



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA A ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DO MESTRADO INTEGRADO DE MEDICINA

ANA MARIA BRAZ ROCHA RIBEIRO

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DE INIBIDORES
DO NF-KB NO LINFOMA DIFUSO DE GRANDES
CÉLULAS B**

ARTIGO CIENTÍFICO

ÁREA CIENTÍFICA DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA/HEMATO-ONCOLOGIA

**TRABALHO REALIZADO SOBRE A ORIENTAÇÃO DE:
PROFESSORA DOUTORA ANA BELA SARMENTO RIBEIRO
MESTRE ANA CRISTINA PEREIRA GONÇALVES**

ABRIL/2012

Potencial terapêutico de inibidores do NF-κB no Linfoma Difuso de Grandes Células B

Ana Ribeiro¹, José Mendes¹, Raquel Alves^{2,3}, Vera Alves^{1,4}, Ana Cristina Gonçalves^{1,2,3,5}, Ana Bela Sarmiento-Ribeiro^{1,2,3,5}

¹Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal; ²Biologia Molecular Aplicada e Clínica Universitária de Hematologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal; ³Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC), Universidade de Coimbra, Portugal; ⁴Instituto de Imunologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal; ⁵Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia (CIMAGO), Portugal

CONTACTOS

Ana Maria Braz Rocha Ribeiro, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal
anabrazribeiro@gmail.com

Ana Bela Sarmiento Ribeiro

Biologia Molecular Aplicada e Clínica Universitária de Hematologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal – Azinhaga de Santa Comba, Celas, 3000-548 Coimbra, Portugal
absarmiento@fmed.uc.pt

Ana Cristina Pereira Gonçalves

Biologia Molecular Aplicada e Clínica Universitária de Hematologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal – Azinhaga de Santa Comba, Celas, 3000-548 Coimbra, Portugal
ac.goncalves@fmed.uc.pt

Resumo

O Linfoma Difuso de Grandes Células B é o mais comum dos subtipos de Linfoma não-Hodgkin, representando cerca de 30 a 58 % dos casos destas neoplasias.

Tal como em outros linfomas, a via do fator de transcrição nuclear kB (NF-kB) está envolvida no seu processo oncogénico. Após ativação, o NF-kB é translocado do citoplasma para o núcleo celular, acionando a transcrição génica de fatores antiapoptóticos. Desta forma, a desregulação da via do NF-kB confere às células cancerígenas vantagem na sobrevivência por inibir a apoptose, sendo responsável pelo desenvolvimento de vários Linfomas não-Hodgkin e sendo essencial para o Linfoma Difuso de Grandes Células B.

A inativação do NF-kB conseguida pela inibição da IKK ou pela inibição da degradação proteasómica do IκB surge assim como potencial estratégia terapêutica neste tipo de linfomas.

O objetivo desta investigação foi avaliar o potencial terapêutico de um inibidor da IKK (Parthenolide) e de um inibidor do proteasoma (MG-262) no Linfoma Difuso de Grandes Células B, em monoterapia e em associação com a quimioterapia convencional. Pretendeu-se ainda clarificar os mecanismos moleculares envolvidos na citotoxicidade induzida por estes fármacos.

Uma linha celular de Linfoma Difuso de Grandes Células B, as células Farage, foi testada na ausência e na presença de doses crescentes de Parthenolide e MG-262, em monoterapia e em associação com a Vincristina, fármaco anticancerígeno do esquema de tratamento convencional. O efeito antiproliferativo foi avaliado pelo Teste metabólico da resazurina. O tipo de morte celular foi investigado por Citometria de Fluxo (pela dupla marcação celular com Anexina V e Iodeto de Propídeo e pela análise do ciclo celular) e por Microscopia Ótica (usando a coloração *May-Grünwald-Giemsa*). A expressão da Caspase 3, molécula reguladora da apoptose, foi analisada por Citometria de Fluxo utilizando um

anticorpo monoclonal marcado com um fluorocromo. Este método foi utilizado para avaliar a expressão do NF-kB fosforilado e de conjugados de ubiquitina, de forma a esclarecer o efeito farmacodinâmico do Parthenolide e do MG-262, respetivamente.

Os resultados obtidos mostram que o Parthenolide e o MG-262, tanto em monoterapia como em combinação com a Vincristina, reduziram a viabilidade celular de modo dependente da dose e do tempo de exposição, induzindo morte celular predominantemente por apoptose. Um efeito antiproliferativo sinérgico foi observado quando a Vincristina foi usada em combinação com o MG-262, sugerindo um benefício clínico.

A diminuição do NF-kB fosforilado e o aumento dos conjugados de ubiquitina traduzem a inibição da IKK e do proteasoma, respetivamente pelo Parthenolide e MG-262, confirmando o efeito inibitório da via do NF-kB por estes dois fármacos.

Assim, este estudo sugere que o Parthenolide e o MG-262 podem constituir novas abordagens terapêuticas no Linfoma Difuso de Grandes Células B.

Palavras-chave: I κ B, IKK, Linfoma Difuso de Grandes Células B, MG-262, NF-kB, Parthenolide, Proteasoma

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

BCR: Recetores de células B

BSA: Albumina de soro bovino

CD: *Cluster Differentiation*

FBS: Soro fetal bovino

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

HEPES: Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanossulfónico

HLA DR: Antígeno DR do sistema de Antígenos Leucocitários Humanos

IC₅₀: Concentração de fármaco capaz de reduzir a viabilidade celular em 50 %

IKK: Cinase do I κ B

IP: Iodeto de Propídeo

LDGC-B: Linfoma Difuso de Grandes Células B

LH: Linfomas de Hodgkin

LNH: Linfomas não-Hodgkin

NF- κ B: Fator Nuclear κ B

NK: *Natural Killer*

PBS: Solução salina de tampão de fosfato

PE: Ficoeritrina

PRT: Parthenolide

RANK: Recetor ativador do NF- κ B

TCR: Recetores de células T

TLR: Recetores *Toll-like*

TNF- α : Fator de necrose tumoral α

VCR: Vincristina

1. INTRODUÇÃO

Os linfomas são um grupo de neoplasias hematológicas que se caracterizam pela acumulação de linfócitos malignos nos gânglios linfáticos, podendo contudo atingir o sangue periférico (fase leucêmica) ou infiltrar outros órgãos para além dos do tecido linfoide. Subdividem-se em dois grandes subtipos: os Linfomas de Hodgkin (LH) e os Linfomas não-Hodgkin (LNH)¹.

Os LNH têm origem maioritariamente em células B em diferentes estádios de diferenciação, apresentando uma história natural e um quadro clínico muito variáveis. Podem atingir, além das células B maduras, as células T ou NK².

O Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGC-B) é o mais comum dos vários subtipos de LNH, representando cerca de 30 a 58% dos casos destas neoplasias. Desde meados dos anos 90 que a sua incidência tem vindo a aumentar em todos os grupos etários, exceto em crianças, sendo atualmente de 5-6 casos/100.000/ano na União Europeia³.

Este linfoma é considerado um LNH de tipo agressivo, ou seja, um linfoma que tem uma evolução rápida, com grande capacidade proliferativa e que necessita de tratamento imediato, que muitas vezes leva à cura⁴. Pode atingir o sangue periférico e infiltrar progressivamente a medula óssea, o trato gastrointestinal, a medula espinhal, os rins e outros órgãos. Pode surgir em todas as idades, mas é mais frequente a partir dos 60 anos, sendo a sobrevivência aos cinco anos de 50 %⁵.

Trata-se de uma entidade clínico-patológica, morfológica e biológica heterogénea⁶. Os estudos genéticos e moleculares permitiram distinguir três diferentes subtipos moleculares distintos de LDGC-B⁷: um derivado de células B do centro germinativo (o subtipo *Germinal Center B cell-like*, GCB), um derivado de células B ativadas (o subtipo *Activated B cell-like*, ABC) e um terceiro subtipo, o Linfoma primário do mediastino de grandes células B (PMBL),

com características patobiológicas diferentes dos subtipos anteriores^{8,9}. Todos estes subtipos moleculares diferem na expressão de centenas de genes e também no prognóstico^{7,8}.

Uma das vias de sinalização celular que se encontra ativa em vários LNH é a via do fator de transcrição nuclear kB (NF-kB) (Figura 1-A.), a qual é essencial para os LDGC-B¹⁰, em particular para o subtipo de pior prognóstico, o ABC. A ativação desta via confere às células cancerígenas vantagem na sobrevivência por inibição do processo apoptótico.

Estudos efetuados em murinos sugerem que o NF-kB desempenha um papel central na regulação da imunidade inata e adquirida, na resposta inflamatória e no desenvolvimento de órgãos linfoides. A atividade do NF-kB é fortemente controlada durante o normal desenvolvimento das células B, em que diferentes heterodímeros do NF-kB são diferencialmente expressos na linhagem B, realçando o seu papel como regulador específico no desenvolvimento, sobrevivência, divisão e expressão de imunoglobulinas destas células. Além disso, o NF-kB é um dos fatores de transcrição ativados pela sinalização dos recetores de células B (BCR), a qual consititui um ponto crítico para a sobrevivência de células B quiescentes, permitindo que estas escapem à apoptose¹¹.

Quando a célula é sujeita à ação de fatores de crescimento ou outros tipos de stresse, o IκB – proteína reguladora da proliferação celular – sofre fosforilação (principalmente pela ativação de uma cinase, a IκB cinase – IKK), ubiquitinação e subsequente degradação pelo proteaoma. O NF-kB é então libertado e translocado para o núcleo celular, acionando a transcrição de genes que codificam fatores de crescimento, moléculas relacionadas com a adesão celular, fatores angiogénicos e fatores antiapoptóticos¹² (Figura 1-B.).

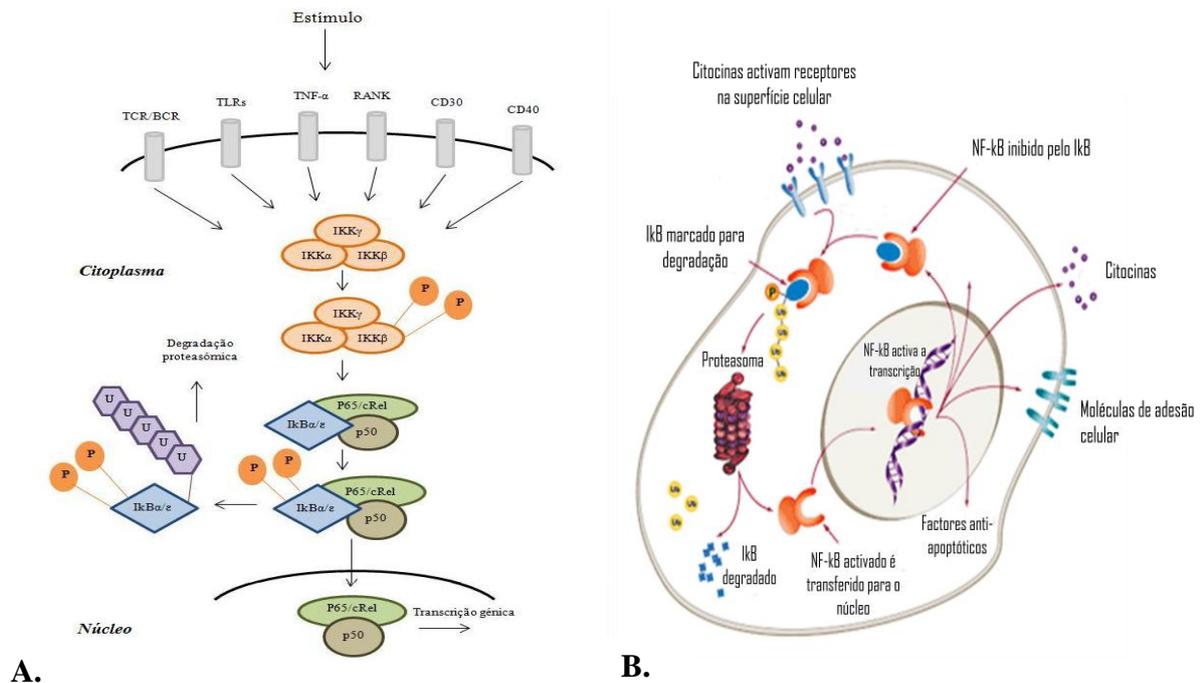


Figura 1 – A via de ativação do NF- κ B. **A.** Estímulos extracelulares ativam vias de sinalização celular que resultam em fosforilação e degradação proteasômica do I κ B¹³. **B.** O NF- κ B é assim libertado e promove no núcleo celular a transcrição, entre outros, de citocinas, moléculas de adesão celular e fatores antiapoptóticos¹⁴ (**A.** adaptado de Jost, 2007; **B.** adaptado de Richardson, 2003).
 BCR: Recetores de células B. P: Fosforilação. RANK: Recetor ativador do NF- κ B. TCR: Recetores de células T. TLRs: Recetores *Toll-like*. TNF- α : Fator de necrose tumoral α . U: Ubiquitinação.

O Parthenolide (Figura 2), um composto do grupo das lactonas sesquiterpênicas derivado de uma planta (família *Asteraceae*)¹², inibe o complexo IKK, evitando a fosforilação e a degradação proteasômica do I κ B. Isto mantém o NF- κ B inativo no citoplasma e inibe assim a proliferação e diferenciação celulares, bem como promove a apoptose¹⁵.

Por outro lado, a inibição do proteassoma, impedindo a degradação do I κ B, mantém igualmente a estabilidade/inatividade do NF- κ B. Fármacos inibidores do proteassoma, como o MG-262 (Figura 3) – derivado do ácido borônico e bloqueador direto da subunidade 20S do proteassoma –, têm sido testados em LNH indolentes e Mieloma Múltiplo, para o qual um inibidor do proteassoma, o Bortezomib, está aprovado pela FDA (*Food and Drug*

Administration)¹⁵. No entanto, a utilização destes tipos de fármacos no tratamento do LDGC-B ainda não se encontra muito estudada.

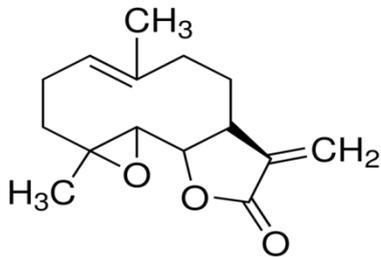


Figura 2 – Estrutura química do Parthenolide¹⁶

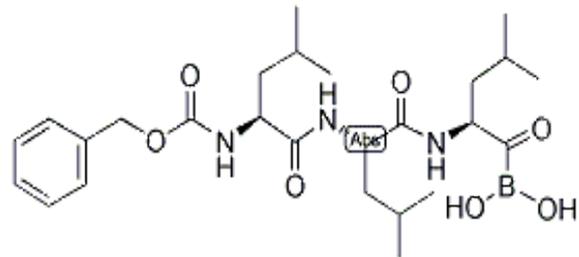


Figura 3 – Estrutura química do MG-262¹⁷

Atualmente, o tratamento de primeira linha para os LDGC-B passa pela associação do esquema de quimioterapia CHOP (Ciclofosfamida, Doxorubicina/Hidroxiclorotriquina, Vincristina/Oncovina e Prednisolona) com o anticorpo monoclonal (anti CD20) Rituximab – CHOP-R. O transplante de medula óssea constitui também uma abordagem terapêutica em casos particulares^{5,18,19,20,21}. No entanto, os efeitos secundários e as recidivas deste tipo de tratamento têm levado à procura de novas estratégias terapêuticas dirigidas a alvos moleculares.

O objetivo deste estudo é avaliar o potencial terapêutico de um inibidor da IKK – Parthenolide – e de um inibidor do proteasoma – MG-262 – numa linha celular de LDGC-B, em monoterapia e em associação com a quimioterapia convencional, no sentido de saber se poderão constituir uma nova abordagem terapêutica neste tipo de linfomas. Procurar-se-á também esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos na citotoxicidade associada a estes fármacos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo foi utilizado um modelo *in vitro* de LDGC-B, as células Farage. Estas foram incubadas em meio apropriado, na ausência (Controlo) e na presença de um inibidor da IKK – Parthenolide – e de um inibidor do proteasoma – MG-262 –, em concentrações crescentes e durante 72 horas, quer em monoterapia quer em associação com a Vincristina, um fármaco do esquema convencional de quimioterapia.

Recorrendo a um ensaio metabólico com resazurina determinou-se a viabilidade celular às 24, 48 e 72 horas após a exposição ao(s) fármaco(s) e obtiveram-se as respetivas curvas dose-resposta com a extrapolação do IC₅₀.

O mecanismo envolvido na citotoxicidade dos fármacos – apoptose e/ou necrose –, bem como alguns aspetos da farmacodinâmica, foram analisados recorrendo à Citometria de Fluxo e à Microscopia Ótica.

2.1. Características e condições da cultura de células

A linha celular Farage, um modelo *in vitro* de LDGC-B, foi adquirida no *American Type Culture Collection* (ATCC). Esta linha celular foi estabelecida a partir de uma biopsia de gânglio linfático de uma doente com LDGC-B. Trata-se de uma linha celular de linfócitos B maduros que crescem em suspensão, imortalizados com o vírus Epstein-Barr. Apresentam a seguinte expressão antigénica: CD10^{+/+}, CD11a⁺, CD19⁺, CD20⁺, CD21⁺, CD22⁺, CD23⁺, CD29⁺, CD38⁺, CD39⁺, CD40⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD58⁺, HLA DR⁺ ²².

As células Farage foram mantidas numa densidade inicial de 0.5 x 10⁶ células/ml em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI 1640, Gibco, Invitrogen), com 2 mM de L-glutamina, 20 mM de HEPES-Na, 1.5 g/l de NaHCO₃, 100 U/ml de Penicilina, 100

μ g/ml de Estreptomicina, enriquecido com FBS (soro fetal bovino) (*Gibco, Invitrogen*) a 10%, tendo sido mantidas a 37° C numa atmosfera humedecida contendo 5% de CO₂.

2.2. Incubação da linha celular Farage com os fármacos anticancerígenos

As células Farage foram colocadas em placas de cultura a uma densidade celular de 0.5×10^6 células/ml e em seguida incubadas na ausência e na presença de concentrações crescentes dos fármacos durante 72 horas. O estudo foi feito com várias concentrações de Parthenolide (*Sigma-Aldrich*) entre 1.0 e 10 μ M, de MG-262 (*Calbiochem*) entre 0.1 e 25 nM e com 0.1 nM de Vincristina (*Sigma-Aldrich*).

2.3. Avaliação do potencial terapêutico do inibidor da IKK (Parthenolide) e do inibidor do proteasoma (MG-262)

2.3.1. Determinação da viabilidade celular pelo Teste da resazurina

Após incubação nas condições indicadas acima, a viabilidade celular foi determinada recorrendo a um ensaio metabólico com resazurina (*Sigma-Aldrich*).

A resazurina é um composto não tóxico de cor azul escura, não fluorogénico, que sofre redução enzimática nas mitocôndrias das células viáveis, transformando-se em resofurina, composto este de cor rosa que emite fluorescência. A redução da resazurina permite assim estabelecer uma relação linear entre a fluorescência emitida e a quantidade de células viáveis (viabilidade celular)^{23,24}.

Assim, a cada período de 24 horas foi adicionado às células resazurina na concentração de 10 µg/ml. Após quatro horas de incubação foi feita a leitura das absorvâncias para comprimentos de onda de excitação de 570 e 600 nm num espectrofotômetro leitor de placas (*Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek Instruments*). A viabilidade celular foi calculada como percentagem do Controlo pela seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{[(A_{570 \text{ nm}} - A_{600 \text{ nm}}) \text{ Amostra}] - [(A_{570 \text{ nm}} - A_{600 \text{ nm}}) \text{ Branco}]}{[(A_{570 \text{ nm}} - A_{600 \text{ nm}}) \text{ Controlo}] - [(A_{570 \text{ nm}} - A_{600 \text{ nm}}) \text{ Branco}]} \times 100$$

Os resultados de cada ensaio representam a média de três leituras, tendo-se realizado três a cinco ensaios independentes.

2.4. Avaliação dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade

2.4.1. Avaliação do tipo de morte celular

Para avaliar o tipo de morte celular induzida pelos fármacos utilizou-se a Citometria de Fluxo, recorrendo à dupla marcação celular com Anexina V e Iodeto de Propídeo e à análise da expressão de Caspase 3, bem como a Microscopia Ótica.

2.4.1.1. Análise da morte celular por Citometria de Fluxo recorrendo à dupla marcação com Anexina V e Iodeto de Propídeo

Durante o processo de morte celular por necrose e apoptose existem alterações celulares suscetíveis de serem detetadas por Citometria de Fluxo através da marcação celular com Anexina V e Iodeto de Propídeo^{25,26}.

Nas células em apoptose ocorre a alteração dos fosfolípidos da bicamada fosfolipídica da membrana celular, nomeadamente a transição para o folheto externo da fosfatidilserina, um fosfolípido de carga negativa que normalmente se encontra no folheto interno da membrana celular. A Anexina V (AV), na presença de cálcio, tem grande afinidade para fosfolípidos com carga negativa, ligando-se à fosfatidilserina. Assim, as células em apoptose são identificadas pela positividade para a AV. A fluorescência emitida (pela AV ligada a um fluorocromo – AV-FITC) é detetada em cada célula pelo citómetro de fluxo²⁷.

O Iodeto de Propídeo (IP) é um composto capaz de se intercalar com o ADN celular de dupla cadeia, sendo que tal só ocorre se houver rutura da membrana plasmática, fenómeno característico da necrose. As células em necrose são então positivas para o IP, sendo igualmente detetadas pela medição da fluorescência emitida^{25,28}.

No entanto, a perda da integridade da membrana plasmática também acontece numa fase tardia da apoptose, sendo o IP capaz de se intercalar no ADN destas células.

Assim, quando as células são duplamente marcadas com AV-FITC e IP, torna-se possível a distinção entre células viáveis (negativas para a AV e para o IP), células em apoptose inicial (positivas para a AV e negativas para o IP), células em apoptose tardia ou necrose (positivas para a AV e para o IP) e células em necrose (negativas para a AV e positivas para o IP)²⁷.

Após uma incubação de 48 horas nas condições referidas em 2.2., recolheu-se o volume equivalente a um milhão de células em suspensão e lavou-se com PBS (solução salina

de tampão de fosfato) durante cinco minutos a 1000 xg. O *pellet* foi ressuspenso em 100 μ l de tampão de ligação frio e incubado com 5 μ l de AV-FITC e 2 μ l de IP (*kit* de detecção de morte celular da *Immunotech*), durante 15 minutos ao abrigo da luz. Em seguida adicionou-se 400 μ l de tampão de ligação e procedeu-se à análise das células num citómetro de fluxo FACS *Calibur* equipado com um laser de árgon. Os comprimentos de onda de excitação foram de 525 nm para a AV-FITC e de 640 nm para o IP. Foram adquiridas 10.000 células através do programa *CellQuestTM* e os dados analisados com recurso ao programa *Paint-a-GateTM*.

Os resultados são apresentados em percentagem de cada uma das populações celulares identificadas com base na positividade e/ou negatividade para a dupla marcação com AV e IP e representam a média \pm desvio-padrão de cinco ensaios independentes.

2.4.1.2. Análise da expressão de Caspase 3 por Citometria de Fluxo

A avaliação de moléculas envolvidas em processos de morte celular permite inferir qual o tipo de efeito citotóxico dos compostos em estudo. Por Citometria de Fluxo, com o recurso a anticorpos monoclonais associados a fluorocromos, pode avaliar-se a expressão dessas moléculas^{25,26}. Foram desta forma analisados os níveis de expressão da Caspase 3, uma proteína pró-apoptótica²⁹.

Aproximadamente um milhão de células incubadas durante 48 horas nas condições referidas em 2.2. foram lavadas por centrifugação com tampão PBS, pH 7.4, durante cinco minutos a 300 xg. Seguidamente foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz com 100 μ l de solução de fixação (Solução A, *Intracell Kit, Immunostep*). Após lavagem, as células foram incubadas em 100 μ l de solução de permeabilização (Solução B, *Intracell Kit, Immunostep*) e 1 μ g de anticorpo monoclonal anti-Caspase 3 ativada marcado com PE (ficoeritrina) (*Pharmingen, BD Biosciences*), durante 15 minutos ao abrigo da luz.

Por último, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 300 xg durante cinco minutos e ressuspensas em 400 μ l do mesmo tampão.

Os resultados são expressos em variação da média de intensidade de fluorescência e representam a média (\pm desvio padrão de cinco ensaios independentes) da expressão intracelular de Caspase 3 ativada nas células em estudo incubadas na ausência e na presença dos vários compostos.

2.4.1.3. Análise da morte celular por Microscopia Ótica

Após a realização de esfregaços de células e coloração das mesmas pelo método *May-Grünwald-Giemsa* (*Sigma-Aldrich*), a morfologia celular foi analisada recorrendo à Microscopia Ótica³⁰.

Para tal, após um período de incubação de 48 horas nas condições indicadas em 2.2., as células foram centrifugadas durante cinco minutos a 300 xg. De seguida foram lavadas com PBS por centrifugação a 300 xg. Para melhorar a sua adesão à lâmina, foram ressuspensas numa pequena quantidade de FBS de forma a obter uma densidade de 50.000 células/ μ l. Os esfregaços foram efetuados e corados durante três minutos com solução de *May-Grünwald* (preparada em 0.3 % de metanol e diluída na proporção de 1:1 com água destilada aquando da utilização) e posteriormente com solução de *Giemsa* (1 g de corante de *Giemsa* dissolvido em 66 ml de glicerol e 66 ml de metanol, diluído na proporção de 1:8 com água destilada aquando da utilização) durante 15 minutos. De seguida procedeu-se à lavagem e secagem dos esfregaços e a morfologia das células foi analisada num microscópio ótico *Nikon Eclipse 80i* acoplado a uma câmara digital *Nikon Digital Camera DXm 1200F*, o que permitiu a aquisição de imagens e o seu processamento no programa *Nikon ACT-1*.

2.4.2. Análise do Ciclo Celular

O efeito antiproliferativo dos fármacos foi avaliado pela análise do ciclo celular, uma vez que a quantificação do conteúdo de ADN nos permite conhecer a distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular – G₀/G₁, S e G₂/M³¹.

Tal é conseguido pelo uso de Iodeto de Propídeo (IP), o qual se intercala no ADN celular e emite fluorescência. Esta fluorescência, detetada por Citometria de Fluxo, é proporcional à quantidade de IP que se intercalou no material genético das células e portanto proporcional à quantidade de ADN presente em cada uma. Deste modo, é possível distinguir células em fase G₀/G₁ e em G₂/M, pois estas últimas têm o dobro da quantidade de ADN, que replicou na fase S, com quantidade intermédia de ADN^{28,31}. Além disso, é ainda possível distinguir células que se encontrem em apoptose, nas quais ocorreu fragmentação do material genético e que apresentam, por isso, menor conteúdo de ADN (pico pré-G₁)³¹.

Após incubação das células durante 48 horas nas condições referidas em 2.2., recolheu-se um milhão de células, que se centrifugou durante cinco minutos a 300 xg. Removeu-se o sobrenadante e as células foram fixadas por adição de 200 μ l de etanol a 70 % e incubadas a 4° C durante 30 minutos. Seguidamente lavaram-se com 2 ml de PBS contendo 2 % de BSA (albumina de soro bovino), por centrifugação durante cinco minutos a 300 xg. Removeu-se o sobrenadante, adicionou-se 0.5 ml de solução de IP/RNAse e agitou-se bem. Após um período de incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, procedeu-se à análise das células por Citometria de Fluxo.

Os resultados foram analisados através de histogramas que relacionam o número de células com a intensidade de fluorescência emitida, utilizando-se para tal o programa *Modfit*.

Os resultados representam a média \pm desvio-padrão de dois ensaios independentes.

2.4.3. Avaliação de marcadores farmacodinâmicos do inibidor da IKK (Parthenolide) e do inibidor do proteasoma (MG-262)

Para avaliar a inibição da IKK pelo Parthenolide determinou-se a expressão de NF-kB fosforilado por Citometria de Fluxo. De igual modo, a inibição do proteasoma pelo MG-262 foi avaliada pela expressão de conjugados de ubiquitina.

2.4.3.1. Análise da expressão de NF-kB fosforilado por Citometria de Fluxo

Para avaliar o envolvimento do Parthenolide na inibição da IKK analisou-se a expressão do NF-kB fosforilado (NF-kB F) por Citometria de Fluxo, utilizando-se um anticorpo monoclonal anti-NF-kB F acoplado a um fluorocromo (anti-NF-kB F-PE). Deste modo, a quantificação da fluorescência emitida por cada célula estará inversamente relacionada com a eficácia do Parthenolide em inibir a IKK³².

Aproximadamente um milhão de células incubadas durante 48 horas nas condições referidas em 2.2. foram lavadas por centrifugação com PBS, pH 7.4, durante cinco minutos a 300 xg. Seguidamente foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz com 100 µl de solução de fixação (Solução A, *Intracell Kit, Immunostep*). Após uma lavagem, as células foram incubadas em 100 µl de solução de permeabilização (Solução B, *Intracell Kit, Immunostep*) e 1 µg de anticorpo anti-NF-kB F-PE (*Pharmlingen, BD Biosciences*), durante 15 minutos ao abrigo da luz. Por último, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 300 xg durante cinco minutos e ressuspensas em 400 µl do mesmo tampão.

Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média (\pm desvio padrão de três ensaios independentes) da expressão

intracelular de NF- κ B fosforilado nas células em estudo incubadas na ausência e na presença dos vários compostos.

2.4.3.2. Análise da expressão de conjugados de ubiquitina por Citometria de Fluxo

Para avaliar o efeito no MG-262 na inibição do proteasoma analisou-se por Citometria de Fluxo a expressão de conjugados de ubiquitina. Os conjugados de ubiquitina referem-se às proteínas marcadas para degradação pelo proteasoma – proteínas que sofreram ubiquitinação. Se existir inibição da atividade do proteasoma, estas proteínas ubiquitinadas acumular-se-ão no citoplasma celular³³, o que pode ser detetado recorrendo a um anticorpo antiubiquitina marcado com um fluorocromo³⁴.

O mesmo protocolo de 2.4.3.1. foi seguido para a avaliação da expressão dos conjugados de ubiquitina, utilizando-se aqui um anticorpo diferente marcado com FITC, anticorpo anti-ubiquitina-FITC (*Santa Cruz Biotechnology*®, Inc.).

Os resultados representam a média \pm desvio padrão de três ensaios independentes.

2.5. Análise estatística

Para análise das diferenças entre os valores da viabilidade celular e dos níveis de expressão das moléculas em estudo recorreu-se ao teste t-student. Os resultados foram analisados utilizando o *software Microsoft Excel 2007*, sendo que se considerou um nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

Os dados são apresentados sobre a forma de média \pm desvio padrão.

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação do potencial terapêutico dos fármacos utilizados – Curvas dose-resposta

Para se determinar o potencial terapêutico do inibidor da IKK, Parthenolide (PRT), e do inibidor do proteasoma, MG-262, avaliou-se a viabilidade das células Farage através do Teste da resazurina na ausência (Controlo) e após exposição ao(s) fármaco(s) em várias concentrações e durante 72 horas, quer em monoterapia quer em associação com a Vincristina (VCR). Desta forma, construíram-se gráficos que traduzem a relação entre a quantidade de células viáveis (como percentagem do Controlo) e o tempo de exposição aos citotóxicos. Nas figuras 4 e 5 está representado o efeito do PRT e do MG-262, respetivamente, na viabilidade das células Farage.

Como se pode observar na Figura 4, verifica-se uma diminuição da viabilidade celular de forma dependente da dose e do tempo de exposição ao PRT. Este fármaco induz um efeito citotóxico após 24 horas de incubação, obtendo-se o IC₅₀ entre as concentrações de 2.5 e 5.0 µM. Pode visualizar-se que existe desde o início da exposição das células ao fármaco uma separação clara entre o efeito citotóxico obtido com as doses mais baixas, de 1.0 e 2.5 µM, e com as doses mais elevadas, de 5.0 a 10 µM. De facto, após 24 horas de exposição, nas células tratadas com PRT nesta gama de concentrações, verifica-se uma diferença de cerca de 65 % na viabilidade celular, que se mantém após as 72 horas de exposição.

Além disso, os resultados sugerem que nas células tratadas com PRT em baixa concentração (1.0 µM) o efeito é reversível, pois a partir das 48 horas de incubação cessa o efeito antiproliferativo e, pelo contrário, observa-se aumento na viabilidade celular (Figura 4).

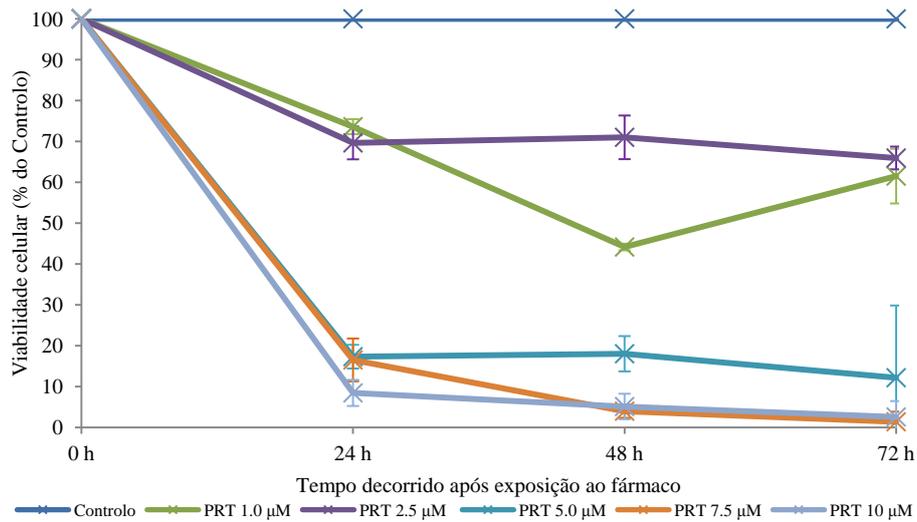


Figura 4 - Curvas dose-resposta das células Farage tratadas com Parthenolide (PRT). As células foram incubadas na ausência (Controlo) e na presença de concentrações crescentes do inibidor da IκB cinase PRT, durante 72 horas. A viabilidade celular foi determinada recorrendo ao Teste da resazurina como descrito nos Materiais e Métodos. Os resultados são expressos em percentagem (%) de células viáveis (relativamente ao Controlo) em função do tempo de incubação com o fármaco e representam a média ± desvio-padrão de três a cinco ensaios independentes.

Na Figura 5, verifica-se que o MG-262 induz diminuição da viabilidade celular de forma dependente da dose e do tempo de exposição. Apesar desta diminuição se verificar logo após as primeiras 24 horas de exposição ao fármaco, o IC₅₀ só é atingido às 48 horas entre as concentrações de 7.5 e 10 nM. Contudo, para as concentrações mais baixas utilizadas, de 0.1 e 1.0 nM, verifica-se um efeito reversível entre as 24 e as 48 horas de exposição, após o qual se verifica de novo um decréscimo na viabilidade celular até ao final da exposição.

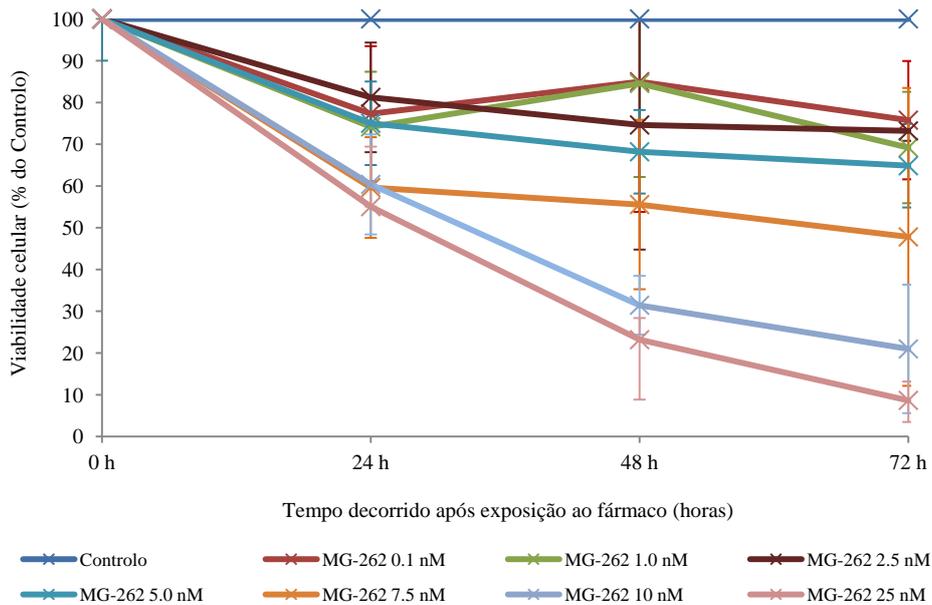


Figura 5 - Curvas dose-resposta das células Farage tratadas com MG-262. As células foram incubadas na ausência (Controlo) e na presença de concentrações crescentes do inibidor do proteasoma MG-262, durante 72 horas. A viabilidade celular foi determinada recorrendo ao Teste da resazurina, como descrito nos Materiais e Métodos. Os resultados estão expressos em percentagem (%) de células viáveis (relativamente ao Controlo) em função do tempo de incubação com o fármaco e representam a média \pm desvio-padrão de três ensaios independentes.

Para avaliar o potencial efeito sinérgico da associação do PRT e do MG-262 com a VCR, as células Farage foram tratadas com as combinações dos fármacos em concentrações inferiores às do IC₅₀ obtido em monoterapia.

Como mostra a Figura 6, observou-se potenciação do efeito citotóxico em todas as combinações terapêuticas com exceção da associação de VCR com PRT. Aliás, nesta condição o efeito foi inferior ao obtido com o PRT em monoterapia (diminuição da viabilidade celular de 25 % vs de 35 %). Por outro lado, a associação mais eficaz parece ser a de VCR com 10 nM de MG-262, observando-se uma redução da viabilidade celular em cerca de 95 %, a qual atinge 100 % com o uso concomitante 2.5 μ M de PRT. De facto, a administração isolada de MG-262 reduz a viabilidade celular após 72 horas de incubação para 20 % (redução de 80 %), a qual passa para 5 % quando se associa a VCR (redução de 95 %) e para 0% quando se adiciona um terceiro fármaco, o PRT. De salientar que a VCR e o PRT

administrados em monoterapia induzem uma diminuição da viabilidade de 10 e 35 10%, respectivamente.

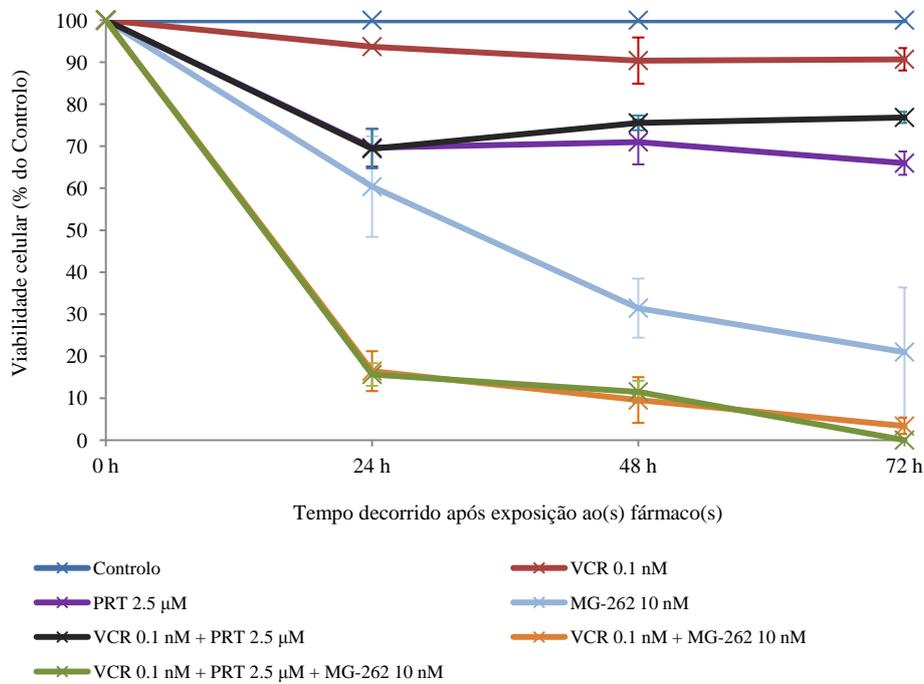


Figura 6 - Curvas dose-resposta das células Farage tratadas com as associações de fármacos. As células foram incubadas na ausência (Controlo) e na presença de Vincristina (VCR) associada ao Parthenolide (PRT) e/ou ao MG-262, durante 72 horas. A viabilidade celular foi determinada recorrendo ao Teste da resazurina, como descrito nos Materiais e Métodos. Os resultados são expressos em percentagem (%) de células viáveis (relativamente ao Controlo) em função do tempo de incubação com os fármacos e representam a média \pm desvio-padrão de três a cinco ensaios independentes.

3.2. Avaliação dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade

3.2.1. Avaliação do tipo de morte celular

O tipo de morte celular induzida pelos fármacos em estudo foi avaliado por Citometria de Fluxo, pela dupla marcação com Anexina V e Iodeto de Propídeo e pela análise da expressão de Caspase 3, bem como por Microscopia Ótica.

3.2.1.1. Avaliação da morte celular por Citometria de Fluxo recorrendo à dupla marcação com Anexina V e Iodeto de Propídeo

Na Figura 7, podemos observar que todos os fármacos nas condições de tratamento do estudo, quer em monoterapia quer em associação, induzem diminuição do número de células vivas e aumento da percentagem de células mortas, sobretudo por apoptose (inicial).

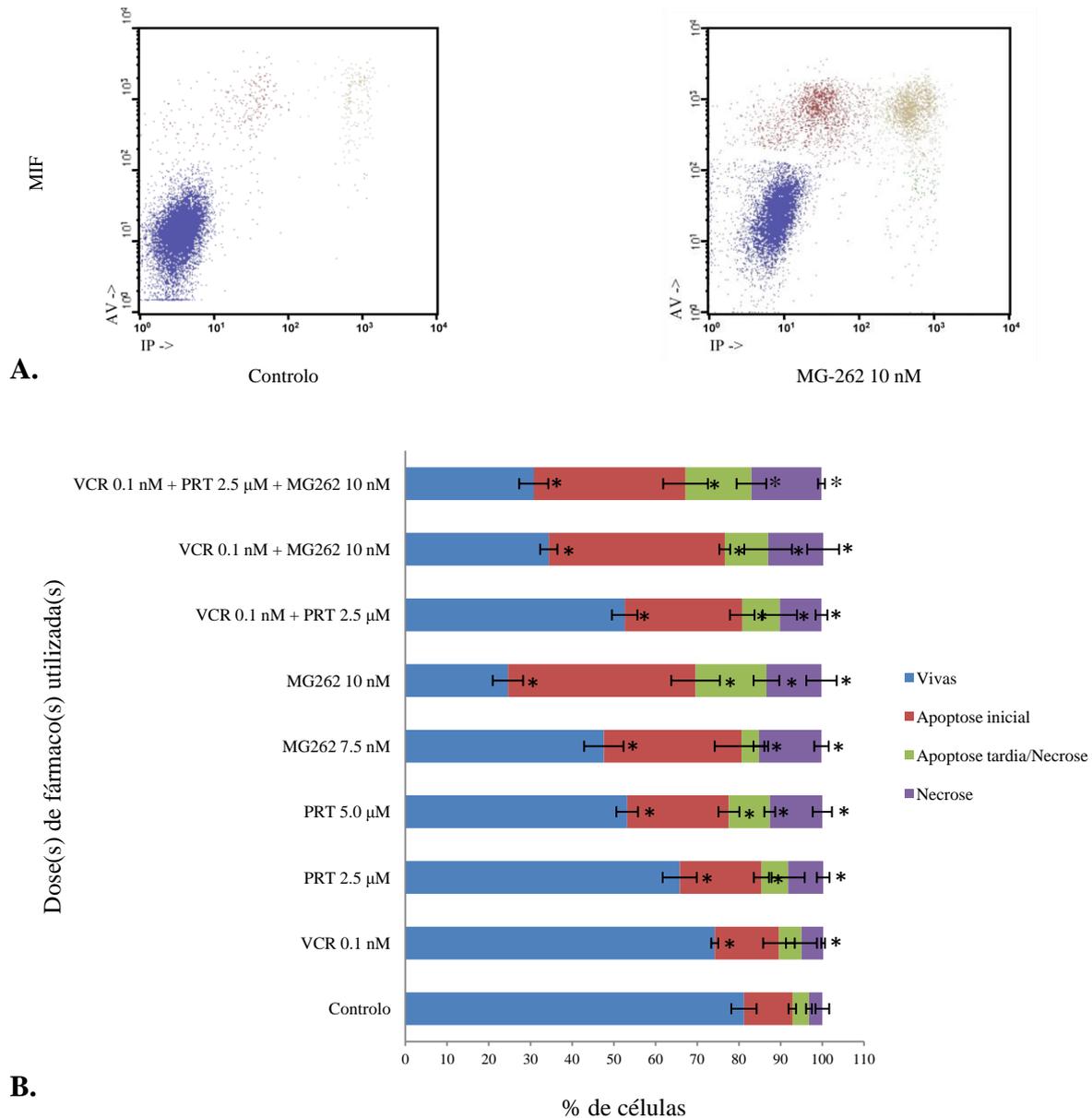


Figura 7 - Avaliação do efeito citotóxico do Parthenolide (PRT) e do MG-262 nas células Farage por Citometria de Fluxo. As células Farage foram incubadas na ausência (Controlo) e na presença dos fármacos nas concentrações referidas na figura. A marcação simultânea das células com Anexina-V (AV) e Iodeto de Propídeo (IP), como descrito nos Materiais e Métodos, permite distinguir células vivas (azul), células em apoptose inicial (vermelho), células em apoptose tardia ou necrose (verde), células em necrose (roxo). Em **A.** estão representados *dot-plots* representativos da análise da viabilidade e morte das células Controlo e das células tratadas com MG-262. Em **B.** está representada a viabilidade celular e o tipo de morte celular induzida pelos compostos em estudo. Os resultados estão expressos em percentagem (%) de células e representam a média \pm desvio-padrão de cinco ensaios independentes. MIF: Média de Intensidade de Fluorescência. VCR: Vincristina. * $p < 0,05$

3.2.1.2. Avaliação da expressão de Caspase 3 por Citometria de Fluxo

Para avaliar os mecanismos envolvidos na morte celular por apoptose induzida pelos fármacos em estudo, avaliou-se a expressão de Caspase 3, uma proteína pró-apoptótica. Como se pode observar na Figura 8, nas células tratadas com Parthenolide e MG-262, quer em monoterapia quer em associação verificou-se para todas as concentrações testadas um aumento significativo da expressão de Caspase 3 ativada relativamente ao Controlo.

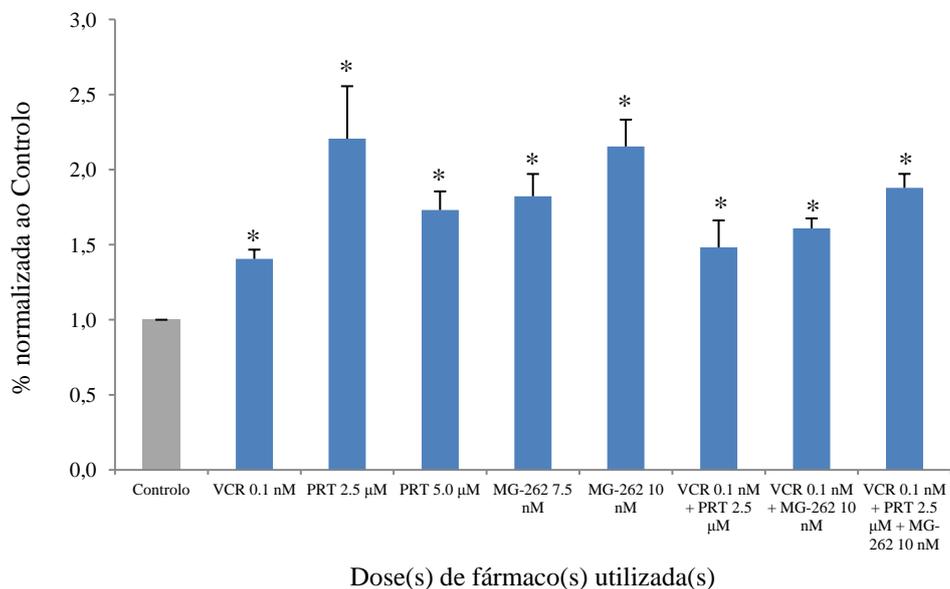


Figura 8 - Avaliação da expressão de Caspase 3 por Citometria de Fluxo. A análise da expressão de Caspase 3, uma proteína pró-apoptótica, permite inferir o envolvimento do processo apoptótico na morte celular. Para tal recorreu-se a um anticorpo anti-Caspase 3 associado a um fluorocromo, como descrito nos Materiais e Métodos. Os resultados estão expressos em variação da Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) relativamente ao Controlo e resultam da média \pm desvio-padrão de cinco ensaios independentes. PRT: Parthenolide. VCR: Vincristina. * $p < 0,05$

3.2.1.3. Avaliação da morte celular por Microscopia Ótica

Para confirmar os resultados obtidos relativamente ao tipo de morte celular, analisou-se a morfologia das células por Microscopia Ótica.

Na Figura 9 podemos verificar que a maioria das células apresenta características de morte celular por apoptose, o que está de acordo com os estudos de Citometria de Fluxo feitos. Veem-se assim células com fragmentação nuclear (bem visível em **D.**, na maior célula da direita), células com projeções citoplasmáticas, os *blebs* (por exemplo: em **B.**, nas células do canto inferior direito; em **C.**, nas células centrais), e retração do volume celular, com membrana citoplasmática íntegra.

Raramente se observa necrose, ou seja, células com núcleo íntegro mas com rutura da membrana citoplasmática e extravasamento do conteúdo intracelular.

Na Figura 9-C. é possível ver na parte inferior uma célula com citoplasma de aspeto rendilhado (por marcada vacuolização), o que sugere o envolvimento de um mecanismo celular de autofagia.

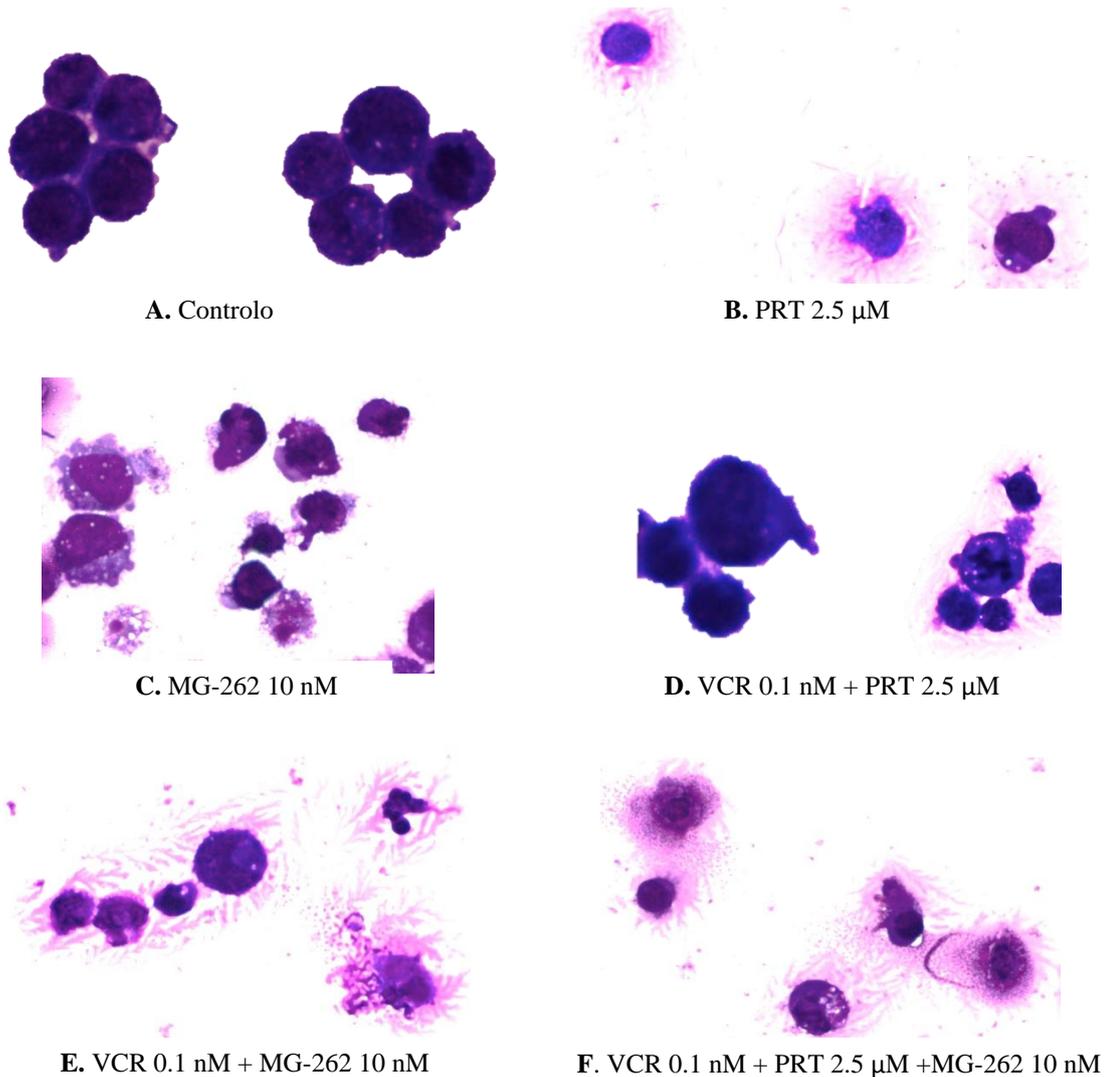


Figura 9 – Aspectos morfológicos das células Farage na ausência de tratamento e após tratamento com Parthenolide (PRT) e MG-262, em monoterapia e em associação com a Vincristina (VCR). As células Farage foram incubadas durante 48 horas na ausência e na presença dos compostos e a concentrações referidas anteriormente. Após este período de incubação efetuaram-se esfregaços de células e coloração com solução de *May-Grünwald-Giemsa* de acordo com o descrito nos Materiais e Métodos, tendo sido os esfregaços observados ao microscópio ótico. Ampliação de 500x.

3.2.2. Análise do Ciclo Celular

Para além do efeito citotóxico analisou-se o efeito antiproliferativo dos fármacos através da análise do ciclo celular por Citometria de Fluxo, recorrendo à incorporação de Iodeto de Propídeo no ADN das células. Para além disso, esta técnica permite-nos detetar células em apoptose.

Como se vê na Tabela I e Figura 10, a maioria dos fármacos nas condições testadas induziu aumento da percentagem de células na fase G_0/G_1 quando em comparação com as células não tratadas (Controlo), exceção feita à Vincristina, para a qual se observa um maior número de células em fase S, e à associação dos três fármacos – Vincristina (VCR) + Parthenolide (PRT) + MG-262 – em que o bloqueio do ciclo celular se observa preferencialmente na fase G_2/M . De facto, com esta associação verifica-se um aumento da percentagem de células nessa mesma fase.

Além disso, podemos verificar que em todas as condições de tratamento das células, quer em monoterapia quer em associação, se observa também um aumento da percentagem de células em pré- G_1 (pico apoptótico) relativamente ao Controlo, o que está de acordo com os resultados anteriores, embora estes não sejam significativos para a VCR nem para o PRT 5.0 μ M.

Tabela I – Análise do Ciclo Celular.

Condição de incubação	Pico apoptótico (%)	Fase G ₀ /G ₁ (%)	Fase S (%)	Fase G ₂ /M (%)
Controlo	4	46	36	18
VCR 0.1 nM	5	39*	55*	5*
PRT 2.5 µM	8*	73*	20	6*
PRT 5.0 µM	15	67*	27	6*
MG-262 7.5 nM	17*	67*	26	6*
MG-262 10 nM	20*	66*	27	6*
VCR 0.1 nM + PRT 2.5 µM	17*	69*	23	7*
VCR 0.1 nM + MG-262 10nM	20*	65*	28	6*
VCR 0.1 nM + PRT 2.5 uM + MG-262 10nM	31*	44	31	24

Recorrendo à marcação das células com Iodeto de Propídeo, a Citometria de Fluxo permitiu contabilizar as células que se encontravam em diferentes fases do ciclo celular – G₀/G₁, S ou G₂/M – e ainda as que se encontravam em apoptose (pico pré-G₁). Os resultados são expressos em percentagem (%) de células e representam a média ± desvio-padrão de dois ensaios independentes. PRT: Parthenolide. VCR: Vincristina. **p* < 0,05

A figura 10 mostra dois exemplos, um para o PRT e outro para o MG-262, dos histogramas obtidos a partir dos dados anteriores.

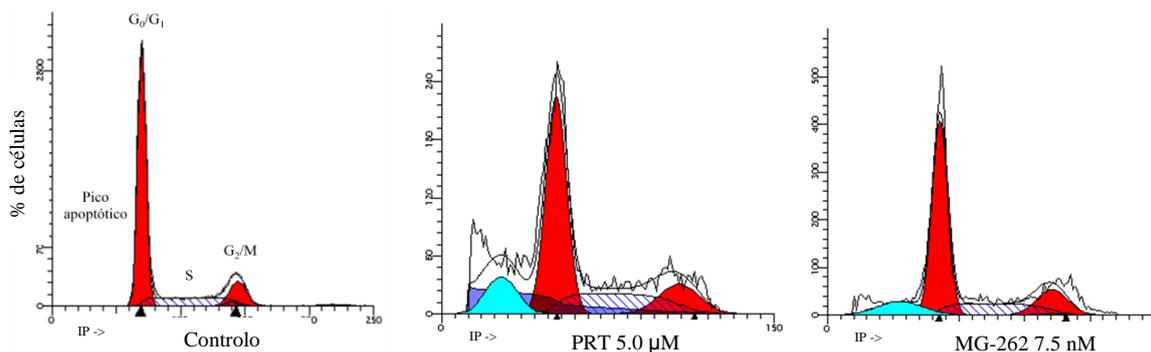


Figura 10 – Análise do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo. Exemplos dos histogramas obtidos evidenciando a distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular, incluindo o pico apoptótico (pré-G₁). Os resultados são expressos em percentagem (%) de células em cada fase do ciclo celular (em função da intensidade de fluorescência) e representam a média ± desvio-padrão de dois ensaios independentes. IP: Iodeto de Propídeo. PRT: Parthenolide.

3.2.3. Avaliação da inibição da IKK pelo Parthenolide e do proteasoma pelo MG-262

Para avaliar a inibição da IKK pelo Parthenolide determinou-se a expressão de NF-kB fosforilado por Citometria de Fluxo. De igual modo, a inibição do proteasoma pelo MG-262 foi verificada através da expressão de conjugados de ubiquitina.

3.2.3.1. Avaliação da expressão de NF-kB fosforilado por Citometria de Fluxo

Na Figura 11 está representada a expressão do NF-kB fosforilado (NF-kB F). Podemos observar que, nas células tratadas com Parthenolide (PRT) em monoterapia e em associação com os outros fármacos do estudo (Vincristina e MG-262), se observa diminuição estatisticamente significativa da expressão de NF-kB F, independente da dose e do esquema terapêutico que engloba o PRT.

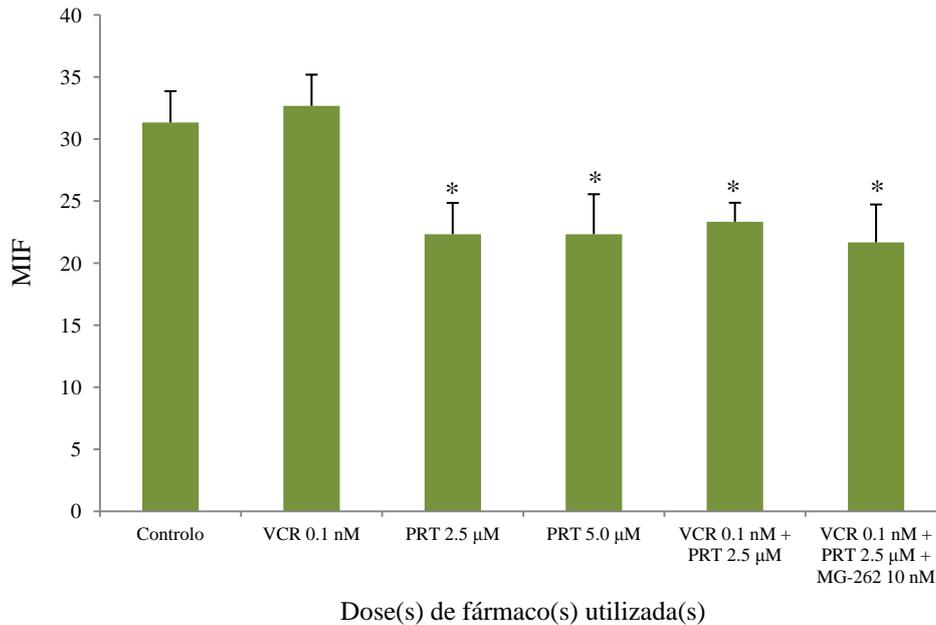


Figura 11 - Avaliação da expressão de NF-κB fosforilado por Citometria de Fluxo. A expressão de NF-κB fosforilado foi avaliada recorrendo a um anticorpo anti-NF-κB fosforilado associado a um fluorocromo, como descrito nos Materiais e Métodos, sendo que a uma maior inibição da IKK pelo fármaco corresponde uma menor quantidade de NF-κB fosforilado e, portanto, menor intensidade de fluorescência emitida. Os resultados resultam da média ± desvio-padrão de três ensaios independentes. MIF: Média de Intensidade de Fluorescência. PRT: Parthenolide. VCR: Vincristina. * $p < 0,05$

3.2.3.2. Avaliação da expressão de conjugados de ubiquitina por Citometria de Fluxo

Na figura 12 está representada a expressão dos conjugados de ubiquitina, ou seja, das proteínas que sofreram ubiquitinação. Como se pode observar, nas células tratadas com o MG-262, quer em monoterapia quer em associação com os outros fármacos do estudo (Vincristina e Parthenolide), existe um aumento daqueles conjugados. No entanto, este resultado apenas é estatisticamente significativo nas células tratadas com MG-262 em monoterapia.

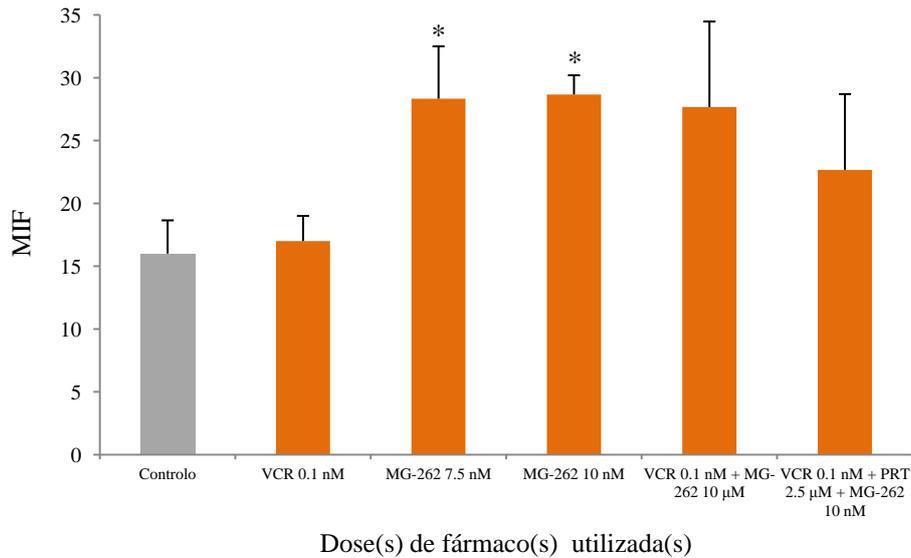


Figura 12 - Avaliação da expressão de conjugados de ubiquitina por Citometria de Fluxo. As proteínas para degradação pelo proteasoma sofrem um processo de ubiquitinação. A inibição do proteasoma pelo MG-262 conduz à acumulação dessas proteínas (conjugados de ubiquitina). Recorrendo a um anticorpo antiubiquitina associado a um fluorocromo, como descrito nos Materiais e Métodos, é detetada a fluorescência emitida, a qual é tanto maior quanto mais conjugados existirem. Os resultados resultam da média \pm desvio-padrão de três ensaios independentes. MIF: Média de Intensidade de Fluorescência. PRT: Parthenolide. VCR: Vincristina. * $p < 0,05$

4. DISCUSSÃO

Apesar do Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGC-B) ser uma neoplasia quimiossensível, muitos doentes não atingem a cura com os esquemas terapêuticos habituais³⁵. O avanço no conhecimento das vias moleculares envolvidas na linfomagenese aponta a via antiapoptótica do NF-kB como um alvo farmacológico de particular interesse em alguns linfomas, nomeadamente no LDGC-B^{15,36,37}.

A regulação da via do NF-kB ocorre a vários níveis. Este fator nuclear é normalmente encontrado no citoplasma ligado ao IκB (que o inibe), num complexo inativo. Em resposta a um estímulo que ative a via do NF-kB, o IκB é fosforilado pelo complexo IKK, que o marca para degradação no proteasoma. O NF-kB é assim libertado e pode ser translocado para o núcleo da célula, onde ativa a expressão de genes específicos^{38,39}.

Este trabalho surge no sentido de esclarecer, no LDGC-B, o potencial terapêutico de dois fármacos que interferem com a ativação do NF-kB, nomeadamente um inibidor da IKK, o Parthenolide (PRT), e um inibidor do proteasoma, o MG-262, quer em monoterapia, quer em combinação com a Vincristina (VCR).

Para tal, o estudo foi efetuado numa linha celular de LDGC-B, as células Farage, tendo-se quantificado a resposta aos fármacos através da determinação do IC₅₀ e tendo-se avaliado alguns dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade.

Os resultados obtidos mostram que, em monoterapia, tanto o inibidor da IKK, o PRT, como o inibidor do proteasoma, o MG-262, têm um efeito antiproliferativo e citotóxico dependente da dose e do tempo de incubação, induzindo morte celular preferencialmente por apoptose. No entanto, o efeito citotóxico nas células tratadas com PRT é obtido mais precocemente do que na presença de MG-262, uma vez que o IC₅₀ é atingido às 24 horas para o PRT e às 48 horas para o MG-262.

O PRT havia já demonstrado um efeito antitumoral significativo na Leucemia Mieloide Aguda, nas Leucemias Linfocíticas Aguda e Crónica⁴⁰ e em alguns subtipos de linfomas, bem como em alguns tumores sólidos como sejam os da mama, o colangiocarcinoma, o carcinoma pancreático e o carcinoma hepatocelular^{41,42}. Contudo, a concentração de PRT necessária para atingir o IC₅₀ nas células do nosso estudo, as células Farage, foi bastante inferior ao referido por outros autores⁴¹, sugerindo que o efeito deste fármaco, além de dependente da dose e do tempo, depende também do tipo celular. Os resultados obtidos com o MG-262 estão de acordo com o referido em outro tipo de linhas celulares de neoplasias hematológicas^{43,44}.

Tendo em conta os ensaios clínicos promissores do uso do inibidor do proteosoma Bortezomib no Mieloma Múltiplo, vários estudos estão a ser conduzidos no sentido de investigar o efeito deste fármaco noutros tumores, particularmente em linfomas, incluindo aqueles com uma sinalização aberrante na via do NF-kB¹³.

Sendo que os inibidores do proteosoma bloqueiam a ação do NF-kB através da inibição da degradação do IκB⁴⁵, investigou-se o efeito do inibidor do proteosoma MG-262 – um derivado do ácido borónico análogo do Bortezomib –, tanto em monoterapia como em combinação com a Vincristina.

Para o PRT e para o MG-262, o facto de a maior redução na viabilidade celular ter acontecido nas primeiras 24 horas de exposição, quer em monoterapia quer em associação, mostra que têm um efeito antiproliferativo rápido, com o interesse clínico daí consequente, pois que uma rápida redução da população celular neoplásica poderá traduzir-se num rápido controlo sintomático da doença.

A associação de VCR com PRT não mostrou ser mais eficaz que o uso do PRT isoladamente. Contrariamente, a associação da VCR com o MG-262 resultou num efeito sinérgico quando comparada com o MG-262 em monoterapia. Estes resultados parecem ser

dependentes da linha celular, uma vez que em células de Leucemia Linfoblástica Aguda da linhagem T este efeito não foi observado⁴⁶. Por outro lado, a utilização dos três fármacos (VCR, PRT e MG-262) mostrou um efeito antiproliferativo idêntico ao da associação da VCR com o MG-262, confirmando que aquele efeito sinérgico se deve a esta associação. Ou seja, os resultados sugerem que o efeito adicional da inibição do proteasoma ganha interesse em detrimento do da inibição da IKK, quando em associação com a quimioterapia convencional. Deste modo, é desnecessária a utilização de esquemas terapêuticos contendo os três fármacos, o que poderá diminuir os efeitos adversos.

Estas conclusões sugerem então um benefício clínico da associação da VCR com o MG-262. Com uma dose mais baixa deste fármaco obteve-se um efeito antiproliferativo mais rápido e mais marcado do que aquele que se verificou para a dose mais eficaz (que foi a mais alta utilizada) de MG-262 em monoterapia. Estes resultados estão de acordo com o descrito por outros autores, que referem que a inibição do NF-kB induz quimiossensibilização, pois muitos fármacos anticancerígenos convencionais ativam a função antiapoptótica do NF-kB⁴⁷.

Contudo, será de interesse verificar futuramente se com aquela associação não existirá também uma potenciação dos efeitos secundários dos dois fármacos, comparando-se com o perfil de segurança da monoterapia. Para além disto, a curva dose-resposta da associação VCR e MG-262 foi muito semelhante às das concentrações mais altas usadas de PRT em monoterapia. Os efeitos adversos do PRT deverão também ser estudados, pois não se pode descartar que este fármaco em uso isolado possa ter um melhor perfil de segurança.

Como é natural, os esquemas terapêuticos possíveis não foram esgotados. Surge assim o interesse de estudar, por exemplo, esquemas de associação diária de fármaco(s), de particular relevância por se ter observado em algumas situações deste estudo um fenómeno de reversibilidade do efeito antiproliferativo.

A análise do tipo de morte celular foi feita por Citometria de Fluxo (através da dupla marcação celular com Anexina V e Iodeto de Propídeo, bem como pela análise da expressão de Caspase 3) e ainda pela observação da morfologia das células recorrendo à Microscopia Ótica.

A apoptose observada nas células tratadas com MG-262 pode estar relacionada com a sua ação de inibir a degradação do I κ B fosforilado, o que vai manter o NF- κ B no citoplasma celular e, conseqüentemente, evitar a transcrição, entre outros, de fatores antiapoptóticos¹⁵. Por outro lado, sendo o MG-262 um inibidor do proteasoma, a acumulação de várias proteínas anómalas normalmente degradadas pode conduzir à ativação da cascata apoptótica³³. O PRT, ao inibir a IKK, evita que o I κ B seja fosforilado e degradado pelo proteasoma, causando igualmente o sequestro do NF- κ B no citoplasma^{12,41} e evitando assim a síntese de fatores antiapoptóticos necessários à linfomagenese¹⁵. No entanto, outros mecanismos poderão estar envolvidos na citotoxicidade induzida pelo PRT, como por exemplo a formação de espécies reativas de oxigénio, tal como referido por outros autores para o Hepatoma e para a Leucemia Mieloide⁴¹.

A fim de esclarecer os mecanismos envolvidos na morte celular por apoptose avaliou-se a expressão de Caspase 3, uma protease que desempenha um papel chave no processo apoptótico, assegurando o seu cumprimento assim que a célula tenha sido marcada para morte^{29,48}. Os resultados obtidos confirmam que a apoptose foi o principal mecanismo envolvido na morte celular, uma vez que se observou um aumento significativo da Caspase 3. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos pelos outros métodos utilizados neste estudo para análise do tipo de morte celular ocorrido.

Para além do efeito citotóxico observado, o PRT e o MG-262 induziram um efeito antiproliferativo nas células, que foi confirmado pela análise do ciclo celular feita através da Citometria de Fluxo. De facto, as células expostas àqueles fármacos pararam a progressão no

ciclo celular em fase G₀/G₁, tendo sido observado um pico apoptótico, de acordo com os nossos resultados anteriores.

Para além das características morfológicas típicas da apoptose, a presença de citoplasma de aspeto rendilhado (por marcada vacuolização) nas células tratadas com MG-262, sugere o envolvimento de autofagia. No entanto, é necessário confirmar este resultado, por exemplo através da avaliação da expressão da proteína Beclina-1, um marcador de morte celular por autofagia⁴⁹. Esta poderá acontecer como um processo de morte celular independente ou como um evento necessário à degradação das células apoptóticas⁵⁰.

Para avaliar a inibição da IKK pelo PRT analisou-se a expressão de NF-kB fosforilado (NF-kB F). A diminuição da expressão de NF-kB F que foi observada é indicativa do envolvimento do PRT na inibição da IKK⁵¹, permitindo que o IκB se mantenha ligado ao NF-kB num complexo não fosforilado^{38,39}.

A maior expressão dos conjugados de ubiquitina após o uso do MG-262 confirma a ocorrência de inativação do proteasoma. A inibição do proteasoma impede a degradação das proteínas que sofrem ubiquitinação, que desta forma se acumulam na célula^{10,33}. No entanto, nas células tratadas com MG-262 em associação com a VCR e o PRT, esse aumento de expressão não foi significativo. Estes resultados podem estar relacionados com o facto do PRT, ao inibir a IKK, fazer com que o IκB deixe de estar fosforilado, e consequentemente, deixe de ser um alvo para degradação no proteasoma (logo, não sofre ubiquitinação).

Numa apreciação global deste estudo, os resultados obtidos sugerem que o PRT e o MG-262 podem constituir alternativas terapêuticas no LDGC-B, com benefícios clínicos para o doente. No entanto, novos esquemas de associação devem ser testados, a fim de otimizar a eficácia terapêutica neste tipo de linfomas, com a menor toxicidade secundária possível.

BIBLIOGRAFIA

¹Hoffman R. *et al.* (2004), *Hematology: Basic Principles and Practice*. 4ª edição. Elsevier, Churchill Livingstone, St. Louis, Missouri EUA.

²Chiu B. C., Weisenburger D. D. (2003), An update of the epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Clinical Lymphoma*; 4(3):161-168.

³Tilly H., Dreyling M. (ESMO Guidelines Working Group) (2009), Diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*; 20(4):110-112.

⁴Hoffbrand A. V. *et al.* (2008), Linfomas não-Hodgkin *in* Fundamentos em Hematologia; pp 213-225. 5ª edição. Artmed, Porto Alegre.

⁵Stein H. *et al.* (2008), Diffuse Large B-Cell Lymphoma, not otherwise specified *in* Swerdlow S. *et al.*, eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC:233-237. Lyon.

⁶Neto A. *et al.* (2006), Estratificação de risco em linfoma difuso de grandes células B. *Revista brasileira de Hematologia e Hemoterapia*; 28(4):296-300.

⁷Jong D., Balaqué Ponz O. (2011), The molecular background of aggressive B cell lymphomas as a basis for targeted therapy. *The Journal of Pathology*; 223(2):274-282.

⁸Lenz G. (2010), Diffuse large B cell lymphoma - The molecular pathogenesis. Education Program for the 15th Congress of European Hematology Association 2010; 4(1):113-117.

⁹Jaffe E. S., Pittaluga S. (2011), Aggressive B-cell lymphomas: a review of new and old entities in the WHO classification. Hematology/American Society Hematology Educational Program; 2011:506-514.

¹⁰Morschhauser *et al.* (2010), Targeting molecular pathways - Diffuse Large B Cell Lymphoma. Education Program for the 15th Congress of European Hematology Association 2010; 4(1):118-123.

¹¹Hachem A., Gartenhaus R. B. (2005), Oncogenes as molecular targets in lymphoma. Blood; 106(6):1911-1923.

¹²Merfort I. (2011), Perspectives on sesquiterpene lactones in inflammation and cancer. Current Drug Targets; 12(11):1560-1573.

¹³Jost P. J., Ruland J. (2007), Aberrant NF-kB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences and therapeutic implications. Blood; 109(7):2700-2707.

¹⁴Richardson P. G. *et al.* (2003), Bortezomib (PS-341): A Novel, First-in-Class Proteasome Inhibitor for the Treatment of Multiple Myeloma and Other Cancers. Cancer Control; 10(5): 361-369.

¹⁵Adams J. (2004), The Proteasome: A Suitable Antineoplastic Target. *Nature Reviews Cancer*; 4:349-360.

¹⁶Imagem da estrutura química do Parthenolide *in*

http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO%7CBRAND_KEY&N4=P0667%7CSIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC.

¹⁷Imagem da estrutura química do MG-262 *in*

http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB3334469.htm.

¹⁸Vose J. M. *et al.* (2002), Update on epidemiology and therapeutics for non-Hodgkin's lymphoma. *Hematology/The Education Program of American Society of Hematology* 2002:241-262.

¹⁹Hennessy B. T. *et al.* (2004), Non-Hodgkin lymphoma: an update. *The Lancet Oncology*; 5:341-353.

²⁰Castagna L. *et al.* (2007), Lymphomas. *Update on Cancer Therapeutics*; 2:101-110.

²¹Michallet A.-S., Coiffier B. (2009), Recent developments in the treatment of aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood Reviews*; 23:11-23.

²²Descrição das células Farage *in*

<http://www.lgcstandards->

[atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCC](http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCC)

[Num=CRL-2630&Template=cellBiology](http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CRL-2630&Template=cellBiology).

²³Nakayama G. R. *et al.* (1997), Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *Journal of Immunological Methods*; 204:205-208.

²⁴Al-Nasiry S. *et al.* (2007), The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human Reproduction*; 22(5):1304-1309.

²⁵Gorman A. M. *et al.* (1997), Use of Flow Cytometry Techniques in Studying Mechanisms of Apoptosis in Leukemic Cells. *Cytometry*; 29:97-105.

²⁶Bernas T. *et al.* (2006), Integrating Cytomics and Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*; 5(1):2-13.

²⁷Aubry J.-P. *et al.* (1999), Annexin V Used for Measuring Apoptosis in the Early Events of Cellular Cytotoxicity. *Cytometry*; 37:197-204.

²⁸Krishan A. (1975), Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *The Journal of Cell Biology*; 9(66):188-193.

²⁹Porter, A. G., Janicke R. U. (1999), Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*; 6(2):99-104.

³⁰Houwen B. (2001), The Differential Cell Count. *Laboratory Hematology*; 7:89-100.

³¹Sarmiento-Ribeiro A. B. (2000), Alterações fenotípicas da célula tumoral e a sua relação com a resistência à quimioterapia. Tese de Doutorado, Universidade de Coimbra.

³²Espinosa I. *et al.* (2008), Activation of the NF-kappaB signalling pathway in diffuse large B-cell lymphoma: clinical implications. *Histopathology*; 53(4):441-449.

³³Nencioni A. *et al.* (2007), Proteasome Inhibitors: Antitumor effects and beyond. *Leukemia*; 21:30-36.

³⁴Pasquini L. A. *et al.* (2002), Apoptosis in Schwann cell cultures is closely interrelated with the activity of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Neurochemical Research*; 27(11):1401-1419.

³⁵Shipp M. A. (2007), Molecular Signatures Define New Rational Treatment Targets in Large B-Cell Lymphomas. *Hematology/The Education Program of American Society of Hematology 2007*:265-269.

³⁶Georg L., Staudt L. M. (2010), Aggressive Lymphomas. *The New England Journal of Medicine*; 362:1417-1429.

³⁷Nishikori M. (2005), Classical and Alternative NF-κB Activation Pathways and Their Roles in Lymphoid Malignancies. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology*; 45(1):15-24.

³⁸Baldwin A. S. (2001). Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-κB. *The Journal of Clinical Investigation*; 107:241-246.

³⁹Matthew C. *et al.* (2006), Parthenolide cooperates with NS398 to inhibit growth of human hepatocellular carcinoma cells through effects on apoptosis and G0-G1 cell cycle arrest. *Molecular Cancer Research*; 4(6):387-399.

⁴⁰Zunino S. J. *et al.* (2010), Parthenolide treatment activates stress signaling proteins in high-risk acute lymphoblastic leukemia cells with chromosomal translocation t(4;11). *International Journal of Oncology*; 37:1307-1313.

⁴¹Steele A. J. *et al.* (2006), The sesquiterpene lactone parthenolide induces selective apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Leukemia*; 20(6):1073-1079.

⁴²Jolanta S. *et al.* (2009). Modulation of cell surface protein free thiols: a potential novel mechanism of action of the sesquiterpene lactone parthenolide. *PLoS One*; 4(12):e8115.

⁴³Sarmiento-Ribeiro A. B. *et al.* (2004), Proteasome Inhibitors - A potential therapeutic approach in acute lymphoblastic leucemia. *Hematology Journal*; 5(2):S135.

⁴⁴Dourado M. *et al.* (2005), Proteasome inhibitors may circumvent resistance to chemotherapy in acute lymphoblastic leukaemia cells in culture. *Haematologica*; 90(2):480.

⁴⁵Dunleavy K. *et al.* (2009), Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*; 113(24):6069-6076.

⁴⁶Denisa M. (2005), Sistema ubiquitina-proteasoma em neoplasias hematológicas – Potencial terapêutico dos inibidores do proteasoma. Dissertação de Mestrado, Universidade de Coimbra.

⁴⁷Orlowski R. Z., Kuhn D. J. (2008), Proteasome Inhibitors in Cancer Therapy: Lessons from the First Decade. *Clinical Cancer Research*; 14(6):1649-1657.

⁴⁸Elmore, S. (2007), Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35:495-516.

⁴⁹Kang R. *et al.* (2011), The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*; 18:571–580.

⁵⁰Konishi A. *et al.* (2012), Involvement of Beclin 1 in the engulfment of apoptotic cells. *The Journal of Biological Chemistry*; 112:348-375.

⁵¹Viatour P. *et al.* (2005), Phosphorylation of NF- κ B and I κ B proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends in Biochemical Sciences*; 30(1):43-52.

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro e à Mestre Ana Cristina Pereira Gonçalves, respetivamente as minhas orientadora e coorientadora nesta investigação. À Doutora Vera Alves. À Raquel Alves e ao José Mendes.

À CIMAGO (Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia), Portugal, que apoiou esta investigação.