da próstata este fármaco revelou um IC₅₀ 1,4 nM mas por outro lado foi obtido um IC₅₀ de 15,9 nM para o cancro pancreático. ^[100] Neste sentido, podemos constatar que a linha celular de cancro da próstata (LnCaP) é mais sensível ao panobinostat do que as linhas celulares de leucemia linfocítica crônica (HG3) e de leucemia mieloide crônica (K562). No entanto, a linha celular de cancro pancreático (Bx-PC3) é menos sensível do que as linhas celulares das duas leucemias anteriormente referidas. Apartir das curvas dose resposta apresentadas nos resultados, pode-se verificar que a concentração mais elevada de vorinostat levou a uma maior redução da atividade metabólica, quando comparado com o panobinostat.

Na atualidade, a terapia epigenética representa uma abordagem terapêutica no tratamento de patologias cancerígenas hematológicas. Este tipo de terapia é realizado recorrendo a agentes hipometilantes e inibidores das desacetilases das histonas pois estas duas classes de fármacos conduzem a modificações epigenéticas. No entanto, a combinação destas duas classes de fármacos conduziu a uma maior atividade anticancerígena, porém os mecanismos destas combinações terapêuticas ainda não estão estabelecidos. No entanto, especula-se que estes mecanismos de ação possam estar relacionados com sobre-regulação de genes inibitórios e pró-apoptóticos que se encontram associados ao crescimento e que sofreram silenciamento por hipermetilação e desacetilação de histonas durante o processo de oncogénese. Os genes responsáveis pelo crescimento podem ser regulados de uma forma positiva por estes moduladores epigenéticos, no entanto, é especulado que o desenvolvimento do tumor durante a oncogénese implique o silenciamento de genes supressores de tumor. Assim, ensaios clínicos demonstraram que a combinação entre estes fármacos tem eficácia no tratamento de patologias hematológicas malignas. Deste modo, no âmbito deste trabalho foi também avaliado o potencial terapêutico das combinações terapêuticas constituídas por um agente hipometilante e por um inibidor das desacetilases das histonas. ^[95,98] A administração de combinações terapêuticas revela-se vantajosa uma vez que desta forma é administrada uma dose mais baixa de cada um dos fármacos, o que reduz a probabilidade da ocorrência de efeitos adversos. ^[32] No presente estudo, foi avaliada a administração inicial do agente hipometilante e após 3h foi adicionado à cultura celular o inibidor das desacetilases das histonas e vice-versa, uma vez que a administração faseada dos fármacos poderia ser vantajosa, uma vez que poderia ocorrer um aumento do efeito ao ser adicionado o segundo fármaco após um período de incubação de 3h com o primeiro fármaco, ou seja, uma maior redução da atividade

metabólica poderia ser atingida. No entanto, os resultados da adição à cultura celular de uma forma simultânea ou faseada foram sobreponíveis e, por isso, procedeu-se à adição simultânea dos dois fármacos à cultura celular.

A associação da azacitidina e do vorinostat levou a uma diminuição da atividade metabólica quando comparada com a monoterapia e com o controlo.

No contexto de um trabalho a combinação terapêutica da azacitidina com o panobinostat, em linhas celulares de leucemia linfóide aguda, levou a uma redução significativa da viabilidade celular. ^[90] Neste trabalho, esta combinação apresentou um comportamento semelhante com redução da atividade metabólica significativa comparativamente ao controlo e à monoterapia.

A associação da decitabina com o vorinostat e com o panobinostat, conduziu também a uma redução da atividade metabólica significativa quando comparada com o controlo e com a monoterapia. Os resultados obtidos para esta combinação estão de acordo com a literatura, pois no contexto de um estudo que utilizou esta associação epigenética em células cancerígenas pancreáticas, esta combinação terapêutica conduziu a uma diminuição da proliferação celular e a um aumento da morte celular. Este resultado poderá ser explicado através da regulação positiva de $p21^{WAF1}$ que possui a capacidade de ligação aos complexos ciclina-CDK2, ciclina-CDK1 e CDK4/6, tendo como função a regulação da passagem das células da fase G_1 para a fase S do ciclo celular, estando também relacionada com apoptose e com uma redução da proliferação celular. Visto que, diversos estudos indicam que o tratamento com fármacos epigenéticos culmina num aumento da expressão de $p21^{WAF1}$, levando também a uma regulação da estrutura da cromatina e a um aumento da acetilação da histona 3 do promotor de $p21^{WAF1}$. Por outro lado, no que diz respeito à combinação da decitabina com o panobinostat, segundo um estudo em modelos de linfoma difuso de grandes células B, resultou numa maior morte celular e diminuição da viabilidade celular, estando estes resultados de acordo com os nossos resultados. ^[94,98] No entanto, a redução da atividade metabólica induzida pelos moduladores epigenéticos em monoterapia ou em combinação poderá estar associada ao facto de as células estarem mortas ou ao facto de as células terem sofrido um bloqueio do ciclo celular e, conseqüentemente, ao término da sua proliferação celular. Assim, com o objetivo de entender se a redução da atividade metabólica está relacionada com uma paragem da proliferação celular, em consequência, de um bloqueio do ciclo celular ou se está associada com a diminuição da viabilidade celular, ou seja, com o aumento da morte celular induzida pelos moduladores epigenéticos, procedeu-se à análise do ciclo celular e também do tipo de

morte celular induzida por estes moduladores epigenéticos quer em monoterapia quer em combinação, através da citometria de fluxo.

No âmbito de um estudo em células de leucemia mieloide aguda foi observado aumento da percentagem de células no pico Sub G_0/G_1 e, simultaneamente, uma diminuição nas restantes fases do ciclo celular para concentrações iguais ou superiores a 1 μM de azacitidina, enquanto, concentrações inferiores a 1 μM não tiveram um efeito significativo a nível do ciclo celular. ^[87] Neste estudo, é referido também um aumento das células em apoptose quando tratadas com azacitidina, no entanto, ocorreu uma maior percentagem de morte no caso da decitabina.

No âmbito do nosso trabalho, a azacitidina em ambas as concentrações induziu aumento da percentagem de células na fase G_0/G_1 , tendo sido este aumento mais significativo na concentração de 5 μM , e também um aumento na percentagem de células na fase G_2/M do ciclo celular, sendo que neste caso, este aumento foi mais significativo na concentração de 0,1 μM .

Relativamente à morte celular provocada por este fármaco, ocorreu também um aumento da percentagem de células que se encontram em apoptose comparativamente ao controlo. No entanto, na condição de 1 μM da decitabina observou-se uma maior fração de células em apoptose comparativamente com o controlo e com a azacitidina, tendo a condição de 0,5 μM da decitabina apresentado uma percentagem de células em apoptose aproximadamente igual à condição de 5 μM da azacitidina. No entanto, estes resultados são o oposto daquilo que ocorreu nos ensaios da avaliação da atividade metabólica pois, tal como referido anteriormente, as células tratadas com azacitidina apresentaram uma menor viabilidade celular às 72h quando comparadas com as células tratadas com decitabina. Isto poderá ser explicado pelo facto de a azacitidina poder ter outro mecanismo de ação para provocar a morte celular, para além da indução de apoptose. Por outro lado, a decitabina induziu aumento da percentagem de células nas fases G_0/G_1 e G_2/M , o que está de acordo com um estudo em linhas celulares cancerígenas hematopoiéticas, e este facto pode ser o resultado da reativação de genes silenciados ou o resultado de outros efeitos deste fármaco. ^[91] Um possível mecanismo de ação da decitabina poderá estar relacionado com a diminuição da metilação e reativação da expressão do gene supressor de tumor *p15*. Este gene supressor de tumor está envolvido na regulação do ciclo celular e encontra-se metilado em alguns casos de LLC. ^[87,91,92]

O vorinostat, em ambas as concentrações em estudo induziu um aumento da quantidade de células na fase G_0/G_1 , tendo sido este aumento mais significativo no caso

da concentração de 0,5 μM , comparativamente com o controlo, ou seja, o vorinostat apresentou efeito citostático.

A regulação das alterações da expressão génica durante a progressão do ciclo celular, é feita pelas cinases dependentes de ciclina (CDK), sendo que estas, dão origem a uma família de proteínas cinases serina/treonina que são ativas em pontos específicos do ciclo celular. Durante o ciclo celular os níveis de CDK's permanecem aproximadamente constantes, enquanto que, o nível de ciclinas apresenta variações ativando, assim, regularmente as CDK's por fosforilação. No entanto, para a passagem das células para a fase S do ciclo celular é essencial a ativação dos complexos CDK4/6-ciclina D e CDK2/ciclina E. Assim, os resultados obtidos podem ser explicados pelo bloqueio do "checkpoint" que existe entre a fase G_1 e a fase S do ciclo celular e através da diminuição de expressão da ciclina D1 e diminuição da fosforilação de CDK4 e CDK2, que ocorre como resposta ao vorinostat. ^[93,94] Relativamente à morte celular induzida por este fármaco, verifica-se que a concentração de 0,5 μM possui uma maior percentagem de morte do que a concentração 0,1 μM deste modulador, no entanto, ambas as concentrações do vorinostat aumentaram a percentagem de morte celular de uma forma pouco significativa quando comparadas com o controlo. A morte celular induzida pelo vorinostat poderá ser explicada pelo facto deste fármaco possuir um efeito na remodelação da cromatina, pois a atividade anormal da histona durante a fase S do ciclo celular, durante a mitose e durante a reparação do DNA culmina com paragem do ciclo celular e também em morte celular. ^[93,94]

No caso do panobinostat verificou-se também um aumento da percentagem de células que se encontravam na fase G_0/G_1 e em simultâneo uma diminuição da quantidade de células que se encontravam na fase S do ciclo celular. No entanto, estas alterações não foram muito significativas o que poderá indicar que este modulador epigenético não tem um efeito citostático evidente, uma vez que não teve qualquer efeito significativo ao nível do ciclo celular. Por outro lado, nas células tratadas com este modulador epigenético também foi observado um aumento pouco significativo da percentagem de células em apoptose quando comparado com o controlo.

Um mecanismo essencial que poderá levar ao bloqueio do ciclo celular pela ação dos inibidores das desacetilases das histonas é através do aumento da expressão do inibidor de CDK p21, pois apesar de o gene TP53 ser o regulador transcricional de p21, estes fármacos podem induzir a expressão de p21 independentemente de TP53 em diversas linhas celulares cancerígenas. ^[93] Por sua vez, o p21 estabelece ligação com as ciclinas D e E, levando à inibição de CDK2 e CDK4, que são essenciais para a progressão no ciclo celular. Por outro lado, estes fármacos também podem levar a uma

rutura da cadeia dupla do DNA nas células cancerígenas, sendo que, esta lesão do DNA regula de uma forma positiva o gene TP53, causando indução da expressão de p21. [93]

Segundo a literatura [95], o vorinostat em baixas concentrações induz bloqueio do ciclo celular na fase G₁, enquanto que, em concentrações elevadas bloqueia as células tanto na fase G₁ como na fase G₂/M. O bloqueio na fase G₁, sem alteração da fase S, pode ser explicado pelo aumento dos níveis de CDK e pela diminuição dos níveis de ciclina podendo levar isto à redução da atividade da CDK. Por sua vez causa a desfosforilação da proteína retinoblastoma (Rb), levando ao bloqueio de E2F no processo de transcrição de genes que são essenciais na progressão das células da fase G₁ para a fase S do ciclo celular, ou seja, conduz a uma interrupção do ciclo celular nas fases G₁ e G₂. Além disto, estes fármacos podem também diminuir a expressão de ciclina D1 e da ciclina A, o que também contribui para o bloqueio em G₁ e G₂. No que diz respeito à morte celular, o vorinostat e o panobinostat podem induzir a morte celular através de mecanismos que envolvem a ativação de vias apoptóticas, quer da via extrínseca ou intrínseca. A via extrínseca da apoptose pode ser mediada por dois recetores, o recetor TRAIL (TNF) e o recetor CD95 (FAS), sendo que, estes fármacos têm a capacidade de efetuar a regulação de uma forma positiva de ambos os recetores mencionados e dos seus ligandos em células cancerígenas. [95,96] No entanto, a morte celular induzida por estes fármacos é devida principalmente à via apoptótica intrínseca ou mitocondrial. [95,96] Estes fármacos possuem a capacidade de ativar esta via levando à libertação de citocromo c do espaço intermembranar mitocondrial e à ativação da caspase-9, culminando, em apoptose. Para além disto, têm também a capacidade de aumentar a expressão de proteínas pró-apoptóticas e diminuir a expressão de proteínas anti-apoptóticas. [95,96] No entanto, os mecanismos destes efeitos ainda não estão bem esclarecidos. Em alternativa, esta classe de fármacos causa um aumento da acetilação da histona, ocorrendo a perturbação da função e estrutura do centrômero e da heterocromatina. O processo de acetilação interfere com a fosforilação da histona, fazendo com que as proteínas do “checkpoint” da mitose não exerçam a sua função. Assim, ocorre a degradação de duas cinases mitóticas treonina/cinase que possuem uma dupla função na apoptose e na mitose. O resultado é uma paragem na prometáfase, que leva a uma mitose onde ocorre uma segregação anormal e perda dos cromossomas, culminando em morte por apoptose ou em morte celular mitótica. [95,96]

A combinação terapêutica da azacitidina com o panobinostat, neste trabalho, resultou num aumento da percentagem de células na fase G₀/G₁ com uma diminuição simultânea da percentagem de células na fase S do ciclo celular, o que indica que possa ter ocorrido um bloqueio do ciclo celular em G₁ e, portanto, esta associação epigenética

teve um efeito citostático. Quanto à morte celular verificou-se que não houve um aumento significativo da morte celular comparativamente ao controlo, tendo a azacitidina em monoterapia uma maior morte celular quando comparada com a combinação terapêutica destes dois fármacos. De um modo semelhante, na combinação da azacitidina com o vorinostat também não ocorreu um aumento significativo da morte celular comparativamente ao controlo. No entanto, a azacitidina mais uma vez apresentou uma maior percentagem de morte celular quando utilizada em monoterapia do que quando usada em combinação com o vorinostat. No que diz respeito ao ciclo celular, esta associação epigenética conduziu ao aumento não muito significativo da percentagem de células na fase G_0/G_1 e na fase G_2/M do ciclo celular.

Num trabalho em células de leucemia linfoblástica aguda a combinação terapêutica da azacitidina com o panobinostat demonstrou induzir um aumento na morte celular. [90]

De acordo com a literatura, a utilização do vorinostat em monoterapia conduz a um efeito não muito significativo no ciclo celular e a utilização da decitabina sozinha leva a um aumento progressivo da quantidade de células na fase G_2/M do ciclo celular, enquanto que, quando é utilizada em combinação com o vorinostat ocorre bloqueio do ciclo celular na fase G_2/M em linhas celulares de cancro do ovário. Por outro lado, neste estudo em linhas celulares de cancro do ovário foi observado um aumento significativo de células em sub- G_0/G_1 no caso da decitabina, enquanto que, o vorinostat não teve qualquer efeito, no entanto, a combinação terapêutica destes dois fármacos evidenciou um efeito sinérgico, uma vez que se observou um aumento das células em apoptose relativamente às terapêuticas em monoterapia. [97,99] No contexto deste estudo, verificou-se que a associação epigenética entre a decitabina e o vorinostat levou a um aumento da percentagem de células em G_0/G_1 e em G_2/M em comparação com o controlo, o que poderá indicar que tenha havido um bloqueio do ciclo celular na fase G_1 , ou seja, esta combinação possuiu um efeito citostático.

No entanto, quando comparada esta combinação com os resultados obtidos da monoterapia destes dois fármacos tiveram um efeito semelhante ao nível do ciclo celular. Contudo, tal como descrito na literatura, neste trabalho também se verificou que a decitabina teve um maior efeito no ciclo celular quando comparado com o efeito provocado pelo vorinostat. No que diz respeito à morte celular, a combinação terapêutica da decitabina com o vorinostat levou a um aumento das células que se encontram em apoptose comparativamente ao controlo e comparativamente ao efeito destes dois fármacos em monoterapia. No entanto, se verificou que a decitabina quando usada em monoterapia conduz a uma maior morte celular comparativamente ao efeito

individual do vorinostat na indução da morte celular por apoptose. Assim, podemos concluir que esta combinação terapêutica levou a um efeito citotóxico e citostático.

Por fim, quanto à combinação epigenética da decitabina com o panobinostat foi observado também um aumento da percentagem de células na fase G_0/G_1 e na fase G_2/M do ciclo celular, tal como no caso da associação epigenética entre a decitabina e o vorinostat, o que indica que possa ter ocorrido um bloqueio do ciclo celular em G_1 , ou seja, esta combinação conduziu a um efeito citostático. Quanto à morte celular esta combinação demonstrou também induzir um aumento da morte celular por apoptose comparativamente ao controlo e aos dois fármacos quando usados em monoterapia. Assim, podemos concluir que esta associação epigenética conduziu também a um efeito citotóxico. Neste caso, de um modo semelhante ao que aconteceu na associação entre a decitabina e o vorinostat, a decitabina quando utilizada em monoterapia levou a uma maior morte celular quando comparada ao panobinostat usado em monoterapia. Num estudo em linfoma difuso de grandes células B, foi mostrado que esta combinação induz morte por apoptose tendo sido observado também que a decitabina quando utilizada em monoterapia leva a uma maior morte por apoptose quando comparada com o panobinostat quando utilizado individualmente. ^[98,99] No contexto deste estudo, a combinação terapêutica da decitabina com o panobinostat não levou a uma paragem significativa do ciclo celular, no entanto, o panobinostat quando utilizado sozinho demonstrou um maior efeito no ciclo celular levando a um aumento da percentagem de células em G_1 , quando comparado com a decitabina e com a combinação epigenética que conduziu a apenas a um aumento de células na fase G_2/M do ciclo celular. Por outro lado, ocorreu uma diminuição de células na fase S e G_1 , o que está de acordo com o aumento da percentagem de células no pico Sub- G_1 , ou seja, com o aumento de células em apoptose.

O presente estudo tem como limitação estar restrito apenas aos resultados de uma única linha celular, pois estes resultados podem variar consoante a linha celular utilizada. Uma vez que cada linha celular possui as suas mutações genéticas e, deste modo, podem ter respostas diferentes aos fármacos utilizados. Numa perspetiva futura, poderíamos testar os moduladores em estudo em monoterapia e em combinação terapêutica em diferentes linhas celulares e proceder a avaliação dos níveis de metilação, ou seja, avaliar a presença de 5-metilcitosina nas linhas celulares utilizadas assim como em amostras de doentes. Por outro lado, poderia ser avaliada também a expressão génica das linhas celulares assim como de amostras doentes.

5. Conclusão

No âmbito deste estudo foi realizada a avaliação do potencial terapêutico de moduladores epigenéticos numa linha celular (HG3) de leucemia linfocítica crónica. Neste sentido, foram utilizados dois tipos de moduladores epigenéticos, agentes hipometilantes (azacitidina e decitabina) e inibidores das desacetilases das histonas (vorinostat e panobinostat). Assim, dos resultados obtidos podem ser retiradas as seguintes conclusões:

1. Os moduladores epigenéticos usados neste trabalho em monoterapia conduziram a diminuição da atividade metabólica das células de leucemia linfocítica crónica. No caso da azacitidina, esta redução da atividade metabólica foi dependente do tempo e da dose do fármaco, enquanto que, no caso da decitabina, esta redução da atividade metabólica foi dependente apenas do tempo. Por outro lado, o vorinostat e o panobinostat diminuíram a atividade metabólica de forma dependente do tempo e da dose de fármaco.
2. No estudo do potencial terapêutico das combinações terapêuticas dos agentes hipometilantes com os inibidores das desacetilases das histonas, verificou-se que estas combinações terapêuticas conduziram a uma maior redução da atividade metabólica quando comparadas com o efeito dos fármacos em monoterapia.
3. A azacitidina conduziu a um aumento da percentagem de células na fase G_0/G_1 e na fase G_2/M do ciclo celular em ambas as concentrações, o que indica que teve um efeito citostático. No que diz respeito à morte celular, induziu aumento da morte celular principalmente por apoptose apresentando, assim, um efeito citotóxico. De um modo semelhante, a decitabina originou um aumento da percentagem de células na fase G_0/G_1 e na fase G_2/M possuindo também um efeito citostático. A decitabina conduziu também a um efeito citotóxico uma vez que também induziu um aumento da morte celular por apoptose essencialmente.
4. O vorinostat levou a um aumento da percentagem de células na fase G_0/G_1 e na fase G_2/M , o que indica que possa ter ocorrido um bloqueio do ciclo celular em G_1 e, portanto, este modulador conduziu a um efeito citostático. Este fármaco

levou a um aumento não muito significativo na morte celular comparativamente ao controlo. Enquanto que, o panobinostat não possui um aumento significativo da percentagem de células na fase G_0/G_1 e na fase G_2/M , portanto, podemos concluir que este modulador não teve efeitos significativos ao nível do ciclo celular. No que diz respeito à morte celular, o panobinostat levou a um aumento da morte celular, o que poderá indicar um efeito citotóxico.

5. A combinação da azacitidina com o vorinostat levou a um aumento da percentagem de células em G_0/G_1 e em G_2/M , no entanto, este aumento não foi muito significativo. No que diz respeito à morte celular, esta associação também não conduziu a alterações significativas comparativamente ao controlo. Por outro lado, a associação entre a azacitidina e o panobinostat levou a um aumento da percentagem de células em G_0/G_1 e em G_2/M , ou seja, esta combinação teve um efeito citostático. No entanto, na morte celular não levou um aumento de morte celular significativo comparativamente ao controlo.
6. A associação da decitabina com o vorinostat possuiu um efeito citostático porque levou a um aumento da percentagem de células em G_0/G_1 e em G_2/M , indicando assim um possível bloqueio do ciclo celular em G_1 . Esta combinação conduziu também a um efeito citotóxico pois quando comparada com o controlo levou a um aumento da percentagem de morte celular. De um modo semelhante, a combinação da decitabina com o panobinostat possui também um efeito citostático pois conduziu também a um aumento da percentagem de células em G_0/G_1 e em G_2/M sugerindo um bloqueio do ciclo celular na fase G_1 . Por outro lado, possuiu também um efeito citotóxico devido ao aumento da percentagem de morte celular quando comparada com o controlo.

Em suma, podemos concluir que a azacitidina, a decitabina, o vorinostat e o panobinostat constituem uma possível abordagem terapêutica no tratamento da leucemia linfocítica crónica seja em monoterapia ou em combinação terapêutica. No entanto, estes moduladores parecem ter essencialmente um efeito citostático do que citotóxico, pois parecem atuar mais ao nível do ciclo celular do que induzirem morte celular.

6. Referências

1. Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., et al., *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press, Lyon, 2008.
2. Scarfò, L., Ferreri, A. J. M., & Ghia, P., *Chronic lymphocytic leukaemia*. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2016. 104, 169–182.
3. Kipps, T. J., Stevenson, F. K., Wu, C. J., Croce, C. M., Packham, G., Wierda, W. G., ... Rai, K., *Chronic lymphocytic leukaemia*. *Nature Reviews, Disease Primers*, 2017. 3, 17008.
4. Slager, S.L., Benavente, Y., Blair, A., Vermeulen, R., Cerhan, J.R., Costantini, A.S., et al., *Medical history, lifestyle, family history, and occupational risk factors for chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma: the InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project*. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr*, 2014. 2014 (48), 41–51.
5. Slager, S.L., Caporaso, N.E., de Sanjose, S., Goldin, L.R., *Genetic susceptibility to chronic lymphocytic leukemia*. *Semin. Hematol*, 2013. 50 (4), 296–302.
6. Goldin, L.R., Bjorkholm, M., Kristinsson, S.Y., Turesson, I., Landgren, O., *Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia*. *Haematologica*, 2009. 94 (5), 647–653.
7. Yu, M. K., *Epigenetics and chronic lymphocytic leukemia*. *American Journal of Hematology*, 2006. 81(11), 864–869
8. Raval, A., Byrd, J. C., & Plass, C., *Epigenetics in Chronic Lymphocytic Leukemia*. *Seminars in Oncology*, 2006. 33(2), 157–166
9. Binet, J.L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, H., Goasguen, J., et al., *A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis*. *Cancer*, 1981. 48, 198–206.
10. Rai, K.R., Sawitsky, A., Cronkite, E.P., Chanana, A.D., Levy, R.N., Pasternack, B.S., *Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 1975. 46 (2), 219–234
11. Dohner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., et al., *Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia*. *N. Engl. J. Med.*, 2000. 343 (26), 1910–1916.
12. Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005. 102 (39), 13944–13949.
13. Gaidano, G., Foa, R., Dalla-Favera, R., *Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia*. *J. Clin. Invest*, 2012. 122 (10), 3432–3438.
14. Stankovic, T., Weber, P., Stewart, G., Bedenham, T., Murray, J., Byrd, P.J., et al., *Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia*. *Lancet*, 1999. 353 (9146), 26–29.
15. Dohner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., et al., *Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia*. *N. Engl. J. Med.*, 2000. 343 (26), 1910–1916.
16. Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., ... Kipps, T. J., *iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL*. *Blood*, 2018. 131(25), 2745–2760.
17. Hallek, M., Cheson, B.D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines*. *Blood*, 2008. 111 (12), 5446–5456.
18. Cheson, B.D., Bennett, J.M., Grever, M., Kay, N., Keating, M.J., O'Brien, S., et al., *National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment*. *Blood*, 1996. 87 (12), 4990–4997.
19. Zenz, T., Eichhorst, B., Busch, R., Denzel, T., Häbe, S., Winkler, D., et al., *TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia*. *J. Clin. Oncol.*, 2010b. 28 (29), 4473–4479.
20. Fabbri, G., Rasi, S., Rossi, D., Trifonov, V., Khiabani, H., Ma, J., et al., *Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation*. *J. Exp. Med.*, 2011. 208 (7), 1389–1401.

21. Rossi, D., Brusca, A., Spina, V., Rasi, S., Khiabani, H., Messina, M., et al., *Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness*. *Blood*, 2011. 118 (26),6904–6908.
22. Mansouri, L., Wierzbinska, J. A., Plass, C., & Rosenquist, R., *Epigenetic deregulation in chronic lymphocytic leukemia: Clinical and biological impact*. *Seminars in Cancer Biology*, 2018. 51, 1–11.
23. Lipsanen, V., et al., *Hypomethylation of ornithine decarboxylase gene and erb-A1 oncogene in human chronic lymphatic leukemia*. *Blood*, 1988. **72**(6): p. 2042-4.
24. Wahlfors, J., et al., *Genomic hypomethylation in human chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 1992. **80**(8): p. 2074-80.
25. Kulis, M., et al., *Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia*. *Nat Genet*, 2012. **44**(11): p. 1236-42.
26. Corcoran, M., et al., *ZAP-70 methylation status is associated with ZAP-70 expression status in chronic lymphocytic leukemia*. *Haematologica*, 2005. **90**(8): p. 1078-88.
27. Duchmann, M., & Itzykson, R., *Clinical update on hypomethylating agents*. *International Journal of Hematology*, 2019. 110(2)
28. Zhao, C., Dong, H., Xu, Q., & Zhang, Y., *Histone deacetylase (HDAC) inhibitors in cancer: a patent review (2017-present)*. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2020 30(4), 263–274.
29. Herrera-Martínez M, Orozco-Samperio E, Montaña S, Ariza-Ortega JA, Flores-García Y, López-Contreras L., *Vorinostat as potential antiparasitic drug*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020 Jul;24(13):7412-7419.
30. Janotka, L., Messingerová, L., Šimoničová, K., Kavcová, H., Elefantová, K., Sulová, Z., & Breier, A., *Changes in apoptotic pathways in molm-13 cell lines after induction of resistance to hypomethylating agents*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021. 22(4), 1–25.
31. Duarte, D., *Universidade de Aveiro Departamento de Química*. 2012. 1–42.
32. Daughton CG, Ruhoy IS., *Lower-dose prescribing: Minimizing "side effects" of pharmaceuticals on society and the environment*. *Sci Total Environ.*, 2013. Jan 15;443:324-37.
33. Gayther, S.A., et al., *Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers*. *Nat Genet*, 2000. **24**(3): p. 300-3.
34. Yang, X.J., *The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(3): p. 959-76
35. Esteller, M., *Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes*. *Br J Cancer*, 2006. **94**(2): p. 179-83.
36. Ozdag, H., et al., *Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers*. *BMC Genomics*, 2006. **7**: p. 90.
37. Ropero, S., et al., *A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition*. *Nat Genet*, 2006. **38**(5): p. 566-9
38. Papakonstantinou, N., et al., *The histone methyltransferase EZH2 as a novel pro-survival factor in clinically aggressive chronic lymphocytic leukemia*. *Oncotarget*, 2016. **7**(24): p. 35946-35959.
39. Varambally, S., et al., *Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer*. *Science*, 2008. **322**(5908): p. 1695-9.
40. Price, B.D. and A.D. D'Andrea, *Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks*. *Cell*, 2013. **152**(6): p. 1344-54.
41. Papamichos-Chronakis, M. and C.L. Peterson, *Chromatin and the genome integrity network*. *Nat Rev Genet*, 2013. **14**(1): p. 62-75.
42. Petesch, S.J. and J.T. Lis, *Overcoming the nucleosome barrier during transcript elongation*. *Trends Genet*, 2012. **28**(6): p. 285-94.
43. Li, B., M. Carey, and J.L. Workman, *The role of chromatin during transcription*. *Cell*, 2007. **128**(4): p. 707-19.
44. Hargreaves, D.C. and G.R. Crabtree, *ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms*. *Cell Res*, 2011. **21**(3): p. 396-420.
45. Puente, X.S., et al., *Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia*. *Nature*, 2015. **526**(7574): p. 519-24.
46. Florek, M., *5-Azacytidine/Azacitidine*. 2010.

47. Sorm F., Piskala A., Cihak A., Vesely J., *5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic*. *Experientia*, 1964. 20:202–203
48. Sorm F., Vesely J., *The activity of a new antimetabolite, 5-azacytidine, against lymphoid leukaemia in Ak mice*. *Neoplasma*, 1964. 11:123–130
49. Von Hoff DD., Slavik M., Muggia FM., *5-Azacytidine. A new anticancer drug with effectiveness in acute myelogenous leukemia*. *Ann Intern Med*, 1976. 85:237–245
50. Jones PA., Taylor SM., *Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation*. *Cell*, 1980. 20:85–93
51. Silverman LR., *Targeting hypomethylation of DNA to achieve cellular differentiation in myelodysplastic syndromes (MDS)*. *Oncologist*, 2001. 6(Suppl 5):8–14
52. Silverman LR., Holland JF., Weinberg RS., Alter BP., Davis RB., Ellison RR., Demakos EP., Cornell CJ. Jr., Carey RW., Schiffer C. et. al., *Effects of treatment with 5-azacytidine on the in vivo and in vitro hematopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes*. *Leukemia*, 1993. 7(Suppl 1): 21–29
53. Kornblith AB., Herndon JE. 2nd, Silverman LR., Demakos EP., Odchimar-Reissig R., Holland JF., Powell BL., DeCastro C., Ellerton J., Larson RA., Schiffer CA., Holland JC., *Impact of azacytidine on the quality of life of patients with myelodysplastic syndrome treated in a randomized phase III trial: a cancer and leukemia group B study*. *J. Clin. Oncol.*, 2002. 20:2441–2452
54. Silverman LR., Demakos EP., Peterson BL., Kornblith AB., Holland JC., Odchimar-Reissig R., Stone RM., Nelson D., Powell BL., DeCastro CM., Ellerton J., Larson RA., Schiffer CA., Holland JF., *Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B*. *J. Clin. Oncol.*, 2002. 20:2429–2440
55. Kaminskas E., Farrell A., Abraham S., Baird A., Hsieh LS., Lee SL., Leighton JK., Patel H., Rahman A., Sridhara R., Wang YC., Pazdur R., *Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes*. *Clin. Cancer Res.*, 2005a. 11:3604–3608
56. Kaminskas E., Farrell AT., Wang YC., Sridhara R., Pazdur R., *FDA drug approval summary: azacitidine (5-azacytidine, Vidaza) for injectable suspension*. *Oncologist*, 2005b. 10:176–182
57. Chiurazzi P., Pomponi MG., Pietrobono R., Bakker CE., Neri G., Oostra BA., *Synergistic effect of histone hyperacetylation and DNA demethylation in the reactivation of the FMR1 gene*. *Hum. Mol. Genet.*, 1999. 8:2317–2323
58. Christman, J. K., *5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: Mechanistic studies and their implications for cancer therapy*. *Oncogene*, 2002. 21(35 REV. ISS. 3), 5483–5495.
59. Richardson, P. G., Laubach, J. P., Lonial, S., Moreau, P., Yoon, S. S., Hungria, V. T., ... San-Miguel, J. F., *Panobinostat: A novel pan-deacetylase inhibitor for the treatment of relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma*. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 2015. 15(7), 737–748.
60. Richards et al., *乳鼠心肌提取 HHS Public Access. Physiology & Behavior*, 2018. 176(5), 139–148.
61. Yoon, S., & Eom, G. H., *HDAC and HDAC Inhibitor: From Cancer to Cardiovascular Diseases*. *Chonnam Medical Journal*, 2016. 52(1), 1.
62. Mann BS., Johnson JR., Cohen MH., Justice R., Pazdur R., *FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma*. *Oncologist*, 2007. 12:1247-52.
63. Oki Y., Buglio D., Fanale M., Fayad L., Copeland A., Romaguera J., et al., *Phase I study of panobinostat plus everolimus in patients with relapsed or refractory lymphoma*. *Clin. Cancer Res.*, 2013. 19:6882-90.
64. Grant, S., Easley, C., & Kirkpatrick, P., *Vorinostat*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2007. 6(1), 21–22.
65. Mann, B. S., Johnson, J. R., Cohen, M. H., Justice, R., & Pazdur, R., *FDA Approval Summary: Vorinostat for Treatment of Advanced Primary Cutaneous T-Cell Lymphoma*. *The Oncologist*, 2007. 12(10), 1247–1252.
66. Hackanson, B., & Daskalakis, M., *Decitabine*. *Recent Results in Cancer Research*, 2014. 201, 269–297.

67. Saba, H. I., *Decitabine in the treatment of myelodysplastic syndromes*. Therapeutics and Clinical Risk Management, 2007. 3(5), 807–817.
68. Hallek, M., *Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment*. American Journal of Hematology, 2019. 94(11), 1266–1287.
69. Xu, P., Hu, G., Luo, C., & Liang, Z., *DNA methyltransferase inhibitors: an updated patent review (2012-2015)*. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2016. 26(9), 1017–1030.
70. Sivaraj, D., Green, M. M., & Gasparetto, C., *Panobinostat for the management of multiple myeloma*. Future Oncology, 2017. 13(6), 477–488.
71. Laubach, J. P., Moreau, P., San-Miguel, J. F., & Richardson, P. G., *Panobinostat for the treatment of multiple myeloma*. Clinical Cancer Research, 2015. 21(21), 4767–4773.
72. Richon, V. M., *Cancer biology: Mechanism of antitumour action of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid), a novel histone deacetylase inhibitor*. British Journal of Cancer, 2006. 95(SUPPL. 1), 2–6.
73. Stresemann, C., & Lyko, F., *Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine*. International Journal of Cancer, 2008. 123(1), 8–13.
74. Wahlfors, J., Hiltunen, H., Heinonen, K., Hamalainen, E., Alhonen, L., & Janne, J., *Genomic hypomethylation in human chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1992. 80(8), 2074–2080.
75. Quentmeier, H., Pommerenke, C., Dirks, W. G., Eberth, S., Koeppel, M., MacLeod, R. A. F., Nagel, S., Steube, K., Uphoff, C. C., Drexler, H. G., *The LL-100 panel: 100 cell lines for blood cancer studies*. Scientific Reports, 2019. 9 (1): 8218 .
76. Rosén, A., Bergh, A. C., Gogolák, P., Evaldsson, C., Myhrinder, A. L., Hellqvist, E., ... Klein, E., *Lymphoblastoid cell line with B1 cell characteristics established from a chronic lymphocytic leukemia clone by in vitro EBV infection*. OncoImmunology, 2012. 1(1), 18–27.
77. Aslantürk, Ö., *In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages*, 2018.
78. Tran, S.L., et al., *Trypan blue dye enters viable cells incubated with the pore-forming toxin HlyII of Bacillus cereus*. PLoS One, 2011. 6(9): p. e22876.
79. Villas, B. H., *Flow cytometry: an overview*. Cell Vision: The Journal of Analytical Morphology, 1998. 5(1), 56–61.
80. Elmore, S., *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. Toxicologic Pathology, 2007. 35(4), 495–516.
81. Sgonc, R., & Gruber, J., *Apoptosis detection: An overview*. Experimental Gerontology, 1998. 33(6), 525–533.
82. Zimmermann, M. and N. Meyer, *Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes*. Methods Mol Biol, 2011. 740: p. 57-63.
83. Riccardi, C., & Nicoletti, I., *Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*. Nature Protocols, 2006. 1(3), 1458–1461.
84. Floden, A, Combs, C., *基因的改变NIH Public Access*. Bone, 2012. 23(1), 1–7.
85. Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., & Hübner, H., *Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin*, Chapter 2 of Cell Viability Assays, 2017. 1601, 1–17.
86. D'Arcy, M. S., *Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy*. Cell Biology International, 2019. 43(6), 582–592.
87. Hollenbach, P. W., Nguyen, A. N., Brady, H., Williams, M., Ning, Y., Richard, N., ... MacBeth, K. J., *A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines*. PLoS ONE, 2010. 5(2).
88. Jonathan Posner and Bradley S. Peterson, J. A. R., *基因的改变NIH Public Access*. Bone, 2008. 23(1), 1–7.
89. Wirries, A., Jabai, S., Jansen, E. P., Roth, S., Figueroa-Juárez, E., Wissniowski, T. T., ... Di Fazio, P., *Panobinostat mediated cell death. A novel therapeutic approach for osteosarcoma*. Oncotarget, 2018. 9(68), 32997–33010.
90. Quagliano, A., Gopalakrishnapillai, A., & Barwe, S. P., *Epigenetic drug combination overcomes osteoblast-induced chemoprotection in pediatric acute lymphoid leukemia*. Leukemia Research, 2017. 56, 36–43.

91. Lavelle, D., DeSimone, J., Hankewych, M., Kousnetzova, T., & Chen, Y. H., *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*, 2003. 27(11), 999–1007.
92. Bodoor, K., Haddad, Y., Alkhateeb, A., Al-Abbadi, A., Dowairi, M., Magableh, A., ... Ghabkari, A., *DNA hypermethylation of cell cycle (p15 and p16) and apoptotic (p14, p53, DAPK and TMS1) genes in peripheral blood of leukemia patients*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2014. 15(1), 75–84.
93. Bernhart, E., Stuedl, N., Kaltenecker, H., Windpassinger, C., Donohue, N., Leithner, A., & Lohberger, B., *Histone deacetylase inhibitors vorinostat and panobinostat induce G1 cell cycle arrest and apoptosis in multidrug resistant sarcoma cell lines*. *Oncotarget*, 2017. 8(44), 77254–77267.
94. Susanto, J. M., Colvin, E. K., Pinese, M., Chang, D. K., Pajic, M., Mawson, A., ... Scarlett, C. J., *The epigenetic agents suberoylanilide hydroxamic acid and 5-AZA-2' deoxycytidine decrease cell proliferation, induce cell death and delay the growth of MiaPaCa2 pancreatic cancer cells in vivo*. *International Journal of Oncology*, 2015. 46(5), 2223–2230.
95. Jonathan Posner and Bradley S. Peterson, J. A. R., *基因的改变* NIH Public Access. *Bone*, 2008. 23(1), 1–7.
96. Marks, P. A., & Xu, W. S., *Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2009. 107(4), 600–608.
97. Amy M. Umansky, Donna B. Jeffe, and J. E. C. L., *基因的改变* NIH Public Access. *Bone*, 2012. 23(1), 1–7.
98. Kalac, M., Scotto, L., Marchi, E., Amengual, J., Seshan, V. E., Bhagat, G., ... O'Connor, O. A., *HDAC inhibitors and decitabine are highly synergistic and associated with unique gene-expression and epigenetic profiles in models of DLBCL*. *Blood*, 2011. 118(20), 5506–5516.
99. Schcolnik-Cabrera, A., Domínguez-Gómez, G., & Dueñas-González, A., *Comparison of DNA demethylating and histone deacetylase inhibitors hydralazine-valproate versus vorinostat-decitabine in cutaneous t-cell lymphoma in HUT78 cells*. *American Journal of Blood Research*, 2018. 8(2), 5–16.
100. Prince, H. M., Bishton, M. J., & Johnstone, R. W., *Panobinostat (LBH589): A potent pan-deacetylase inhibitor with promising activity against hematologic and solid tumors*. *Future Oncology*, 2009. 5(5), 601–612.
101. Eichhorst, B., Robak, T., Montserrat, E., Ghia, P., Niemann, C. U., Kater, A. P., ... Mey, U., *Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Annals of Oncology*, 2021. 32(1), 23–33.
102. Yun, X., Zhang, Y., & Wang, X. (2020). *Recent progress of prognostic biomarkers and risk scoring systems in chronic lymphocytic leukemia*. *Biomarker Research*, 2020. 8(1), 1–11.