



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Beatriz Heliodoro Constantino

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DE INIBIDORES DO
NRF2 NA LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA EM
ASSOCIAÇÃO COM O IBRUTINIB**
ESTUDOS IN VITRO

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal orientada pela
Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro e pela Doutora Raquel Alves
e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Beatriz Heliodoro Constantino

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DE INIBIDORES DO
NRF2 NA LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA EM
ASSOCIAÇÃO COM O IBRUTINIB**
ESTUDOS IN VITRO

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal orientada pela Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro e pela Doutora Raquel Alves e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2022

Agradecimentos

No fim de mais uma etapa da minha vida académica, que me permitiu adquirir novos conhecimentos e crescer enquanto pessoa, gostaria de agradecer a todas as pessoas que me apoiaram durante este percurso.

À Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro agradeço a possibilidade de poder desenvolver o projeto apresentado nesta dissertação no seu grupo de investigação (Laboratório de Oncobiologia e Hematologia – Faculdade de Medicina), toda a disponibilidade e todos os conselhos que me permitiu desenvolver o meu espírito crítico.

À Professora Doutora Ana Cristina Gonçalves e à Doutora Raquel Alves agradeço pela orientação durante este percurso, por toda a disponibilidade, paciência e confiança e por todos os conselhos dados, que foram fundamentais.

À Mestre Joana Jorge e à Mestre Beatriz Lapa, agradeço também toda a orientação, todos os conhecimentos transmitidos, toda a disponibilidade a ajuda e toda a paciência e incentivo, mesmo quando nem tudo parecia fácil.

À Mestre Inês Costa agradeço por toda a ajuda que me prestou durante este percurso, por toda a paciência e incentivo, principalmente, agradeço pela amizade e por todas as palavras de apoio que tornaram o meu dia melhor.

Às minhas colegas de laboratório, Inês e Patrícia, agradeço pela ajuda prestada quando necessário e por proporcionarem um bom ambiente no laboratório. Agradeço especialmente à Diana, ao Santiago e à Sofia não só por toda a ajuda, incentivo e apoio, mas também por toda a amizade, todas as gargalhadas, toda a paciência e todo o carinho demonstrado. Obrigada por este ano desafiador, mas incrível.

Às minhas amigas Ana, Bruna, Daniela e Marla e apesar deste ano não termos passado muito tempo juntas quero agradecer por me terem apoiado sempre durante este percurso e por sempre me incentivarem a fazer mais e melhor. Em especial, agradeço à Marlinha pelos momentos de diversão que partilhamos e por acreditar sempre em mim.

À minha melhor amiga e companheira de casa destes últimos anos, Anita, obrigada por tudo, porque as tuas palavras de apoio e a tua presença foram fundamentais para

conseguir ultrapassar todos os obstáculos e desafios vividos nos últimos 5 anos. Obrigada por me ouvires desabafar uma centena de vezes. Sem ti este percurso teria sido mais difícil.

A todos aqueles que de alguma forma passaram na minha vida nestes últimos 5 anos em Coimbra, muito obrigada.

Por fim, quero agradecer às pessoas que fizeram com que este caminho fosse possível, a minha família, que embora não estejam todos mencionada foram fundamentais.

À minha irmã agradeço por todo o amor, por ter estado sempre presente durante este caminho e por ter aturado o meu mau humor quando as coisas não corriam da forma como queria. Obrigada por seres sempre o meu apoio.

À minha afilhada, Benedita, que apesar de ainda ser um bebé, proporcionou momentos de diversão que foram tão precisos este ano.

Aos meus pais, sem vocês nada disto teria sido possível, não há palavras para descrever tudo o que fazem por mim. Obrigada por estarem sempre presentes, por serem os meus pilares e por todo o amor e confiança.

Obrigada a todos por acreditarem em mim.

Resumo

A leucemia linfocítica crônica (LLC) caracteriza-se pela proliferação e acumulação de pequenos linfócitos B monoclonais no sangue, medula óssea e outros órgãos do tecido linfoide, como o baço. É o tipo de leucemia mais comum nos países ocidentais, sendo mais prevalente em homens. Várias alterações genéticas podem ser encontradas nesta patologia, desde alterações cromossômicas, alterações na expressão de miRNAs, mutações somáticas e modificações epigenéticas.

O stresse oxidativo, que resulta do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS/RNS) e as defesas antioxidantes, em favor das primeiras, parece também desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento desta doença. A via NRF2-KEAP1 é o principal mecanismo de resposta antioxidante e citoprotetora contra estas espécies. Em condições homeostáticas o NRF2 (*Nuclear factor erythroid-2-related factor 2*), que se encontra no citoplasma, liga-se ao KEAP1 (*Kelch-like ECH-associated protein*), sendo rapidamente degradado no proteasoma. Sob condições de stresse oxidativo, resíduos de cisteína presentes no KEAP1 são oxidados, pela ação dos radicais livres, levando à transformação conformacional desta proteína e, conseqüentemente, o NRF2 é libertado e translocado para o núcleo. No núcleo, esta proteína forma um dímero com as proteínas SMAD e liga-se aos ARE (elementos de resposta antioxidante), promovendo a expressão de genes citoprotetores. Esta via de sinalização celular apresenta um duplo papel no cancro – por um lado previne o desenvolvimento tumoral e por outro, após o estabelecimento da neoplasia, pode proteger as células tumorais dos agentes terapêuticos conduzindo a resistência ao tratamento.

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial terapêutico de dois inibidores do NRF2, o brusatol e o ML385, em monoterapia e em associação com o ibrutinib (um inibidor da tirosina cinase de Bruton), num modelo *in vitro* de LLC, a linha celular HG-3.

Em primeiro lugar, os níveis de expressão dos genes *NFE2L2* (que codifica o NRF2) e *KEAP1* (que codifica o KEAP1) foram avaliados com recurso à técnica de qPCR na linha celular HG-3. Seguidamente, as células HG-3 foram incubadas, durante 72 horas, na ausência e na presença de concentrações crescentes de brusatol, ML385 e ibrutinib, em monoterapia e em combinação. A atividade metabólica foi avaliada através do ensaio da resazurina. Uma vez que os estudos demonstraram que o brusatol foi o composto com maior potencial terapêutico na LLC, em monoterapia e em combinação

com o ibrutinib, estudaram-se os mecanismos moleculares subjacentes a estes esquemas terapêuticos. Para avaliar o tipo de morte celular utilizou-se a técnica de citometria de fluxo (CF), através da dupla marcação Anexina V e 7-amino-actinomicina D (7-AAD) e a microscopia ótica para análise morfológica após coloração das células com May-Grünwald Giemsa. O ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo através da utilização da solução iodeto de propídio (PI)/RNase. De modo a avaliar o potencial da membrana mitocondrial recorreu-se à citometria de fluxo, em que se utilizou a sonda JC-1. Os níveis intracelulares de peróxidos, ROS de origem mitocondrial, anião superóxido, óxido nítrico e glutathiona reduzida foram analisados por citometria de fluxo com recurso às sondas fluorescentes, DCFH₂-DA, DHR-123, DHE, DAF-FM DA e MO, respetivamente. Por fim foram avaliados os níveis de expressão dos genes *KEAP1*, *NF-κB1*, *NQO1*, *TXNRD1*, *HMOX1* e *GPX1*, que são regulados pela proteína NRF2, pela técnica de qPCR. Os resultados foram analisados tendo em consideração um nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

Os resultados demonstraram que as células HG-3 expressavam ambos os genes que codificam as proteínas KEAP1 e NRF2. Sendo o NRF2 o alvo terapêutico dos fármacos em estudo, a presença destes genes possibilita a continuação do estudo.

O brusatol e o ML385 reduziram a atividade metabólica das células HG-3 de forma dependente da dose e do tempo. No entanto esta linha celular revelou ser mais sensível ao brusatol, sendo o valor do IC₅₀ às 48 horas de incubação, aproximadamente, 110 nM para o brusatol e de 500 μM para o ML385. A combinação do brusatol (50 nM) com o ibrutinib (0,5 μM) revelou ser bastante eficaz, sendo a redução dos níveis da atividade metabólica maior que a soma dos efeitos individuais dos fármacos (efeito sinérgico), às 48 e 72 horas de incubação (37% e 37% para a combinação, 67% e 57%, para o brusatol em monoterapia e 79% e 74% para o ibrutinib em monoterapia, respetivamente). Por outro lado, a combinação entre o ML385 (2,5 μM) e ibrutinib (0,5 μM) não demonstrou ser tão eficaz sendo a redução da atividade metabólica das células HG-3 inferior à soma dos efeitos individuais dos fármacos em todos os tempos de incubação.

Verificamos ainda que, o brusatol em monoterapia e em combinação terapêutica com ibrutinib induziu efeito citotóxico e citostático. A morte celular foi mediada, sobretudo, por apoptose e observou-se um bloqueio do ciclo celular na fase G₀/G₁. Além disso, as células tratadas com brusatol, em monoterapia e em associação com o ibrutinib, evidenciaram diminuição do potencial da membrana mitocondrial em comparação com o controlo, confirmando que estas estratégias terapêuticas induzem disfunção

mitocondrial, o que pode contribuir para a morte celular por apoptose. Pela análise de espécies reativas de oxigénio (peróxidos intracelulares, anião superóxido e ROS de origem mitocondrial), de nitrogénio (óxido nítrico) e da glutatona reduzida verificou-se que o brusatol em monoterapia e em combinação com o ibrutinib, induziram aumento das ROS/RNS e diminuição da GSH, indicando que a morte celular induzida por este fármaco é mediada pela indução de stresse oxidativo. Este resultado foi confirmado pelo aumento da razão ROS/GSH. No entanto, o tratamento com brusatol não parece influenciar a expressão dos genes envolvidos na via de sinalização do NRF2 (*KEAP1*, *NF-κB1*, *NQO1*, *TXNRD1*, *HMOX1* e *GPX1*).

Em conclusão, este estudo permitiu elucidar que o brusatol poderá ser um potencial agente farmacológico para a terapêutica da LLC, em monoterapia e como coadjuvante do tratamento com ibrutinib.

Palavras chave:

- ◇ Leucemia linfocítica crónica;
- ◇ Stresse oxidativo;
- ◇ Via NRF2-KEAP1;
- ◇ Inibidores do NRF2
- ◇ Ibrutinib

Abstract

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by the proliferation and accumulation of small monoclonal B lymphocytes in the blood, bone marrow and other secondary lymphoid organs, like spleen. Is the commonest leukemia in Western Countries being more prevalent in men. Various genetic alterations can be found in this pathology, including chromosomic alterations, miRNA alterations, epigenetic changes and somatic mutations.

Oxidative stress, which results from the disequilibrium between the production of reactive oxygen species/ reactive nitrogen species (ROS/RNS) production and antioxidant defenses, seems also to play a crucial role in the development of this disease. The NRF2-KEAP1 pathway is the principal mechanism of antioxidant and cytoprotective response against this species. Under homeostatic conditions, the NRF2 (Nuclear factor erythroid-2-related factor 2), which is located in the cytoplasm, binds to KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein), being rapidly degraded in the proteasome. Under stress conditions, cysteine residues in KEAP1 are oxidized, by the action of free radicals, leading to the conformational changes of this protein, and, consequently, NRF2 is released and translocated to the nucleus. In the nucleus, NRF2 forms a heterodimer with sMAF proteins and binds to ARE sequences (antioxidant response element), stimulating the expression of target genes. This pathway presents a dual role in cancer – can prevent tumor development and, after tumor establishment, can protect the tumor cells from therapeutic agents leading to treatment resistance.

The aim of this study was to evaluate the therapeutic potential of two NRF2 inhibitors, brusatol and ML385, in monotherapy and association with ibrutinib (Bcr tyrosine kinase inhibitor used in clinical practice for CLL treatment), in an *in vitro* CLL model, the HG-3 cell line.

The expression levels of *NFE2L2* (which encodes NRF2) and *KEAP1* (which encodes KEAP1) genes were initially evaluated in the HG-3 cells, using the qPCR. Then, the HG-3 cells were incubated, for 72 hours, in the absence and presence of increasing concentrations of brusatol, ML385, and ibrutinib in monotherapy and association. The metabolic activity was determined by resazurin assay. Since studies showed that brusatol was the compound with the greatest therapeutic potential in CLL, in monotherapy and in combination with ibrutinib, the molecular mechanisms underlying these therapeutic schedules were studied. The type of cell death was analyzed by optical

microscopy (May-Grünwald Giemsa staining) and by flow cytometry (FC), using the annexin-V (AV) and 7- AAD double staining. The cell cycle was evaluated by flow cytometry using the propidium iodide (PI)/RNase solution. The mitochondrial membrane potential was quantified by FC using JC-1 probe. Intracellular peroxides, mitochondrial ROS, superoxide anion, nitric oxide and reduced glutathione levels were measured by fluorimetry using DCFH₂-DA, DHR-123, DHE, DAF-FM DA and MO fluorescent probes, respectively. Finally, the levels of gene expression of *KEAP1*, *NF-κB1*, *NQO1*, *TXNRD1*, *HMOX1* and *GPX1*, which are regulated by NRF2 protein, were assessed using qPCR. Results were analyzed statistically considering a 95% significance level (p<0.05).

The results showed that HG-3 cells express *NFE2L2* and *KEAP-1* genes. Since NRF2 is the therapeutic target of the drugs under study, the presence of these genes makes it possible to continue the study.

The exposure to increasing concentrations of brusatol and ML385 induced reduced metabolic activity depending on concentration and time. However, this cell line proved to be more sensitive to brusatol, being the IC₅₀ value at 48 hours of incubation, approximately, 110 nM for brusatol and 500 μM for ML385. The association of brusatol (50 nM) with ibrutinib (0.5 μM) showed a synergic effect at 48 and 72 hours (37% and 37% for the combination, 67% and 57%, for brusatol in monotherapy and 79% and 74% for ibrutinib in monotherapy, respectively), leading to a higher reduction of metabolic activity than drugs alone. On the other hand, the combination between ML385 (2.5 μM) and ibrutinib (0.5 μM) did not prove to be as effective, with the reduction in the metabolic activity of HG-3 cells being less than the sum of the individual drug effects at all incubation times.

We further check that brusatol in monotherapy and in association with ibrutinib induce a cytostatic and cytotoxic effect. The cell death was mediated, mainly, by apoptosis, and it was observed cell cycle arrest in phase G₀/G₁. Besides that, cells treated with both conditions showed a decrease in the mitochondrial membrane potential. Our results suggest that brusatol could be a potential pharmacological agent for the therapeutic of CLL, in monotherapy and as an adjuvant to treatment with ibrutinib, confirming that these therapeutic strategies induce mitochondrial dysfunction, which may contribute to cell death by apoptosis. By the analysis of reactive oxygen species (peroxides, mitochondrial ROS and superoxide anion), reactive nitrogen species (nitric oxide) and reduced glutathione it was found that brusatol, in monotherapy and in association with ibrutinib induced an increase of ROS/RNS and a decrease of GSH. This result indicates that the

cell death induced by brusatol, in monotherapy and in association with ibrutinib, was mediated by inducing oxidative stress. The induction of oxidative stress was confirmed by the increase in the ROS/GSH ratio. However, brusatol treatment does not seem to influence the expression of genes involved in the NRF2 signaling pathway (*KEAP1*, *NF- κ B1*, *NQO1*, *TXNRD1*, *HMOX1* and *GPX1*).

In conclusion, this study allowed us to elucidate that brusatol could be a potential pharmacological agent for the therapy of CLL, in monotherapy and as an adjunct to treatment with ibrutinib.

Key-words:

- ◇ Chronic lymphocytic leukemia;
- ◇ Oxidative stress;
- ◇ NRF2-KEAP1 pathway;
- ◇ NRF2 inhibitors
- ◇ Ibrutinib

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	iii
Abstract	vii
Abreviaturas	xv
1. Introdução	1
1.1. Sistema hematopoiético.....	3
1.2. Leucemia linfocítica crónica	5
1.2.1. Incidência e prevalência	5
1.2.2. Fisiopatologia e características clinico-laboratoriais – breve abordagem....	5
1.2.3. Características genéticas da LLC	6
1.2.3.1. Alterações cromossómicas	9
1.2.3.2. Mutações somáticas	9
1.2.3.3. Alterações na expressão de miRNAs	10
1.2.3.4. Alterações epigenéticas.....	11
1.3. Diagnóstico e prognóstico.....	12
1.4. Stresse oxidativo.....	13
1.4.1. Espécies reativas de oxigénio/nitrogénio.....	15
1.4.2. Stresse oxidativo em neoplasias hematológicas.....	16
1.5. Sistema NRF2-KEAP1	17
1.5.1. NRF2: estrutura.....	17
1.5.2. KEAP1: estrutura.....	19
1.5.3. Regulação do NRF2.....	19
1.5.4. Funções do NRF2	23
1.5.5. Via NRF2-KEAP1 e o cancro.....	24
1.6. Tratamentos da LLC	26
1.6.1. Ibrutinib	27
1.7. Inibidores do NRF2	28
1.7.1. Brusatol.....	28
1.7.2. ML385	29
1.8. Objetivo.....	30
2. Materiais e métodos.....	33
2.1. Caracterização da linha celular e condições de cultura.....	35

2.2.	Avaliação da expressão dos genes <i>NFE2L2</i> e <i>KEAP1</i>	35
2.2.1.	Extração de RNA.....	36
2.2.2.	Quantificação do RNA.....	36
2.2.3.	Síntese do cDNA.....	37
2.2.4.	PCR em tempo real (qPCR).....	37
2.3.	Avaliação da proliferação e viabilidade celular.....	39
2.4.	Avaliação do potencial terapêutico dos fármacos brusatol e ML385, em monoterapia e em associação com o ibrutinib.....	39
2.4.1.	Avaliação da atividade metabólica.....	40
2.4.2.	Avaliação do tipo de morte celular.....	42
2.4.3.	Avaliação do ciclo celular.....	44
2.4.4.	Avaliação do potencial da membrana mitocondrial.....	45
2.4.5.	Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio (ROS/RNS) e de glutatona reduzida (GSH).....	45
2.4.5.1.	Avaliação dos níveis de peróxidos intracelulares.....	46
2.4.5.2.	Avaliação dos níveis de ROS de origem mitocondrial.....	47
2.4.5.3.	Avaliação dos níveis do anião superóxido.....	48
2.4.5.4.	Avaliação dos níveis de óxido nítrico.....	49
2.4.5.5.	Avaliação dos níveis de GSH.....	50
2.4.6.	Avaliação da expressão dos genes alvo do NRF2.....	51
2.4.7.	Análise estatística.....	51
3.	Resultados.....	53
3.1.	Curva de crescimento da linha celular HG-3.....	55
3.2.	Avaliação da expressão dos genes <i>NFE2L2</i> e <i>KEAP1</i>	56
3.3.	Avaliação dos inibidores do NRF2 em combinação com o ibrutinib como novas estratégias terapêuticas na LLC.....	56
3.3.1.	Efeito do brusatol, ML385 e ibrutinib na linha celular HG-3: monoterapia.....	57
3.3.2.	Efeito do brusatol e ML385 em associação com o ibrutinib na linha celular HG-3.....	59
3.4.	Efeito citotóxico induzido pelo brusatol em monoterapia e em associação com o ibrutinib nas células HG-3.....	63
3.5.	Efeito no ciclo celular após a exposição a brusatol em monoterapia e em associação com o ibrutinib nas células HG-3.....	66
3.6.	Avaliação do potencial da membrana mitocondrial.....	67
3.7.	Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio (ROS/ RNS) e de glutatona reduzida (GSH).....	68

3.8. Avaliação da expressão de genes alvo do NRF2.....	71
4. Discussão	75
5. Conclusão	85
6. Referências	89

Abreviaturas

7-AAD: 7-aminoactinomicina D
ABC: Transportadores cassete de ligação a ATP
AHR: Recetor de aril hidrocarboneto
AID: Citidina desaminase induzida por ativação
AKT: *Protein kinase B*
APE1: *Apurinic/aprimidinic Endonuclease 1*
ARE: Elemento de resposta antioxidante
ATM: *Ataxia-Telangiectasia Mutated*
ATP: Adenosina trifosfato
AV: Anexina V
BCL2: *B-cell lymphoma 2*
BCR: *BCR activator of RhoGEF and GTPase*
BIRC3: *Baculoviral IAP Repeat Containing 3*
BTB: *Broad-complex, tramtrack e bric-a-brac*
BTK: Tirosina cinase de Bruton
bZIP: *Basic leucine zipper*
cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar
CEH: Células estaminais hematopoiéticas
CES1G: Carboxilesterase 1G
CES1H: Carboxilesterase 1H
CHD2: *Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 2*
CHDH6: *Chromodomain helicase DNA bBinding protein 6*
CLL-IPI: *International Prognostic Index*
CNC: Cap 'N' Collar
COX: Ciclooxygenases
CPM: Célula progenitora multipotente
CPTNK: Células progenitoras T e Natural killer
Cul1: *Cullin-1*
Cul3: *Cullin-3*
dNTP's: Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DAF-FM DA: Diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína
DAF-FM: 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína
DCF: 2',7'-diclorofluoresceína

DCFH: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DCFH2-DA: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
DHE: Dihidroetídio
DHR: Dihidroradamina-123
DLEU7: *Deleted in lymphocytic leukemia 7*
DNA: Ácido desoxirribonucleico
EBV: Vírus de Epstein–Barr
EPA: Ácido eicosapentaenóico
ERK: *extracellular signal-regulated kinase*
FADH₂: Dinucleótido de flavina e adenina reduzido
FBS: Soro bovino fetal
G6PD: Glucose-6-fosfato-1-desidrogenase
GCL: Glutamato-cisteína ligase
GCLC: Glutamato-cisteína ligase subunidade catalítica
GCLM: Glutamato-cisteína ligase subunidade modificadora
GLRX: Glutaredoxina
GPX: Glutationa peroxidase
GPX1: Glutationa peroxidase 1
GSH: Glutationa reduzida
GSK-3 β : Glicogénio sintase cinase-3 β
GSS: Glutationa sintetase
GST: Glutationa S-transferase
HIST1H1E: *Histone Gene Cluster 1 Member E*
HMOX1: Heme oxigenase 1
IGHV: *Immunoglobulin heavy chain gene*
iwCLL: *International Workshop on CLL*
IVR: Região intermedia da KEAP1
JC-1: 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbo-cianina iodeto
JNK: *c-Jun N-terminal cinase*
KEAP1: *Kelch Like ECH Associated Protein 1*
LLA: Leucemia linfoblástica aguda
LLC: Leucemia linfocítica crónica
LMA: Leucemia mielóide aguda
LMC: Leucemia mielóide crónica
MAF: *V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog*
MO: Alaranjado de mercúrio

MYD88: *Myeloid differentiation primary response 88*
NADH: Dinucleotídeo de adenina nicotinamida reduzido
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-E2 p45: *Nuclear Factor-erythroid 2 p45*
NF-κB: factor nuclear kappa B
NGS: *Next-Generation Sequencing*
NK: Natural killer
NOTCH1: Recetor de notch1
NOX: NADPH oxidases
NQO1: NAD(P)H quinona oxidoreductase 1
NRF1: *Nuclear Respiratory Factor 1*
NRF2: *Nuclear factor erythroid-2-related factor 2*
NRF3: *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3*
P53: Proteína tumoral p53
PI: Iodeto de propídio
PI3K: *Phosphoinositide 3-kinases*
PS: Fosfatidiserina
RH-123: Rodamina-123
RNA: Ácido ribonucleico
RNS: Espécies reativas de nitrogénio
ROS: Espécies reativas de oxigénio
RXRα: *Retinoid X receptor alfa*
SF3B1: *Splicing Factor 3b Subunit 1*
SIAH2: *Seven In Absentia Homolog 2*
SO: stresse oxidativo
SOD: Superóxido dismutase
tBHQ: Terc-butil-hidroquinona
TCL1A: *T-cell leukemia/lymphoma protein 1A*
TNF: Fator de necrose tumoral
TP53: *Tumor-suppressor p53*
TPM: Transição de permeabilidade mitocondrial
TRXR: Tiorredoxina redutase
TXN: Tiorredoxina
TXNIP: Proteína de interação com tiorredoxina
TXNRD1: Tiorredoxina redutase 1
WNT: *Wingless/Integrated*

XPO1: *Exportin-1*

ZMYM3: *Zinc Finger MYM-Type Containing 3*

β -TrCP: *β transducin repeat-containing protein*

$\Delta\Psi_{mit}$: Potencial de membrana mitocondrial

1.INTRODUÇÃO

1.1. Sistema hematopoiético

O sistema hematopoiético é responsável pela produção das células sanguíneas maduras presentes no sangue, um processo denominado por hematopoiese [1]. A produção contínua destas células altamente diferenciadas só é possível devido à presença das células estaminais hematopoiéticas (CEH), que têm a capacidade de se autorrenovar, proliferar e diferenciar para dar origem a células maduras sanguíneas [2], [3], [4]. Embora a hematopoiese possa ocorrer em vários locais durante o desenvolvimento fetal, tais como no saco vitelino, no fígado e baço, na última fase gestacional até à fase adulta, este processo ocorre na medula óssea [5].

Para serem formadas células maduras, as CEH diferenciam-se de forma organizada originando os vários subtipos de linhagens celulares (Figura 1). Inicialmente, após a autorrenovação, a CEH pode dar origem a uma célula progenitora multipotente (CPM), que tem a capacidade de formar células progenitoras/precursoras mielóides e linfóides. Por sua vez, a célula precursora mielóide pode resultar num progenitor de macrófagos/granulócitos (que dá origem aos monócitos e granulócitos) e num progenitor de eritrócitos/megacariócitos (que formam os eritrócitos e as plaquetas). Já a célula precursora linfóide promove a formação das células progenitoras B, T e *Natural killer* (NK). Assim, as células estaminais hematopoiéticas, ao longo de todo o percurso tornam-se cada vez mais específicas até formarem uma célula madura, com funções específicas. Todo este processo onde são formadas células hematopoiéticas é regulado por fatores de crescimento e por citocinas [6].

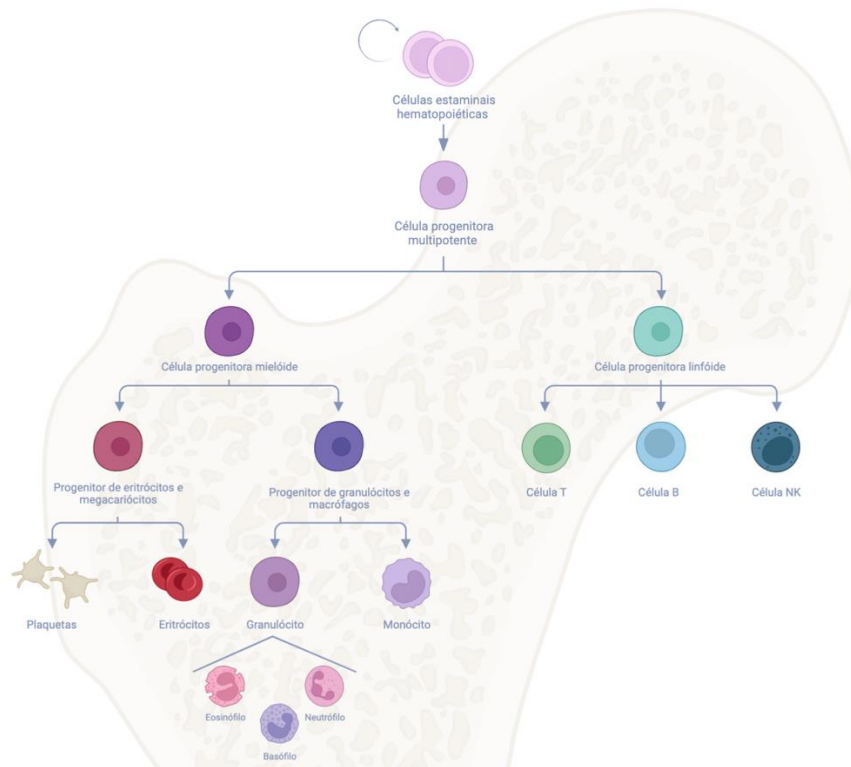


Figura 1: Modelo da hematopoiese na medula óssea. No topo da hierarquia encontram-se as células estaminais hematopoiéticas (CEH), que possuem capacidade de se auto-renovarem de forma ilimitada (representado pela seta circular), dando origem a uma célula progenitora multipotente (CPM), com capacidade limitada para se auto-renovar. As CPMs podem formar células progenitoras mielóides ou linfóides e cada uma dessas células pode dar origem a constituintes sanguíneos específicos.

Para a formação de uma única linhagem celular são necessários vários processos, que devem ser constantemente regulados. Qualquer alteração nas células precursoras e no microambiente da medula óssea, local onde esse processo ocorre, pode prejudicar a formação adequada da célula madura e, conseqüentemente, levar à formação de células leucémicas [6]. Alterações nos fatores de crescimento, que são os principais reguladores das CEH, demonstraram estar envolvidas na origem da leucemia [7]. Desta forma, pode-se caracterizar a leucemia, como uma neoplasia hematológica que resulta da transformação maligna de progenitores hematopoiéticos, no qual estão envolvidos vários mecanismos moleculares, genéticos e/ou epigenéticos [8].

De um modo geral, as leucemias são neoplasias hematológicas onde existe uma produção exacerbada de células imaturas na medula óssea (blastos) e/ou o bloqueio

maturativo em diferentes fases do processo de diferenciação celular, afetando a produção de células sanguíneas normais [9], [10]. Estas patologias podem ser agudas, quando as células malignas têm uma rápida proliferação e as suas funções encontram-se alteradas ou podem ser crônicas quando as células se dividem de uma forma mais lenta [10]. Existem quatro principais subtipos de leucemias, a leucemia mieloblástica aguda (LMA), a leucemia linfoblástica aguda (LLA), a leucemia mielóide crônica (LMC) e a leucemia linfocítica crônica (LLC), sendo que este projeto tem como foco a LLC [9], [10].

1.2. Leucemia linfocítica crônica

1.2.1. Incidência e prevalência

A LLC é considerada o tipo de leucemia mais comum nos países ocidentais [11]. Dados atuais revelam que o nível de incidência desta patologia é de 4,9 novos casos por 100 mil habitantes, por ano [12], [13]. Com uma predisposição de gênero, os homens são, frequentemente, mais afetados do que as mulheres, sendo que a idade média de diagnóstico ocorre em torno dos 70 anos. No entanto, a idade média de diagnóstico tem vindo a diminuir, isto porque, atualmente existe um aumento do número de exames sanguíneos que, conseqüentemente, leva à descoberta de diagnósticos de forma acidental e precoce [14].

1.1.1. Fisiopatologia e características clinico-laboratoriais – breve abordagem

A leucemia linfocítica crônica caracteriza-se pela proliferação e acumulação de pequenos linfócitos B monoclonais no sangue, medula óssea e outros órgãos linfoides, como o baço [11], [15]. O aumento destes linfócitos pode manifestar-se com linfocitose, linfadenopatia e esplenomegália [16]. As células B linfóides, normalmente, co-expressam na sua superfície os marcadores CD5, CD19 e CD23, apresentam baixa expressão para a imunoglobulina de superfície (sIg) e CD20 e são negativas para CD10

e ciclina D1 [17], [18]. A evolução clínica desta patologia é muito variável, ou seja, ela pode manifestar-se de forma indolente e o doente não apresentar quaisquer sintomas ou de forma agressiva, e levar à morte do doente muito rapidamente [19].

1.1.2. Características genéticas da LLC

Na superfície das células B encontra-se expresso o recetor de células B (BCR), que desempenha um papel importante no desenvolvimento destas células, como por exemplo na produção de anticorpos [20]. O principal componente do BCR são as imunoglobulinas de superfície (Ig), que permitem tanto o funcionamento e sobrevivência de células B saudáveis, como de células B malignas [21]. Estas imunoglobulinas são formadas por uma região de ligação a antígenos e por um domínio de interação com o recetor Fc (uma proteína presente na superfície de células B) [22]. Cada imunoglobulina consiste em quatro polipeptídeos, dois de cadeia pesada (α , δ , ϵ , γ ou μ) e dois de cadeia leve (Kappa (K) ou lambda (λ)). Existem cinco classes primárias de imunoglobulinas (IgA, IgM, IgG, IgE e IgD), que se diferenciam pelo tipo de cadeia pesada encontrada no anticorpo. Uma das funções das imunoglobulinas é tornar as células B específicas para cada antígeno [22]. Ao longo do seu amadurecimento, no tecido linfóide secundário, dá-se o rearranjo dos genes da região variável de cadeia pesada através da recombinação genética dos segmentos V (variável), D (diversidade) e J (junção) e os genes da cadeia leve pelos segmentos genéticos V e J, como representado na Figura 2 [23]. Posteriormente, as células tornam-se ainda mais específicas ao antígeno quando passam por centros germinativos, sofrendo alterações nos nucleótidos, na região variável, um processo denominado de hipermutação somática pela enzima citidina desaminase induzida por ativação (AID).

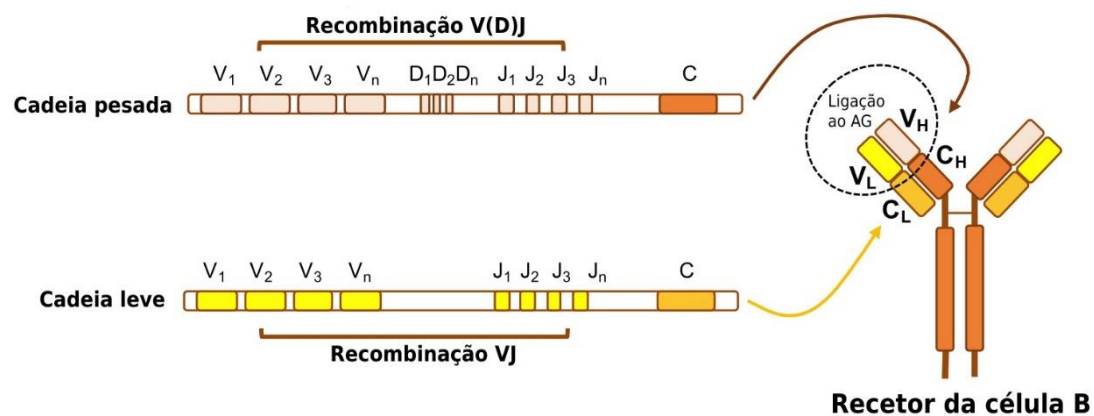


Figura 2: Recombinação somática V(D)J. Através da recombinação genética dos segmentos variável (V), de diversidade (D) e de junção (J), presentes na cadeia pesada, com as regiões VJ, que se encontram na cadeia leve, são geradas regiões variáveis únicas de cadeia pesada e leve no BCR. Neste recetor encontram-se duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. (Adaptado de Hacken *et al.*, 2018, [23])

Apesar da origem das células de LLC não ser totalmente conhecida, estas células podem ser distinguidas pela presença ou ausência de mutação nos genes de região variável de cadeia pesada da imunoglobulina (*IGHV*), tendo cada uma destas células origens distintas, como se pode observar na Figura 3 [11], [24]. As células linfóides não mutadas na *IGHV* são derivadas de células B que não sofreram diferenciação nos centros germinativos, local onde ocorre a seleção de células B que produzem anticorpos de alta afinidade [11], [25]. Por outro lado, as células que têm a presença de mutações na *IGHV* são originadas de células B do centro pós-germinativo [26]. As células de LLC que possuem genes de imunoglobulina mutados apresentam semelhanças com as células B de memória, enquanto aquelas que não têm mutação são equivalentes às células B naïve. Alguns autores consideram, ainda, um terceiro subtipo de células de LLC, uma vez que existem casos onde os níveis de mutação *IGHV* são moderados [26].

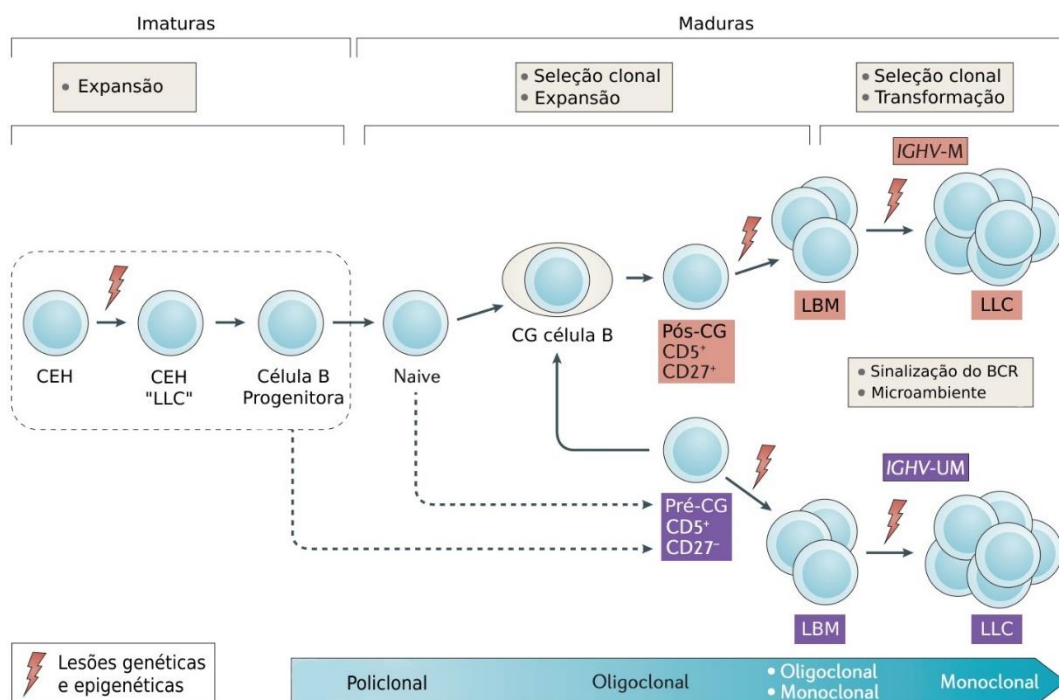


Figura 3: Origem das células de LLC com a presença ou ausência de mutação nos genes de região variável de cadeia pesada da imunoglobulina. Apesar do pouco conhecimento sobre a origem das células de LLC, Bosch *et al.* propõem que estas células surgem de células estaminais hematopoiéticas que sofreram lesões genéticas e epigenéticas. Essas alterações resultam na formação de progenitores de células B (denominada de expansão clonal), que após serem sujeitas a estimulação antigênica, desencadeiam a seleção oligoclonal e expansão de células B maduras. Enquanto as células que não têm mutação na *IGHV* originam-se de células B naíve CD5⁺ e CD27⁻, aquelas que apresentam a mutação parecem ter origem em células B que sofreram diferenciação no centro pós-germinativo e por isso apresentam marcadores CD5⁺ e CD27⁺. (Adaptado de Fabbri *et al.*, 2018, [24])

Vários estudos têm permitido compreender a heterogeneidade genética encontrada em células de LLC. Assim, as alterações genéticas presentes nesta patologia têm sido extensivamente investigadas e utilizadas de forma a avaliar o prognóstico. Entre essas alterações encontram-se alterações cromossômicas, mutações somáticas, alterações na expressão de miRNAs e modificações epigenéticas [11].

1.1.2.1. Alterações cromossômicas:

As alterações cromossômicas mais comuns são a deleção 13q, deleção 11q, deleção 17p e trissomia 12, sendo que, aproximadamente, 82% dos doentes com LLC apresentam pelo menos uma destas alterações [27], [28]. A deleção 13q é a mais comum em doentes com LLC, representando mais de 50% dos casos. Apesar de ser a alteração cromossômica mais comum é também aquela que oferece o melhor prognóstico, uma vez que esses doentes podem apresentar uma taxa de sobrevivência equivalente à de um indivíduo sem patologia. A alteração nesta região pode resultar na deleção dos miR15A e miR16A. Estes dois miRNA são essenciais na expressão de reguladores chave da apoptose e do ciclo celular e quando inibidos conduzem à sobrevivência e proliferação de células B linfóides. Esta deleção também está envolvida na sobreexpressão do gene *BCL2*, que se tornou um alvo da LLC (por exemplo, o fármaco venetoclax tem como alvo a proteína codificada por este gene). As deleções 11q22-23 são detetadas em, aproximadamente, 15% dos doentes e resultam, em quase todos os casos, na ausência do gene supressor tumoral *ATM* [29], [30]. A principal função deste gene é proteger a integridade do genoma, pela ativação das vias de reparação do DNA que regulam a interrupção do ciclo celular induzida por lesões do DNA na fase G₁/S e G₂/M e promovem a apoptose quando as lesões do DNA não podem ser reparadas. Cerca de 16% dos doentes com LLC apresentam trissomia 12, que leva a características imunofenóticas e morfológicas atípicas [27]. A presença de trissomia 12 aumenta a probabilidade de existirem mutações *NOTCH1*, 25-30% dos doentes com LLC e trissomia 12 têm esta mutação. Pode ainda ocorrer evolução para a síndrome de Richter, que tem mau prognóstico e evolução bastante agressiva [29]. A quarta alteração cromossômica mais comum é a deleção 17p13, afetando, em média, 10% dos doentes com LLC e é mais frequentemente observada em células de LLC sem a mutação na *IGHV*. Esta deleção resulta na eliminação do gene supressor tumoral *TP53*, responsável pela reparação de lesões do DNA. Os doentes com esta deleção apresentam alta complexidade genómica e um pior prognóstico, em relação às alterações apresentadas anteriormente.

1.1.2.2. Mutações somáticas:

Através da técnica de sequenciação massiva paralela (NGS), em particular pela sequenciação do exoma, foi possível identificar mutações em genes associados à LLC

[11]. Desta forma, foram encontradas mutações em genes responsáveis pela reparação do DNA (*TP53*, *ATM* e *BIRC3*), processamento do mRNA (*SF3B1* e *XPO1*), modificação da cromatina (*HIST1H1E*, *CHD2* e *ZMYM3*), sinalização do WNT (*WNT*), sinalização do NOTCH (*NOTCH1*) e resposta inflamatória (*MYD88*). As principais mutações somáticas encontradas em doentes com LLC são nos genes *TP53* (4-12% dos casos com LLC), *ATM* (12% dos casos com LLC), *NOTCH1* (10-15% dos doentes no momento do diagnóstico), *SF3B1* (5-10% dos casos com LLC), *BIRC3* (cerca de 4% dos casos com LLC) e *MYD88* (3-5% dos casos com LLC) [31], [32]. O gene *TP53*, como referido anteriormente, é responsável pela reparação de lesões do DNA e na LLC a mutação neste gene encontra-se associado à rápida progressão da patologia, resposta insuficiente à quimioterapia e menor sobrevivência dos doentes [32], [33]. Envolvido na reparação da dupla cadeia de DNA encontra-se o gene *ATM*, que na LLC pode ser encontrado mutado em, aproximadamente, 30% dos doentes com deleção 11q23 [32]. *NOTCH1* está envolvido na proliferação, diferenciação e autorrenovação das células e é responsável pela regulação de vários genes como *c-MYC*, *TP53* e genes envolvidos na via de sinalização do NF-κB [32]. A mutação deste gene encontra-se com maior frequência em doentes em estágio avançado, sendo mais prevalente quando esses doentes têm trissomia 12 ou que não apresentam mutação na *IGHV* [14], [31]. Na LLC este gene encontra-se envolvido na resistência à apoptose e sobrevivência das células malignas [31]. As mutações que ocorrem no gene *SF3B1* estão envolvidas num *splicing* defeituoso de vários mRNA, o que resulta numa incorreta síntese proteica [32]. Alterações nos genes *BIRC3* e *MYD88* não são muito frequentes em doentes com LLC, no entanto, ambas as alterações promovem a resistência à apoptose.

1.1.2.3. Alterações na expressão de miRNAs:

Além das alterações dos miR15A e miR16A, que afetam a proliferação e sobrevivência das células tumorais, as células de LLC podem apresentar alterações noutros miRNAs [11]. Algumas células de LLC apresentam ausência ou expressão reduzida de alguns miRNA, como do miR29a/b, miR29c, miR34b, miR181b e miR3676. Estas alterações resultam no aumento de expressão do gene *TCL1A*, que codifica a proteína 1A de leucemia/linfoma de células T e promove o desenvolvimento de LLC em murganhos transgênicos [34]. A expressão aumentada do miR155, por vezes, também é encontrada nestas células linfóides e está associada ao aumento da sinalização do BCR e à proliferação de células B [35].

1.1.2.4. Alterações epigenéticas:

Após uma análise ao epigenoma verificou-se que alguns doentes com LLC apresentam alterações epigenéticas [11]. Quando comparadas com células saudáveis, algumas células de LLC apresentaram hipometilação global e hipermetilação localizada. Esta metilação disfuncional pode resultar na alteração da expressão de vários genes, promovendo a evolução do tumor. A variação de metilação é maior em células de LLC que possuem uma *IGHV* não mutada, do que em células que têm uma *IGHV* mutada [26].

Na Figura 4, encontra-se um esquema que representa algumas alterações genéticas presentes na LLC.

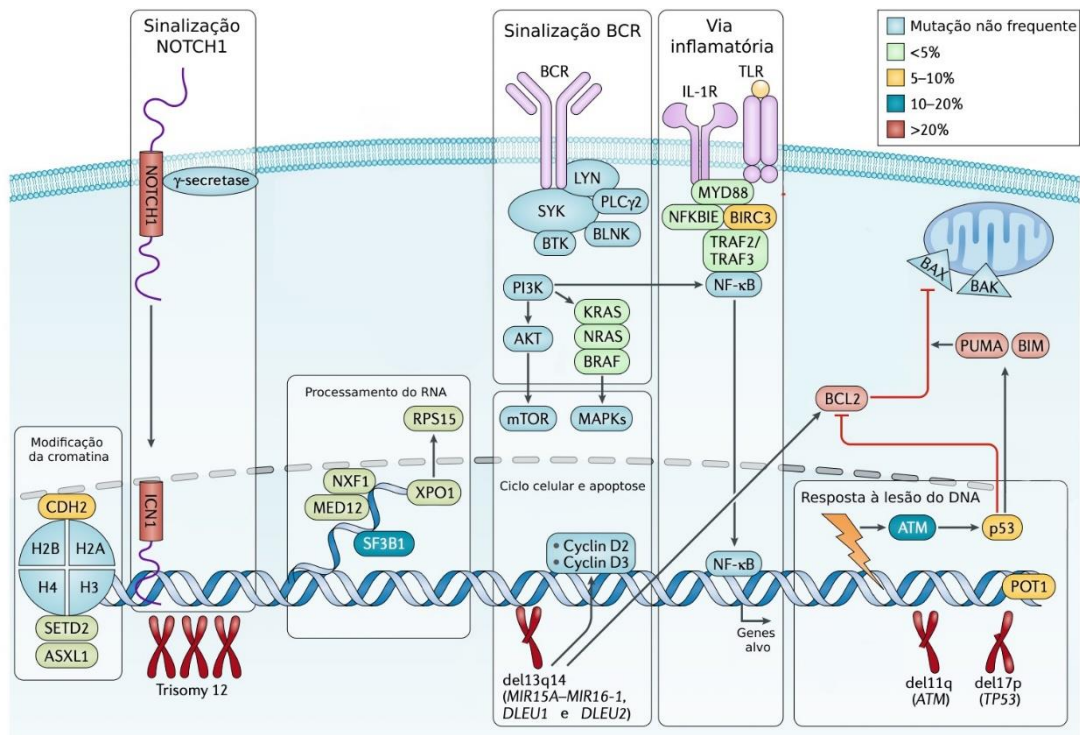


Figura 4: Alterações genéticas presentes na LLC. Este esquema representa várias alterações genéticas (como alterações cromossômicas, somáticas, na expressão de miRNA e epigenéticas) que podem estar presentes na leucemia linfocítica crônica. As alterações cromossômicas mais comuns nesta patologia são a deleção 13q (envolvida na sobreexpressão do gene *BCL2* devido à deleção dos miR15A e miR16-1), deleção 11q (que compromete a função do supressor tumoral *ATM*), deleção 17p (implicado na eliminação do gene supressor tumoral *TP53*) e trissomia 12 (aumenta a probabilidade de existirem mutações *NOTCH1*). Também se podem observar algumas alterações somáticas, que resultam em mutações em genes

responsáveis pela reparação do DNA (*TP53* e *ATM*), processamento do mRNA (*SF3B1* e *XPO1*), modificação da cromatina (*CHD2*), sinalização do Notch (*NOTCH1*) e na resposta inflamatória (*MYD88*). As alterações presentes no miR15A e miR16-1 também se encontram neste esquema, afetando, principalmente, a proliferação e sobrevivência das células (Adaptado de Bosch *et al.*, 2019, [14]).

1.2. Diagnóstico e prognóstico

A primeira classificação da LLC foi realizada pelo “*National Cancer Institute Working Group*” em 1996. No entanto, em 2008, essa classificação sofreu alterações por parte do “*International Workshop on CLL*” (iwCLL) [36], [37]. Atualmente, o diagnóstico de LLC pode ser estabelecido através de hemogramas, contagens diferenciais, esfregaço de sangue e por imunofenotipagem, sendo necessária a presença de ≥ 5000 linfócitos B/ μ L no sangue periférico durante, pelo menos, 3 meses e uma população de células B clonais [38]. Porém, a LLC pode ser facilmente confundida com linfoma de pequenos linfócitos, uma vez que este tipo de neoplasia também apresenta um número elevado de linfócitos B no sangue. Além dos linfócitos B encontrados no sangue, o diagnóstico só é confirmado depois dessas células serem caracterizadas imunofenotipicamente por citometria de fluxo (CF), sendo as principais características a expressão dos marcadores de superfície CD5, CD23, CD19, os baixos níveis de expressão dos marcadores CD20 e CD79b e a existência de restrição nas cadeias leves de imunoglobulinas (K ou λ) [39]. Estas células são ainda analisadas por microscopia ótica através do esfregaço sanguíneo, onde se devem observar linfócitos, caracteristicamente, pequenos e maduros.

Devido à heterogeneidade desta patologia, existe um grande esforço para identificar fatores de prognóstico mais específicos, de modo a fornecer o melhor tratamento para cada doente. Os doentes com LLC, ou apresentam sintomas muito leves (ou mesmo inexistentes) ou apresentam sintomas agressivos, que podem resultar na morte do doente muito rapidamente [11]. Dois índices de prognóstico foram definidos por Rai e Binet e são, atualmente, aceites pela comunidade científica. Ambos os sistemas de classificação possuem três grupos de prognóstico, no entanto, inicialmente, a classificação de Rai tinha cinco grupos [38]. Estes sistemas permitem diferenciar os

doentes que não necessitam de tratamento (por serem assintomáticos, ficando apenas sob observação) dos que, efetivamente, precisam de tratamento. Os sistemas de classificação de Rai e Binet basearam-se em características clínicas e laboratoriais incluindo a presença de células de LLC no sangue periférico, gânglios linfáticos, baço, fígado, medula óssea, com as consequentes repercussões no hemograma (linfocitose e anemia e/ou trombocitopenia). Estes sistemas de estadiamento permitem ainda estratificar o risco dos doentes: baixo risco, risco intermedio e alto risco.

Apesar de serem aceites na prática clínica, estes dois sistemas de classificação apresentam limitações e devem ser complementados através de outros estudos. Atualmente, já foram identificados perfis citogenéticos e moleculares em células de LLC que podem dar informações mais detalhadas sobre o estado de cada doente [40]. As alterações genéticas e cromossómicas encontradas nessas células são essenciais, uma vez que podem dar informações clínicas, biológicas e genéticas. O índice internacional de prognóstico da LLC (*“International Prognostic Index”*, CLL-IPI) é, atualmente, o sistema que fornece o melhor prognóstico para cada doente [38]. Neste sistema são considerados cinco fatores de prognóstico, sendo eles a deleção/mutação do gene *TP53*, o estado mutacional na *IGHV*, os níveis de β 2-microglobulina no plasma, o estado clínico e a idade do doente. As alterações presentes no gene *TP53* estão associadas a um pior prognóstico e podem resultar na transformação da doença ou numa resposta insatisfatória ao tratamento [41]. Considera-se que as células de LLC possuem mutação na *IGHV* quando existe uma carga mutacional $> 2\%$ em relação à linha germinativa e não apresenta mutação quando essa carga é $< 2\%$ [42]. Doentes na presença de mutação na *IGHV* desenvolvem a doença de uma forma menos agressiva em relação aos doentes que não apresentem a mutação. Células de LLC sem mutação são mais proliferativas, sofrem com mais facilidade apoptose espontânea e são mais reativas a vários antígenos do que as células de LLC com mutação [40].

1.3. Stresse oxidativo

A homeostasia redox é essencial para garantir que as células desempenhem todos os processos fisiológicos essenciais para o seu funcionamento e para a sua sobrevivência [43], [44]. As células permanecem num estado homeostático quando existe um equilíbrio

entre a produção e eliminação de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio (ROS/RNS). A perturbação desse equilíbrio pode resultar em várias alterações prejudiciais para as células. Em condições fisiológicas, a presença de uma pequena quantidade de ROS é essencial, pois estas espécies regulam várias funções celulares, como a proliferação, diferenciação, modificações epigenéticas e quiescência, além de atuarem como mensageiros na sinalização redox [45], [46]. Embora essa pequena quantidade de ROS seja essencial, ela não é suficiente para causar qualquer tipo de lesões nos tecidos [47]. De facto, um ligeiro aumento destas espécies, facilmente, pode ser controlado por alguns mecanismos, como por exemplo pela ativação da defesa antioxidante. No entanto, um aumento exacerbado de ROS ou a diminuição da capacidade de produção de agentes antioxidantes leva ao desequilíbrio nas reações de oxidação-redução e o organismo passa a estar sob condições de stresse oxidativo (SO) [48]. O SO, é assim, caracterizado por um desequilíbrio entre a produção e eliminação de ROS/RNS através da ação das defesas antioxidantes, como representado pela Figura 5 [49].

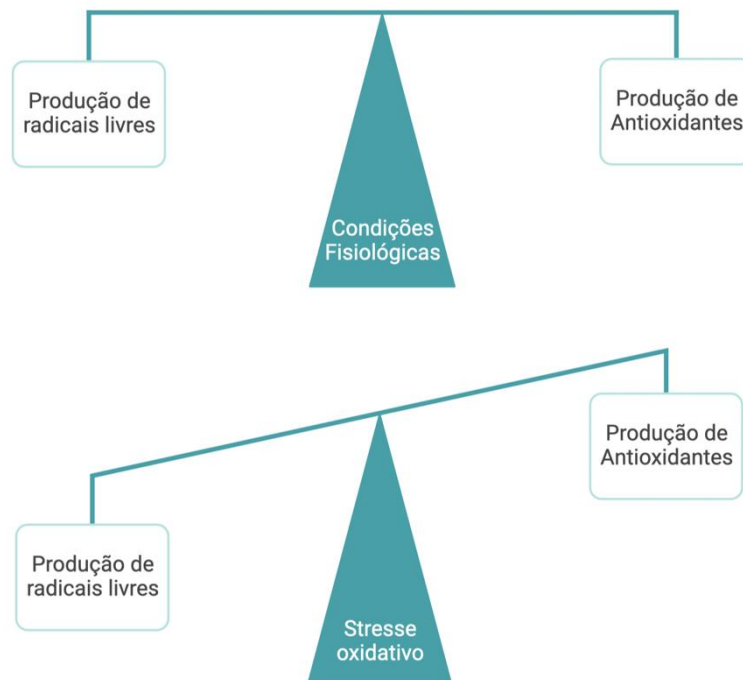


Figura 5: Stresse Oxidativo. Em condições fisiológicas existe um equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigénio/nitrogénio e as defesas antioxidantes, no entanto em condições

de stresse oxidativo esse equilíbrio é perturbado, resultando numa produção excessiva de antioxidantes em relação à produção de ROS/RNS.

1.3.1. Espécies reativas de oxigénio/ nitrogénio

As ROS/RNS são espécies químicas com um curto tempo de vida e com elevada reatividade. As ROS têm na sua estrutura eletrões desemparelhados, formados pela redução do oxigénio molecular (O_2) [50]. Estas espécies podem apresentar-se como radicais livres, como o radical hidroxilo ($\cdot OH$), o anião superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e o radical de oxigénio ($O_2^{\cdot \cdot}$) ou como moléculas não radicalares, que são moléculas mais estáveis, que resultam da conversão dos radicais livres, como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o ácido hipocloroso ($HClO$), o ozono (O_3), o ácido hipobromoso ($HOBr$) ou o oxigénio singleto (1O_2) [43], [50]. O O_2 através da captação de eletrões, presentes na cadeia transportadora de eletrões forma o $O_2^{\cdot -}$ (quando não existe redução completa de O_2 a água), a fonte primária das ROS [51], [52]. A principal enzima envolvida neste processo são as oxidases dependentes do NADPH, no entanto podem ser encontradas outras, como a xantina oxidase ou a lipoxigenase. As RNS são formadas, principalmente, pelo radical óxido nítrico (NO^{\cdot}), anião peróxinitrito ($ONOO^-$), radical de dióxido de nitrogénio e por outros óxidos de nitrogénio e produtos que resultam da reação com o $O_2^{\cdot -}$ e ROO^{\cdot} . A fonte primária das RNS é o NO^{\cdot} , que é produzido pelo metabolismo do aminoácido L-arginina, sendo as sintetases do óxido nítrico as principais enzimas envolvidas neste processo. O NO^{\cdot} pode formar, especialmente, o $ONOO^-$ através da sua reação com o $O_2^{\cdot -}$ [53].

Existem várias fontes endógenas e exógenas responsáveis pela produção das ROS. As principais fontes endógenas podem derivar: 1) do aumento do metabolismo da glicose; 2) das reações de oxi-redução que envolvem enzimas que promovem a redução de radicais livres, como a superóxido dismutase (SOD) e a glutathiona peroxidase (GPx); 3) da diminuição das defesas antioxidantes não enzimáticas como a glutathiona reduzida (GSH); 4) da atividade oncogénica; 5) do aumento de produção de fatores de crescimento e citocinas ou 6) do aumento de produção de oxidantes intracelulares [50]. Esses oxidantes são formados, principalmente, em reações que ocorrem nas mitocôndrias, e são catalisadas pelas NADPH oxidases (NOX), ciclooxigenases (COX), lipoxigenases, xantina oxidases, enzimas do citocromo P450 e pela reação de Fenton e de Haber-Weiss, que envolvem espécies de ferro [50], [54], [55]. Alguns agentes

externos podem também induzir a produção destas espécies, como a radiação ionizante e xenobióticos [49]. As principais fontes que dão origem às espécies reativas de oxigênio são a cadeia respiratória mitocondrial e o complexo enzimático NOX [50], [56], [57]. De uma forma geral, as enzimas NOX promovem a produção de ROS após a sua intervenção a uma resposta inflamatória. Estas enzimas são responsáveis pela produção do $O_2^{\bullet-}$, pela transferência de elétrons através de membranas biológicas. Esses elétrons são captados pelo oxigênio molecular produzindo o anião superóxido. O superóxido pode ser convertido a H_2O_2 , uma molécula mais estável, pela enzima SOD [58].

Alguns compostos atuam como antioxidantes (enzimáticos ou não-enzimáticos) de forma a manter a ação das ROS equilibrada [59]. Os antioxidantes enzimáticos têm como função remover e quebrar os radicais livres, sendo constituídos pela SOD, catalase (CAT), GPx, glutathione peroxidase (GRd) e tioredoxina (TXN) [59], [60]. Estes antioxidantes exercem diferentes funções, como por exemplo, a SOD é responsável pela conversão do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , a CAT reduz o H_2O_2 em água (H_2O) e a GPx reduz o H_2O_2 em H_2O e O_2 e reduz os radicais peróxido em álcoois e oxigênio [60], [61]. Os antioxidantes não enzimáticos atuam interrompendo reações em cadeia dos radicais livres. Como exemplo destes antioxidantes, podemos encontrar as vitaminas C e E, polifenóis vegetais, carotenóides e a glutathione reduzida [59]. A vitamina C, por exemplo, atua como um dador de elétrons e consegue capturar o $O_2^{\bullet-}$, 1O_2 e $\bullet OH$ e a GSH elimina o $\bullet OH$ e o $O_2^{\bullet-}$, atua como cofator para as enzimas de GPx e regenera outros oxidantes, como as vitaminas C e E [62].

1.3.2. Stresse oxidativo em neoplasias hematológicas

Vários estudos demonstram que as ROS estão envolvidas em várias vias do desenvolvimento do cancro. Estas espécies, atuam em diversos mecanismos biológicos e, conseqüentemente, promovem a alteração de um fenótipo normal em maligno [63]. Dentro desses mecanismos, é de realçar as lesões em biomoléculas chave, como o DNA, os lípidos e as proteínas, como por exemplo a membrana lipídica ou enzimas, que podem levar à alteração de vias de sinalização envolvidas na proliferação, metastização e morte celular e à interferência com a resposta inflamatória ou imunológica.

As células estaminais hematopoiéticas, encontram-se, principalmente, na medula óssea, local onde o nível de ROS é bastante baixo [64], [65]. Por esse motivo, estas

células são bastante sensíveis às alterações dos níveis destes radicais. Os níveis baixos de ROS permitem que as CEHs mantenham a quiescência, enquanto os níveis moderados podem exercer funções que não danificam as células, atuando como segundos mensageiros e regulando a proliferação, diferenciação e mobilidade das CEHs. No entanto, os elevados níveis de ROS resultam na perda de quiescência das CEHs, que, conseqüentemente, podem impedir que essas células se consigam autorrenovar, induzir a senescência celular ou a morte celular [65], [66]. Estas alterações, provocadas pelas ROS, conduzem a alterações metabólicas e perda de função destas células, podendo dar origem a células leucémicas.

1.4. Sistema NRF2-KEAP1

Como já foi referido, o stresse oxidativo desempenha um papel fundamental em várias patologias, nomeadamente, no cancro. De forma a manter o equilíbrio entre as ROS e as defesas antioxidantes, as células ativam processos biológicos fundamentais para a sua proteção. O sistema NRF2-KEAP1 é a principal via de sinalização que promove uma resposta citoprotetora contra as espécies reativas de oxigénio [67]. O fator nuclear eritroide 2 (NRF2) é o principal fator de transcrição responsável por controlar as vias antioxidantes e citoprotetoras e dessa forma manter a homeostasia redox celular. Além de regular o stresse oxidativo, o NRF2, exerce outras funções, que serão descritas no capítulo 1.4.4. [68]. Por outro lado, a proteína KEAP1 (*kelch-like ECH-associated protein 1*) atua como um regulador negativo do NRF2, pois permite a sua degradação através do proteasoma [69].

1.4.1. NRF2: Estrutura

O NRF2 é um fator de transcrição que se integra na subfamília *cap "n" colar* (CNC) da família bZIP (*basic leucine zipper*) [70]. Existem, também, outros fatores de transcrição que pertencem a essa família, como o NRF1, NRF3 e o NF-E2 p45. A forma dominante do NRF2 possui 605 aminoácidos e tem uma massa molecular de 67,7 kDa, mas são conhecidas no total 12 isoformas desta proteína [71], [72]. Estruturalmente, este fator de transcrição é composto por sete domínios funcionais NRF2-ECH, com diferentes

funções, designados por Neh1-7. Os domínios Neh1, Neh3, Neh4 e Neh5 são responsáveis pela ativação da transcrição génica, através da sua ligação a co-ativadores, enquanto os restantes domínios, Neh2, Neh6 e Neh7, controlam a estabilidade desta proteína [73]. O domínio Neh1 possui uma região CNC-bZIP que permite a heterodimerização (que irá fazer a ligação a elementos de resposta antioxidante, ARE) e, posteriormente, ao DNA. É nas regiões ETGE e DLG do domínio Neh2, localizado no terminal amínico que se dá a interação com a proteína KEAP1. No terminal carboxílico encontra-se o domínio Neh3, que promove a transcrição de genes com o auxílio dos domínios Neh4 e Neh5. Estes últimos domínios ligam-se à proteína de ligação CREB, enquanto o Neh3 se liga à proteína CHDH6 (*chromodomain helicase DNA bBinding protein 6*) [74]. O Neh6 é uma região rica em resíduos de serina e tem a função de promover a degradação do NRF2, de forma independente do KEAP1. Neste domínio, estão localizados os motivos peptídicos DSGIS e DSAPGS que, quando são fosforilados pela glicogénio sintase cinase-3 β (GSK-3 β) induzem a degradação proteossomal da proteína NRF2 através da ubiquitinação dependente da culina 1 (Cul1). O recrutamento da Cul1 é feito após a interação do Neh6 com a β -TrCP (*β transducin repeat-containing protein*). Recentemente, foi descrito o domínio Neh7, que está envolvido na inibição da atividade transcrricional do NRF2, através da sua ligação ao recetor RXR α (*Retinoid X receptor alpha*). Na Figura 6, encontra-se representada a estrutura do fator de transcrição NRF2 [75].

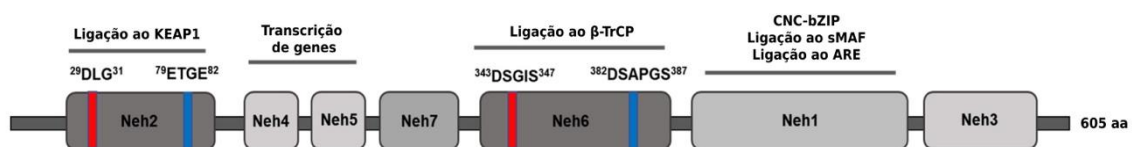


Figura 6: Estrutura dos domínios do fator de transcrição NRF2. O NRF2 é composto por 7 domínios, designados por Neh1-Neh7. O domínio Neh2 encontra-se no terminal amínico e contém as regiões DLG e ETGE que permitem a ligação à proteína KEAP1. Os domínios Neh3, Neh4 e Neh5 são responsáveis pela transcrição de genes alvo do NRF2. O domínio Neh1 é responsável pela heterodimerização com as sMAF e o domínio Neh6 medeia a degradação do NRF2. (Adaptado de Song *et al.*, 2021, [75])

1.4.2. KEAP1: Estrutura

A proteína KEAP1 foi identificada como um regulador negativo do fator de transcrição NRF2. Esta proteína encontra-se expressa em diversos tipos de células e tecidos e localiza-se, principalmente, no citoplasma, sendo que pode ser encontrada, também, em menores quantidades no núcleo, retículo endoplasmático e corpos de inclusão [76]. A KEAP1 é um dos 50 elementos da família de proteínas BTB-kelch, que são designadas por *Kelch-like*, sendo que todas as proteínas desta família têm em comum a presença do domínio BTB (*broad complex/tramtrack, bric-a-brac domain*) e Kelch na sua estrutura [77]. Na estrutura da proteína KEAP1 podem ser encontradas cinco regiões distintas: o terminal amínico, o domínio BTB, uma região interveniente (IVR), o domínio Kelch e o terminal carboxílico [78]. No entanto, alguns autores defendem que, estruturalmente, a proteína KEAP1 apenas possui três regiões (os domínios BTB, IVR e Kelch). O domínio BTB é responsável pela homodimerização da proteína e permite a interação com a culina 3 (Cul3). Essa homodimerização irá permitir a interação com o NRF2, pela ligação do domínio Kelch, presente na KEAP1, com os motivos DLG e ETGE, presentes no domínio Neh2 do NRF2. O domínio IVR é constituído por resíduos de cisteína que conseguem detetar espécies reativas de oxigénio, de nitrogénio e de hidrogénio. A deteção destas espécies é muito importante, pois é através delas que a atividade da proteína KEAP1 é regulada. A estrutura dos domínios presentes na proteína KEAP1 encontra-se representada na Figura 7.

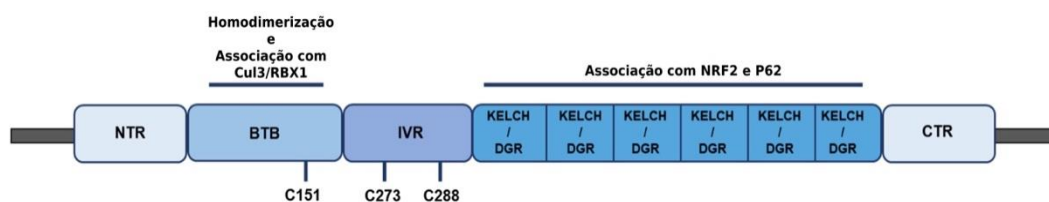


Figura 7: Estrutura dos domínios da proteína KEAP1. Esta proteína é constituída por cinco regiões, o terminal amínico, o domínio BTB (permite a homodimerização e a interação com a Cul3), uma região interveniente (IVR, responsável pela deteção de ROS), o domínio Kelch (permite a ligação ao NRF2) e o terminal carboxílico. (Adaptado de Song *et al.*, 2021, [75])

1.4.3. Regulação do NRF2

Apesar do KEAP1 ter sido identificado como o principal repressor do NRF2, existem várias vias que estão envolvidas na regulação desta proteína [71]. Como reguladores

positivos do NRF2 podem ser encontrados: 1) fatores de transcrição como o NF- κ B ou o Ahr-ARNT; 2) processo de autofagia pela p62 e 3) vias de sinalização (através da ERK, JNK ou PI3K/AKT). Além dos reguladores positivos também existem vários reguladores negativos que podem controlar o NRF2, tais como: 1) receptores nucleares (como os receptores retinóides e os receptores glicocorticóides); 2) vias não canônicas (pela GSK-3 ou HRD-1) e 3) outras proteínas, tais como a SIAH2 ou APE1/RED1.

Através do KEAP1, os níveis de NRF2 podem ser regulados de forma a manter o equilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes. Em condições basais, ou seja, na ausência de um estímulo oxidativo, a proteína NRF2, que possui um tempo de semi-vida de, aproximadamente, 20 minutos, mantém-se ligada ao KEAP1. Esta ligação dá-se pelos domínios ETGE e DLG, presentes no NRF2, ao domínio Kelch do KEAP1 [70]. A associação a esta proteína desencadeia a degradação do NRF2 pelo proteossoma 26, uma vez que o domínio BTB se liga à Cul3, que pode recrutar substratos de ubiquitinação [79]. Sob condições fisiológicas, o NRF2 encontra-se constantemente a ser sintetizado, mas rapidamente é degradado no citoplasma, devido à presença do seu regulador, o KEAP1 [80]. Em condições de stresse oxidativo ocorre um aumento de expressão de NRF2, que pode permanecer na célula num tempo de semi-vida até 200 minutos. As ROS/RNS ou eletrófilos provocam a oxidação de resíduos de cisteína (especificamente, nos grupos tiol) presentes no domínio IVR da proteína KEAP1. Essa reação leva à inativação da KEAP1 devido à alteração conformacional que provocam na molécula, o que resulta na libertação do NRF2 e, conseqüente, na sua translocação para o núcleo [70], [81]. A quantidade de proteína que transita para o núcleo é dependente da intensidade de oxidação. No núcleo, a proteína NRF2 associa-se com pequenas proteínas MAF (sMAF), fatores de transcrição do tipo bZIP compostas pelas proteínas MAF F, G e K, resultando num heterodímero [82]. O complexo NRF2/sMAF possui elevada especificidade de reconhecimento e uma grande afinidade para se ligar a elementos de resposta antioxidante (ARE, *antioxidant response element*). A ligação é feita na região promotora dos genes alvo do NRF2 e promove a estimulação da transcrição de genes citoprotetores, genes esses que podem estar envolvidos na síntese da glutatona reduzida, na eliminação de ROS, no metabolismo de xenobióticos ou no transporte de fármacos. Na Figura 8 está representada a via de sinalização do NRF2-KEAP1.

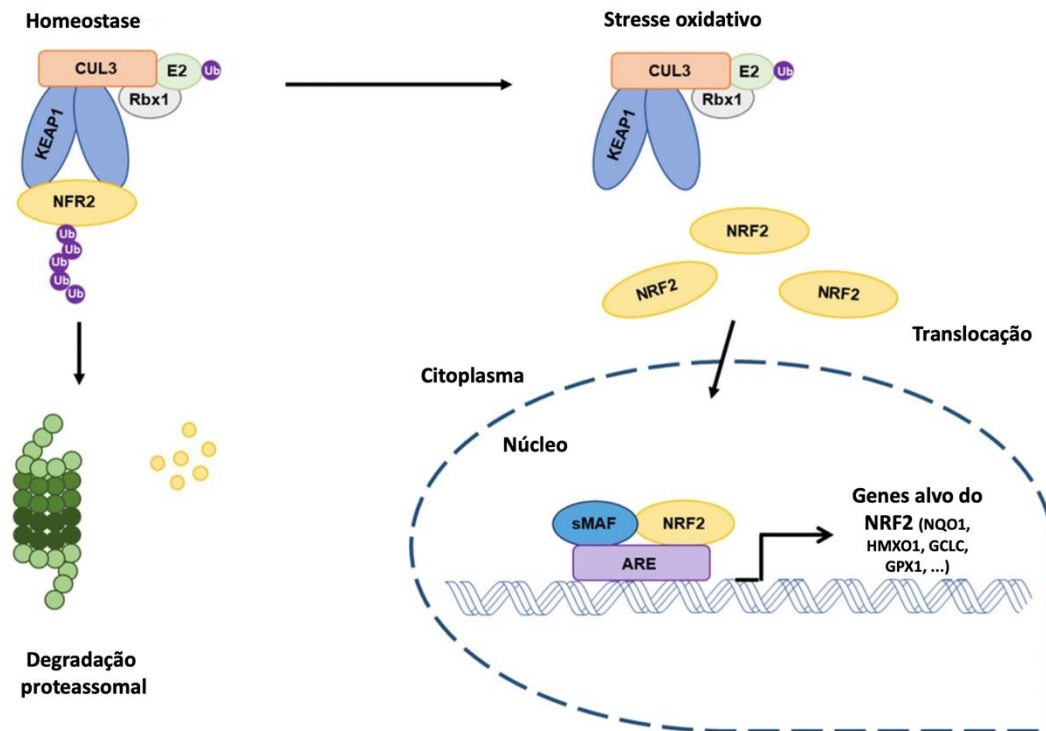


Figura 8: Via de sinalização do NRF2-KEAP1. Em condições basais, o NRF2 encontra-se ligado ao seu principal regulador, o KEAP1, no citoplasma. Esta interação resulta na degradação proteossomal do fator de transcrição NRF2. No entanto, sob condições de stresse, resíduos de cisteína presentes no KEAP1 são oxidados, levando à transformação conformacional deste elemento e, conseqüentemente, o NRF2 é libertado, translocando para o núcleo. Nesse local, NRF2 forma um dímero com as proteínas sMAF e liga-se a ARE promovendo a estimulação de genes citoprotetores. (Adaptado de Song *et al.*, 2021, [75])

Existem dois modelos, principais, que permitem entender o mecanismo de interação entre o KEAP1 e o NRF2, como representado na Figura 9. O primeiro modelo é designado de *Hinge-Latch*, e foca-se essencialmente na ligação dos domínios ETGE e DLG ao KEAP1. O motivo ETGE possui elevada afinidade com o KEAP1, enquanto o motivo DLG, constituído por três hélices, tem baixa afinidade com esta proteína. Neste modelo é considerado que a presença de espécies oxidantes não perturbam a ligação entre o ETGE, que funciona como uma dobradiça “*Hinge*”, à proteína KEAP1, no entanto, esses radicais podem destabilizar a associação mediada pelo DLG, o travão “*Lach*” [83]. Em condições basais (sem o estímulo oxidativo), ambos os motivos se encontram ligados ao motivo Kelch, sendo que o motivo DLG permite a ubiquitinação e posterior degradação do NRF2 pelo bloqueio do domínio Neh2 [84]. A presença de um

estímulo oxidativo leva à oxidação dos resíduos de cisteína presentes no domínio IVR, o que resulta na separação entre DLG e a KEAP1. Essa rutura provoca a libertação do NRF2 e, conseqüentemente, favorece o aumento de expressão deste fator de transcrição.

No segundo modelo, denominado de modelo de dissociação Cul3-KEAP1, existe a dissociação entre NRF2 e KEAP1 na presença de indutores e, conseqüentemente, a ubiquitinação é inibida permitindo a acumulação de NRF2 [84]. Os indutores podem ser a terc-butil-hidroquinona (tBHQ) ou o ácido eicosapentaenóico (EPA). A cisteína 151 (Cys151) é um resíduo muito importante neste modelo porque é ela que irá funcionar como um sensor químico e promover a ativação de NRF2, pela alteração conformacional do KEAP1, se for necessário. Em situações de stresse, o resíduo Cys151 é modificado, levando à dissociação do complexo Cul-Keap1 e à ativação de NRF2.

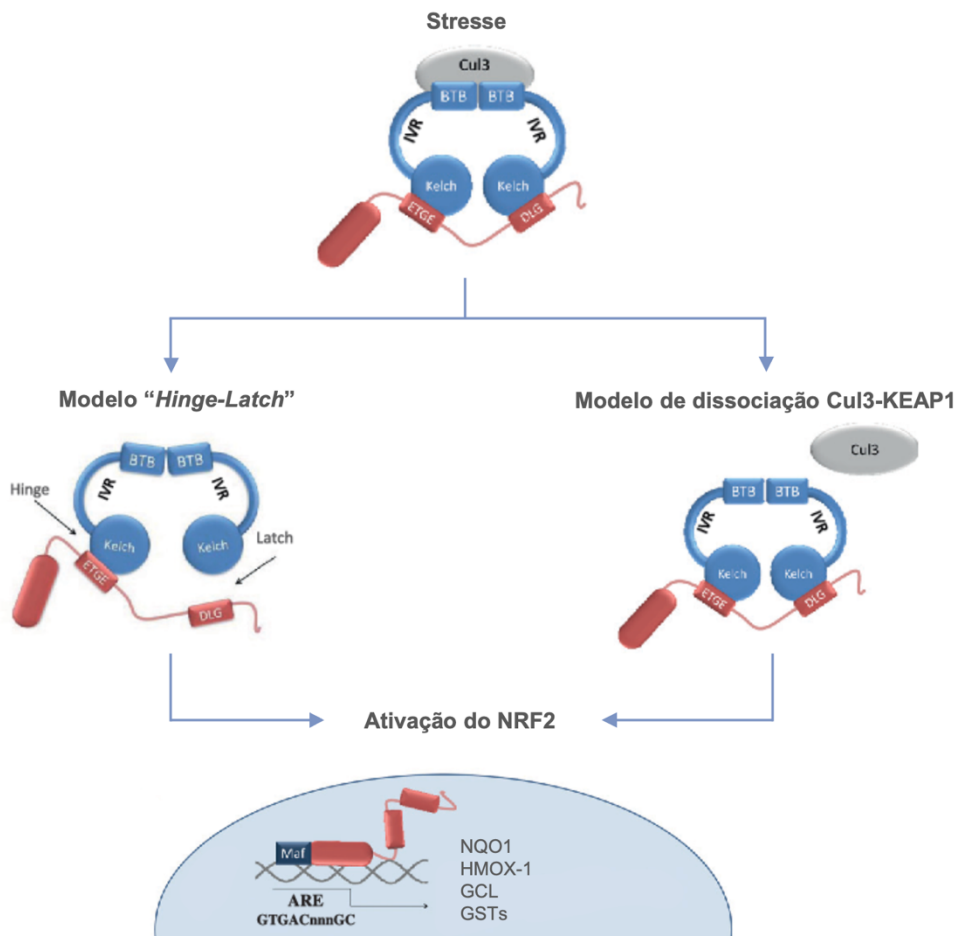


Figura 9: Modelo “Hinge-Latch” e de dissociação Cul3-KEAP1. No modelo “Hinge-Latch” a transformação conformacional do KEAP1 permite a libertação da região DLG do NRF2 ao

domínio Kelch, presente no KEAP1. Esta alteração impede a degradação do NRF2 e, conseqüentemente, resulta na libertação deste fator de transcrição. No modelo de dissociação Cul3-KEAP1 a presença de indutores interrompe a ligação entre o KEAP1 e o NRF2, permitindo a libertação do NRF2, que transloca para o núcleo. (Adaptado de Kansanen, E *et al.*, 2013, [85])

Além destes dois modelos apresentados, existem outros mecanismos reguladores da atividade da via NRF2-KEAP1, tais como o transporte núcleo-citoplasmático do KEAP1, a ubiquitinação de KEAP1 ou a ação direta do NRF2 como sensor [84].

1.4.4. Funções do NRF2

O NRF2 permite a transcrição de mais de 100 genes importantes para o controlo celular, compreendendo no total mais de 1% do genoma humano [76]. Dos genes transcritos por esse fator de transcrição encontramos: 1) enzimas metabólicas de fase I, fase II e fase III, como a NADPH quinona oxidoreductase 1 (*NQO1*), glutathione S-transferase (*GST*) e as proteínas da família ABC (*ATP-binding cassette transporters*); 2) enzimas antioxidantes com base na glutathione, como a GSH, a glutathione cisteína ligase (*GCL*) e a glutaredoxina (*GLRX*); 3) enzimas antioxidantes da tiorredoxina, como a tiorredoxina (*TXN1*) ou a tiorredoxina reductase 1 (*TXNRD1*); 4) enzimas do sistema regenerador de NADPH e do metabolismo de hidratos de carbono, como a glucose-6-fosfato-1-desidrogenase (*G6PD*); 5) enzimas do metabolismo lipídico, como a carboxilesterase 1G e 1H (*CES1G/H*); 6) enzimas envolvidas no metabolismo do ferro e heme, como a heme oxigenase 1 (*HMOX1*); 7) fatores de transcrição e proteínas associadas, como o recetor de aril hidrocarboneto (*AHR*) e 8) subunidade do complexo ubiquitina ligase, como a enzima KEAP1 [86].

O NRF2 tem um papel fundamental em regular a expressão de elementos chave dos sistemas antioxidantes glutathione (GSH) e TXN [87], [88], [70]. A glutathione reduzida é a molécula antioxidante mais abundante nas células, e a sua síntese está dependente das enzimas, glutathione-cisteína ligase, composta por uma subunidade catalítica (GCLC) e modificadora (GCLM), e da glutathione sintetase (GSS) [89], [90]. O NRF2 regula a expressão da tiorredoxina reductase (TRXR), a proteína de interação com tiorredoxina (TXNIP) e a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH, como dador de eletrões), principais constituintes do sistema antioxidante TRX [91]. Através

destas enzimas, a TRX atua na regulação redox pela redução de tióis de proteínas oxidadas [92]. O sistema TRX também desempenha funções na síntese do DNA, na inibição da apoptose e na defesa de lesões oxidativas [89], [93].

1.4.5. Via NRF2-KEAP1 e o cancro

A via NRF2-KEAP1 parece desempenhar um duplo papel no cancro. Por um lado, previne o desenvolvimento do tumor e por outro, após o estabelecimento da neoplasia, consegue proteger as células tumorais de agentes terapêuticos e conduzir à resistência ao tratamento (Figura 10) [94], [85]. Numa fase inicial da doença, as enzimas antioxidantes, promovidas pelo NRF2, podem ser benéficas para a prevenção do desenvolvimento do tumor. No entanto, em estádios mais avançados, essas defesas antioxidantes facilitam a proliferação e sobrevivência das células tumorais e, conseqüentemente, aumentam a resistência ao tratamento. Vários estudos demonstram que a via NRF2-KEAP1 se encontra comprometida no cancro, provocando uma resposta inadequada ao stresse oxidativo. Já foram relatados alguns mecanismos que se encontram envolvidos na ativação inadequada do NRF2 no cancro, como mutações somáticas, processamento do RNA e proteínas disruptivas, que são descritas de seguida [74], [95].

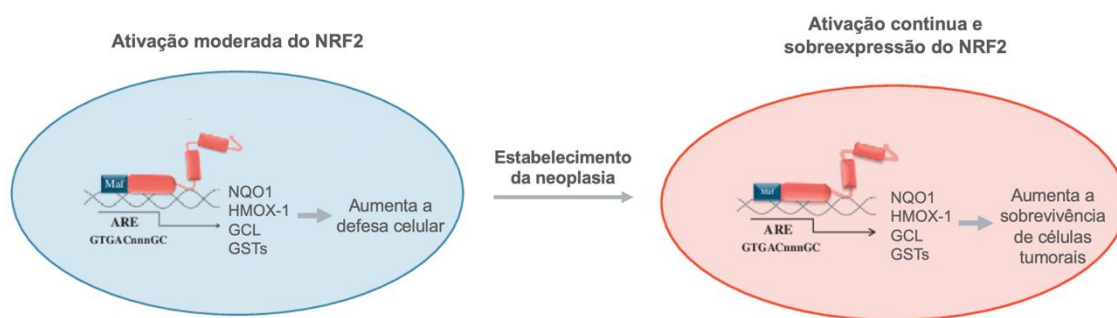


Figura 10: Duplo papel da via de sinalização NRF2-KEAP1 no cancro. A via NRF2-KEAP1 desempenha um duplo papel no cancro – por um lado previne o desenvolvimento tumoral e por outro, após o estabelecimento da neoplasia, pode proteger as células tumorais dos agentes terapêuticos conduzindo à resistência ao tratamento. (Adaptado de Kansanen et al., 2013, [85])

Uma das alterações mais conhecida para a ativação do NRF2 no cancro são as mutações somáticas nas proteínas KEAP1 e NRF2 [73]. As mutações encontradas no KEAP1 são do tipo *missense* (quando a alteração de uma base no DNA leva à codificação de um aminoácido diferente na sequência) ou *nonsense* (quando a alteração de uma base no DNA provoca a codificação de um codão de terminação ou codão stop). Por outro lado, as mutações identificadas no NRF2 ocorrem nas regiões que contêm os motivos ETGE e DLG. Por exemplo, foram encontradas mutações de perda de função no KEAP1 e mutações de ganho de função no NRF2, em 19 e 3%, respetivamente, dos doentes com adenocarcinoma no pulmão [74]. No cancro do pulmão, cabeça e pescoço foi relatado a perda do exão 2 no NRF2, que resultava na síntese deste fator sem o domínio de interação com o seu regulador negativo KEAP1. Apesar de não se conhecer ao certo os mecanismos de ação, sabe-se que as proteínas KRAS^{G12D}, BRAF^{V619E} e MYC^{ERT2} regulam positivamente a expressão do gene *NFE2L2* (gene que codifica o NRF2). Outra via que pode resultar na ativação do NRF2 são as modificações epigenéticas em regiões promotoras do KEAP1 e NRF2. Em vários cancros foi demonstrado que a região promotora do gene *KEAP1* se encontrava hipermetilada, resultando numa menor expressão da proteína, e, conseqüentemente, no aumento de ativação do NRF2. Pelo contrário, verificou-se que a região promotora do gene *NFE2L2* está frequentemente desmetilada, levando à sobreexpressão da proteína codificada por este gene.

Além disso, a desregulação de miRNAs pode também estar envolvida na ativação do NRF2 no cancro, uma vez que estas moléculas regulam a expressão genética, através da ligação específica de sequências com o mRNA [70]. No cancro da mama e do ovário, por exemplo, descobriu-se que o miR-141 está sobreexpresso e, conseqüentemente, induz quimiorresistência ao 5-fluorouracilo através da repressão da tradução da proteína KEAP1. Por fim, algumas proteínas disruptivas podem aumentar a expressão do NRF2 no cancro [74]. Uma dessas proteínas é a P62, que compete com o NRF2 na ligação ao KEAP1, uma vez que na sua estrutura a P62 contém um motivo designado de STGE, que é semelhante ao motivo ETGE. Assim, se a P62 ganhar a “batalha”, o KEAP1 fica impedido de sinalizar a degradação do fator de transcrição NRF2.

1.5. Tratamento da LLC

A investigação científica tem promovido avanços substanciais no tratamento da LLC, mas, apesar deste esforço ainda existem grupos de risco que são um grande desafio, como os doentes que apresentam deleções 17p [42]. Como ainda não foi descoberta uma terapia curativa, procura-se encontrar novas formas terapêuticas que diminuam os sintomas agressivos e aumentem a sobrevivência de cada doente [39]. De uma forma geral, as formas de tratamento podem ser divididas em dois conjuntos, nos doentes que nunca receberam nenhum tratamento e naqueles que já receberam o tratamento, mas tiveram uma recaída [40]. Além disso as estratégias terapêuticas dependem da presença e/ou ausência da mutação *IGVH* e/ou da deleção 17p, e ainda da situação clínica do doente (que deve ter em consideração os sintomas, o estadiamento e a sua condição física). Dependendo dos fatores mencionados, os doentes LLC podem ser tratados com imunoquimioterapia (rituximab/obinutuzumab, fludarabina, ciclofosfamida, bendamustina) em vários esquemas terapêuticos, ou com inibidores da cinase de Bruton ou do BCL2, como o ibrutinib, e o venetoclax, respectivamente.

Atualmente, o tratamento principal dos doentes com LLC são os inibidores da tirosina cinase de Bruton (BTK), independentemente, se esses doentes se encontrem em recidiva ou se a doença é refratária [96]. A BTK é uma enzima essencial para a cascata de sinalização do BCR e, conseqüentemente, fundamental para o desenvolvimento e maturação das células B [97]. Esta enzima não é expressa em células T, nem nos plasmócitos, apresentando expressão apenas em células B [98]. Os agentes farmacológicos com capacidade para inibir a BTK têm-se mostrado eficazes e com uma toxicidade inferior àquela demonstrada pela quimioterapia [96]. São também uma das principais opções terapêuticas, quando a doença se manifesta de forma agressiva (como é o caso de doentes com deleção 17p, 11q, mutação no gene *TP53* ou que não apresentem mutação na *IGHV*) [96]. Atualmente, existem diferentes inibidores da BTK como o ibrutinib (primeira geração) e o acalabrutinib, tirabrutinib e zanubrutinib, (segunda geração). No entanto, o ibrutinib é o inibidor da BTK mais bem estudado e, por isso, o mais previsível [97], [96].

1.5.1. Ibrutinib

O ibrutinib é um inibidor da BTK que está aprovado para o tratamento da LLC, linfoma do manto, macroglobulinemia de Waldenström e linfoma esplênico da zona marginal [99]. Esta molécula liga-se, covalentemente e de forma irreversível, ao resíduo cisteína 481 (Cys481) presente no local ativo da BTK [20], [99], [98]. No entanto, ela também se pode ligar de forma reversível a esta enzima, mas o potencial farmacológico não será tão elevado [99]. Cerca de 85% dos doentes com LLC respondem de forma positiva a este tratamento, independentemente das características genéticas e epigenéticas presentes na neoplasia [98]. Ao inibir a BTK, o ibrutinib impede a proliferação das células linfóides, reduz a sobrevivência destas células e impede que estas se “protejam” no seu microambiente, tecido linfóide e medula óssea [100]. Este fármaco é facilmente absorvido e tem um tempo de semi-vida entre 2 a 3 horas, atingindo a concentração máxima 1 a 2 horas após a administração oral. A sua estrutura química encontra-se representada na Figura 11 [101].

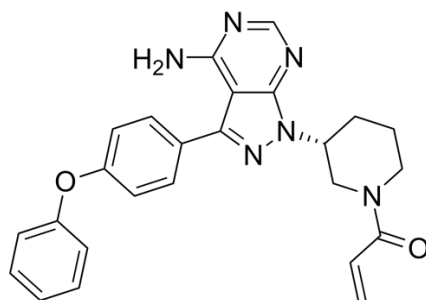


Figura 11: Estrutura química do ibrutinib. (Adaptado de Dhingra *et al.*, 2014, [101])

Apesar da eficácia demonstrada das novas terapêuticas no tratamento da LLC, como o ibrutinib e venetoclax, muitos doentes não respondem eficazmente e/ou são resistentes aos tratamentos, pelo que o estudo de novos agentes terapêuticos continua a ser um desafio.

1.6. Inibidores do NRF2

Como referido, anteriormente, o NRF2 apresenta um duplo papel no cancro, podendo desempenhar uma função de prevenção ou de proteção contra as células tumorais. Na LLC, o NRF2 parece ser um promissor alvo para novas abordagens terapêuticas, uma vez que alguns estudos revelaram que amostras sanguíneas de doentes com esta patologia apresentaram níveis elevados desta proteína [102]. Os níveis elevados de NRF2 no microambiente da LLC conduzem ao aumento da sobrevivência das células linfóides [102]. Assim, a utilização de inibidores do NRF2 pode ser essencial para reverter a atividade oncogénica. O brusatol e o ML385 são dois inibidores do NRF2 e a sua ação pode conduzir à morte de células tumorais e à redução do tumor.

1.6.1. Brusatol

O brusatol é um composto quassinóide (um grupo de triterpenos degradados), reconhecido por possuir várias atividades biológicas, nomeadamente anticancerígenas, antiparasitárias, antivirais, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antidiabéticas, entre outras [103]. Este composto é produzido através das sementes e frutos da planta *Brucea Javanica* (L.) Merr., uma planta que pertence à família da *Simaroubaceae* e que se distribui, principalmente, no sudeste Asiático e no norte da Austrália [104]. O brusatol foi isolado e produzido pela primeira vez em 1968 [104], [105]. Apesar das várias aplicações medicinais desta molécula, a atividade antitumoral é a propriedade mais importante do brusatol [106].

Estruturalmente, o brusatol é composto por um anel de ciclohexanona α , β -insaturado, dois anéis de ciclohexano, um anel de lactona de seis membros e um anel de tetra-hidrofurano, como demonstrado na Figura 12. Recentemente, um estudo identificou que a maioria do fármaco era excretado sob a forma de metabolitos. No total foram descobertos 4 metabolitos, M438 (produto da hidrólise), M536 (resultado da hidroxilação), M618 (produto da glucuronidação) e o M424 (produto da desmetilação ou hidrólise de M438) [107].

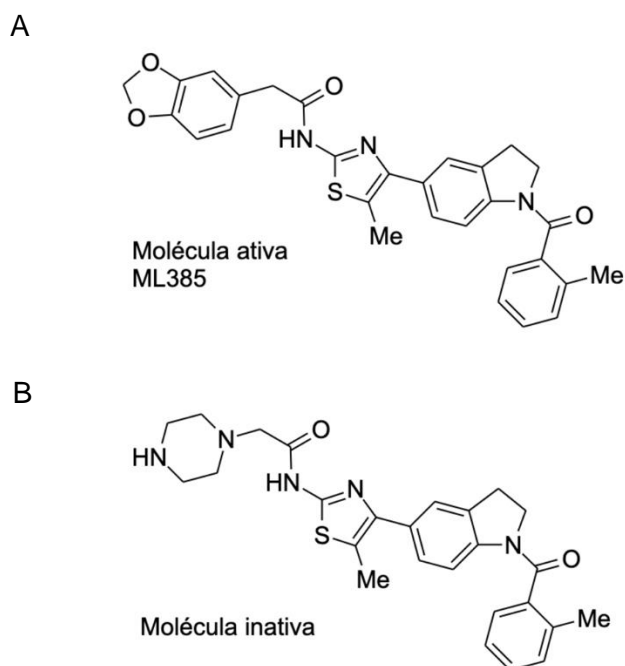


Figura 13: Estrutura química do ML385 na sua forma ativa (ML385) (A) e inativa (B). (Adaptado de Singh A. et al, 2016, [109])

O ML385 liga-se ao domínio Neh1, no terminal carboxílico do NRF2, interferindo com a ligação entre o complexo NRF2-MAF e os elementos de resposta antioxidante. Essa perturbação impede a ativação da transcrição de genes citoprotetores. No estudo acima referido, também se demonstrou que o ML385 era seletivo e específico para células do cancro do pulmão de células não pequenas (NSCLC) que possuíam mutações com perda de função da proteína KEAP1 ou de ganho de função da proteína NRF2 [109].

1.7. Objetivo

A LLC sendo o tipo de leucemia mais comum nos países ocidentais, é ainda uma patologia que afeta uma grande parte da população humana, representando, este ano, 25% de todos os novos casos de leucemia [110]. Esta doença, que resulta de alterações

genéticas e epigenéticas que interferem com a regulação da proliferação e apoptose em células B monoclonais, ainda precisa que sejam encontrados tratamentos mais eficientes.

Sendo a LLC uma patologia na qual o stresse oxidativo desempenha um papel relevante, o NRF2, um fator de transcrição que regula a homeostasia redox, surge como um potencial alvo terapêutico. De forma a tentar encontrar um tratamento mais eficiente para esta patologia, o potencial terapêutico e os mecanismos moleculares subjacentes ao efeito biológico de dois inibidores do NRF2, o brusatol e o ML385, foram estudados em monoterapia e em combinação com o ibrutinib (um inibidor da tirosina cinase de Bruton, um fármaco já aprovado para o tratamento da LLC).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Caracterização da linha celular e condições de cultura

Para este estudo foi utilizada a linha celular HG-3, um modelo *in vitro* de leucemia linfocítica crônica. Esta linha celular foi estabelecida em 1998, pela imortalização de linfócitos B de um homem de 70 com LLC ao diagnóstico, em estágio II de Rai. As células HG-3 possuem no seu fenótipo a ausência da mutação no gene que codifica a região variável da cadeia pesada da imunoglobulina e deleções bialélicas no cromossoma 13q14. Esta deleção pode resultar na perda genômica de *DLEU7* e miR15A/miR16-1, alterações que, por vezes, estão associadas a um prognóstico agressivo para a LLC [111]. Sendo o *DLEU7* e miR15/16 supressores tumorais, a sua inativação pela deleção 13q14, resultam na ativação da sinalização por TNF e aumento da expressão do BCL2, respetivamente, dois mecanismos oncogénicos. Além destas alterações, a linha celular HG-3 possui também características de linfócitos B, uma vez que estas células expressam os marcadores CD5, CD20, CD27 e CD43 e promovem a libertação de anticorpos naturais IgM [112]. Esta linha celular foi imortalizada pelo vírus Epstein–Barr (EBV), no entanto esse fenómeno não está relacionado com a etiologia da LLC. As células HG-3 apresentam, morfológicamente, uma estrutura redonda e formam ligeiros aglomerados em suspensão.

As células em estudo foram obtidas no *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* (DSMZ) e mantidas, durante todo o projeto, em meio *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI-1640, Gibco, Invitrogen) a pH=7,4, suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) (Gibco, Invitrogen), 2 mM de L-Glutamina, 10 mM HEPES-Na, 4500 mg/L de glicose, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e 1% de antibiótico/antimicótico (ZellShield; Minerva biolabs). As células HG-3 foram mantidas a uma temperatura de 37°C, numa atmosfera humedecida com 5% de CO₂ e incubadas a uma densidade ótima de 0,5x10⁶ células/mL.

2.2. Avaliação da expressão dos genes *NFE2L2* e *KEAP1*

O primeiro passo neste estudo foi determinar o nível de expressão dos genes *NFE2L2* e *KEAP1*, na linha celular HG-3. O *NFE2L2* é o gene que codifica o fator de transcrição NRF2, o alvo terapêutico dos fármacos em estudo, enquanto o gene *KEAP1* codifica a proteína KEAP1, responsável pela regulação do NRF2 [113]. A análise da expressão destes dois genes foi realizada recorrendo à técnica de PCR em tempo real (qPCR). Foram utilizadas as células HG-3 na ausência de estímulo, iniciando-se a análise pela

extração e isolamento do ácido ribonucleico (RNA) e depois procedeu-se à sua conversão em ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA).

2.2.1. Extração de RNA

Realizou-se a extração do RNA, utilizado o kit TripleXtractor directRNA (GRiSP), de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante. Neste kit é utilizado o composto TripleXtractor que contém na sua composição fenol com tiocianato de guanidina, que em contacto com as células permite a sua lise preservando a integridade do RNA. Primeiramente, procedeu-se à recolha de 3×10^6 de células. De seguida, as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salino (PBS), o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL do composto TripleXtractor. Seguidamente, adicionou-se 200 μ L de clorofórmio, que permite solubilizar e remover os lípidos encontrados nas amostras. As amostras foram incubadas durante 3 minutos à temperatura ambiente e, após esse período, foram centrifugadas a 12 000g, durante 15 minutos, a 4°C. Nesta etapa podem ser observadas três fases distintas: uma orgânica (onde se encontram o clorofórmio e fenol), uma interfase (que corresponde ao DNA) e uma fase aquosa, na superfície, onde fica retido o RNA. Essa fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionou-se 1 mL de isopropanol, que promoveu a precipitação do RNA. As amostras foram agitadas, incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, sujeitas a centrifugação a 12 000g, durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi, novamente, descartado e foram realizadas duas lavagens com etanol a 70%. Removeu-se o excesso de etanol e o sedimento ficou a secar durante alguns minutos, de forma a garantir que todo o etanol evaporava. Finalmente, adicionou-se 30 μ L de água ultrapura (tipo 1) e foi realizada uma incubação de 10 minutos, a uma temperatura entre 55 e 60°C. Através deste procedimento obteve-se o RNA isolado, que foi armazenado a -80°C até uso posterior.

2.2.2. Quantificação do RNA

A quantidade e pureza de RNA foram avaliadas, após a sua extração, no espectrofotómetro *NanoDrop One* (ThermoFisher Scientific). Este procedimento é essencial, pois permite determinar se o RNA extraído se encontra nas condições ideais para ser utilizado, livre de contaminantes. O aparelho consegue medir a absorção da amostra de RNA, em diferentes comprimentos de onda. Foi feita uma leitura no $\lambda 260$,

que determina a quantidade de amostra, uma vez que é nesse λ que os ácidos nucleicos absorvem luz. Uma vez que as proteínas absorvem luz no comprimento de onda 280nm, a razão A260/A280 foi utilizada para avaliar o nível de pureza da amostra, sendo que os valores dessa razão devem estar compreendidos entre 1,9 e 2,1.

2.2.3. Síntese de cDNA

A conversão de RNA em cDNA foi realizada, com recurso ao kit Xpert cDNA Synthesis Supermix (GRiSP) de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante. Este kit permite uma rápida e eficiente síntese de cDNA. Neste processo foi utilizada uma concentração equivalente a 2 μ g de RNA total, 4 μ L de mastermix e o volume necessário de água ultrapura (tipo 1) de forma a perfazer 20 μ L. Após a mistura destes componentes, as amostras foram colocadas no termociclador (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad), onde foram incubadas durante 15 minutos a 37°C, seguindo-se um ciclo de 10 minutos a 60°C. O cDNA foi conservado a -20°C e utilizado posteriormente.

2.2.4. PCR em tempo real (qPCR)

A PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR) é uma técnica que permite amplificar e quantificar amostras que contenham ácidos nucleicos, como o DNA ou cDNA. Esta amplificação é detetada e medida ao mesmo tempo que a reação ocorre, ou seja, em tempo real, distinguindo-se assim do PCR convencional. Para a quantificação da reação é necessária uma molécula fluorescente, que se ligue ao material de interesse, que pode ser um corante de ligação ao DNA ou uma sonda específica. Além deste componente, são precisos *primers*, dNTP's e DNA polimerase. Para realizar uma análise de qPCR é utilizado um termociclador específico e, de uma forma geral, os componentes são sujeitos a vários ciclos, onde passam por várias etapas. Inicialmente, existe uma fase de desnaturação, que permite separar as cadeias de DNA ou cDNA através do aumento de temperatura, segue-se a etapa de emparelhamento na qual ocorre a ligação entre os *primers* e a amostra e por fim na fase de extensão as sequências são replicadas [114].

Para avaliar a expressão dos genes *NFE2L2* e *KEAP1*, nas células HG-3, foi utilizado o NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x) (NZYtech) que contem um corante fluorescente verde (um corante que intercala, de forma não específica, com o DNA de

cadeia dupla). A fluorescência emitida por este composto é proporcional à quantidade de amostra, ou seja, quanto maior a quantidade de DNA amplificado, maior será a fluorescência [114]. Além dos genes *NFE2L2* e *KEAP1*, foi também analisado o gene *HPRT*. O *HPRT* funciona como controlo endógeno e é o normalizador da expressão génica. Os controlos endógenos devem ter uma expressão estável em diferentes condições experimentais, uma vez que a expressão deste gene servirá de normalizador em todas as amostras. Para esta análise, além da mistura de reação 2x, foram utilizados *primers* (*reverse* e *forward*) específicos para cada gene de interesse, água ultrapura (tipo 1) e a amostra de cDNA. Os *primers* utilizados para cada gene encontram-se identificados na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência de *primers* utilizados na reação de qPCR para avaliar a expressão dos genes *NFE2L2* e *KEAP1*

Gene	Forward	Reverse
<i>NFE2L2</i>	5'-CCCTGGCGTCGTGATTAGTG-3'	5'-CCAGGACTTACAGGCAATTCTT-3'
<i>KEAP1</i>	5'-CAACCCTTGTCACCATCTCAG-3'	5'-CCAGGACTTACAGGCAATTCTT-3'
<i>HPRT</i>	5'-CATTATGCTGAGGATTTGAAAGG-3'	5'-CTTGAGCACACAGAGGGCTACA-3'

Após inserir todos os componentes numa placa de qPCR de 96 poços, em duplicado, esta foi centrifugada por 2 min em rotação máxima e depois colocada no aparelho QuantStudio™ 3 System (ThermoFisher Scientific), onde decorreu a amplificação das amostras. Esta amplificação passa por vários ciclos, que são descritos de seguida:

1. Desnaturação inicial do DNA e ativação enzimática, 3 minutos a 95°C;
2. Emparelhamento, 40 ciclos durante 5 segundos a 95°C, e 20 segundos a 60°C;
3. Extensão, a 95°C.

Depois da amplificação estar completa, a expressão génica relativa foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta Ct}$, sendo os genes *NFE2L2* e *KEAP1* normalizados ao controlo endógeno *HPRT*. Os resultados das células HG-3 representam a média \pm SEM de 3 ensaios independentes.

2.3. Avaliação da proliferação e viabilidade celular

Para avaliar a proliferação e a viabilidade celular das células HG-3, foi utilizado o teste de exclusão com azul de tripano. O azul tripano é um corante que permite quantificar células vivas, através da sua internalização nas células mortas. De uma forma geral, este composto não consegue penetrar as membranas de células viáveis, uma vez que a membrana se encontra íntegra. No entanto, a membrana de células mortas encontra-se comprometida, permitindo a internalização do azul tripano para o citoplasma, corando essas células de azul. Essa coloração pode ser observada num microscópio ótico [115].

Para este ensaio, as células foram plaqueadas a diferentes concentrações, compreendidas entre 0,1 e 1×10^6 células/mL, durante 96h. A cada 24h, foi retirada uma alíquota de suspensão celular das diferentes concentrações e as células foram contadas. Para realizar a contagem celular, de modo a determinar a percentagem de células viáveis e a sua densidade, foi utilizada uma diluição de 1:1 (suspensão celular e azul tripano) e o auxílio de um hemocítmetro. A densidade celular foi determinada pela equação 1, e a viabilidade celular pela equação 2. Os resultados das células HG-3 representam a média \pm SEM de 5 ensaios independentes.

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

$$Viabilidade\ celular = \frac{\Sigma\ células\ viáveis}{\Sigma\ células\ totais} \times 100\% \text{ (Equação 2)}$$

2.4. Avaliação do potencial terapêutico dos fármacos brusatol e ML385, em monoterapia e em associação com o ibrutinib

Com a finalidade de avaliar o potencial terapêutico dos fármacos brusatol e ML385, quer em monoterapia, quer em combinação com o agente terapêutico ibrutinib, foram executados vários ensaios:

1. Avaliação da atividade metabólica através do ensaio da resazurina;
2. Avaliação do tipo de morte celular, por morfologia e por citometria de fluxo;
3. Avaliação do ciclo celular, através de citometria de fluxo;
4. Avaliação dos níveis de espécies reativa de oxigênio e nitrogênio (ROS/RNS) e de glutatona reduzida (GSH);
5. Avaliação do potencial da membrana mitocondrial;
6. Avaliação da expressão de genes alvo do NRF2.

Através do ensaio da atividade metabólica determinaram-se as doses mais adequadas para realizar tanto os ensaios com a combinação entre o brusatol e ML385 com o ibrutinib, como para prosseguir com os ensaios denominados entre os pontos 2 e 6.

2.4.1. Avaliação da atividade metabólica

Para medir a atividade metabólica, recorreu-se ao ensaio metabólico com resazurina. A resazurina, descoberta por Weselsky, é um corante azul não fluorescente e não tóxico, que permite medir a atividade metabólica [116]. Devido à sua permeabilidade celular, a resazurina, que atua como aceitador de elétrons, é internalizada para o meio intracelular onde é reduzida, pela ação de fontes de elétrons, como as coenzimas NADP ou NADPH, a resorufina (composto rosa, com elevada fluorescência) [117]. Na Figura 14, encontram-se as estruturas da resazurina e resorufina. Como essas coenzimas são o resultado da ação das desidrogenases, pode-se considerar que a redução da resazurina ocorre pela ação das desidrogenases, maioritariamente, presentes nas mitocôndrias. Assim, células viáveis têm a capacidade de converter a resazurina em resorufina, enquanto células não viáveis não têm essa capacidade, uma vez que a sua integridade se encontra comprometida. Este ensaio permite determinar a atividade metabólica, em %, presente em cada condição, uma vez que a quantidade de resorufina formada é proporcional ao número de células viáveis.

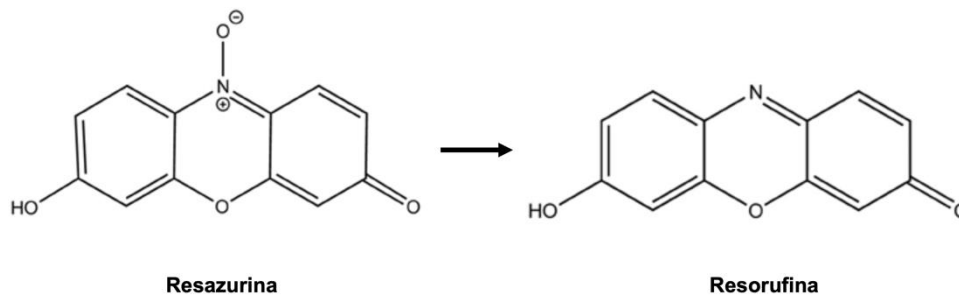


Figura 14: Estrutura química da resazurina e resorufina. A resazurina é reduzida a resorufina pela ação de desidrogenases presentes, maioritariamente, nas mitocôndrias. (Adaptado de Schmitt, D. *et al.*, 2013, [117])

Para realizar este ensaio, a linha celular HG-3 foi incubada, durante 72h, a uma densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ células/mL, na ausência e presença de doses crescentes de brusatol (5, 10, 25, 50, 100, 250 e 500 nM), ML385 (0,25; 2,5; 5; 100; 250 e 500 μM) e ibrutinib (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 25 e 50 μM). Com base nas curvas dose-resposta obtidas neste ensaio, determinaram-se as doses mais adequadas para realizar o mesmo estudo com as combinações. A escolha dessas doses teve como referência o IC_{25} , e escolheram-se as doses 0,5 μM de ibrutinib + 50 nM de brusatol e 0,5 μM de ibrutinib + 2,5 μM de ML385. A cada período de 24h as células foram incubadas com resazurina (Sigma-Aldrich) (10% do volume de suspensão plaqueada), com uma concentração de 0,1 mg/mL e procedeu-se à leitura das absorvâncias através de um espectrofotómetro de microplacas (SynergyTM HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek Instruments). Este aparelho irá medir as absorvâncias nos comprimentos de onda 570 e 600 nm, que representam a luz emitida pela resazurina e resorufina, respetivamente. Além disso, também a razão entre estes dois comprimentos de onda foi medida e através desse valor determinou-se a % de atividade metabólica, equação 3. Os resultados das células HG-3 representam a média \pm SEM de 5 ensaios independentes.

$$\textit{Atividade metabólica} = \frac{[(A_{570-600}) \textit{amostra} - (A_{570-600}) \textit{branco}]}{[(A_{570-600}) \textit{controlo} - (A_{570-600}) \textit{branco}]} \times 100\% \text{ (Equação 3)}$$

Através deste ensaio, as doses selecionadas para os restantes ensaios foram as seguintes: brusatol (50, 100 e 250 nM em monoterapia), ibrutinib (0,5 μ M em monoterapia) e a combinação entre brusatol (50 nM) e ibrutinib (0,5 μ M).

2.4.2. Avaliação do tipo de morte celular

A morte celular é um processo essencial, que resulta na eliminação da célula. Embora muitas células ativem mecanismos de morte celular programada, existem algumas que não os ativam, acabando por permanecer no organismo, como é o caso das células tumorais [118]. Desde modo, é necessário recorrer a agentes terapêuticos, de forma a eliminar as células malignas. Embora existam várias formas pelas quais as células podem morrer, são distinguidos três grandes tipos: apoptose, autofagia e necrose [119]. Neste estudo analisaram-se os processos de apoptose e necrose, dois mecanismos com características morfológicas e vias bioquímicas muito diferentes [120].

Para avaliar o tipo de morte celular foram utilizadas duas técnicas, a citometria de fluxo e a microscopia ótica. Para ambos os ensaios as células HG-3 foram plaqueadas a uma densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ células/mL e sujeitas às concentrações descritas na secção 2.4.1., durante 48h.

A morfologia celular foi analisada por microscopia ótica através de um esfregaço das células coradas com *May-Grünwald Giemsa* (Sigma-Aldrich). Para realizar esse esfregaço, foram recolhidas 1×10^6 células, após o tempo de incubação, e seguiram-se duas lavagens com PBS. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 10 μ L de FBS, e o esfregaço foi realizado numa lâmina de vidro. De seguida as células foram coradas e para esse processo começou-se por distribuir, aproximadamente, 2 mL da solução *May-Grünwald* por cada lâmina, e incubou-se as lâminas durante 3 minutos. Depois, adicionou-se o mesmo volume de água ultrapura (tipo I) sobre a solução anterior, durante 1 minuto, e após esse período, as lâminas foram escorridas e uma solução de *Giemsa* (Sigma-Aldrich) [preparado na hora, 3 mL de *Giemsa* por cada 10 mL de água ultrapura (tipo I)] foi adicionada, incubando-se durante 15 minutos. Finalmente, as lâminas foram lavadas com água corrente e, após secarem, as características morfológicas das células foram observadas através do microscópio ótico *Nikon Eclipse 80i* acoplado a uma câmara digital *Nikon Digital Camera DXm 1200F*. Foram captadas imagens através do programa *Nikon ACT-1*.

Como referido anteriormente, o tipo de morte celular foi, também, avaliado através de citometria de fluxo, uma tecnologia bastante rigorosa [121]. De forma a identificar qual o processo que resultava na morte das células, recorreu-se à dupla marcação com Anexina V (AV) e 7-amino-actinomicina D (7-AAD), marcadores característicos da apoptose e necrose, respetivamente. É através da elevada fluorescência destes dois compostos, que se torna possível detetá-los por CF.

A Anexina V foi utilizada como marcador de apoptose. As células viáveis possuem fosfatidilserina (PS), um fosfolípido de carga negativa, no folheto interno da membrana celular. A presença deste fosfolípido no interior das células é bastante importante na fisiologia celular, facilitando vários processos, como a ligação de proteínas na camada interna da membrana ou para facilitar a fusão durante a exocitose [122]. No entanto, durante o processo de apoptose, além da contração e condensação das estruturas celulares e formação de corpos apoptóticos (fragmentos celulares fechados por membrana), a PS também transloca do folheto interno para o folheto externo da membrana celular [120]. A Anexina V é uma proteína impermeável às células e possui elevada afinidade com a PS, assim, através da ligação destes dois componentes podem ser identificadas as células que se encontram em apoptose [123]. Por outro lado, o 7-AAD permite identificar células em necrose, através da sua elevada afinidade com ácidos nucleicos. Ao contrário da apoptose, o processo de necrose leva ao comprometimento agressivo da membrana celular. A rutura da membrana celular permite a internalização do 7-AAD nas células. No interior das mesmas, este marcador intercala nos ácidos nucleicos presentes no DNA e RNA, emitindo fluorescência.

Para identificar o tipo de morte celular por CF, foram recolhidas $0,5 \times 10^6$ células e lavadas com PBS através de uma centrifugação com 1703 g, durante 5 minutos. Após descartar o sobrenadante, as células foram ressuspensas em 100 μL de tampão de ligação da Anexina, 2,5 μL de Anexina V (Biolegend) e 5 μL de 7-AAD (Biolegend) e incubadas durante 15 minutos, no escuro. Findo o tempo de incubação, adicionou-se 300 μL de tampão de ligação da Anexina e realizou-se a análise num citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson), onde foram analisadas 50 000 células. Para adquirir os dados da análise foi utilizado o software Paint-a-Gate 3.02 (Becton Dickinson) e os resultados foram obtidos pelo software paint-a-gate (Becton Dickinson). Os resultados foram apresentados sob a forma de percentagem (%) de células viáveis ($\text{AV}^- / 7\text{-AAD}^-$), em apoptose inicial ($\text{AV}^+ / 7\text{-AAD}^-$), em apoptose tardia ou necrose ($\text{AV}^+ / 7\text{-AAD}^+$) e em

necrose (AV/ 7-AAD⁺). Os resultados das células HG-3 representam a média \pm SEM de 5 ensaios independentes.

2.4.3. Avaliação do ciclo celular

A análise do ciclo celular foi realizada recorrendo à técnica de citometria de fluxo, pela marcação com a solução iodeto de propídio (PI)/RNase (Immunostep). Tal como o 7-AAD, o PI também é um marcador fluorescente que intercala nos ácidos nucleicos [124]. O ciclo celular é um processo que permite a multiplicação de células, pela formação de duas células filhas a partir de uma célula mãe [125]. A fluorescência do PI é proporcional à quantidade de DNA presente na célula. Desse modo, podem ser identificadas as diferentes fases do ciclo celular (G_0/G_1 , S e G_2/M) através da quantidade de DNA, uma vez que essa quantidade é diferente em cada uma das fases. No entanto, é necessário utilizar a enzima RNase, para que possa degradar todo o RNA presente nas células, de modo a este não interferir nos resultados, uma vez que o PI também se pode intercalar neste ácido nucleico. Um pico, Sub- G_0/G_1 , também pode ser encontrado nesta análise, e corresponde à % de células que sofrem apoptose, uma vez que numa fase mais avançada deste processo de morte celular ocorre fragmentação do DNA e, posteriormente, estes fragmentos serão marcados pelo PI [124].

Neste ensaio utilizaram-se as mesmas condições da análise do tipo de morte celular, uma densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ células/mL e as condições descritas na secção 2.4.1., durante 48h. Após esse período, foram retiradas 1×10^6 de células e lavadas com PBS por centrifugação a 1703 g, durante 5 minutos. Seguidamente, as células foram fixadas pela adição de 200 μ L de etanol a 70%, durante 40 minutos, a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas, como descrito anteriormente, ressuspensas em 300 μ L de solução PI/RNase e incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente. Por fim, foi realizada a análise através do citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) e da recolha de 50 000 células. A distribuição de células pelas diferentes fases do ciclo celular foi analisada através da utilização do software ModFit LT (Verity Software House), sendo os resultados apresentados sob a forma de percentagem de células em cada fase do ciclo celular. Os resultados das células HG-3 representam a média \pm SEM de 5 ensaios independentes.

2.4.4. Avaliação do potencial da membrana mitocondrial

Para avaliar o potencial da membrana celular ($\Delta\psi_m$) recorreu-se à técnica de citometria de fluxo, onde foi utilizado a sonda JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbo-cianina iodeto) [126]. O JC-1 é um corante lipofílico e catiónico, que tem a capacidade de entrar e se acumular no interior das mitocôndrias, formando complexos reversíveis, denominados de agregados J, que emitem fluorescência vermelha [127]. No exterior das mitocôndrias, o JC-1 encontra-se em forma de monómero e emite fluorescência verde. Em células saudáveis o potencial da membrana celular encontra-se normal e permite a internalização deste composto, mas quando a célula sofre alguma alteração que leve à despolarização da membrana mitocondrial, o JC-1 perde a capacidade de entrar na mitocôndria.

Para realizar este estudo, foram recolhidas 1×10^6 das células incubadas na ausência e presença das condições descritas na secção 2.4.1., durante 48h. As células foram lavadas com PBS por centrifugação com 1703 g, por 5 minutos e, de seguida, incubadas durante 15 minutos a 37°C com 5 $\mu\text{g/mL}$ de JC-1 (Molecular Probes, Invitrogen). Posteriormente, as células foram novamente lavadas, como descrito anteriormente, e ressuspensas em 300 μL de PBS. Finalmente, as células foram quantificadas através do citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson), onde se recolheram 50 000 células com o programa CellQuest™ e os dados obtidos foram analisados e quantificados usando o programa Paint-a-Gate 3.02. Os resultados foram representados pela média da razão agregados/ monómeros de JC-1 e representam a média \pm SEM de 5 ensaios independentes.

2.4.5. Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio (ROS/ RNS) e de glutatona reduzida (GSH)

De forma a avaliar os níveis de ROS (em particular o peróxido intracelular, ROS de origem mitocondrial e o anião superóxido), RNS (óxido nítrico) e da GSH, na linha celular HG-3, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo. Os níveis de peróxidos intracelulares, anião superóxido, ROS de origem mitocondrial e óxido nítrico foram analisados utilizando as sondas diacetato de 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂-DA), dihidroetídio (DHE), dihidroradamina-123 (DHR-123) e diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM DA), respetivamente. A sonda alaranjado de mercúrio (MO) foi utilizada para avaliar os níveis da defesa antioxidante GSH.

Para realizar este ensaio, as células HG-3 foram incubadas num frasco de cultura com uma área de crescimento de 25 cm² a uma densidade inicial de 0,5 x 10⁶ células/mL, na presença e ausência das condições descritas na secção 2.4.1., durante 48h.

2.4.5.1. Avaliação dos níveis de peróxidos intracelulares

Os níveis de peróxidos intracelulares foram analisados através da utilização da sonda DCFH₂-DA, uma das sondas mais utilizadas para a medição destes radicais [128], [129], [130]. Após atravessar a membrana celular, a sonda DCFH₂-DA é hidrolisada por esterases celulares em 2'-7'- diclorodihidrofluoresceína (DCFH), uma forma que a impede de sair da célula. No interior da célula e na presença de ROS, principalmente, do H₂O₂, a DCFH é oxidada, tomando a forma de 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF), uma sonda fluorescente, como ilustrado na Figura 15. Esta sonda pode ser detetada quando utilizado um comprimento de onda de excitação e emissão de 498 e 522 nm, respetivamente.

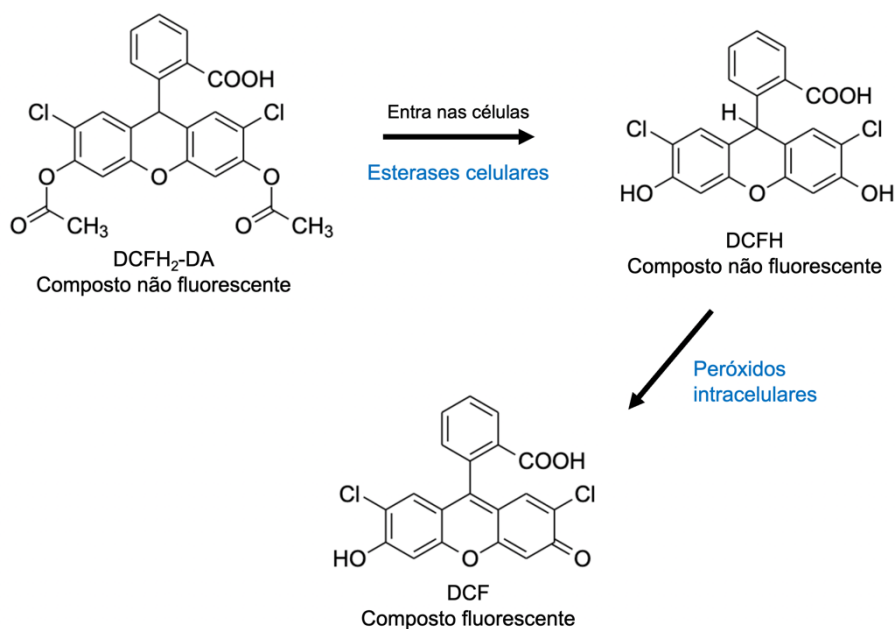


Figura 15: Detecção de peróxidos intracelulares pela sonda DCFH₂-DA. A sonda DCFH₂-DA é permeável à membrana celular, entrando facilmente nas células. Pela ação das esterases essa sonda não fluorescente é hidrolisada e convertida em DCFH, uma molécula também não fluorescente. Peróxidos intracelulares presentes na célula oxidam a sonda DCFH₂ em DCF, uma molécula fluorescente que pode ser detetada.

Para analisar os peróxidos intracelulares, foram recolhidas $0,5 \times 10^6$ células após o tempo de incubação com as devidas condições. As células foram lavadas com PBS por centrifugação com 1703 g por 5 minutos, ressuspensas em 500 μ L de PBS e incubadas durante 45 minutos a 37 °C com a sonda DCFH₂-DA. Após o tempo de incubação, as células foram, novamente, lavadas com PBS, como descrito anteriormente, ressuspensas em 500 μ L de PBS e analisadas no citómetro de fluxo indicado previamente. Foram adquiridas 50 000 células através do programa CellQuest™ e os dados obtidos foram analisados e quantificados usando o programa Paint-a-Gate 3.02. Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) e representam a media da expressão de peróxidos intracelulares da linha celular HG-3 \pm SEM de 4 experiências independentes.

2.4.5.2. Avaliação dos níveis de ROS de origem mitocondrial

A sonda DHR-123 foi também utilizada com o propósito de avaliar níveis de ROS de origem mitocondrial. Após a sua difusão na membrana celular, esta sonda lipofílica e não fluorescente é, espontaneamente, oxidada na presença de ROS a rodamina-123 (RH-123), como representado na Figura 16 [131]. A RH-123, ao contrário da DHR-123, é um composto com elevada fluorescência e pode ser detetada quando utilizados um comprimento de onda de excitação e de emissão de 507 e 529 nm, respetivamente [132].

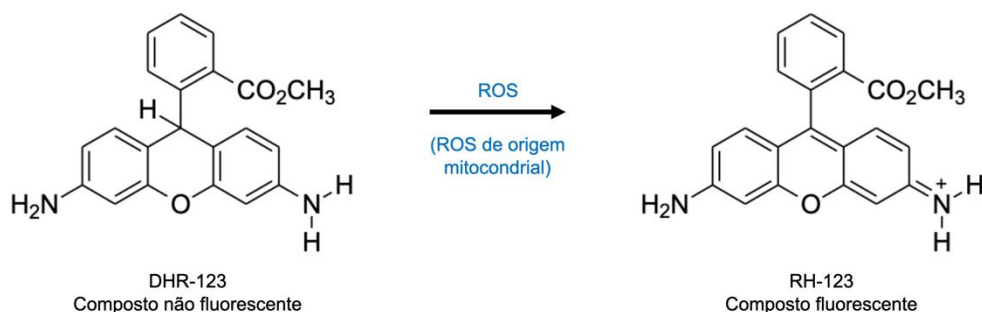


Figura 16: Detecção de ROS de origem mitocondrial pela sonda DHR-123. A sonda DHR-123, não fluorescente, é oxidada por ROS de origem mitocondrial, a RH-123, uma molécula fluorescente, que permite a deteção destes radicais.

Para analisar os ROS de origem mitocondrial, foram recolhidas $0,5 \times 10^6$ células após o tempo de incubação com as devidas condições. As células foram lavadas com PBS por centrifugação com 1703 g, por 5 minutos, ressuspensas em 500 μL de PBS e incubadas, durante 30 minutos a 37 °C com a sonda DHR-123. Após o tempo de incubação, as células foram, novamente, lavadas com PBS, como descrito anteriormente, ressuspensas em 500 μL de PBS e analisadas no citómetro de fluxo indicado previamente. Foram adquiridas 50 000 células através do programa CellQuest™ e os dados obtidos foram analisados e quantificados usando o programa Paint-a-Gate 3.02. Os resultados são expressos em MIFs e representam a média da expressão de ROS de origem mitocondrial da linha celular HG-3 \pm SEM de 4 experiências independentes.

2.4.5.3. Avaliação dos níveis do anião superóxido

A sonda DHE, ao atravessar a membrana celular, é oxidada em dois eletrões pelo anião superóxido, dando origem a um composto fluorescente, o etídeo, Figura 17 [131]. O etídeo, por sua vez tem capacidade de internalizar no DNA, emitindo uma fluorescência vermelha. Esta sonda é detetada pela utilização de um comprimento de onda de excitação e de emissão de 518 e 605 nm, respetivamente [133].

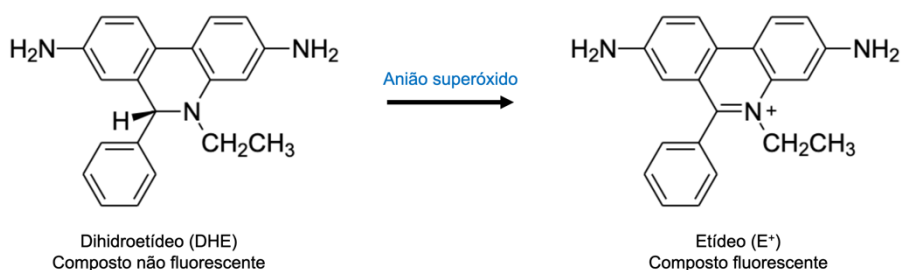


Figura 17: Detecção do anião superóxido através da sonda DHE. A sonda DHE (não fluorescente) é oxidada pelo anião superóxido formando o etídeo, uma molécula fluorescente.

De forma a obter os níveis do anião superóxido, foram recolhidas $0,5 \times 10^6$ células, após o tempo de incubação com as devidas condições. As células foram lavadas com PBS por centrifugação com 1703 g, por 5 minutos, ressuspensas em 500 μL de PBS e incubadas durante 15 minutos a 37 °C com a sonda DHE. Posteriormente, as células foram, novamente, lavadas com PBS, como descrito anteriormente, ressuspensas em

500 μ L de PBS e analisadas no citómetro de fluxo indicado previamente. Foram adquiridas 50 000 células através do programa CellQuest™ e os dados obtidos foram analisados e quantificados usando o programa Paint-a-Gate 3.02. Os resultados são expressos em MIFs e representam a média da expressão de peróxidos intracelulares da linha celular HG-3 \pm SEM de 4 experiências independentes.

2.4.5.4. Avaliação dos níveis de óxido nítrico

Para avaliar o óxido nítrico utilizou-se a sonda DAF-FM DA (não fluorescente), uma diamina derivada de uma fluoresceína, altamente sensível a esta molécula [134]. Esta sonda é um derivado da sonda DAF-FM (não fluorescente), mas ao contrário desta ela é permeável à membrana celular (propriedade concebida pelo diacetato) [135]. Assim, quando a sonda DAF-FM DA penetra a membrana celular ela é hidrolisada por esterases intracelulares em DAF-FM. Retida no interior da célula a DAF-FM capta moléculas de óxido nítrico tornando-a num derivado triazólico, DAF-FM-T, um composto fluorescente. Na Figura 18, encontra-se um esquema representativo da deteção de NO pela DAF-FM DA. Esta sonda é detetada pela utilização de um comprimento de onda de excitação e de emissão de 500 e 515 nm, respetivamente.

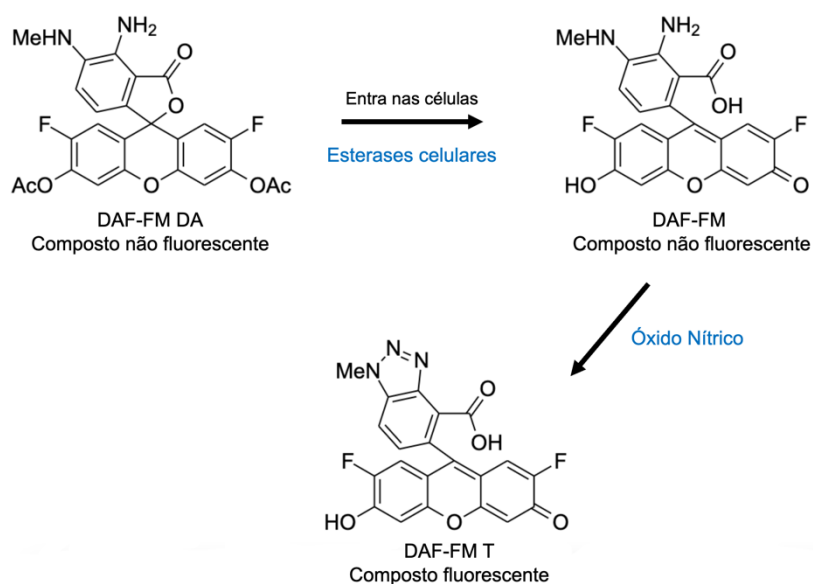


Figura 18: Deteção do óxido nítrico através da sonda DAF-FM DA. A sonda DAF-FM DA é um composto não fluorescente permeável às membranas celulares. Uma vez no interior destas,

ela é hidrolisada por esterases formando a sonda DAF-FM, também não fluorescente, que fica retida no interior da célula e pode ser oxidada por óxido nítrico, que forma um composto triazólico, que é fluorescente.

Para realizar esta análise foram recolhidas $0,5 \times 10^6$ células após o tempo de incubação com as condições descritas na secção 2.4.1. De seguida, as células passaram por um processo de lavagem com PBS, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 500 μ L de PBS e a sonda DAF-FM DA. Após 15 minutos de incubação a 37°C, outro processo de lavagem com PBS (1703 g, por 5 minutos) foi realizado, o sobrenadante removido, as células foram ressuspensas em 500 μ L de PBS e analisadas no citómetro de fluxo indicado previamente. Foram adquiridas 50 000 células através do programa CellQuest™ e os dados obtidos foram analisados e quantificados usando o programa Paint-a-Gate 3.02. Os resultados são expressos em MIFs e representam a média da expressão de óxido nítrico da linha celular HG-3 \pm SEM de 4 experiências independentes.

2.4.5.5. Avaliação dos níveis de GSH

A sonda MO foi utilizada para avaliar os níveis de GSH, uma vez que este composto tem capacidade para se ligar a grupos tióis presentes nesta molécula. Apesar de existirem várias proteínas que possuem grupos tióis que se poderiam ligar ao MO, parece que esta sonda se liga mais rápido aos grupos tióis presentes na glutatona reduzida. Dessa forma, a utilização desta sonda é indicada para avaliar os níveis de glutatona reduzida presentes nas células HG-3. A fluorescência da sonda pode ser detetada pelos comprimentos de ondas de excitação e de emissão de 488 e 580 nm, respetivamente [136], [137].

Para avaliar a defesa antioxidante glutatona reduzida, foram recolhidas $0,5 \times 10^6$ células, após o tempo de incubação com as devidas condições. As células foram lavadas com PBS por centrifugação com 1703 g, por 5 minutos, ressuspensas em 500 μ L de PBS e incubadas durante 15 minutos a 37°C com a sonda DHE. Posteriormente, as células foram, novamente, lavadas com PBS, como descrito anteriormente, ressuspensas em 500 μ L de PBS e analisadas no citómetro de fluxo indicado previamente. Foram adquiridas 50 000 células através do programa CellQuest™ e os dados obtidos foram analisados e quantificados usando o programa Paint-a-Gate 3.02.

Os resultados são expressos em MIFs e representam a média da expressão da glutathiona reduzida da linha celular HG-3 \pm SEM de 4 experiências independentes.

2.4.6. Avaliação da expressão de genes alvo do NRF2

O NRF2 quando ativo promove a transcrição de vários genes citoprotetores. Assim, neste estudo foram avaliados alguns genes alvo desta proteína, nomeadamente, os genes *KEAP1*, *NF- κ B1*, *NQO1*, *TXNRD1*, *HMOX1* e *GPX1*. Esta análise foi realizada através de qPCR e os métodos utilizados para a realizar foram os mesmos utilizados na avaliação dos genes *KEAP1* e *NRF2*, descritos na secção 2.2. A sequência dos *primers* utilizados encontra-se na Tabela 2. Os resultados das células HG-3 representam a média \pm SEM de 3 ensaios independentes e foram normalizados ao controlo endógeno *HPRT*.

Tabela 2: Sequência de *primers* utilizados na reação de qPCR para avaliar a expressão dos genes *KEAP1*, *NF- κ B1*, *NQO1*, *TXNRD1*, *HMOX1* e *GPX1*.

Gene	Forward	Reverse
<i>KEAP1</i>	5'-CAACCCTTGTCCACATCTCAG-3'	5'-CCAGGACTTACAGGCAATTCTT-3'
<i>NF-κB1</i>	5'-AGGCAGCACTACTTCTTGAC-3'	5'-AACCAGCAGCAGCAAACAT-3'
<i>NQO1</i>	5'-CATGGCTGTCAGAAAAGCACTG-3'	5'-GGTCTGACACAGTGACCTCC-3'
<i>TXNRD1</i>	5'-TGCGTGTCTGTGCTTAC-3'	5'-TGCTGCCTGCCTTCTATTCC-3'
<i>HMOX1</i>	5'-CATCGACCCCACACCTACAC-3'	5'-AAGACGCCATCACCAGCTTA-3'
<i>GPX1</i>	5'-ATGAGGTGGGATTTTAGGTT-3'	5'-ACCAAACAACACACATAACACA-3'
<i>HPRT</i>	5'-CATTATGCTGAGGATTTGAAAGG-3'	5'-CTTGAGCACACAGAGGGCTACA-3'

2.4.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o GraphPad Prism (versão 8,02, para o Windows). Através da regressão logística não linear calculou-se o IC₅₀ e o IC₂₅ das

curvas dose-resposta do brusatol e ML385 na linha celular HG-3. A significância estatística foi obtida através do uso de testes paramétricos e não paramétricos. Para determinar qual o melhor teste, primeiramente, foi utilizado um teste de normalidade Shapiro-Wilk e Kolmogorov Smirnov nas análises de curvas dose resposta e citometria de fluxo (exceto nos resultados das ROS/RNS e GSH) e apenas o teste de normalidade Shapiro-Wilk na análise das ROS/RNS e GSH e da expressão de genes. Resultados que obedeceram à distribuição normal das células foram submetidos ao teste one-way ANOVA e, simultaneamente, ao teste das comparações múltiplas de Dunn's ou de Tukey's ou de Dunnett's. Resultados que não obedeceram à distribuição normal foram analisados com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, ou ao teste de comparações múltiplas de Dunn's. Os resultados foram expressos como média±erro-padrão (SEM, *standard error of the mean*) do número de experiências independentes e foi considerado um nível de significância de 95% ($p < 0,05$). A resposta de combinação entre os fármacos foi calculada com base no modelo *highest single agente* (HSA) através do SynergyFinder 2.0. Um score de sinergia >10 foi considerado sinérgico, entre -10 e $+10$ foi considerado aditivo e < -10 foi considerado antagônico.

3. RESULTADOS

3.1. Curva de crescimento da linha celular HG-3

No presente estudo foram utilizadas as células HG-3, um modelo *in vitro* da leucemia linfocítica crónica. Inicialmente, foi avaliada a curva de crescimento das células através da técnica de exclusão do azul tripano com determinação da densidade e viabilidade, o que permitiu avaliar a concentração ideal para o crescimento destas células. Para este ensaio, as células foram incubadas, durante 96h, com as seguintes densidades celulares: $0,1 \times 10^6$, $0,3 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$, $0,75 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^6$ células/mL. Ao longo de 96h de incubação observou-se o aumento exponencial das células em todas as densidades iniciais testadas, como se pode observar na Figura 19A, e determinou-se que o tempo de duplicação das células HG-3 ocorre após 48h de incubação. Por outro lado, não foram observadas variações significativas na viabilidade celular (Figura 19B), que se manteve acima dos $88 \pm 3\%$, durante todo o tempo de incubação. No entanto, na densidade de $0,75 \times 10^6$ células/mL e 1×10^6 células/mL pode verificar-se uma ligeira diminuição da viabilidade celular, que atinge os $95 \pm 1\%$ e $88 \pm 3\%$, respetivamente, às 96h de incubação. Assim, de forma a manter um crescimento celular adequado e uma viabilidade elevada, determinou-se que a densidade inicial ideal das células HG-3 é $0,5 \times 10^6$ células/mL.

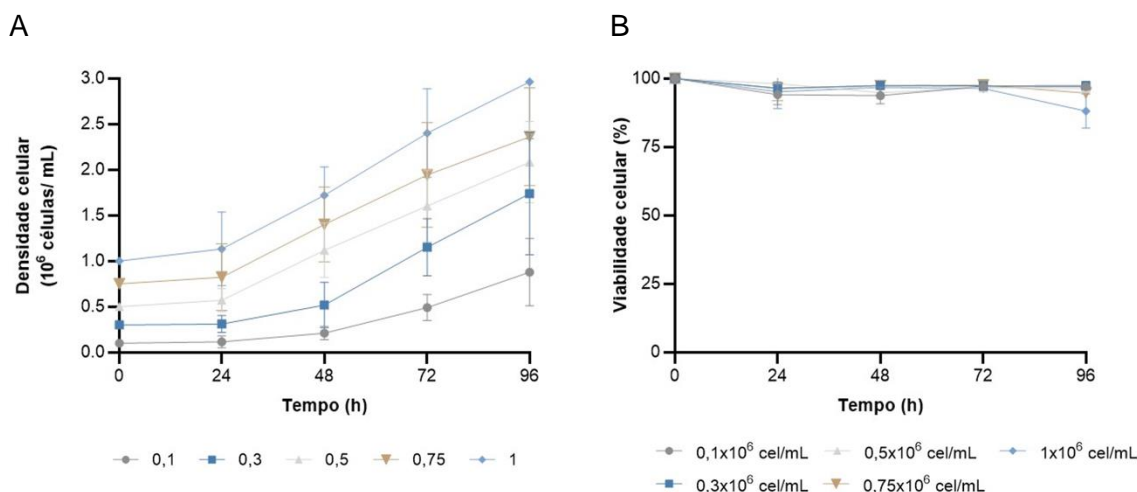


Figura 19: Curva de proliferação (A) e viabilidade celular (B) das células HG-3. As células HG-3 foram mantidas a diferentes concentrações ($0,1$, $0,3$, $0,5$, $0,75$ e 1×10^6 células/mL) durante 96 horas. A cada período de 24 horas a densidade e a viabilidade celular foram obtidas através da técnica de exclusão do azul tripano. Os resultados representam a média \pm SEM de 5 ensaios independentes.

3.2. Avaliação da expressão dos genes *NFE2L2* e *KEAP1*

O *NFE2L2* é o gene que codifica o fator de transcrição NRF2, por outro lado, o *KEAP1* codifica a proteína com o mesmo nome, que é responsável pela regulação do NRF2. Com o propósito de avaliar os valores basais destes dois genes nas células HG-3, foi utilizada a técnica de qPCR. Através destes valores pode-se determinar os níveis de expressão basal destes genes (Figura 20). Para esta análise, os genes *NFE2L2* e *KEAP1* foram normalizados a um controlo endógeno, o *HPRT*.

Na Figura 20 pode-se observar que as células HG-3 expressam ambos os genes. Também foi possível observar uma maior expressão do gene *NFE2L2* ($0,102 \pm 0,02$) em relação ao gene *KEAP1* ($0,057 \pm 0,01$), no entanto esta variação não foi significativa.

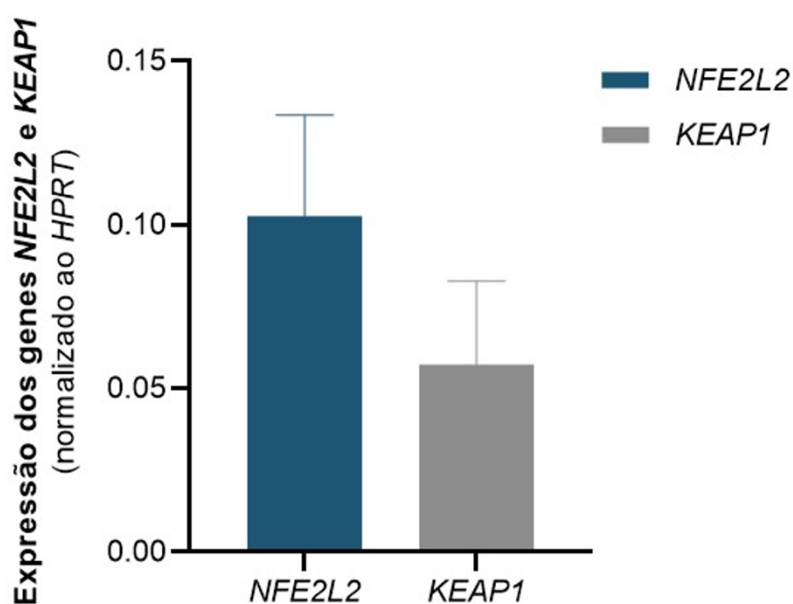


Figura 20: Níveis de expressão basal dos genes *NFE2L2* e *KEAP1*, na linha celular HG-3. A expressão dos genes foi avaliada através da técnica de qPCR. Os resultados foram normalizados ao *HPRT* e representam a média \pm SEM de 5 ensaios independentes.

3.3. Avaliação dos inibidores do NRF2 em combinação com o ibrutinib como novas estratégias terapêuticas na LLC

3.3.1. Efeito do brusatol, ML385 e ibrutinib na linha celular HG-3: monoterapia

Para analisar o efeito dos agentes terapêuticos brusatol, ML385 e ibrutinib, na linha celular HG-3, recorreu-se ao ensaio metabólico com resazurina. Estas células foram incubadas na ausência e presença de doses crescentes destes fármacos, durante 72 horas.

Como se pode observar na Figura 21A, o brusatol diminuiu a atividade metabólica de forma dependente da dose e do tempo, o que significa que doses mais elevadas induzem um efeito maior nesta linha celular e esse efeito foi mais acentuado ao longo do tempo de incubação. Através destes resultados, determinou-se após 48h de incubação, que a dose de brusatol necessária para diminuir a atividade metabólica em 50% (IC_{50}) e 25% (IC_{25}) corresponde a aproximadamente 110 nM e 50 nM, respetivamente. O ML385 também diminuiu a atividade metabólica nas células HG-3 ao longo das 72h de incubação, como observado na Figura 21B. Esta diminuição foi dependente da dose e do tempo, apresentando um IC_{50} superior a 500 μ M às 48 horas de incubação. Por fim, e de forma semelhante ao resultado obtido com o brusatol e ML385, o ibrutinib reduziu a atividade metabólica de forma dependente da dose e do tempo (Figura 21C). Apesar deste fármaco já ser utilizado na clínica no tratamento da leucemia linfocítica crónica, o seu efeito em monoterapia foi estudado de forma a serem escolhidas as doses indicadas para o esquema de combinação com os inibidores do NRF2. Assim, determinou-se que a dose de ibrutinib necessária para diminuir a atividade metabólica em 25% (IC_{25}) corresponde a, aproximadamente, 0,5 μ M, após 48h de exposição.

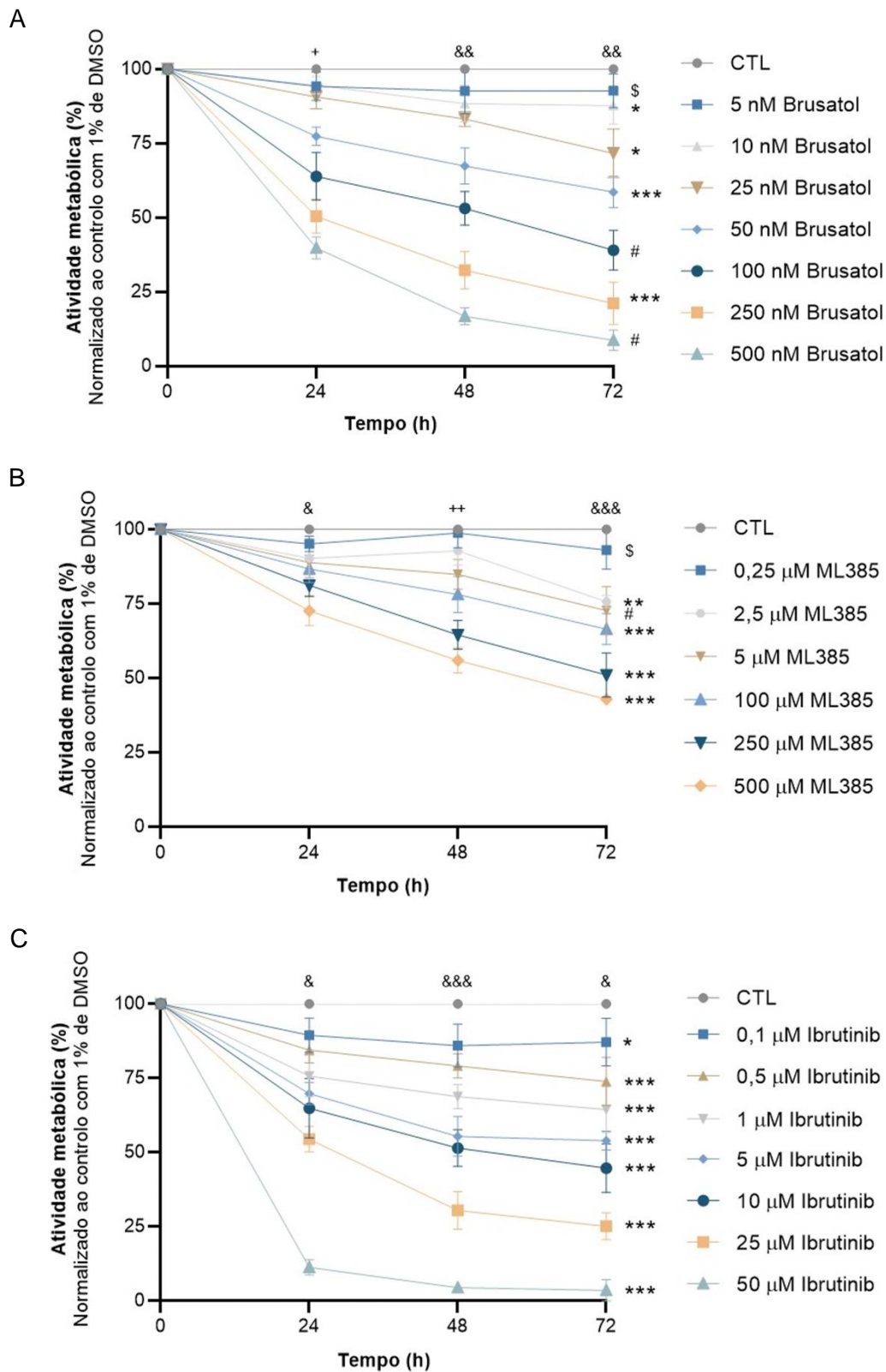


Figura 21: Curvas dose-resposta do brusatol (A), ML385 (B) e ibrutinib (C), na linha celular HG-3. As células HG-3 foram incubadas, numa densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ células/mL durante 72 horas, na ausência (controlo - CTL) e presença de concentrações crescentes de brusatol, ML385 e ibrutinib, em monoterapia. A atividade metabólica foi determinada através do

ensaio metabólico com resazurina. Os resultados encontram-se expressos em percentagem (%) e normalizados ao controlo com 1% de DMSO, representando a média \pm SEM obtida de 5 ensaios independentes. Na análise estatística foram aplicados os testes de múltiplas comparações de Dunn's e Dunnett's entre concentrações e o teste de Dunnett's entre diferentes tempos de incubação. (*) representa a comparação entre as 0h de incubação e as 24, 48 e 72h, sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. (\$) representa a comparação entre as 0h e as 48 e 72h, sendo \$ $p < 0,05$. (#) representa a comparação entre as 0h e as 72h, sendo # $p < 0,05$. (+) representa a comparação entre o CTL e concentrações acima de 50 nM (brusatol) e 100 μ M (ML385), sendo + $p < 0,05$ e ++ $p < 0,01$. (&) representa a comparação entre o CTL e concentrações acima de 100 nM (brusatol), concentrações acima de 2,5 μ M (ML385) e todas as concentrações (ibrutinib), sendo & $p < 0,05$, && $p < 0,01$ e &&& $p < 0,001$.

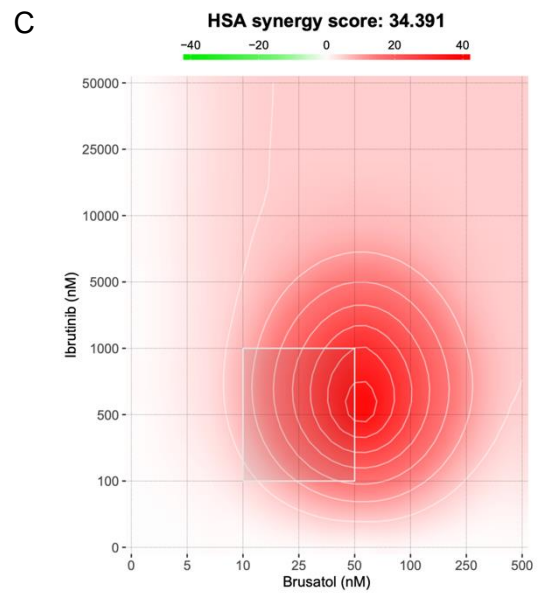
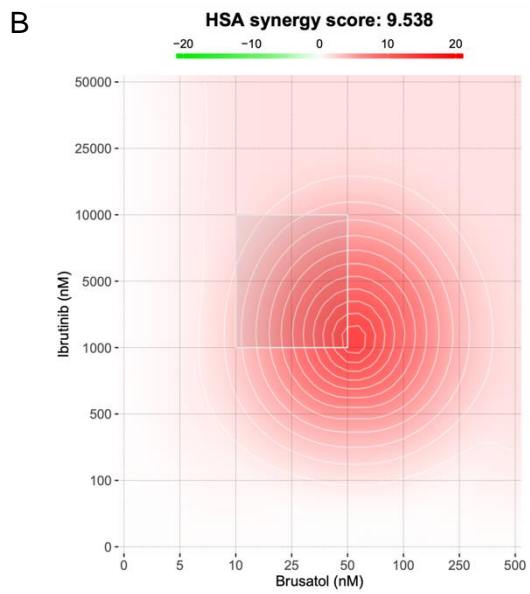
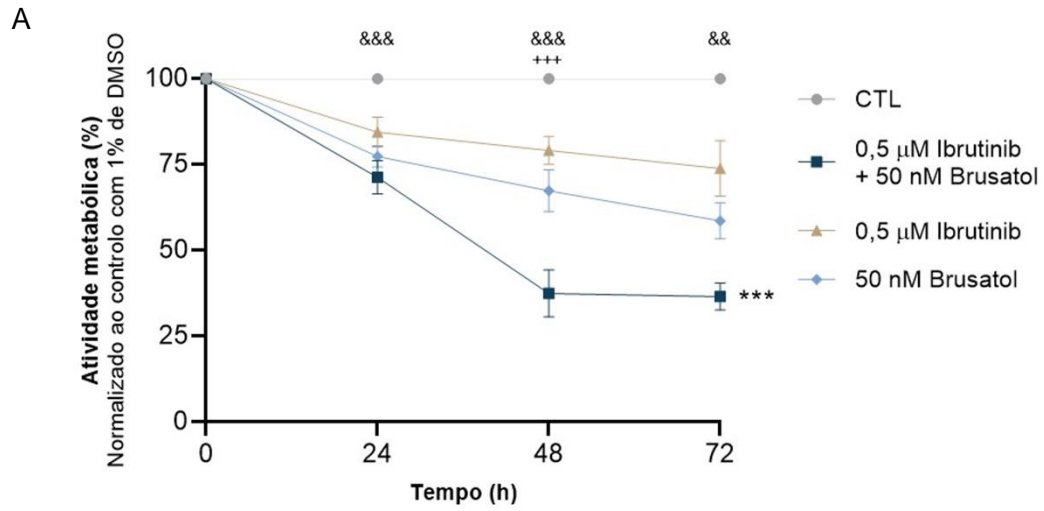
Através da Figura 21 determinou-se que as doses que correspondiam ao IC_{25} , seriam 50 nM, 2,5 μ M e 0,5 μ M para o brusatol, ML385 e ibrutinib, respetivamente, após 48h de incubação.

3.3.2. Efeito do brusatol e ML385 em associação com o ibrutinib na linha celular HG-3

Através dos resultados do efeito do brusatol, ML385 e ibrutinib nas células HG-3 foi possível determinar as doses adequadas para combinar os inibidores do NRF2, o brusatol e ML385, com o inibidor da tirosina cinase de Bruton, o ibrutinib. As doses adequadas de cada fármaco devem ser aquelas que conseguem diminuir a atividade metabólica em 25%, o IC_{25} . Assim, a combinação dos dois compostos deverá conseguir alcançar, pelo menos, o IC_{50} , dose ideal para a terapêutica.

Como se pode observar na Figura 22A, o brusatol (50 nM) em associação com o ibrutinib (0,5 μ M) diminuiu mais a atividade metabólica que a soma do efeito dos compostos em monoterapia às 48 e 72h, traduzindo um efeito sinérgico desta combinação terapêutica. A atividade metabólica nas células tratadas com a combinação do brusatol com o ibrutinib às 48h e 72h corresponde a $37 \pm 3\%$ e $37 \pm 2\%$, respetivamente, sendo a redução da atividade metabólica estatisticamente superior à atividade metabólica nas células tratadas com brusatol (48h: $67 \pm 3\%$, 72h: $57 \pm 2\%$; $p < 0,001$) e com ibrutinib (48h: $79 \pm 2\%$, 72h: $74 \pm 4\%$; $p < 0,001$), isoladamente. O score de sinergia (que se traduz no efeito extra em relação há resposta esperada) também foi calculado às 24, 48 e 72h como se pode observar nas Figuras 22B, 22C e 22D, respetivamente. Esta combinação terapêutica apresentou um score de 34 às 48h e de

23 às 72h, o que confirma o efeito sinérgico da associação do brusatol com o Ibrutinib, uma vez que um *score* acima de 10 é considerado sinérgico.



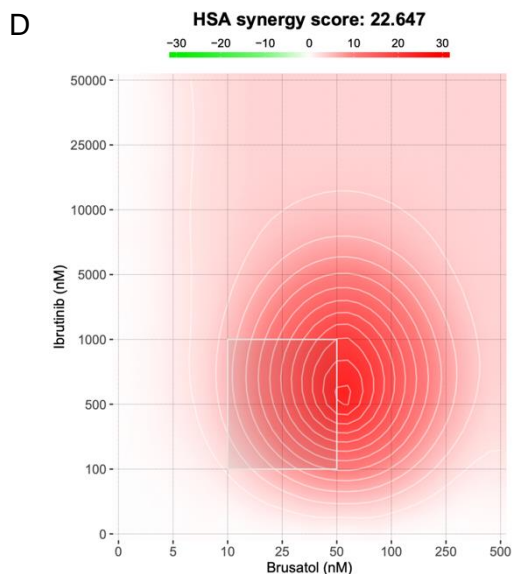


Figura 22: Curvas dose-resposta do brusatol em combinação com o ibrutinib (A) e dos scores de sinergia (B, C e D), na linha celular HG-3. As células HG-3 foram incubadas, numa densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ células/mL durante 72 horas, na ausência (controlo - CTL) e presença das concentrações 50 nM de brusatol e $0,5 \mu\text{M}$ de ibrutinib, em monoterapia e em associação. (A) A atividade metabólica foi determinada através do ensaio metabólico com resazurina. Os resultados estão expressos em percentagem (%) e normalizados ao controlo com 1% de DMSO, representando a média \pm SEM obtida de 5 ensaios independentes. Através do modelo de referência *highest single agent* (HSA) determinou-se o *score* de sinergia da associação do brusatol com o ibrutinib, às 24h (B) 48h (C) e 72h (D). Na análise estatística foram aplicados os testes de comparações múltiplas de Tukey's e de Dunn's entre concentrações e o teste de comparações múltiplas de Dunnett's entre tempos. Comparativamente às 0h de incubação *** $p < 0,001$. (+) representa a comparação entre a combinação brusatol/ ibrutinib e 50 nM de brusatol, sendo +++ $p < 0,001$. (&) representa a comparação entre a combinação brusatol/ ibrutinib e $0,5 \mu\text{M}$ (ibrutinib), sendo && $p < 0,01$ e &&& $p < 0,001$.

Por outro lado, e como se pode observar nas Figuras 23B e D, a associação do ML385 com o ibrutinib demonstrou sobretudo um efeito aditivo, uma vez que o *score* de sinergia às 24 e 72h encontra-se compreendido entre -10 e 10, nas células HG-3. A combinação destes fármacos diminuiu a atividade metabólica para $86 \pm 2\%$; $65 \pm 2\%$ e $61 \pm 2\%$, respetivamente às 24, 48 e 72h (Figura 23A). No entanto, observou-se um efeito sinérgico às 48h (HSA score: 12; Figura 23C).

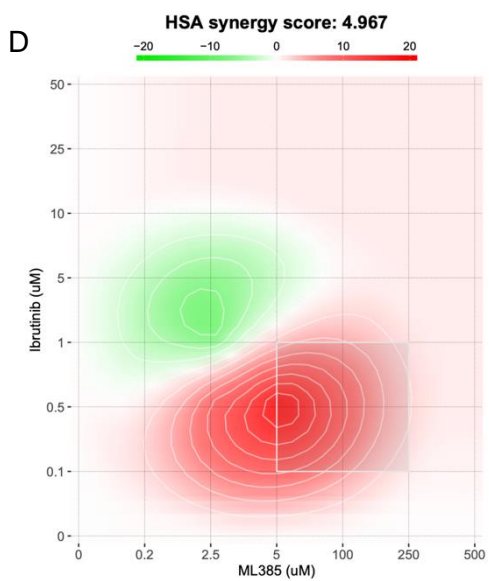
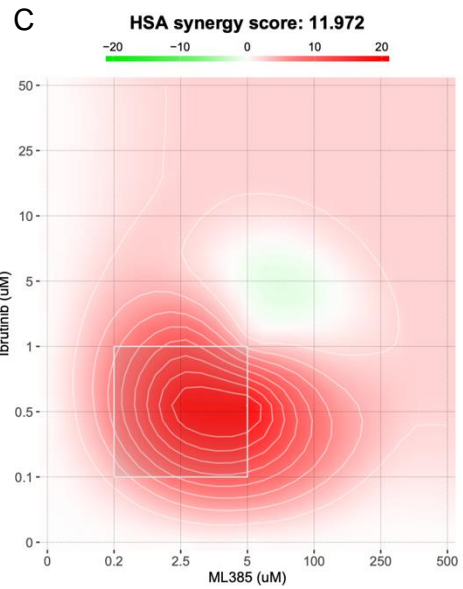
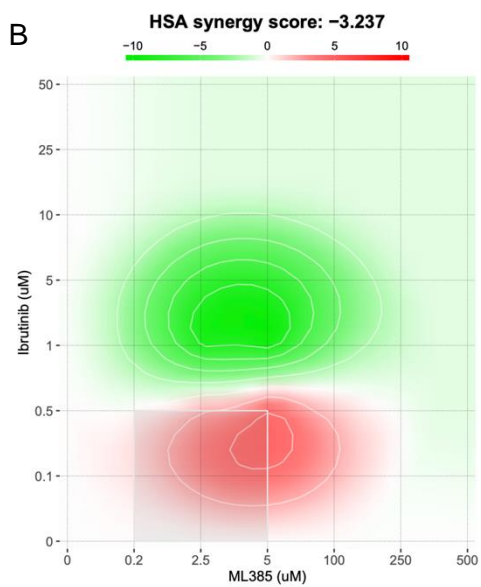
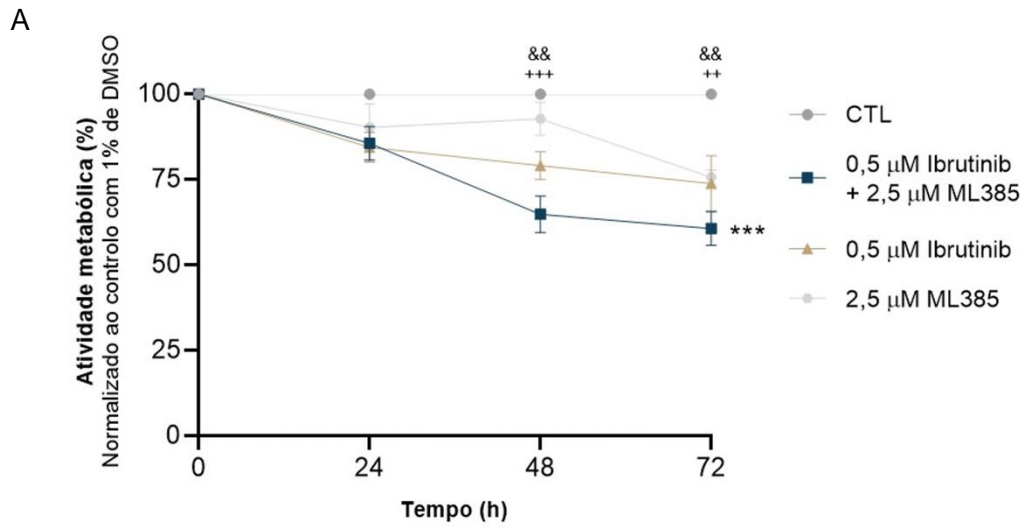


Figura 23: Curvas dose-resposta do ML385 em combinação com o ibrutinib e dos scores de sinergia (B, C e D), na linha celular HG-3. As células HG-3 foram incubadas, numa densidade inicial de $0,5 \times 10^6$ células/mL durante 72 horas, na ausência (controlo - CTL) e presença das concentrações 2,5 μ M de ML385 e 0,5 μ M de ibrutinib, em monoterapia e em associação. (A) A atividade metabólica foi determinada através do ensaio metabólico com resazurina. Os resultados encontram-se expressos em percentagem (%) e normalizados ao controlo com 1% de DMSO, representando a média \pm SEM obtida de 5 ensaios independentes. Através do modelo de referência HSA determinou-se a *score* de sinergia da associação do ML385 com o ibrutinib, às 24h (B) 48h (C) e 72h (D). Na análise estatística foram aplicados os testes de comparações múltiplas de Tukey's entre concentrações e o teste de comparações múltiplas de Dunnett's entre tempos. Comparativamente às 0h de incubação *** $p < 0,001$. (+) representa a comparação entre a combinação ML385/ Ibrutinib e 2,5 μ M de ML385, sendo ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$. (&) representa a comparação entre a combinação ML385/ Ibrutinib e 0,5 μ M de Ibrutinib, sendo && $p < 0,01$

Uma vez que o efeito do ML385 na atividade metabólica das células HG-3 não foi tão significativo como o do brusatol, os estudos subsequentes foram apenas realizados nas células HG-3 tratadas com brusatol.

3.4. Efeito citotóxico induzido pelo brusatol em monoterapia e em associação com o ibrutinib nas células HG-3

Os mecanismos de morte celular foram avaliados por citometria de fluxo, através da dupla marcação com Anexina V e 7-AAD. As concentrações e o tempo de incubação utilizados foram selecionados com base nos resultados anteriores (100 e 250 nM de brusatol em monoterapia e 0,5 μ M de ibrutinib em combinação com 50 nM de brusatol), após 48 horas.

De acordo com a análise pela citometria de fluxo (Figura 24A) observou-se que tanto o brusatol em monoterapia, como em associação com o ibrutinib demonstraram ter efeito citotóxico na linha celular HG-3, de forma dependente da concentração. A exposição a 50 nM de brusatol diminuiu as células viáveis ($82 \pm 1\%$) e aumentou as células em apoptose inicial ($7 \pm 1\%$), apoptose tardia/necrose ($7 \pm 0\%$) e necrose ($4 \pm 1\%$), em comparação com o controlo (células viáveis: $91 \pm 1\%$; células em apoptose inicial: $3 \pm 0\%$; células em apoptose tardia/necrose $4 \pm 1\%$; células em necrose: $1 \pm 0\%$). A exposição a 100 e 250 nM de brusatol diminuiu, significativamente, a percentagem de células viáveis (100 nM: $64 \pm 2\%$; 250 nM: $39 \pm 5\%$, $p < 0,01$),

B

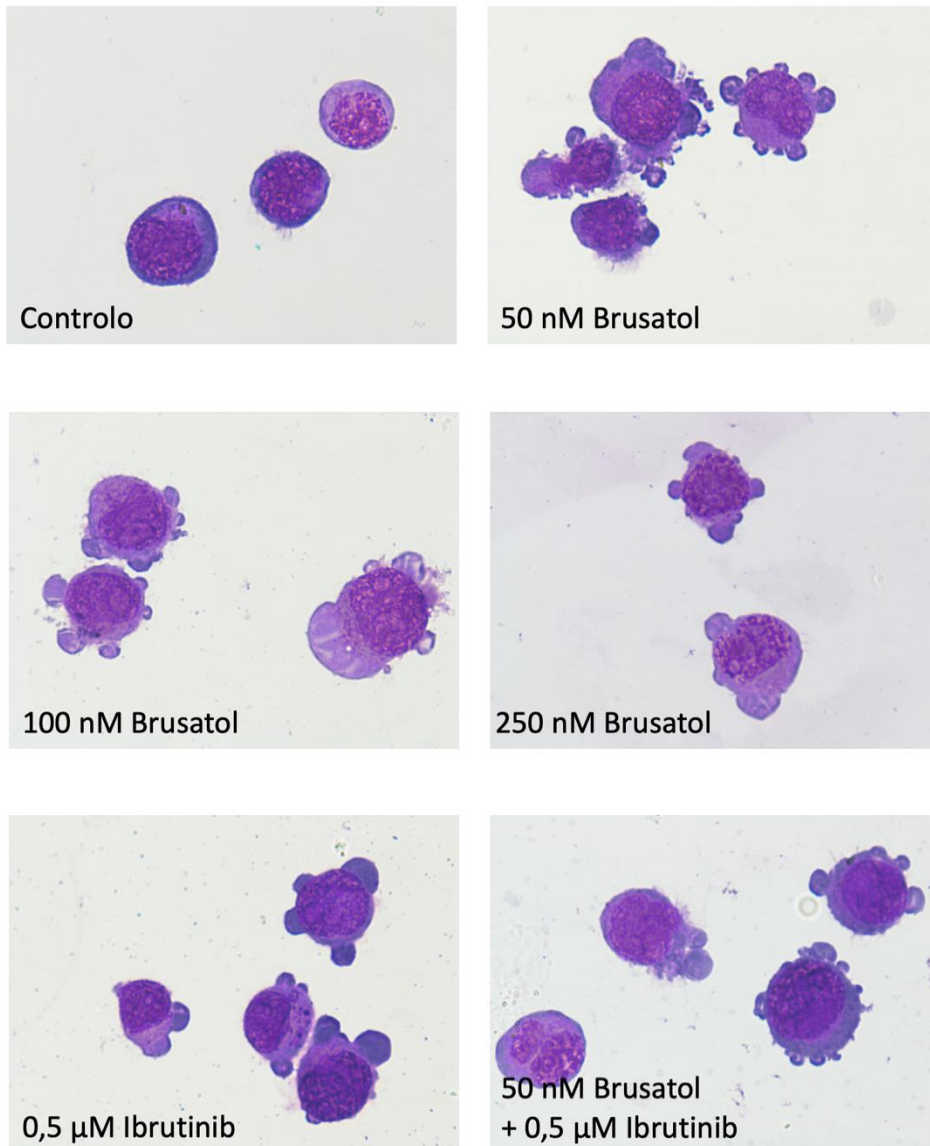


Figura 24: Análise do tipo de morte celular das células de leucemia linfocítica crônica após a exposição ao brusatol e ibrutinib em monoterapia e em combinação. As células HG-3 foram cultivadas com a densidade ótima de crescimento, $0,5 \times 10^6$ células/mL, na ausência e presença de brusatol e ibrutinib em monoterapia e em combinação. (A) A morte celular foi avaliada por citometria de fluxo utilizando a dupla marcação Anexina V e 7-AAD. (B) A morte celular foi avaliada por análise morfológica através da coloração dos esfregaços com May-Grünwald Giemsa (amplificação de 500x). Os resultados foram obtidos após 48 horas de incubação e representam a média \pm SEM de 5 experiências independentes. Na análise estatística foi aplicado o teste de comparações múltiplas de Dunn's, por comparação ao controlo. Comparativamente à condição CTL, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ para todas as condições. (#) representa comparação entre a combinação brusatol (50 nM)/ibrutinib (0,5 μ M) com 50 nM de brusatol, sendo # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$. (\$) representa comparação entre a combinação brusatol (50 nM)/ibrutinib (0,5 μ M) com 0,5 μ M de Ibrutinib, sendo \$ $p < 0,05$.

3.5. Efeito no ciclo celular após a exposição a brusatol em monoterapia e em associação com o ibrutinib nas células HG-3

Para avaliar se as terapêuticas em estudo provocavam um efeito citostático, ou seja, um bloqueio do ciclo celular foi utilizada a técnica de citometria de fluxo, recorrendo à marcação com a solução PI/RNase.

Na Tabela 3, observa-se a distribuição das células em cada fase do ciclo celular. Os resultados evidenciaram que, de uma forma geral, existe um aumento da percentagem de células na fase G₀/G₁, nas células tratadas em relação ao controlo. De facto, o brusatol em monoterapia demonstrou ter efeito citostático com bloqueio na fase G₀/G₁, induzindo aumento em 8%, 26% e 22% a percentagem de células nesta fase do ciclo celular, respetivamente nas células tratadas com 50, 100 e 250 nM, e sendo este efeito significativo em relação ao controlo em todas as doses (p<0,050). Por outro lado, o ibrutinib, em monoterapia, não induziu bloqueio do ciclo celular, uma vez que a distribuição das células foi muito semelhante ao controlo. A combinação entre o brusatol (50 nM) e o ibrutinib (0,5 μM) aumentou em 21% as células em fase G₀/G₁, em relação ao controlo (p<0,001). Através deste estudo foi também possível confirmar a indução de apoptose nas células HG-3, uma vez que foram observadas células com menor conteúdo de DNA (Sub G₁). Nas células tratadas com 250 nM de brusatol observou-se um aumento significativo das células em sub G₁ (5 ± 2%; p<0,01).

Tabela 3: Análise da distribuição das células de leucemia linfocítica crónica em cada fase do ciclo celular.

		Sub G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
HG3	CTL	0,2 ± 0,2%	56,43 ± 1,78%	34,86 ± 2,81	8,71 ± 1,02
	50 nM Brusatol	0,4 ± 0,4%	64,20 ± 1,77% *	29,00 ± 2,55	6,80 ± 1,11
	100 nM Brusatol	0,8 ± 0,37%	82,17 ± 1,36% ***	12,17 ± 0,93 **	5,67 ± 0,92
	250 nM Brusatol	5,4 ± 2,46% **	78,20 ± 1,77% ***	17,40 ± 2,42 *	4,80 ± 0,8 *
	0,5 μM Ibrutinib	1 ± 0,63%	61,00 ± 1,41%	32,20 ± 1,93	6,80 ± 1,02
	50 nM Brusatol + 0,5 μM Ibrutinib	0,2 ± 0,2%	77,33 ± 2,06% *** ### \$\$\$	16,17 ± 2,36 * \$	6,50 ± 0,92

Os resultados encontram-se representados sob a forma de percentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular. Na análise estatística foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Dunn's. Comparativamente à condição CTL, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ para todas as condições. (#) representa a comparação entre a combinação brusatol (50 nM)/ibrutinib (0,5 μ M) com 50 nM de brusatol, sendo ### $p < 0,001$. (\$) representa comparação entre a combinação brusatol (50 nM)/ibrutinib (0,5 μ M) com 0,5 μ M de Ibrutinib, sendo \$ $p < 0,05$ e \$\$\$ $p < 0,001$.

3.6. Avaliação do potencial da membrana mitocondrial

A função da membrana mitocondrial foi avaliada por citometria de fluxo através da sonda JC-1. Os resultados foram expressos sob a forma da razão agregado/monómero (A/M) normalizada ao controlo, sendo que a diminuição desta razão corresponde a uma maior despolarização da membrana mitocondrial.

Como ilustrado na Figura 25, verificou-se uma redução da razão A/M com o aumento da concentração de brusatol, indicando que este composto promove a despolarização da membrana mitocondrial nas células HG-3. A dose de 50 nM de brusatol diminuiu o potencial de membrana mitocondrial em 39% relativamente ao controlo ($p > 0,050$). Nas células tratadas com 100 e 250 nM de brusatol a diminuição, significativa, do potencial de membrana mitocondrial foi de 43% ($p < 0,050$) e 55% ($p < 0,001$), respetivamente, em relação ao controlo. O ibrutinib, em monoterapia, não reduziu de forma significativa a razão A/M de JC-1. A combinação do brusatol com o ibrutinib reduziu 44% a razão A/M de JC-1 em relação ao controlo ($p < 0,050$), no entanto esse efeito deve-se essencialmente ao brusatol.

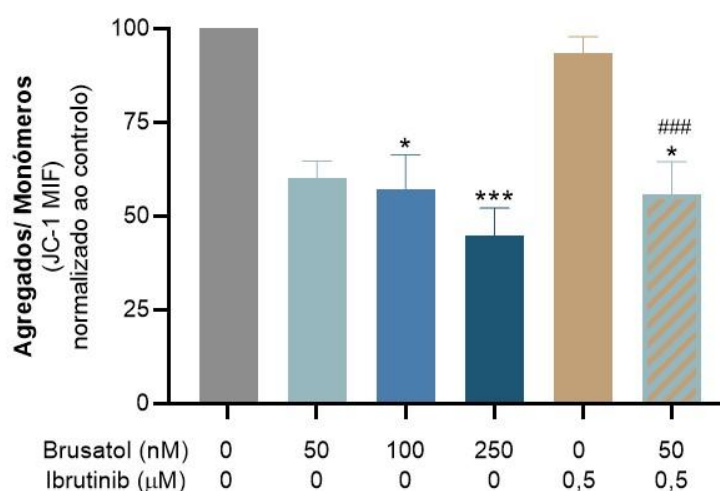


Figura 25: Análise do potencial da membrana mitocondrial na linha celular de leucemia linfocítica crónica, HG-3. A linha celular HG-3 foi incubada nas condições ótimas de crescimento ($0,5 \times 10^6$ células/mL) na ausência (CTL) e na presença do brusatol (50, 100 e 250 nM), ibrutinib (0,5 µM) e da combinação brusatol 50 nM + ibrutinib 0,5 µM. A análise do potencial da membrana mitocondrial foi realizada por citometria de fluxo com a utilização da sonda fluorescente JC-1. Os resultados foram obtidos após 48 horas de incubação e representam a média \pm SEM de 5 experiências independentes. Na análise estatística foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Dunn's. Comparativamente à condição CTL, * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ para todas as condições. (#) representa comparação entre a combinação brusatol (50 nM)/ibrutinib (0,5 µM) com 50 nM de brusatol, sendo ### $p < 0,001$.

3.7. Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio (ROS/RNS) e de glutathiona reduzida (GSH);

O stresse oxidativo, que resulta do desequilíbrio entre a produção e eliminação das ROS/RNS, encontra-se envolvido no mecanismo de ação de diversos fármacos. Neste sentido, foram analisadas ROS/RNS, como peróxidos intracelulares (DCFH₂-DA), anião superóxido (DHE), ROS de origem mitocondrial (DHR-123) e óxido nítrico (DAF), assim como a defesa antioxidante glutathiona reduzida (MO).

Como representado na Figura 26A, as células HG-3 tratadas com brusatol apresentam níveis de ROS/RNS aumentados comparativamente ao controlo. O brusatol (250 nM) levou a um aumento de 44% dos níveis intracelulares de peróxidos relativamente ao controlo ($p < 0,01$). A mesma dose de brusatol também conduziu a um aumento de 81% dos níveis intracelulares de ROS de origem mitocondrial relativamente ao controlo

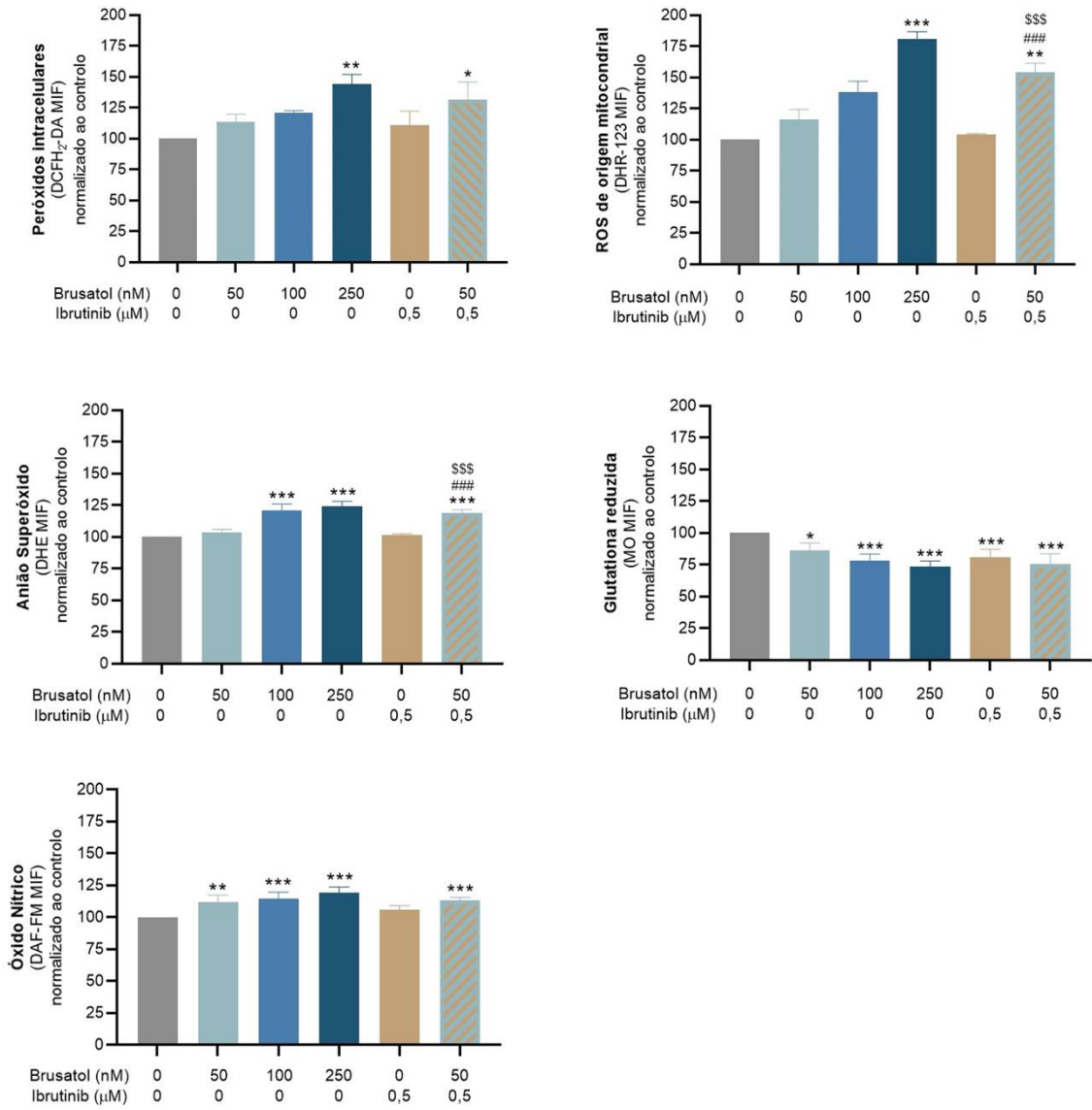
($p < 0,001$). Quanto aos níveis intracelulares do anião superóxido, observou-se um aumento de 21% ($p < 0,001$) e 24% ($p < 0,001$) quando utilizadas as doses 100 e 250 nM de brusatol, respetivamente. As doses de 50, 100 e 250 nM de brusatol conduziram a uma diminuição de 14% ($p < 0,050$), 21% ($p < 0,001$) e 26% ($p < 0,001$) dos níveis de glutaciona reduzida em relação ao controlo. Verificou-se um aumento de 12% ($p < 0,01$), 15% ($p < 0,001$) e 19% ($p < 0,001$) dos níveis de óxido nítrico, após a exposição das doses 50, 100 e 250 nM de brusatol, respetivamente, relativamente ao controlo.

Nas células HG-3 tratadas com 0,5 μ M de ibrutinib (Figura 26A), não se observaram efeitos significativos nos níveis de ROS/RNS em relação ao controlo. No entanto, observou-se que este fármaco conduziu à diminuição de 19% dos níveis de glutaciona reduzida em relação ao controlo ($p < 0,001$).

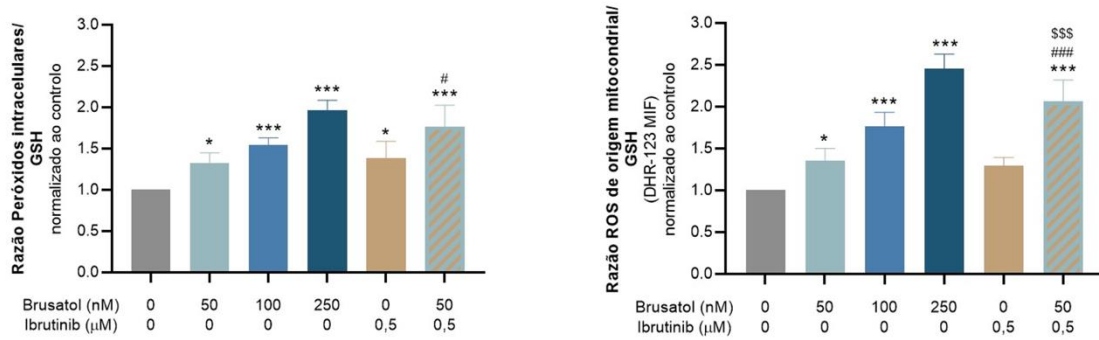
A combinação entre os fármacos brusatol (50 nM) e ibrutinib (0,5 μ M) aumentou, significativamente, os níveis das ROS/RNS (Figura 26A) e diminuiu os níveis de glutaciona reduzida. Observou-se um aumento de 32% ($p < 0,050$) dos níveis de peróxidos intracelulares, 19% ($p < 0,001$) dos níveis de anião superóxido, 54% ($p < 0,01$) dos níveis de ROS de origem mitocondrial e 13% ($p < 0,001$) dos níveis de óxido nítrico, em relação ao controlo. Além disso, também esta combinação diminuiu em 24% os níveis de glutaciona reduzida em relação ao controlo ($p < 0,001$).

Para compreender melhor o desequilíbrio redox induzido pelo brusatol em monoterapia e em associação terapêutica, foram calculadas as razões peróxidos intracelulares/GSH, ROS de origem mitocondrial/GSH e anião superóxido/GSH (Figura 26B). Os resultados foram normalizados ao controlo. Observou-se um aumento de 0,32 u.a. ($p < 0,050$), 0,55 u.a. ($p < 0,001$), 0,96 u.a. ($p < 0,001$), 0,38 u.a. ($p < 0,050$) e 0,77 u.a. ($p < 0,001$) da razão peróxidos intracelulares/GSH após a exposição das doses 50 nM brusatol, 100 nM brusatol, 250 nM brusatol, 0,5 μ M ibrutinib e 50 nM brusatol + 0,5 μ M ibrutinib nas células HG-3, respetivamente, em relação ao controlo (1 u.a.). As doses de 50, 100 e 250 nM de brusatol e a combinação brusatol/ibrutinib conduziram a um aumento de 0,35 u.a. ($p < 0,050$), 0,77 u.a. ($p < 0,001$), 1,45 u.a. ($p < 0,001$) e 1,06 u.a. ($p < 0,001$) da razão ROS de origem mitocondrial/GSH, relativamente ao controlo. Observou-se um aumento da razão anião superóxido/ GSH de 0,54 u.a. ($p < 0,001$) na dose de 100 nM brusatol, de 0,69 u.a. ($p < 0,001$) na dose de 250 nM brusatol, de 0,26 u.a. ($p < 0,050$) na dose de 0,5 μ M ibrutinib e de 0,60 u.a. ($p < 0,001$) na combinação brusatol/ibrutinib, relativamente ao controlo.

A



B



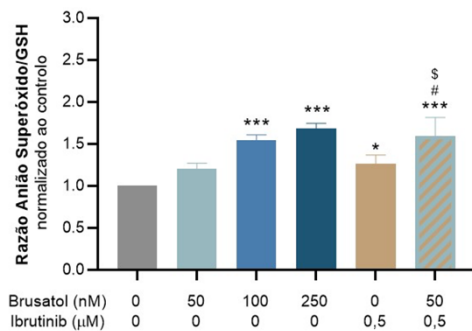


Figura 26: Avaliação dos níveis intracelulares de ROS/RNS e GSH na linha celular de leucemia linfocítica crônica. As células HG-3 foram incubadas na ausência e na presença de brusatol e ibrutinib em monoterapia e em combinação. (A) Os níveis intracelulares de peróxidos, ROS com origem mitocondrial, anião superóxido, glutatona reduzida e óxido nítrico foram avaliados por citometria de fluxo através das sondas DCFH₂-DA, DHR-123, DHE, MO e DAF-FM DA, respetivamente. (B) Foi calculada a razão de peróxidos intracelulares, ROS de origem mitocondrial e anião superóxido com a GSH. Os resultados foram obtidos após 48 horas de incubação e representam a média ± SEM de 4 experiências independentes. Na análise estatística foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Dunnett's. Comparativamente à condição CTL, * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 para todas as condições. (#) representa comparação entre a combinação brusatol (50 nM)/ibrutinib (0,5 µM) com 50 nM de brusatol, sendo # p<0,05 e ### p<0,001. (\$) representa comparação entre a combinação brusatol (50 nM)/ibrutinib (0,5 µM) com 0,5 µM de Ibrutinib, sendo \$ p<0,05 e \$\$\$ p<0,001.

3.8. Avaliação da expressão dos genes alvo do NRF2

A expressão dos genes *KEAP1*, *NF-κB1*, *NQO1*, *TXNRD1*, *HMOX1* e *GPX1*, que são regulados pelo fator de transcrição NRF2, foram avaliados recorrendo à técnica de qPCR.

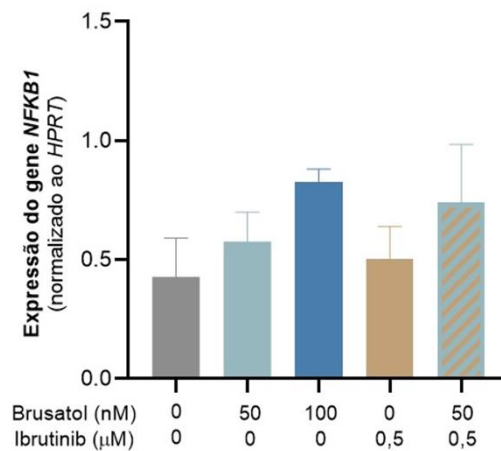
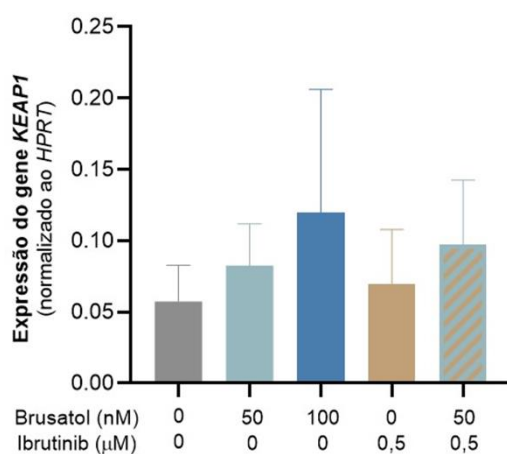
Embora não se observem alterações significativas na expressão de praticamente todos os genes analisados, observou-se ligeiras variações nas células tratadas em relação ao controlo, Figura 27.

Observou-se um ligeiro aumento dos níveis de expressão dos genes *KEAP1*, *NF-κB1*, *TXNRD1*, *HMOX1* e *GPX1* após a exposição ao fármaco brusatol, em relação ao controlo. Os níveis de expressão dos genes *KEAP1*, *NF-κB1* e *TXNRD1* também aumentaram, ligeiramente, após a exposição da combinação brusatol (50 nM)/ibrutinib (0,5 µM), relativamente ao controlo. Todas as terapêuticas em estudo levaram ao

aumento, ligeiro, da expressão do gene *NQO1* nas células HG-3, sendo que esse aumento foi significativo na dose 100 nM de brusatol (2 ± 0 , $p < 0,050$) relativamente ao controlo.

Não foram observadas alterações dos níveis de expressão dos genes *KEAP1* e *NF- κ B1* quando exposto ao ibrutinib, em comparação com o controlo. Também os níveis de expressão do gene *TXNRD1* não sofreram alterações, quando as células HG-3 foram tratadas com brusatol e com a combinação brusatol/ibrutinib, em relação ao controlo. Os níveis de expressão do gene *HMOX1* também não sofreram alterações após a exposição da combinação brusatol (50 nM)/ibrutinib (0,5 μ M), relativamente ao controlo. O ibrutinib e a combinação brusatol/ibrutinib também não alteraram os níveis de expressão do gene *GPX1*, relativamente ao controlo.

Observou-se uma ligeira diminuição dos níveis de expressão dos genes *TXNRD1* e *HMOX1* quando as células foram tratadas com ibrutinib, em relação ao controlo.



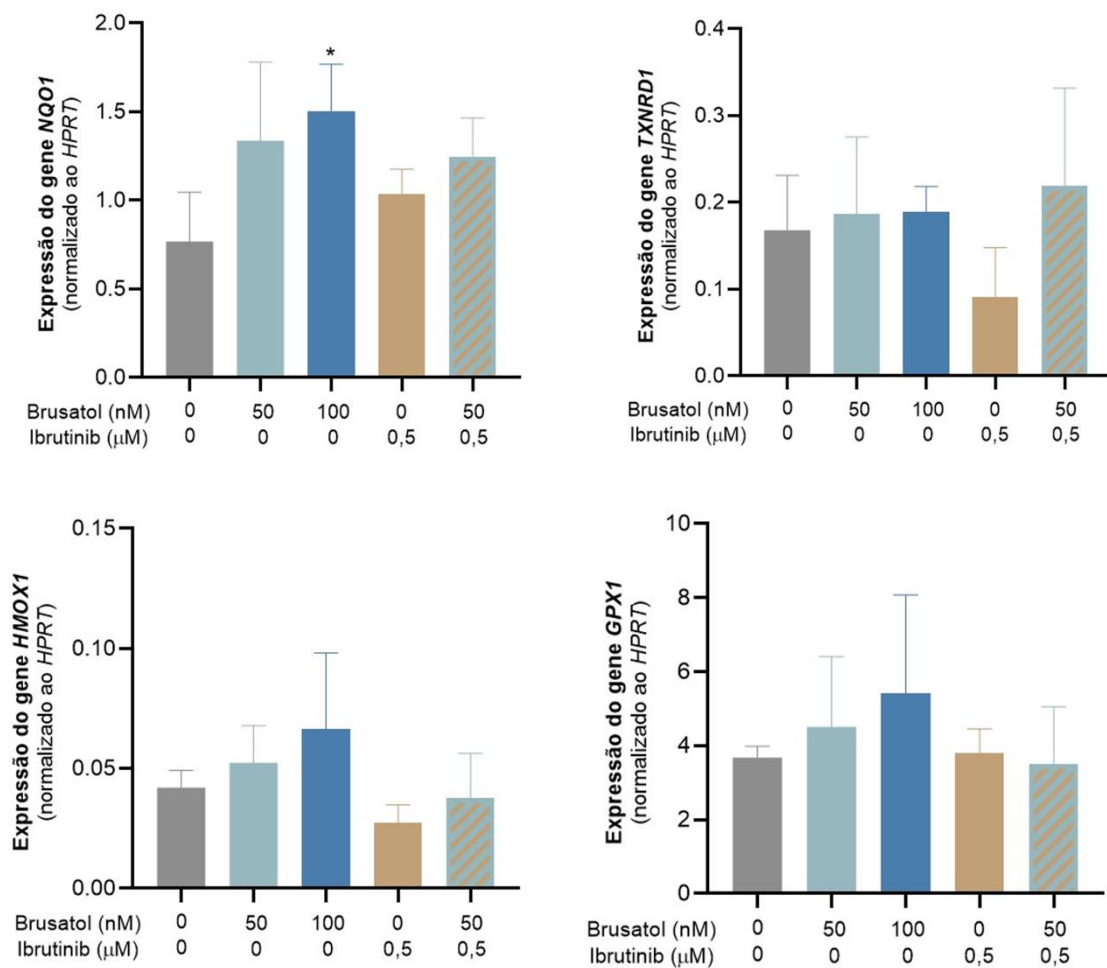


Figura 27: Análise da expressão de genes envolvidos na via NRF2. As células HG-3 foram incubadas na ausência e na presença de brusatol e ibrutinib em monoterapia e em combinação. Os níveis de expressão dos genes *KEAP1*, *NF-κB1*, *NQO1*, *TXNRD1*, *HMOX1* e *GPX1* foram avaliados por qPCR. Os resultados foram obtidos após 48 horas de incubação e representam a média ± SEM de 4 experiências independentes. Na análise estatística foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Dunnett's. Comparativamente à condição CTL, * p<0,05 para todas as condições.

4.DISSCUSSÃO

A LLC que se caracteriza pela proliferação e acumulação de pequenos linfócitos B monoclonais, tipicamente CD5⁺, no sangue, medula óssea e outros tecidos linfóides, como o baço, é considerada o tipo de leucemia mais comum nos países ocidentais.

O interesse pelo NRF2 surgiu quando vários estudos demonstraram que esta proteína se encontra associada à progressão e formação de metástases tumorais. Além destas funções que o NRF2 exerce no cancro, ele também parece desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento da resistência das células tumorais à terapêutica utilizada, principalmente contra agentes quimioterapêuticos. No contexto da LLC, tem sido demonstrado que existe um aumento de expressão do fator de transcrição NRF2 nas células linfóides em relação às células normais.

Assim, o objetivo do nosso estudo foi avaliar o potencial terapêutico de dois inibidores do NRF2 em monoterapia e em combinação com um fármaco já aprovado para o tratamento da LLC, o ibrutinib (um inibidor da tirosina cinase de Bruton). Como inibidores do NRF2 foram utilizados os compostos brusatol e ML385. No presente estudo, foi utilizado um modelo *in vitro* de LLC, a linha celular HG-3.

O esquema de combinação utilizado neste estudo poderá permitir não só a utilização de dois fármacos com alvos terapêuticos distintos ao mesmo tempo, como o aumento da eficácia terapêutica e a redução de possíveis efeitos adversos, uma vez que se utilizaram doses mais baixas do que em monoterapia.

O primeiro passo deste estudo foi avaliar os níveis de expressão dos genes *NFE2L2* e *KEAP1*, por qPCR. Este passo foi essencial para determinar se os alvos terapêuticos do brusatol e ML385 se encontravam expressos nas células HG-3. Embora os níveis das proteínas NRF2 e KEAP1 não tenham sido avaliados, os resultados determinaram que, de facto, esta linha celular expressava ambos os genes, o que nos permitiu prosseguir com o estudo.

Ambos os inibidores do NRF2, brusatol e ML385, demonstraram diminuir a atividade metabólica de forma dependente da dose e do tempo. No entanto, a linha celular HG-3 parece ser mais sensível ao fármaco brusatol do que ao ML385, uma vez que o IC₅₀ do brusatol foi 5000 vezes inferior ao do ML385 (brusatol, IC₅₀: 100 nM às 48 horas). Apesar do ML385, também, reduzir a atividade metabólica das células HG-3, o IC₅₀ é superior a 500 µM após 48 horas de incubação. No entanto, num estudo realizado em células do cancro do pulmão de células não pequenas, observou-se que estas células são bastante

sensíveis a este composto, uma vez, que o IC₅₀ foi de 1,9 µM, sugerindo que o ML385 é dependente do tipo celular [109].

Em 2016, quando Singh *et al.* descobriram que o ML385 se destacava como um novo inibidor específico para o NRF2, também descreveram que este fármaco apenas parecia ter efeito nas linhas celulares que possuíam mutações de perda/ganho de função do KEAP1/NRF2, respetivamente. O tratamento com ML385 em células de cancro do pulmão de células não pequenas (A549 e H460), que possuíam uma mutação de perda de função do KEAP1, resultaram na diminuição da formação de colónias, dependente da dose (em doses compreendidas entre 1 e 10 µM). No entanto, numa linha celular sem a mutação no KEAP1, as mesmas concentrações de ML385 não foram eficazes, demonstrando que estas células sem a mutação KEAP1 são resistentes ao tratamento, o que significa que a presença e ausência desta mutação pode constituir um biomarcador de resposta ao ML385. Numa linha celular do epitélio pulmonar não cancerígena (que não possui qualquer mutação no KEAP1 ou NRF2) também não foram observadas alterações no número de colónias com as diferentes concentrações de ML385, demonstrando que este fármaco atua, seletivamente, em células cancerígenas. Pelos nossos resultados verificou-se um efeito pouco significativo na redução da atividade metabólica com o ML385, em doses baixas. Outro estudo semelhante, realizado em células do cancro do pulmão também demonstrou que o ML385 (doses entre 0,25 e 5 µM) inibiu, de uma forma mais eficaz, a proliferação de células portadoras da mutação no KEAP1 em relação a células que não possuíam tal mutação [138]. O ML385 (5 µM) também demonstrou ser eficaz no cancro da próstata resistente à castração, pela inibição da tumorigénese, sendo mais eficaz quando combinado com um inibidor da autofagia [139]. Uma hipótese que justificaria a baixa sensibilidade das células HG-3 ao ML385 seria a ausência de mutação nas proteínas KEAP1/ NRF2 nesta linha celular, pelo que a sua avaliação poderia ajudar a clarificar melhor a ação do ML385 nesta linha celular de LLC.

Um estudo dirigido por Mata-Greenwood *et al.*, demonstrou que o brusatol (em concentração inferior a 25 ng/mL ≈ 50 nM) diminuiu a viabilidade celular em linhas celulares de leucemia mielóide crónica e aguda e leucemia linfoblástica aguda (NB4, U937, BV173, SUPB13, RS4;11, Daudi e DHL-6) [140]. No entanto, as linhas celulares HL-60, K562, Kasumi-1 e Reh evidenciaram ser menos sensíveis, uma vez que o efeito do brusatol (50-100 ng/mL ≈ 100-200 nM) não foi tão significativo na indução de citotoxicidade. A sensibilidade destas linhas celulares para o brusatol foi justificada pelo

fato das células mais sensíveis possuírem a mutação no gene *TP53*, enquanto as células menos sensíveis não apresentavam essa mesma mutação. Ambas as linhas SUPB13 e Reh são de linhagem B, no entanto verificou-se que o brusatol teve efeitos distintos. Por um lado, o IC_{50} do brusatol nas células SUPB13 foi de, aproximadamente 50nM, enquanto nas células Reh foi de 100 nM. Segundo a base de dados da DepMap Portal, as células HG-3 não possuem mutação no gene *TP53*. Essa informação está de acordo com os resultados do artigo acima mencionado, uma vez que, o comportamento do brusatol nas células HG-3 foi semelhante aos resultados obtidos nas células Reh (um tipo de células menos sensíveis e sem mutação *TP53*), pois o IC_{50} nas células HG-3 com o brusatol foi de, aproximadamente, 110 nM. A variação da sensibilidade do fármaco brusatol foi observada também em diferentes linhas celulares da mesma patologia, leucemia linfoblástica aguda [141]. Células de LLA de linhagem B foram mais sensíveis ao brusatol ($IC_{50}=1,4$ nM) do que células de LLA de linhagem T ($IC_{50}=7,4$ nM nas células CEM e 7,8 nM nas células MOLT-4). Estes resultados indicam que a sensibilidade das linhas celulares pode variar, mesmo dentro da mesma patologia, sendo dependentes das características celulares (B ou T) e genéticas (presença ou ausência de mutação *TP53*, por exemplo).

Os nossos resultados demonstraram que a combinação brusatol/ibrutinib conduziram a níveis de atividade metabólica superiores à soma da redução induzida pelos fármacos isoladamente (efeito sinérgico). Apesar do ibrutinib ser o tratamento central na LLC, ainda existem algumas limitações na utilização deste fármaco, como a baixa taxa de remissão completa, o desenvolvimento de resistência, efeitos adversos induzidos pela inibição de outros alvos moleculares e o uso prolongado do composto [97]. A associação realizada no nosso estudo permite que se utilizem doses bastante baixas em relação às doses utilizadas em monoterapia (IC_{50} do brusatol \approx 100 nM e IC_{50} do ML385 \approx 500 μ M) e desta forma, pode evitar as limitações provenientes do uso do ibrutinib em monoterapia. A combinação entre o brusatol e o ML385 não demonstrou ter eficácia para o tratamento na linha celular HG-3. Através dos estudos com a resazurina observou-se uma ligeira diminuição da atividade metabólica quando usados em associação, mas o IC_{50} nunca foi alcançado.

Devido ao efeito do ML385 em monoterapia e em combinação com o ibrutinib não ter sido significativo na linha celular em estudo, os estudos com este fármaco não foram continuados. Uma vez que o brusatol se revelou um melhor agente farmacológico, apenas foram continuados os estudos com este fármaco, em monoterapia e em

combinação com o ibrutinib. Além disso, alguns estudos já demonstraram que o brusatol apresenta potencial como coadjuvante de quimioterápicos. Por exemplo, observou-se que o brusatol aumentou a eficácia terapêutica quando associado aos fármacos gemcitabina e cisplatina, no cancro do pâncreas e pulmão, respetivamente [142], [143]. Também em estudos *in vitro*, realizados em cancros positivos para HER2, se demonstrou que o brusatol em combinação com o trastuzumab teve um efeito sinérgico [144].

A diminuição da atividade metabólica das células HG-3, quando expostas ao brusatol (50, 100 e 250 nM), é o resultado do efeito citotóxico e citostático deste composto. Através da citometria de fluxo, observou-se uma redução de percentagem de células viáveis e um aumento de células, principalmente, em apoptose tardia/necrose. Também noutras patologias, tais como no carcinoma da nasofaringe (em células CNE-1), cancro do pulmão de pequenas células (nas células PC9) e em adenomas na hipófise (nas células GH3 e MMQ), o fármaco brusatol induziu morte celular por apoptose [145], [146], [147]. Um trabalho realizado por Xiang *et al.* concluiu que o brusatol induzia apoptose em células do pâncreas através da via intrínseca, um mecanismo também observado neste estudo, uma vez que se determinou que o brusatol diminuiu o potencial da membrana mitocondrial, o que significa que estão a ser produzidos sinais intracelulares na mitocôndria que podem conduzir à morte celular por apoptose pela via mitocondrial ou intrínseca [148]. Estes resultados foram confirmados através da observação morfológica das células por microscopia ótica, tendo-se verificado que o tratamento das células HG-3 com brusatol induziu alterações características de apoptose, como a presença de *blebbing*. Além da baixa viabilidade celular das células, também se verificou, pela análise do ciclo celular, que o brusatol levava a um bloqueio na fase G₀/G₁ do ciclo celular. [143] Estes resultados corroboram os obtidos noutras linhas celulares de doenças hematológicas, nomeadamente, em LLA (Reh e SUPB13), LMA (HL-60 e Kasumi-1) e LMC (K562), onde, também, se observou um bloqueio do ciclo celular na fase G₀/G₁ [140]. O bloqueio nesta fase do ciclo pode indicar que o brusatol inibe a síntese de DNA. Efetivamente, um estudo já relatou que este composto tem a capacidade de inibir a síntese de DNA, RNA e proteínas, assim como a fosforilação oxidativa em células p-388 de leucemia linfocítica [143].

Quando estudados em associação, os fármacos brusatol e ibrutinib induziram morte celular por apoptose tardia/ necrose e apoptose inicial. A diminuição da percentagem de células viáveis foi maior quando as células HG-3 foram tratadas em combinação em

relação ao tratamento em monoterapia com cada um dos fármacos. Estes resultados indicam que esta associação pode ser benéfica para garantir uma boa eficácia com doses muito inferiores às utilizadas em monoterapia. A combinação entre o brusatol e o ibrutinib, também, promoveram um aumento da percentagem de células na fase G_0/G_1 , o que indica que esta combinação também desencadeia o bloqueio do ciclo celular nesta mesma fase.

A apoptose é um processo muito bem regulado nas células eucarióticas, no entanto em células cancerígenas este processo encontra-se muitas vezes desregulado, e quando inibido resulta na proliferação celular descontrolada, no desenvolvimento e progressão do tumor e na resistência às terapias utilizadas [149]. Desta forma, a estimulação da apoptose mediada pelos fármacos em estudo, quer em monoterapia, quer em combinação, pode contribuir para a eficácia terapêutica [150]. Uma vez que o ciclo celular é essencial para a proliferação celular, a interrupção do mesmo pode ser essencial para impedir a progressão do tumor.

As espécies reativas de oxigénio e nitrogénio são produzidas na sequência de processos metabólicos que ocorrem no organismo. Embora níveis baixos destes radicais possam ser benéficos para as células, auxiliando na sobrevivência e proliferação celular, níveis elevados causam lesões em biomoléculas chave (DNA, lípidos e proteínas), como alterações nas vias de sinalização envolvidas na proliferação, metastização e morte celular, na resposta inflamatória ou imunológica. De forma a reduzir os níveis de ROS/RNS são produzidas moléculas antioxidantes, como a glutathiona reduzida (GSH). No contexto da LLC já foi demonstrado que o NRF2, o principal fator nuclear na defesa antioxidante contra estes radicais, se encontra elevado e constitutivamente ativo, mantendo os níveis de ROS/RNS baixos e, conseqüentemente, impedindo que as células tumorais sejam eliminadas. Assim, avaliar as ROS/RNS e os agentes antioxidantes é bastante relevante no sentido de se entender se o brusatol, um inibidor do NRF2, exerce os seus efeitos terapêuticos através da indução de stresse oxidativo.

Neste estudo verificou-se que o brusatol aumentou todas as ROS/RNS e reduziu os níveis de GSH, o que se traduziu num aumento do stresse oxidativo (razão ROS/GSH). Este aumento foi, mais uma vez, dependente da dose de brusatol utilizada, sendo que a dose de 250 nM foi a que teve um efeito mais significativo. O aumento dos níveis destas espécies, pode ser consequência da inibição do NRF2 pelo brusatol. Uma vez que o NRF2 é inibido, este fica impedido de ativar a transcrição de genes citoprotetores

contra estas espécies o que, conseqüentemente, resulta num aumento das mesmas, que ficam disponíveis para danificar componentes presentes nas células linfóides. No entanto, observámos que o brusatol não parece influenciar a transcrição de genes do NRF2. Apesar da expressão génica não se encontrar alterada não significa que não possa existir uma diminuição da expressão proteica que conduzem, conseqüentemente, ao aumento das ROS/RNS nas células. O brusatol pode até mesmo induzir a degradação das respetivas proteínas que seriam codificadas pelos genes alvo do NRF2. Uma vez aumentadas, as ROS/RNS podem, agora, induzir lesões oxidativas ao DNA e limitar a proliferação celular das células tumorais. Um estudo realizado em células do cancro do pâncreas demonstrou que o brusatol conseguiu superar a quimiorresistência à gemcitabina através da inibição da função do NRF2 e do aumento dos níveis das ROS [142]. O brusatol também aumentou a radiosensibilidade em células do cancro do pulmão pelo aumento dos níveis de ROS e pelo agravamento de lesões no DNA [151]. Através dos nossos resultados, observámos que o ibrutinib não teve efeito significativo na alteração dos níveis de peróxidos intracelulares, anião superóxido, ROS de origem mitocondrial e óxido nítrico. No entanto, observou-se uma redução dos níveis de glutathiona reduzida após a administração de 0,5 µM de ibrutinib. Este resultado já tinha sido demonstrado em culturas primárias de LLC, em que de facto, o ibrutinib reduz os níveis de glutathiona reduzida [152]. No entanto, nesse estudo sugeriu-se que o tratamento com o ibrutinib resultou na redução da síntese de glutathiona e não da diminuição da sua biodisponibilidade. A combinação brusatol/ibrutinib conduziu ao aumento das ROS/RNS. O aumento destas espécies foi significativo, principalmente, em relação aos níveis do anião superóxido e ROS de origem mitocondrial em comparação com os fármacos em monoterapia, indicando, mais uma vez, que esta combinação pode ser benéfica para o tratamento da LLC. Estes resultados demonstram a indução de stresse oxidativo, pelo aumento de produção das ROS e diminuição de antioxidantes, que será fundamental na citotoxicidade contra as células da LLC.

A acumulação excessiva de ROS pode, ainda, resultar na disfunção da mitocôndria, provocar lesões no DNA e apoptose [153]. A lesão de lípidos provocada pelas ROS afeta, negativamente, o potencial da membrana mitocondrial, resultando na formação e abertura de poros na membrana interna da mitocôndria [conhecido como transição de permeabilidade mitocondrial (TPM)]. Assim, outro parâmetro avaliado no nosso estudo foi o potencial da membrana mitocondrial.

O brusatol nas doses 100 e 250 nM diminuiu, de forma significativa, o potencial da membrana mitocondrial. Esta descoberta pode confirmar, mais uma vez, a indução de apoptose nas células HG-3, através do composto brusatol. Ao promover a abertura de poros na membrana da mitocôndria, as ROS conduzem, também, à libertação de proteínas intermembranares mitocondriais, tais como o citocromo C, para o citoplasma [153], [154]. Por sua vez, no citoplasma, essa proteína associa-se a outros componentes, como a Apaf-1 e caspase-9, induzindo a ativação de várias caspases específicas para iniciar o processo de morte celular, por apoptose. Estes resultados estão de acordo com outros estudos onde, também, foi avaliado o potencial da membrana mitocondrial. Em células do cancro do pulmão de células não pequenas (PC9), por exemplo, o brusatol induziu de forma significativa a despolarização da membrana mitocondrial [146]. Mais uma vez o brusatol demonstrou induzir apoptose através da via intrínseca, pela despolarização da membrana mitocondrial.

Sabe-se que o NRF2 é responsável por regular muitos genes, que podem estar envolvidos quer na resposta citoprotetora, no metabolismo de lípidos ou na transcrição de genes [86]. Assim, e de modo a saber se a inibição do NRF2, pelo brusatol, provoca alterações na expressão de alguns genes, por ele regulados, recorreu-se á técnica de qPCR. Os genes *KEAP1*, *NQO1*, *TXNRD1*, *HMOX1* e *GPX1* foram então analisados. Uma vez que a via antioxidante NRF2 pode encontrar-se interligada com a via pró inflamatória do NF- κ B, também o gene *NF- κ B1* (responsável pela codificação da proteína NF- κ B1) foi estudado [155].

Através dos nossos resultados observou-se que o brusatol não parece influenciar diretamente a atividade transcricional do NRF2, uma vez que não se observaram resultados significativos em praticamente todos os genes, com exceção do *NQO1*. Como demonstrado por outros autores, o brusatol não parece inibir de forma seletiva o NRF2, pois verificou-se que a expressão génica do *NFE2L2* não era alterada após a exposição a este fármaco, mas havia diminuição da expressão proteica [143], [156]. Assim, apesar de não se observarem alterações na transcrição de genes pelo NRF2, após a sua inibição, o brusatol pode estar a degradar a sua proteína. Além disso, este fármaco também poderá estar a promover a degradação das proteínas que seriam codificadas pelos genes estudados. Através destes resultados pode-se determinar que o brusatol induz morte celular através do aumento das ROS/RNS.

O gene *NQO1* (que codifica a proteína NQO1), regulado pelo NRF2, pertence há família das enzimas metabólicas de fármacos e consegue catalisar a redução de dois

eletrões de uma quinona para formar a hidroquinona [157], [158]. Na literatura não foram encontrados estudos onde o brusatol induzisse o aumento de expressão do gene *NQO1*. De facto, em todos os projetos onde a expressão proteica/ génica do *NQO1* foi avaliada, o brusatol diminuiu a sua expressão. No entanto, os nossos resultados demonstram o contrário e o aumento de expressão do *NQO1* chega a ser significativo na dose de 100 nM. Esse efeito contraditório pode ser justificado por estarmos a utilizar uma linha celular e uma patologia diferente das dos estudos anteriores. Além disso, a expressão do gene *NQO1* não pode ser diretamente comparável com o nível de expressão proteica, uma vez que o gene pode não ser traduzido.

Em resumo, este estudo, *in vitro*, demonstrou que o brusatol poderá ser um potencial fármaco para o tratamento da LLC. O brusatol provou ser mais eficaz que o ML385 e em combinação com o ibrutinib apresentava um efeito sinérgico, permitindo a utilização de doses mais baixas que em monoterapia e ao mesmo tempo reduzindo os possíveis efeitos adversos. No entanto, deve ser realçado que o efeito desta terapêutica apenas foi estudado numa única linha celular de LLC, as células HG-3.

5. CONCLUSÃO

Através deste estudo foi possível avaliar o potencial terapêutico de dois inibidores do NRF2, o brusatol e o ML385, num modelo *in vitro* de leucemia linfocítica crónica, a linha celular HG-3. Além do potencial terapêutico destes compostos ter sido estudado em monoterapia, também foi avaliado em combinação com o ibrutinib, um fármaco já utilizado na clínica para o tratamento desta patologia. Assim, através dos estudos efetuados retiraram-se as seguintes conclusões:

1. O brusatol e o ibrutinib diminuem a atividade metabólica de forma dependente da dose e do tempo, na linha celular HG-3. No entanto, estas células foram mais sensíveis ao brusatol, que alcançou o IC₅₀ com, aproximadamente, 100 nM, enquanto que o do ML385 foi superior (IC₅₀ superior a 500 µM).
2. A combinação entre o brusatol e o ibrutinib demonstrou ter um efeito sinérgico, principalmente às 48 e 72h de incubação. Por sua vez, a combinação entre o ML385 e o ibrutinib não apresentou um efeito benéfico.
3. O brusatol induz efeito citotóxico mediado, principalmente, por apoptose e efeito citostático por bloqueio do ciclo celular em fase G₀/G₁. A combinação entre o brusatol e ibrutinib também demonstrou efeito citotóxico e citostático mediado pelos mesmos mecanismos.
4. A morte celular por apoptose após a exposição das células HG-3 ao brusatol, em monoterapia e em associação com o ibrutinib pode estar relacionada com a diminuição do potencial da membrana mitocondrial demonstrando que esta terapêutica induziu a despolarização da membrana mitocondrial e, conseqüentemente, disfunção mitocondrial.
5. A disfunção mitocondrial e morte celular induzidas pelo brusatol em monoterapia e em combinação com o ibrutinib podem ser mediadas pelo stresse oxidativo, uma vez que os fármacos induziram aumento das espécies reativas de oxigénio (peróxidos e anião superóxido) e de nitrogénio (óxido nítrico) e diminuição da glutathiona reduzida com aumento da razão ROS/ GSH.
6. Não foram observadas alterações, estatisticamente significativas, nos níveis de expressão dos genes envolvidos na via de sinalização do NRF2 (*KEAP1*, *NF-κB1*, *NQO1*, *TXNRD1*, *HMOX1* e *GPX1*), em todas as condições.

Em conclusão, este estudo permitiu elucidar que o brusatol poderá ser um potencial agente farmacológico para a terapêutica da LLC, em monoterapia e como coadjuvante do tratamento com ibrutinib. Apesar do ibrutinib ser o tratamento central para a LLC, ainda existem algumas limitações na utilização deste fármaco. Assim, a combinação entre estes dois compostos poderá ser uma alternativa na abordagem terapêutica, uma vez que esta se revelou bastante eficaz neste estudo *in vitro*. Esta escolha terapêutica também poderia vir a diminuir possíveis efeitos adversos do ibrutinib, uma vez que se está a utilizar doses bastante baixas. De modo a poder clarificar o mecanismo desta abordagem terapêutica alguns estudos complementares poderiam ser realizados. Por exemplo, podiam ser avaliados os níveis das proteínas codificadas pelos genes transcritos pelo NRF2 e podia-se fazer uma análise de forma a perceber se a linha celular HG-3 possui alguma mutação no KEAP1 ou NRF2. Também se poderiam repetir os estudos noutras linhas celulares da LLC, para verificar se a sensibilidade encontrada nesta linha era semelhante com outras células.

6. REFERÊNCIAS

- [1] L. Ramaiah, D. I. Bounous, and S. A. Elmore, "Hematopoietic System," in *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*, Elsevier Inc., 2013, pp. 1863–1933. doi: 10.1016/B978-0-12-415759-0.00050-9.
- [2] D. A. Alagpulinsa, M. P. Toribio, I. Alhallak, and R. J. Shmookler Reis, "Advances in understanding the molecular basis of clonal hematopoiesis," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 28, no. 5. Elsevier Ltd, pp. 360–377, May 01, 2022. doi: 10.1016/j.molmed.2022.03.002.
- [3] S. N. Hurwitz, S. K. Jung, and P. Kurre, "Hematopoietic stem and progenitor cell signaling in the niche," *Leukemia*, vol. 34, no. 12. Springer Nature, pp. 3136–3148, Dec. 01, 2020. doi: 10.1038/s41375-020-01062-8.
- [4] T. C. Luis, N. M. B. Killmann, and F. J. T. Staal, "Signal transduction pathways regulating hematopoietic stem cell biology: Introduction to a series of Spotlight Reviews," *Leukemia*, vol. 26, no. 1. pp. 86–90, Jan. 2012. doi: 10.1038/leu.2011.260.
- [5] I. Godin, "Ontogeny of the Hematopoietic System," in *Kaufman's Atlas of Mouse Development Supplement*, Elsevier, 2016, pp. 111–120. doi: 10.1016/b978-0-12-800043-4.00008-7.
- [6] E. S. Fasouli and E. Katsantoni, "JAK-STAT in Early Hematopoiesis and Leukemia," *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 9. Frontiers Media S.A., May 14, 2021. doi: 10.3389/fcell.2021.669363.
- [7] S. Duddu, R. Chakrabarti, A. Ghosh, and P. C. Shukla, "Hematopoietic Stem Cell Transcription Factors in Cardiovascular Pathology," *Frontiers in Genetics*, vol. 11. Frontiers Media S.A., Oct. 16, 2020. doi: 10.3389/fgene.2020.588602.
- [8] A. A. Ferrando and C. López-Otín, "Clonal evolution in leukemia," *Nature Medicine*, vol. 23, no. 10. Nature Publishing Group, pp. 1135–1145, 2017. doi: 10.1038/nm.4410.
- [9] F. Wang *et al.*, "Iron and leukemia: New insights for future treatments," *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, vol. 38. BioMed Central Ltd., 2019. doi: 10.1186/s13046-019-1397-3.
- [10] N. Bibi, M. Sikandar, I. U. Din, A. Almogren, and S. Ali, "IOMT-based automated detection and classification of leukemia using deep learning," *J Healthc Eng*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/6648574.
- [11] T. J. Kipps *et al.*, "Chronic lymphocytic leukaemia," *Nat Rev Dis Primers*, vol. 3, Jan. 2017, doi: 10.1038/nrdp.2016.96.
- [12] "Chronic Lymphocytic Leukemia - Cancer Stat Facts." SEER. Retrieved January 13, 2022, from <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html>

- [13] M. Hallek and O. Al-Sawaf, "Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures," *Am J Hematol*, vol. 96, no. 12, pp. 1679–1705, Dec. 2021, doi: 10.1002/ajh.26367.
- [14] F. Bosch and R. Dalla-Favera, "Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment," *Nature Reviews Clinical Oncology*, vol. 16, no. 11. Nature Publishing Group, pp. 684–701, Nov. 01, 2019. doi: 10.1038/s41571-019-0239-8.
- [15] P. Cramer and M. Hallek, "Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia-what do we need to know?," *Nature Reviews Clinical Oncology*, vol. 8, no. 1. Nature Publishing Group, pp. 38–47, 2011. doi: 10.1038/nrclinonc.2010.167.
- [16] F. P. S. Santos and S. O'brien, "Small Lymphocytic Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia Are They the Same Disease?," 2012. [Online]. Available: www.journalppo.com
- [17] A. C. Rawstron *et al.*, "Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project," *Cytometry B Clin Cytom*, vol. 94, no. 1, pp. 121–128, Jan. 2018, doi: 10.1002/cyto.b.21595.
- [18] N. Chiorazzi, S. S. Chen, and K. R. Rai, "Chronic lymphocytic leukemia," *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 11, no. 2, pp. 1–35, Feb. 2021, doi: 10.1101/cshperspect.a035220.
- [19] U. Rozovski, M. J. Keating, and Z. Estrov, "Why Is the Immunoglobulin Heavy Chain Gene Mutation Status a Prognostic Indicator in Chronic Lymphocytic Leukemia?," *Acta Haematologica*, vol. 140, no. 1. S. Karger AG, pp. 51–54, Sep. 01, 2018. doi: 10.1159/000491382.
- [20] J. A. Burger and A. Wiestner, "Targeting B cell receptor signalling in cancer: Preclinical and clinical advances," *Nature Reviews Cancer*, vol. 18, no. 3. Nature Publishing Group, pp. 148–167, Mar. 01, 2018. doi: 10.1038/nrc.2017.121.
- [21] L. Scarfò, A. J. M. Ferreri, and P. Ghia, "Chronic lymphocytic leukaemia," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 104. Elsevier Ireland Ltd, pp. 169–182, Aug. 01, 2016. doi: 10.1016/j.critrevonc.2016.06.003.
- [22] K. Crassini, W. S. Stevenson, S. P. Mulligan, and O. G. Best, "Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia," *British Journal of Haematology*, vol. 186, no. 5. Blackwell Publishing Ltd, pp. 668–684, 2019. doi: 10.1111/bjh.16102.
- [23] E. ten Hacken, M. Gounari, P. Ghia, and J. A. Burger, "The importance of B cell receptor isotypes and stereotypes in chronic lymphocytic leukemia," *Leukemia*,

- vol. 33, no. 2. Nature Publishing Group, pp. 287–298, Feb. 01, 2019. doi: 10.1038/s41375-018-0303-x.
- [24] G. Fabbri and R. Dalla-Favera, “The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 16, no. 3. Nature Publishing Group, pp. 145–162, Mar. 01, 2016. doi: 10.1038/nrc.2016.8.
- [25] K. Basso and R. Dalla-Favera, “Germinal centres and B cell lymphomagenesis,” *Nat Rev Immunol*, vol. 15, no. 3, pp. 172–184, Mar. 2015, doi: 10.1038/nri3814.
- [26] J. Delgado, F. Nadeu, D. Colomer, and E. Campo, “Chronic lymphocytic leukemia: From molecular pathogenesis to novel therapeutic strategies,” *Haematologica*, vol. 105, no. 9. Ferrata Storti Foundation, pp. 2205–2217, Sep. 01, 2020. doi: 10.3324/haematol.2019.236000.
- [27] A. Condoluci and D. Rossi, “Genetic mutations in chronic lymphocytic leukemia: impact on clinical treatment,” *Expert Review of Hematology*, vol. 12, no. 2. Taylor and Francis Ltd, pp. 89–98, Feb. 01, 2019. doi: 10.1080/17474086.2019.1575130.
- [28] R. Guì Eze and C. J. Wu, “Review Series CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA: TAKING A BIG LEAP FORWARD Genomic and epigenomic heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia,” 2015, doi: 10.1182/blood-2015-02.
- [29] Y. Kikushige, “Pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia and the development of novel therapeutic strategies,” *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology*, vol. 60, no. 4, pp. 146–158, 2020, doi: 10.3960/jslrt.20036.
- [30] T. Zenz, D. Mertens, H. Döhner, and S. Stilgenbauer, “Importance of genetics in chronic lymphocytic leukemia,” *Blood Rev*, vol. 25, no. 3, pp. 131–137, May 2011, doi: 10.1016/j.blre.2011.02.002.
- [31] M. Putowski and K. Giannopoulos, “Perspectives on precision medicine in chronic lymphocytic leukemia: Targeting recurrent mutations—NOTCH1, SF3B1, MYD88, BIRC3,” *Journal of Clinical Medicine*, vol. 10, no. 16. MDPI, Aug. 02, 2021. doi: 10.3390/jcm10163735.
- [32] M. Shahjahani *et al.*, “Molecular basis of chronic lymphocytic leukemia diagnosis and prognosis,” *Cellular Oncology*, vol. 38, no. 2. Kluwer Academic Publishers, pp. 93–109, Apr. 01, 2015. doi: 10.1007/s13402-014-0215-3.
- [33] J. C. Aster, W. S. Pear, and S. C. Blacklow, “The Varied Roles of Notch in Cancer,” *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, vol. 12. Annual Reviews Inc., pp. 245–275, Jan. 24, 2017. doi: 10.1146/annurev-pathol-052016-100127.

- [34] C.-H. Yeh, R. Moles, and C. Nicot, "Clinical significance of microRNAs in chronic and acute human leukemia," *Mol Cancer*, vol. 15, no. 1, p. 37, Dec. 2016, doi: 10.1186/s12943-016-0518-2.
- [35] B. Cui *et al.*, "MicroRNA-155 influences B-cell receptor signaling and associates with aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia," *Blood*, vol. 124, no. 4, pp. 546–554, Jul. 2014, doi: 10.1182/blood-2014-03-559690.
- [36] M. Hallek *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*, vol. 111, no. 12. American Society of Hematology, pp. 5446–5456, Jun. 15, 2008. doi: 10.1182/blood-2007-06-093906.
- [37] P. Strati, N. Jain, and S. O'Brien, "Chronic Lymphocytic Leukemia: Diagnosis and Treatment," *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 93, no. 5. Elsevier Ltd, pp. 651–664, May 01, 2018. doi: 10.1016/j.mayocp.2018.03.002.
- [38] M. Hallek, "Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment," *Am J Hematol*, vol. 94, no. 11, pp. 1266–1287, Nov. 2019, doi: 10.1002/ajh.25595.
- [39] B. Jakšić *et al.*, "Guidelines for diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia. Krohem B-CLL 2017," *Acta Clin Croat*, vol. 57, no. 1, pp. 190–215, 2018, doi: 10.20471/acc.2018.57.01.27.
- [40] S. Sharma and K. R. Rai, "Chronic lymphocytic leukemia (CLL) treatment: So many choices, such great options," *Cancer*, vol. 125, no. 9. John Wiley and Sons Inc., pp. 1432–1440, May 01, 2019. doi: 10.1002/cncr.31931.
- [41] J. Á. Hernández-Rivas and I. González-Gascón, "Genetic Heterogeneity in Chronic Lymphocytic Leukemia: What Can Conventional Cytogenetics Add?," *Acta Haematologica*, vol. 138, no. 1. S. Karger AG, pp. 31–32, Aug. 01, 2017. doi: 10.1159/000477997.
- [42] K. R. Rai and P. Jain, "Chronic lymphocytic leukemia (CLL)-Then and now," *Am J Hematol*, vol. 91, no. 3, pp. 330–340, Mar. 2016, doi: 10.1002/ajh.24282.
- [43] C. Gorrini, I. S. Harris, and T. W. Mak, "Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 12, no. 12. pp. 931–947, Dec. 2013. doi: 10.1038/nrd4002.
- [44] L. Gambhir, V. Sharma, P. Kandwal, and S. Saxena, "Perturbation in cellular redox homeostasis: Decisive regulator of T cell mediated immune responses," *International Immunopharmacology*, vol. 67. Elsevier B.V., pp. 449–457, Feb. 01, 2019. doi: 10.1016/j.intimp.2018.12.049.

- [45] S. Trombetti *et al.*, “Oxidative stress and ros-mediated signaling in leukemia: Novel promising perspectives to eradicate chemoresistant cells in myeloid leukemia,” *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 5, pp. 1–19, Mar. 2021, doi: 10.3390/ijms22052470.
- [46] L. Milkovic, A. C. Gasparovic, M. Cindric, P. A. Mouthuy, and N. Zarkovic, “Short overview of ROS as cell function regulators and their implications in therapy concepts,” *Cells*, vol. 8, no. 8. MDPI, Aug. 01, 2019. doi: 10.3390/cells8080793.
- [47] V. Tretter, B. Hochreiter, M. L. Zach, K. Krenn, and K. U. Klein, “Understanding cellular redox homeostasis: A challenge for precision medicine,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 1. MDPI, Jan. 01, 2022. doi: 10.3390/ijms23010106.
- [48] P. D. Ray, B. W. Huang, and Y. Tsuji, “Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling,” *Cellular Signalling*, vol. 24, no. 5. pp. 981–990, May 2012. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008.
- [49] J. D. Hayes, A. T. Dinkova-Kostova, and K. D. Tew, “Oxidative Stress in Cancer,” *Cancer Cell*, vol. 38, no. 2. Cell Press, pp. 167–197, Aug. 10, 2020. doi: 10.1016/j.ccell.2020.06.001.
- [50] J. N. Moloney and T. G. Cotter, “ROS signalling in the biology of cancer,” *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 80. Elsevier Ltd, pp. 50–64, Aug. 01, 2018. doi: 10.1016/j.semcd.2017.05.023.
- [51] R. Apak, M. Özyürek, K. Güçlü, and E. Çapanoğlu, “Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 3. Reactive Oxygen and Nitrogen Species (ROS/RNS) Scavenging Assays, Oxidative Stress Biomarkers, and Chromatographic/Chemometric Assays,” *J Agric Food Chem*, vol. 64, no. 5, pp. 1046–1070, Feb. 2016, doi: 10.1021/acs.jafc.5b04744.
- [52] J. Li, X. Ran, M. Zhou, K. Wang, H. Wang, and Y. Wang, “Oxidative stress and antioxidant mechanisms of obligate anaerobes involved in biological waste treatment processes: A review,” *Science of The Total Environment*, vol. 838, p. 156454, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.156454.
- [53] S. di Meo, T. T. Reed, P. Venditti, and V. M. Victor, “Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions.,” *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2016, p. 1245049, 2016, doi: 10.1155/2016/1245049.
- [54] S. Sajadimajd and M. Khazaei, “Oxidative Stress and Cancer: The Role of Nrf2,” *Curr Cancer Drug Targets*, vol. 18, no. 6, pp. 538–557, Oct. 2017, doi: 10.2174/1568009617666171002144228.

- [55] B. Perillo *et al.*, “ROS in cancer therapy: the bright side of the moon,” *Experimental and Molecular Medicine*, vol. 52, no. 2. Springer Nature, pp. 192–203, Feb. 01, 2020. doi: 10.1038/s12276-020-0384-2.
- [56] D. Nolfi-Donagan, A. Braganza, and S. Shiva, “Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement,” *Redox Biology*, vol. 37. Elsevier B.V., Oct. 01, 2020. doi: 10.1016/j.redox.2020.101674.
- [57] R. Z. Zhao, S. Jiang, L. Zhang, and Z. bin Yu, “Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review),” *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 44, no. 1. Spandidos Publications, pp. 3–15, 2019. doi: 10.3892/ijmm.2019.4188.
- [58] S. Gaikwad and S. K. Srivastava, “Role of Phytochemicals in Perturbation of Redox Homeostasis in Cancer,” 2021, doi: 10.3390/antiox100.
- [59] S. B. Nimse and D. Pal, “Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms,” *RSC Adv*, vol. 5, no. 35, pp. 27986–28006, 2015, doi: 10.1039/C4RA13315C.
- [60] K. Miazek, K. Beton, A. Śliwińska, and B. Brożek-Płuska, “The Effect of β -Carotene, Tocopherols and Ascorbic Acid as Anti-Oxidant Molecules on Human and Animal In Vitro/In Vivo Studies: A Review of Research Design and Analytical Techniques Used,” *Biomolecules*, vol. 12, no. 8, p. 1087, Aug. 2022, doi: 10.3390/biom12081087.
- [61] M. v. Fanucchi, “Development of Antioxidant and Xenobiotic Metabolizing Enzyme Systems,” in *The Lung*, Elsevier, 2014, pp. 223–231. doi: 10.1016/B978-0-12-799941-8.00011-0.
- [62] Y. Chen, G. Mehta, and V. Vasiliou, “Antioxidant defenses in the ocular surface.,” *Ocul Surf*, vol. 7, no. 4, pp. 176–85, Oct. 2009, doi: 10.1016/s1542-0124(12)70185-4.
- [63] G. D’Arena *et al.*, “Oxidative stress in chronic lymphocytic leukemia: still a matter of debate,” *Leukemia and Lymphoma*, vol. 60, no. 4. Taylor and Francis Ltd, pp. 867–875, Mar. 21, 2019. doi: 10.1080/10428194.2018.1509317.
- [64] A. Ludin *et al.*, “Reactive oxygen species regulate hematopoietic stem cell self-renewal, migration and development, as well as their bone marrow microenvironment,” *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 21, no. 11. Mary Ann Liebert Inc., pp. 1605–1619, Oct. 10, 2014. doi: 10.1089/ars.2014.5941.

- [65] Y. Chen, J. Li, and Z. Zhao, "Redox control in acute lymphoblastic leukemia: From physiology to pathology and therapeutic opportunities," *Cells*, vol. 10, no. 5. MDPI, May 01, 2021. doi: 10.3390/cells10051218.
- [66] C. Dong, N. J. Zhang, and L. J. Zhang, "Oxidative stress in leukemia and antioxidant treatment," *Chinese Medical Journal*, vol. 134, no. 16. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 1897–1907, Aug. 20, 2021. doi: 10.1097/CM9.0000000000001628.
- [67] R. P. Wu *et al.*, "Nrf2 responses and the therapeutic selectivity of electrophilic compounds in chronic lymphocytic leukemia," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no. 16, pp. 7479–7484, Apr. 2010, doi: 10.1073/pnas.1002890107.
- [68] C. Cheng *et al.*, "Inhibition of Nrf2-mediated glucose metabolism by brusatol synergistically sensitizes acute myeloid leukemia to Ara-C," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 142, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.biopha.2021.111652.
- [69] A. Cuadrado *et al.*, "Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 18, no. 4. Nature Publishing Group, pp. 295–317, Apr. 01, 2019. doi: 10.1038/s41573-018-0008-x.
- [70] C. Tonelli, I. I. C. Chio, and D. A. Tuveson, "Transcriptional Regulation by Nrf2," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 29, no. 17. Mary Ann Liebert Inc., pp. 1727–1745, Dec. 10, 2018. doi: 10.1089/ars.2017.7342.
- [71] P. Basak, P. Sadhukhan, P. Sarkar, and P. C. Sil, "Perspectives of the Nrf-2 signaling pathway in cancer progression and therapy," *Toxicology Reports*, vol. 4. Elsevier Inc., pp. 306–318, 2017. doi: 10.1016/j.toxrep.2017.06.002.
- [72] H. Y. Cho, "Genomic structure and variation of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2," *Oxid Med Cell Longev*, 2013, doi: 10.1155/2013/286524.
- [73] P. Telkoparan-Akillilar, E. Panieri, D. Cevik, S. Suzen, and L. Saso, "Therapeutic targeting of the NRF2 signaling pathway in Cancer," *Molecules*, vol. 26, no. 5, Mar. 2021, doi: 10.3390/molecules26051417.
- [74] B. J. Jung, H. S. Yoo, S. Shin, Y. J. Park, and S. M. Jeon, "Dysregulation of NRF2 in cancer: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities," *Biomolecules and Therapeutics*, vol. 26, no. 1. Korean Society of Applied Pharmacology, pp. 57–68, Jan. 01, 2018. doi: 10.4062/biomolther.2017.195.
- [75] M. Y. Song, D. Y. Lee, K. S. Chun, and E. H. Kim, "The role of nrf2/keap1 signaling pathway in cancer metabolism," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 9. MDPI AG, May 01, 2021. doi: 10.3390/ijms22094376.
- [76] A. Kopacz, D. Kloska, H. J. Forman, A. Jozkowicz, and A. Grochot-Przeczek, "Beyond repression of Nrf2: An update on Keap1," *Free Radical Biology and*

- Medicine*, vol. 157. Elsevier Inc., pp. 63–74, Sep. 01, 2020. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.03.023.
- [77] P. Canning, F. J. Sorrell, and A. N. Bullock, “Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 88, no. Part B. Elsevier Inc., pp. 101–107, 2015. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.034.
- [78] B. K. Ooi, K. G. Chan, B. H. Goh, and W. H. Yap, “The Role of Natural Products in Targeting Cardiovascular Diseases via Nrf2 Pathway: Novel Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches,” *Frontiers in Pharmacology*, vol. 9, no. NOV. Frontiers Media S.A., Nov. 15, 2018. doi: 10.3389/fphar.2018.01308.
- [79] W. Dubiel, D. Dubiel, D. A. Wolf, and M. Naumann, “Cullin 3-Based Ubiquitin Ligases as Master Regulators of Mammalian Cell Differentiation,” *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 43, no. 2. Elsevier Ltd, pp. 95–107, Feb. 01, 2018. doi: 10.1016/j.tibs.2017.11.010.
- [80] X. M. Yamamoto, T. W. Kensler, and H. Motohashi, “THE KEAP1-NRF2 SYSTEM: A THIOL-BASED SENSOR-EFFECTOR APPARATUS FOR MAINTAINING REDOX HOMEOSTASIS,” *Physiol Rev*, vol. 98, pp. 1169–1203, 2018, doi: 10.1152/physrev.00023.
- [81] G. Barrera, M. A. Cucci, M. Grattarola, C. Dianzani, G. Muzio, and S. Pizzimenti, “Control of oxidative stress in cancer chemoresistance: spotlight on Nrf2 role,” *Antioxidants*, vol. 10, no. 4. MDPI, 2021. doi: 10.3390/antiox10040510.
- [82] F. Katsuoka and M. Yamamoto, “Small Maf proteins (MafF, MafG, MafK): History, structure and function,” *Gene*, vol. 586, no. 2. Elsevier B.V., pp. 197–205, Jul. 25, 2016. doi: 10.1016/j.gene.2016.03.058.
- [83] Y. Horie *et al.*, “Molecular basis for the disruption of Keap1–Nrf2 interaction via Hinge & Latch mechanism,” *Commun Biol*, vol. 4, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/s42003-021-02100-6.
- [84] D. A. Abed, M. Goldstein, H. Albanyan, H. Jin, and L. Hu, “Discovery of direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as potential therapeutic and preventive agents,” *Acta Pharmaceutica Sinica B*, vol. 5, no. 4. Chinese Academy of Medical Sciences, pp. 285–299, Jul. 01, 2015. doi: 10.1016/j.apsb.2015.05.008.
- [85] E. Kansanen, S. M. Kuosmanen, H. Leinonen, and A. L. Levonenn, “The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer,” *Redox Biology*, vol. 1, no. 1. Elsevier B.V., pp. 45–49, 2013. doi: 10.1016/j.redox.2012.10.001.

- [86] J. D. Hayes and A. T. Dinkova-Kostova, "The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 39, no. 4. Elsevier Ltd, pp. 199–218, 2014. doi: 10.1016/j.tibs.2014.02.002.
- [87] N. Vargas-Mendoza *et al.*, "Flavolignans from silymarin as Nrf2 bioactivators and their therapeutic applications," *Biomedicines*, vol. 8, no. 5. MDPI AG, May 01, 2020. doi: 10.3390/BIOMEDICINES8050122.
- [88] K. Mizumura, S. Maruoka, T. Shimizu, and Y. Gon, "Role of Nrf2 in the pathogenesis of respiratory diseases," *Respiratory Investigation*, vol. 58, no. 1. Elsevier B.V., pp. 28–35, Jan. 01, 2020. doi: 10.1016/j.resinv.2019.10.003.
- [89] T.-Y. Lin, L. C. Cantley, and G. M. DeNicola, "NRF2 Rewires Cellular Metabolism to Support the Antioxidant Response," in *A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2*, InTech, 2016. doi: 10.5772/65141.
- [90] F. He, X. Ru, and T. Wen, "NRF2, a transcription factor for stress response and beyond," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 13. MDPI AG, pp. 1–23, Jul. 01, 2020. doi: 10.3390/ijms21134777.
- [91] M. Jaganjac, L. Milkovic, S. B. Sunjic, and N. Zarkovic, "The nrf2, thioredoxin, and glutathione system in tumorigenesis and anticancer therapies," *Antioxidants*, vol. 9, no. 11. MDPI, pp. 1–41, Nov. 01, 2020. doi: 10.3390/antiox9111151.
- [92] L. E. Tebay *et al.*, "Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 88, no. Part B. Elsevier Inc., pp. 108–146, 2015. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.021.
- [93] J. Zhang *et al.*, "Enhanced thioredoxin, glutathione and Nrf2 antioxidant systems by safflower extract and aceglutamide attenuate cerebral ischaemia/reperfusion injury," *J Cell Mol Med*, vol. 24, no. 9, pp. 4967–4980, May 2020, doi: 10.1111/jcmm.15099.
- [94] S. Lee and L. Hu, "Nrf2 activation through the inhibition of Keap1–Nrf2 protein–protein interaction," *Medicinal Chemistry Research*, vol. 29, no. 5. Springer, pp. 846–867, May 01, 2020. doi: 10.1007/s00044-020-02539-y.
- [95] T. Suzuki and M. Yamamoto, "Molecular basis of the Keap1–Nrf2 system," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 88, no. Part B. Elsevier Inc., pp. 93–100, 2015. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.006.

- [96] K. Patel and J. M. Pagel, "Current and future treatment strategies in chronic lymphocytic leukemia," *Journal of Hematology and Oncology*, vol. 14, no. 1. BioMed Central Ltd, Dec. 01, 2021. doi: 10.1186/s13045-021-01054-w.
- [97] N. Timofeeva and V. Gandhi, "Ibrutinib combinations in CLL therapy: scientific rationale and clinical results," *Blood Cancer Journal*, vol. 11, no. 4. Springer Nature, Apr. 01, 2021. doi: 10.1038/s41408-021-00467-7.
- [98] J. A. Burger and S. O'Brien, "Evolution of CLL treatment — from chemoimmunotherapy to targeted and individualized therapy," *Nature Reviews Clinical Oncology*, vol. 15, no. 8. Nature Publishing Group, pp. 510–527, Aug. 01, 2018. doi: 10.1038/s41571-018-0037-8.
- [99] B. Aslan *et al.*, "Pirtobrutinib inhibits wild-type and mutant Bruton's tyrosine kinase-mediated signaling in chronic lymphocytic leukemia," *Blood Cancer J*, vol. 12, no. 5, May 2022, doi: 10.1038/s41408-022-00675-9.
- [100] D. L. Tucker and S. A. Rule, "A critical appraisal of ibrutinib in the treatment of mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia," *Ther Clin Risk Manag*, vol. 11, pp. 979–990, Jun. 2015, doi: 10.2147/TCRM.S73559.
- [101] S. Dhingra and M. Sachdeva, "Expanding horizons in the treatment of mantle cell lymphoma: Ibrutinib a novel BTK-targeting inhibitor," *Int J Basic Clin Pharmacol*, vol. 3, no. 1, p. 249, 2014, doi: 10.5455/2319-2003.ijbcp20140231.
- [102] A. Khodakarami *et al.*, "The molecular biology and therapeutic potential of Nrf2 in leukemia," *Cancer Cell Int*, vol. 22, no. 1, p. 241, Dec. 2022, doi: 10.1186/s12935-022-02660-5.
- [103] Z. Li *et al.*, "Relationship between Structural Characteristics and Plant Sources along with Pharmacology Research of Quassinoids," 2019.
- [104] X. qi Yu, X. yue Shang, X. xiao Huang, G. dong Yao, and S. jiang Song, "Brusatol: A potential anti-tumor quassinoid from *Brucea javanica*," *Chinese Herbal Medicines*, vol. 12, no. 4. Elsevier B.V., pp. 359–366, Oct. 01, 2020. doi: 10.1016/j.chmed.2020.05.007.
- [105] S. J. Cai, Y. Liu, S. Han, and C. Yang, "Brusatol, an NRF2 inhibitor for future cancer therapeutic," *Cell Biosci*, vol. 9, no. 1, Jun. 2019, doi: 10.1186/s13578-019-0309-8.
- [106] H. M. Chen *et al.*, "Synergistic antitumor effect of brusatol combined with cisplatin on colorectal cancer cells," *Int J Mol Med*, vol. 41, no. 3, pp. 1447–1454, Mar. 2018, doi: 10.3892/ijmm.2018.3372.

- [107] N. Guo, X. Xu, G. Yuan, X. Chen, Q. Wen, and R. Guo, "Pharmacokinetic, metabolic profiling and elimination of brusatol in rats," *Biomedical Chromatography*, vol. 32, no. 12, Dec. 2018, doi: 10.1002/bmc.4358.
- [108] Z. Lu, Z.-Q. Lai, A. W. N. Leung, P. S. Leung, Z.-S. Li, and Z.-X. Lin, "Exploring brusatol as a new anti-pancreatic cancer adjuvant: biological evaluation and mechanistic studies," 2017. [Online]. Available: www.impactjournals.com/oncotarget
- [109] A. Singh *et al.*, "Small molecule inhibitor of NRF2 selectively intervenes therapeutic resistance in KEAP1-deficient NSCLC tumors," *ACS Chem Biol*, vol. 11, no. 11, pp. 3214–3225, Nov. 2016, doi: 10.1021/acscchembio.6b00651.
- [110] "Leukemia - Chronic Lymphocytic - CLL: Statistics," (2022, April 14). Cancer.Net. Retrieved August 10, 2022, from <https://www.cancer.net/cancer-types/leukemia-chronic-lymphocytic-ctl/statistics>
- [111] M. Russo *et al.*, "CK2 and PI 3 K are direct molecular targets of quercetin in chronic lymphocytic leukaemia," 2017. [Online]. Available: www.impactjournals.com/oncotarget/
- [112] A. Rosén *et al.*, "Lymphoblastoid cell line with B1 cell characteristics established from a chronic lymphocytic leukemia clone by in vitro EBV infection," *Oncoimmunology*, vol. 1, no. 1, pp. 18–27, 2012, doi: 10.4161/onci.1.1.18400.
- [113] K. G. Trošelj *et al.*, "Oxidative Stress and Cancer Heterogeneity Orchestrate NRF2 Roles Relevant for Therapy Response," *Molecules*, vol. 27, no. 5. MDPI, Mar. 01, 2022. doi: 10.3390/molecules27051468.
- [114] "Applications Guide Real-Time PCR Applications Guide." Bio-Rad Laboratories, 2006.
- [115] I. J. Fang and B. G. Trewyn, "Application of mesoporous silica nanoparticles in intracellular delivery of molecules and proteins," in *Methods in Enzymology*, vol. 508, Academic Press Inc., 2012, pp. 41–59. doi: 10.1016/B978-0-12-391860-4.00003-3.
- [116] K. Präbst, H. Engelhardt, S. Ringgeler, and H. Hübner, "Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin," in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1601, Humana Press Inc., 2017, pp. 1–17. doi: 10.1007/978-1-4939-6960-9_1.
- [117] D. M. Schmitt *et al.*, "The use of resazurin as a novel antimicrobial agent against *Francisella tularensis*," *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 3, 2013, doi: 10.3389/fcimb.2013.00093.

- [118] A. Strasser and D. L. Vaux, "Cell Death in the Origin and Treatment of Cancer," *Molecular Cell*, vol. 78, no. 6. Cell Press, pp. 1045–1054, Jun. 18, 2020. doi: 10.1016/j.molcel.2020.05.014.
- [119] L. Galluzzi *et al.*, "Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018," *Cell Death and Differentiation*, vol. 25, no. 3. Nature Publishing Group, pp. 486–541, Mar. 01, 2018. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
- [120] G. Kumar, H. Degheidy, B. J. Casey, and P. L. Goering, "Flow cytometry evaluation of in vitro cellular necrosis and apoptosis induced by silver nanoparticles," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 85, pp. 45–51, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.fct.2015.06.012.
- [121] K. M. McKinnon, "Flow cytometry: An overview," *Curr Protoc Immunol*, vol. 2018, pp. 5.1.1-5.1.11, Feb. 2018, doi: 10.1002/cpim.40.
- [122] H. P. Dong *et al.*, "Evaluation of cell surface expression of phosphatidylserine in ovarian carcinoma effusions using the annexin-V/7-AAD assay: Clinical relevance and comparison with other apoptosis parameters," *Am J Clin Pathol*, vol. 132, no. 5, pp. 756–762, 2009, doi: 10.1309/AJCPAVFA8J3KHPRS.
- [123] M. Zimmermann and N. Meyer, "Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes.," *Methods Mol Biol*, vol. 740, pp. 57–63, 2011, doi: 10.1007/978-1-61779-108-6_8.
- [124] C. Riccardi and I. Nicoletti, "Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry," *Nat Protoc*, vol. 1, no. 3, pp. 1458–1461, Aug. 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.238.
- [125] L. C. Crowley, G. Chojnowski, and N. J. Waterhouse, "Measuring the DNA content of cells in apoptosis and at different cell-cycle stages by propidium iodide staining and flow cytometry," *Cold Spring Harb Protoc*, vol. 2016, no. 10, pp. 905–910, Oct. 2016, doi: 10.1101/pdb.prot087247.
- [126] A. Perelman, C. Wachtel, M. Cohen, S. Haupt, H. Shapiro, and A. Tzur, "JC-1: Alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry," *Cell Death Dis*, vol. 3, no. 11, Nov. 2012, doi: 10.1038/cddis.2012.171.
- [127] F. Sivandzade, A. Bhalerao, and L. Cucullo, "Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe," *Bio Protoc*, vol. 9, no. 1, 2019, doi: 10.21769/bioprotoc.3128.
- [128] S. Cho and E. S. Hwang, *Fluorescence-Based Detection and Quantification of Features of Cellular Senescence*, vol. 103. 2011. doi: 10.1016/B978-0-12-385493-3.00007-3.

- [129] C. Yang, L. Jiang, H. Zhang, L. A. Shimoda, R. J. Deberardinis, and G. L. Semenza, "Analysis of hypoxia-induced metabolic reprogramming," in *Methods in Enzymology*, vol. 542, Academic Press Inc., 2014, pp. 425–455. doi: 10.1016/B978-0-12-416618-9.00022-4.
- [130] B. Kalyanaraman *et al.*, "Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 52, no. 1. Elsevier Inc., pp. 1–6, Jan. 01, 2012. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030.
- [131] M. Yazdani, "Concerns in the application of fluorescent probes DCDHF-DA, DHR 123 and DHE to measure reactive oxygen species in vitro," *Toxicology in Vitro*, vol. 30, no. 1. Elsevier Ltd, pp. 578–582, Dec. 25, 2015. doi: 10.1016/j.tiv.2015.08.010.
- [132] F. Qi *et al.*, "S-ethyl ethanethiosulfinate, a derivative of allicin, induces metacaspase-dependent apoptosis through ROS generation in *Penicillium chrysogenum*," *Biosci Rep*, vol. 39, no. 6, Jun. 2019, doi: 10.1042/BSR20190167.
- [133] B. Kalyanaraman, B. P. Dranka, M. Hardy, R. Michalski, and J. Zielonka, "HPLC-based monitoring of products formed from hydroethidine-based fluorogenic probes - The ultimate approach for intra- and extracellular superoxide detection," *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, vol. 1840, no. 2. pp. 739–744, Feb. 2014. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.05.008.
- [134] S. M. Namin, S. Nofallah, M. S. Joshi, K. Kavallieratos, and N. M. Tsoukias, "Kinetic analysis of DAF-FM activation by NO: Toward calibration of a NO-sensitive fluorescent dye," *Nitric Oxide*, vol. 28, pp. 39–46, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.niox.2012.10.001.
- [135] Y.-J. Xie and W.-B. Shen, "In vivo Imaging of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species Using Laser Scanning Confocal Microscopy," in *Plant Salt Tolerance*, Totowa, NJ: Humana Press, 2012, pp. 191–200. doi: 10.1007/978-1-61779-986-0_12.
- [136] X. Sun, A. Y. Shih, H. C. Johannssen, H. Erb, P. Li, and T. H. Murphy, "Two-photon imaging of glutathione levels in intact brain indicates enhanced redox buffering in developing neurons and cells at the cerebrospinal fluid and blood-brain interface," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 25, pp. 17420–17431, Jun. 2006, doi: 10.1074/jbc.M601567200.
- [137] J. Enrique O'connor, B. F. Kirnler, M. C. Morgan, and K. J. Tempas, "A Flow Cytometric Assay for Intracellular Nonprotein Thiols Using Mercury Orange'."

- [138] M. Gong *et al.*, “Loss-of-function mutations in KEAP1 drive lung cancer progression via KEAP1/NRF2 pathway activation,” *Cell Communication and Signaling*, vol. 18, no. 1, p. 98, Dec. 2020, doi: 10.1186/s12964-020-00568-z.
- [139] Y. Zhang, Z. Xin, B. Dong, and W. Xue, “Combination of the NRF2 Inhibitor and Autophagy Inhibitor Significantly Inhibited Tumorigenicity of Castration-Resistant Prostate Cancer,” *Comput Math Methods Med*, vol. 2022, pp. 1–11, Jun. 2022, doi: 10.1155/2022/4182401.
- [140] E. Mata-Greenwood, M. Cuendet, D. Sher, D. Gustin, W. Stock, and J. M. Pezzuto, “Brusatol-mediated induction of leukemic cell differentiation and G1 arrest is associated with down-regulation of c-myc,” *Leukemia*, vol. 16, no. 11, pp. 2275–2284, Nov. 2002, doi: 10.1038/sj.leu.2402696.
- [141] J. Jorge, N. Magalhães, R. Alves, B. Lapa, A. C. Gonçalves, and A. B. Sarmento-Ribeiro, “Antitumor effect of Brusatol in acute lymphoblastic leukemia models is triggered by reactive oxygen species accumulation,” *Biomedicines*, 2022.
- [142] Y. Xiang *et al.*, “Brusatol enhances the chemotherapy efficacy of gemcitabine in pancreatic cancer via the Nrf2 signalling pathway,” *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/2360427.
- [143] D. Ren *et al.*, “Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, no. 4, pp. 1433–1438, Jan. 2011, doi: 10.1073/pnas.1014275108.
- [144] Y. Yang, Z. Tian, R. Guo, and F. Ren, “Nrf2 Inhibitor, Brusatol in Combination with Trastuzumab Exerts Synergistic Antitumor Activity in HER2-Positive Cancers by Inhibiting Nrf2/HO-1 and HER2-AKT/ERK1/2 Pathways,” *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2020, pp. 1–14, Jul. 2020, doi: 10.1155/2020/9867595.
- [145] S. Guo *et al.*, “Anticancer effects of brusatol in nasopharyngeal carcinoma through suppression of the Akt/mTOR signaling pathway,” *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 85, no. 6, pp. 1097–1108, Jun. 2020, doi: 10.1007/s00280-020-04083-3.
- [146] J. Xie *et al.*, “Apoptotic activities of brusatol in human non-small cell lung cancer cells: Involvement of ROS-mediated mitochondrial-dependent pathway and inhibition of Nrf2-mediated antioxidant response,” *Toxicology*, vol. 451, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.tox.2021.152680.
- [147] Z. Wu *et al.*, “Brusatol Inhibits Tumor Growth and Increases the Efficacy of Cabergoline against Pituitary Adenomas,” *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2021, 2021, doi: 10.1155/2021/6696015.
- [148] Y. Xiang *et al.*, “Brusatol inhibits growth and induces apoptosis in pancreatic cancer cells via JNK/p38 MAPK/NF- κ B/Stat3/Bcl-2 signaling pathway,” *Biochem*

- Biophys Res Commun*, vol. 487, no. 4, pp. 820–826, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.133.
- [149] J. L. Koff, S. Ramachandiran, and L. Bernal-Mizrachi, “A time to kill: Targeting apoptosis in cancer,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, no. 2. MDPI AG, pp. 2942–2955, Jan. 28, 2015. doi: 10.3390/ijms16022942.
- [150] T. Otto and P. Sicinski, “Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 17, no. 2. Nature Publishing Group, pp. 93–115, Jan. 27, 2017. doi: 10.1038/nrc.2016.138.
- [151] X. Sun, Q. Wang, Y. Wang, L. Du, C. Xu, and Q. Liu, “Brusatol enhances the radiosensitivity of A549 cells by promoting ROS production and enhancing DNA damage,” *Int J Mol Sci*, vol. 17, no. 7, Jul. 2016, doi: 10.3390/ijms17070997.
- [152] G. Galicia-Vázquez and R. Aloyz, “Ibrutinib Resistance Is Reduced by an Inhibitor of Fatty Acid Oxidation in Primary CLL Lymphocytes,” *Front Oncol*, vol. 8, Sep. 2018, doi: 10.3389/fonc.2018.00411.
- [153] S. Mani, “Production of reactive oxygen species and its implication in human diseases,” in *Free Radicals in Human Health and Disease*, Springer India, 2015, pp. 1–15. doi: 10.1007/978-81-322-2035-0_1.
- [154] Y. Li *et al.*, “Mitochondrial MPTP: A Novel Target of Ethnomedicine for Stroke Treatment by Apoptosis Inhibition,” *Frontiers in Pharmacology*, vol. 11. Frontiers Media S.A., Mar. 25, 2020. doi: 10.3389/fphar.2020.00352.
- [155] V. Krajka-Kuźniak and W. Baer-Dubowska, “Modulation of Nrf2 and NF-κB signaling pathways by naturally occurring compounds in relation to cancer prevention and therapy. Are combinations better than single compounds?,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 15. MDPI, Aug. 01, 2021. doi: 10.3390/ijms22158223.
- [156] A. Olayanju *et al.*, “Brusatol provokes a rapid and transient inhibition of Nrf2 signaling and sensitizes mammalian cells to chemical toxicity - Implications for therapeutic targeting of Nrf2,” *Free Radic Biol Med*, vol. 78, pp. 202–212, 2015, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.003.
- [157] D. Ross and D. Siegel, “Functions of NQO1 in cellular protection and CoQ10 metabolism and its potential role as a redox sensitive molecular switch,” *Frontiers in Physiology*, vol. 8, no. AUG. Frontiers Media S.A., Aug. 24, 2017. doi: 10.3389/fphys.2017.00595.
- [158] A. Atia and A. Abdullah, “NQO1 Enzyme and its Role in Cellular Protection; an Insight,” *IBEROAMERICAN JOURNAL OF MEDICINE*, vol. 04, pp. 306–313, 2020, doi: 10.5281/zenodo.3877528.