

Joana Pinto Fernandes

# Potencial terapêutico do Sirolimus e da Metformina em células de Leucemia Linfoblástica Aguda

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, orientada pela Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro e pelo Professor Doutor João Nuno Sereno Almeida Moreira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Joana Pinto Fernandes

# Potencial terapêutico do Sirolimus e da Metformina em células de Leucemia Linfoblástica Aguda

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, orientada pela Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro e pelo Professor Doutor João Nuno Sereno Almeida Moreira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Índice





# Índice

Agradecimentos .....	VII
Resumo .....	XI
Abreviaturas .....	XVII
<b>I. Introdução .....</b>	<b>3</b>
I.1. Sistema Hematopoiético .....	4
I.2. Desenvolvimento de células B .....	5
I.3 Leucemia Linfoblástica Aguda .....	6
I.3.1. Epidemiologia e Etiologia .....	6
I.3.2. Classificação .....	7
I.3.2.1. Translocações do <i>MLL</i> .....	9
I.4. Vias de sinalização alteradas em LLA .....	10
I.4.1. FLT3 .....	11
I.4.2. RAS .....	11
I.4.3. mTOR .....	12
I.5. Tratamento .....	15
I.5.1. Novos alvos terapêuticos .....	16
I.5.1.1. Sirolimus .....	16
I.5.1.2. Metformina .....	18
I.6. Objetivos .....	19
<b>2. Materiais e Métodos .....</b>	<b>23</b>
2.1. Caracterização e cultura da linha celular KOPN-8 .....	23
2.2. Incubação da linha celular KOPN-8 .....	23
2.3. Avaliação da proliferação e viabilidade celular pelo teste de exclusão com azul de tripano .....	24
2.4. Avaliação da morte celular por citometria de fluxo .....	25
2.5. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo .....	26
2.6. Avaliação da expressão de moléculas envolvidas na morte celular por citometria de fluxo .....	26
2.7. Avaliação do potencial de membrana mitocindrial ( $\psi_{mit}$ ) por citometria de fluxo .....	27
2.8. Avaliação da morte celular por microscopia ótica .....	28

2.9. Avaliação da autofagia por determinação da proteína LC3B por citometria de fluxo.....	28
2.10. Análise Estatística .....	29
<b>3. Resultados .....</b>	<b>33</b>
3.1. Avaliação do potencial terapêutico de um fármaco inibidor do mTOR .....	33
3.1.1. Curvas de Viabilidade e Proliferação celular .....	33
3.2. Avaliação do potencial terapêutico de um fármaco ativador da AMPK .....	35
3.2.1. Curvas de Viabilidade e Proliferação celular .....	35
3.3. Avaliação do potencial terapêutico da associação entre um fármaco inibidor do mTOR e um activador da AMPK .....	36
3.3.1. Curvas de Viabilidade e Proliferação celular .....	36
3.4. Avaliação do tipo de morte celular por citometria de fluxo .....	37
3.5. Avaliação do tipo de morte por microscopia ótica .....	38
3.6. Avaliação dos mecanismos moleculares induzidos pelo Sirolimus e Metformina .....	40
3.6.1. Avaliação da expressão de caspases por citometria de fluxo .....	40
3.6.2. Avaliação do potencial de membrana da mitocôndria por citometria de fluxo ...	41
3.6.3. Avaliação da proteína autofágica LC3B por citometria de fluxo .....	42
3.7. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo .....	43
<b>4. Discussão .....</b>	<b>47</b>
4.1. Avaliação do potencial terapêutico de um inibidor do mTOR e um ativador da AMPK em células precursoras B de leucemia linfoblástica aguda <i>in vitro</i> .....	47
<b>5. Conclusão .....</b>	<b>54</b>
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>57</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> Esquema da Hematopoiese .....	4
<b>Figura 2</b> Estados iniciais do desenvolvimento de células B .....	5
<b>Figura 3</b> Patogénese da LLA de células precursoras B .....	9
<b>Figura 4</b> Representação esquemática da sinalização do mTOR.....	14
<b>Figura 5</b> Representação esquemática da formação dos autofagossomas.....	15
<b>Figura 6</b> Efeito do Sirolimus na proliferação e viabilidade das células KOPN-8.....	33
<b>Figura 7</b> Efeito do Sirolimus em administração fracionada na proliferação e viabilidade das células KOPN-8.....	34
<b>Figura 8</b> Efeito da Metformina na proliferação e viabilidade das células KOPN-8.....	35
<b>Figura 9</b> Efeito da combinação entre o Sirolimus e a Metformina na proliferação e viabilidade das células KOPN-8.....	36
<b>Figura 10</b> Avaliação da morte celular na linha celular KOPN-8 por citometria de fluxo.....	38
<b>Figura 11</b> Aspeto morfológico das células KOPN-8 na ausência (Controlo) e após o contacto com SIR, MET e os dois fármacos em associação.....	39
<b>Figura 12</b> Análise da expressão de caspases na linha celular KOPN-8 por citometria de fluxo.....	41
<b>Figura 13</b> Análise do potencial de membrana mitocondrial na linha celular KOPN-8 por citometria de fluxo.....	42
<b>Figura 14</b> Análise da expressão de LC3B na linha celular KOPN-8 por citometria de fluxo.....	43
<b>Figura 15</b> Análise do ciclo celular na linha celular KOPN-8 por citometria de fluxo.....	44

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> Classificação da Leucemia Linfoblástica Aguda pela Organização Mundial de Saúde (OMS) .....	8
---	---





## **Agradecimientos**





## Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com todo o meu empenho, esforço e dedicação. No entanto, há pessoas às quais devo e quero agradecer, pois sem elas teria sido mais difícil concluir a etapa da minha vida que aqui encerro.

Em primeiro lugar agradeço à Professora Doutora Ana Bela Sarmento por ter aceite orientar o meu projeto de Mestrado, pelos seus conselhos e pelas sábias sugestões e soluções que sempre apresentou. Agradeço também ao Professor Doutor João Nuno Moreira pela disponibilidade sempre demonstrada ao longo de todo o Mestrado.

À Doutora Ana Cristina Gonçalves pelos esclarecimentos e partilha de conhecimentos preciosos no decorrer dos experimentos laboratoriais. Agradeço ainda por toda a disponibilidade e paciência demonstradas, especialmente na reta final.

Às minhas colegas do laboratório Raquel, Joana, Ana, Patrícia e Cátia que estiveram sempre presentes, desde a primeira à última pipetagem, me deram motivação e foram incansáveis principalmente na reta final do meu trabalho. A elas devo todas as aprendizagens do dia a dia no laboratório. Agradeço também às Saras e à Mariana, que entretanto rumaram a outras aventuras, pelo à vontade e bom humor sempre demonstrados muito importantes para a minha integração inicial.

Agradeço também aos meus colegas de Mestrado, Inês Amaral, Inês Marques e Gonçalo Brites pela amizade, companheirismo e por nunca faltarem aos jantares de Mestrado. Desejo-lhes o maior sucesso e poder continuar a acompanhá-los.-

Um obrigada também às minhas amigas que, algumas delas apesar de longe, estiveram sempre a torcer por mim e mostraram sempre preocupação.

Ao Granjo, meu melhor amigo e namorado, obrigada pela paciência, compreensão e motivação dadas, por me fazer sempre rir e por me acalmar, pelas refeições confeccionadas, por me facilitar as vidas nas horas de aperto, pela motivação e pelo carinho sempre dados.

Por fim, mas não em último, quero agradecer à minha família. Aos meus pais que com esforço me proporcionaram mais esta oportunidade de enriquecer a minha formação académica. A eles devo tudo o que sou e estarei eternamente grata por todos os ensinamentos, pela motivação dada, pela paciência e pelo amor incondicional. Sem eles nada disto teria sido possível! Agradeço ainda à minha irmã e à minha avó São pelos telefonemas e constante preocupação. A todos um enorme bem-haja!



## Resumo





## Resumo

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é a neoplasia hematológica mais frequente em crianças e pode afetar a linhagem B ou T de linfócitos, caracterizando-se pelo bloqueio da diferenciação e excessiva proliferação de linfoblastos com deficiente produção de células hematopoiéticas. A LLA tem origem, maioritariamente, na ocorrência de alterações cromossômicas sendo as translocações que envolvem o gene *MLL* as mais frequentes em crianças com idade inferior a um ano e associadas a um prognóstico desfavorável. Apesar do evento inicial ser uma destas alterações, o estabelecimento do quadro da doença dá-se devido a mutações secundárias em recetores ou outras proteínas com consequente desregulação de vias de sinalização intracelulares que contribuem para a continuidade da proliferação das células leucémicas.

Apesar do tratamento da LLA nos últimos anos ter melhorado significativamente os níveis de sobrevivência dos doentes, as percentagens de recaída e de insucesso obrigam ainda à procura de alternativas terapêuticas. Torna-se necessário conhecer as alterações citogenéticas e as vias desreguladas de forma a direcionar os fármacos e criar novas estratégias terapêuticas mais eficazes. Uma das vias frequentemente alteradas em células de LLA é a via de sinalização do mTOR, o regulador central de processos como o crescimento, proliferação e sobrevivência das células. Um outro processo associado à atividade do mTOR é a autofagia que tem sido estudada como possível mecanismo de morte, apesar de em alguns tipos de tumores estar associada à resistência das células neoplásicas ao tratamento. Assim, a inibição da atividade do mTOR e a estimulação da autofagia por ativação de outros alvos como a AMPK, podem ser sinergicamente eficazes na eliminação das células de LLA.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial terapêutico da associação entre um inibidor do mTOR (Sirolimus) e de um ativador da AMPK (Metformina), em monoterapia e combinação terapêutica, num modelo *in vitro* de LLA de células precursoras B com a translocação t(11;19)(q23;p13) que origina a proteína de fusão MLL-ENL. As células foram incubadas na ausência e na presença do Sirolimus em concentrações entre 250 nM e 15 µM, da Metformina em concentrações entre 1 mM e 7,5 mM e do Sirolimus associado à Metformina nas concentrações de 250 nM e 1 mM, respectivamente. Com recurso ao teste de exclusão do azul de tripano avaliou-se os efeitos citotóxicos e citostáticos dos dois fármacos isoladamente e em associação. A administração fracionada do Sirolimus permitiu ainda avaliar a influência do esquema de administração

deste fármaco. A morte celular foi avaliada por microscopia ótica, após coloração de esfregaços usando o método de May-Grünwald-Giemsa, e por Citometria de Fluxo (CF), através da dupla marcação com Anexina V e Iodeto de Propídeo. Foi também avaliada por CF a activação de caspases utilizando a sonda Apstat, o potencial de membrana com o JC-1, bem como o ciclo celular com recurso ao Iodeto de Propídeo/RNase. De forma a verificar se os fármacos induziam autofagia foi analisada por CF a expressão de LC3B, um marcador do processo autofágico.

Os resultados mostram que o Sirolimus reduz a viabilidade e a proliferação celular de uma forma dependente do tempo e da dose. O  $IC_{50}$  do fármaco foi obtido após 48h de exposição sendo entre 7,5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M. Além disso, os resultados sugerem que a administração diária do fármaco é mais eficaz na redução da viabilidade e da proliferação celular quando comparado com mesma dose total em administração única. O Sirolimus mostrou induzir morte celular por apoptose com ativação de caspases associada à despolarização da membrana. A análise do ciclo celular confirma a atividade anti-proliferativa do fármaco, uma vez que é observado um bloqueio na fase  $G_0/G_1$ . Também se verificou um aumento da LC3B dependente da dose que pode estar associado à morte celular. Por sua vez, a Metformina mostrou também induzir uma redução da viabilidade e da proliferação celular. O  $IC_{50}$  deste fármaco foi obtido mais tardiamente, às 72h de exposição, e está entre 2,5 mM e 5 mM. A morte celular induzida pela Metformina foi sobretudo por apoptose com activação de caspases associada também à despolarização da membrana. A exposição à Metformina levou igualmente a um aumento da expressão da LC3B dependente da dose que pode estar associado à morte celular.

Seria expectável que a associação entre o Sirolimus e a Metformina intensificasse a atividade demonstrada por cada um dos fármacos individualmente especialmente em relação ao aumento da autofagia. No entanto, esta combinação não potenciou os seus efeitos. Futuramente seria importante uma avaliação mais profunda dos mecanismos subjacentes à ação do Sirolimus e da Metformina em associação, testar novos esquemas de administração e ainda novas doses dos fármacos.

#### **Palavras chave:**

- Leucemia Linfoblástica Aguda
- Sirolimus
- Metformina



## Abstract

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the most common type of cancer in children and affects B or T lymphocyte lineage. It's characterized by the excessive proliferation of lymphoblasts and impaired hematopoietic cell production. ALL occurrence is mainly due to chromosomal alterations and *MLL* gene translocations are frequently in children less than one year of age associated to an unfavorable prognosis. Although the initial event is based on these changes, the leukemia establishment occurs due to secondary changes in receptor or other proteins with consequent disruption of intracellular signaling pathways that contribute to a sustained proliferation of leukemic cells.

Although treatment of ALL has significantly improved survival levels in recent years, relapse rates and failure of therapy still require new therapeutic agents. It's necessary to know the cytogenetic changes and pathways deregulated in leukemic cells in order to direct drug targeting and create new and more effective therapeutic strategies. One pathway usually altered in ALL cells is the mTOR signaling pathway, the central controller processes such as growth, proliferation and cell survival. Another process associated with mTOR activity is autophagy and it has been studied as a possible mechanism of tumor cell death although in some types of tumors this process contributes to treatment resistance. Thus, inhibition of mTOR activity and autophagy stimulation through activation of targets like AMPK may be synergistically effective elimination of ALL cells.

Thus, the main goal of this study was to evaluate the therapeutic potential of association between a mTOR inhibitor (Sirolimus) and an AMPK activator (Metformin) as adjuvant in *in vitro* models of B precursor cells ALL with the translocation t (11; 19) (q23; p13) and MLL-ENL fusion protein. The cells were incubated in the absence and presence of Sirolimus at a range of concentrations between 250 nM and 15  $\mu$ M, Metformin at concentrations between 1 mM and 7,5 mM and Sirolimus associated with Metformin at concentrations of 250 nM and 1 mM, respectively. Using the trypan blue exclusion test was possible to construct dose-response curves that allowed the evaluation of cytotoxic and cytostatic effects of that two agents individually and combined. The administration of Sirolimus in a fractionated way allowed us to evaluate the influence of dose schedule on these cells. Cell death was assessed by optical microscopy after May-Grünwald-Giemsa staining and by flow cytometry Annexin V and Propidium Iodide double staining. Also by flow cytometry was measured caspase using the Apostat probe, membrane potential with JC-1 as well as cell cycle through the use of propidium iodide/RNase. In order to verify the

autophagy induction it was analyzed LC3B expression, an autophagic marker, with the same technique previously resfered.

The results show that Sirolimus reduced cell viability and proliferation of a time and dose-dependent manner. The drug  $IC_{50}$  was obtained after 48 hours of exposure and it's a value between 7,5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M. Furthermore, the results suggest a more effective daily administration of the drug with a greater reduction of cell viability and proliferation compared to the same total dose in a single administration. Sirolimus shown to induce cell death through apoptosis with caspase activation associated to mitochondrial membrane depolarization. The cell cycle analysis confirmed the antiproliferative activity of drug, since it is observed a G0 / G1 phase block. There was also an increase of LC3 in a dose dependent manner which can be associated to cell death. In turn, Metformin has also been shown to induce a reduction in viability and cell proliferation. The drug  $IC_{50}$  was obtained later than Sirolimus  $IC_{50}$ , close to the 72 hours of exposure, and its value is between 2,5 mM and 5 mM. Metformin induces mainly apoptotic cell death with caspase activation also associated with membrane depolarization. However, cell cycle analysis isn't conclusive. Metformin exposure has also led to a LC3 expression increase depending of dose which may can be related to cell death.

It would be expected that Sirolimus and Metformin association produced an activity improvement relatively to drugs effects individually, especially in autophagy induction. However, this combination did not showed to potentiate their effects. In future it would be important a further evaluation of Sirolimus and Metformin underlying mechanisms of action and test several administration schedules and new drug dosages.

**Key words:**

- Acute Lymphoblastic Leukemia
- Sirolimus
- Metformin

## **Abreviaturas**





## **Abreviaturas**

**Akt** (*protein kinase B*)

**AMPK** (*AMP-activated protein kinase*)

**Atg** (*Autophagy related genes*)

**AV** (*Anexina V*)

**BCL-2** (*B-cell lymphoma 2*)

**CEH** (*Célula Estaminal Hematopoiética*)

**CO<sub>2</sub>** (*Dióxido de Carbono*)

**CPM** (*Célula progenitora multipotente*)

**DNA** (*Deoxyribonucleic acid*)

**EBF** (*Early B factor 1*)

**ENL** (*eleven-nineteen leucemia*)

**EPHA7** (*EPH receptor A7*)

**ERK** (*Extracellular signal-regulated kinase*)

**E2A** (*Immunoglobulin enhancer-binding factors E12/E47*)

**FDA** (*Food and Drug Administration*)

**FKBP12** (*FK-12 binding protein*)

**FLT3** (*Fms-related tyrosine kinase*)

**G** (*força centrífuga*)

**GABARAP** (*Gamma-aminobutyric acid receptor associated-protein*)

**FBS** (*Fetal bovine serum*)

**Hox** (*Homeobox*)

**H3K4** (*histona 4 lisina 4*)

**H3K79** (*histona 3 lisina 79*)

**IGF-1** (*Insulin growth factor 1*)

**IP** (*Iodeto de Propídeo*)

**JC-1** (*5,5',6,6'-tetrachloro-1,1'3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide*)

**LC3** (*Light chain 3*)

**LKB1** (*Liver kinase B1*)

**LMA** (*Leucemia Mielóide Aguda*)

**LLA** (*Leucemia Linfoblástica Aguda*)

**LLA-B** (Leucemia Linfoblástica Aguda de células B)  
**LLA-CPB** (Leucemia Linfoblástica Aguda de células precursoras B)  
**LLA-T** (Leucemia Linfoblástica Aguda de células T)  
**MAPK** (*Mitogen activated protein kinase*)  
**Meis1** (*Meis homebox 1*)  
**MET** (Metformina)  
**MLL** (*Mixed lineage leucemia*)  
**mTOR** (*Mammalian target of rapamycin*)  
**mTORC1** (*mTOR complex 1*)  
**mTORC2** (*mTOR complex 2*)  
**MYC** (*Cellular myelocytomatosis gene*)  
**Notch** (*Notch homolog 1, translocation associated Drosophila*)  
**OMS** (Organização Mundial de Saúde)  
**Pax5** (*paired box gene 5*)  
**PBS** (tampão fosfato)  
**PE** (fosfatidiletanolamina)  
**PIP2** (*Phosphatidylinositol (4,5) biphosphate*)  
**PIP3** (*Phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate*)  
**PI3K** (*Phosphatidylinositol 3-kinase*)  
**PKC** (*protein kinase C*)  
**PLC** (Precursor linfóide comum)  
**PMC** (Precursor mielóide comum)  
**pTEF** (*positive transcription elongation factor*)  
**RAF** (*Ras function*)  
**RAS** (*rat sarcoma*)  
**RPMI** (*Roswell Park Memorial Institute*)  
**RNA** (*Ribonucleic acid*)  
**RSK** (*Ribossomal S6 kinase*)  
**SIR** (Sirolimus)  
**SGKI** (*Serum/glucocorticoid regulated kinase*)  
**SMD** (Síndrome Mielodisplásica)

**SNC** (Sistema Nervoso Central)

**STAT5** (*Signal transducer and activator of transcription 5*)

**S6KI** (*S6 kinase 1*)

**TCEH** (Transplante de células estaminais hematopoiéticas)

**TSC** (*Tuberous sclerosis complex*)

**ULK** (*Unc-51-like kinase*)

**Vps34** (*Vacuolar protein sorting 34*)





## **Introdução**





# I. Introdução

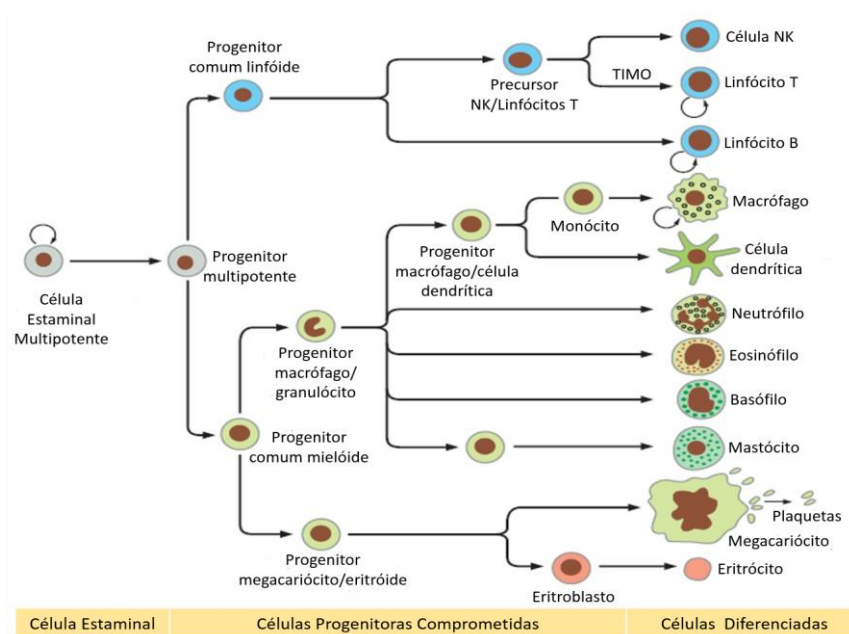
## I.1. Sistema Hematopoiético

As células estaminais hematopoiéticas (CEHs) têm não só a capacidade de se diferenciarem em qualquer tipo de célula sanguínea, tanto da linhagem mielóide como da linhagem linfoide, mas também de originar outras células estaminais idênticas por autorrenovação (1). Estas células indiferenciadas apresentam baixa atividade metabólica e ausência de marcadores específicos de uma linhagem (1). A maior parte das CEHs estão num estado de quiescência no seu microambiente (nicho), isto é, mantêm-se na fase G0/G1 do ciclo celular num estado indiferenciado o que contribui para que, em condições de homeostase, o seu número se mantenha relativamente constante e para uma rápida progressão no ciclo celular perante estímulos de diferenciação. O nicho é o ambiente em que estas células se encontram e que ajuda a controlar a sua sobrevivência, capacidade de renovação e diferenciação (2)(3).

As CEHs são altamente reguladas ao longo de toda a vida de um indivíduo, permitindo uma produção sustentada de todas as linhagens celulares sanguíneas tanto em condições fisiológicas normais como em estados patológicos. Estas regulam o *turnover* de eritrócitos, plaquetas e células do sistema imunitário (leucócitos e linfócitos). A mudança de um estado de multipotência para um estado diferenciado envolve uma série de passos e alterações da expressão de genes. Esta progressão é regulada por diferentes fatores de transcrição cuja função é controlar o nível e o número de divisões das células progenitoras, podendo atuar em passos iniciais do comprometimento celular ou mais tardiamente na diferenciação completa das células. A ausência de fatores que promovam a diferenciação das células culmina na apoptose das mesmas (2)(4). A CEH apresenta uma divisão assimétrica, isto é, gera duas células filhas não idênticas em que uma delas conserva a sua identidade de célula estaminal enquanto a outra se torna numa célula mais diferenciada, a célula progenitora multipotente (CPM) (2). A hematopoiese ocorre na medula óssea, no entanto, algumas células adquirem a sua forma madura noutros tecidos, como os linfócitos T, cuja diferenciação ocorre no timo, e os monócitos, que ao chegarem aos tecidos através da corrente sanguínea adquirem a forma de macrófagos. (5).

Como se pode observar na Figura I, a CEH origina a célula progenitora multipotente que, por sua vez, se divide em células progenitoras multipotentes ou em células progenitoras comprometidas que se tornam progressivamente especializadas até originarem as células

sanguíneas maduras e diferenciadas. No decorrer deste processo de diferenciação celular, denominado hematopoiese, ocorre perda de capacidade proliferativa e aumento da propensão para morte celular por apoptose (3)(5). O primeiro passo de diferenciação é o comprometimento celular com a linhagem linfóide ou com a linhagem mielóide (5). Os progenitores multipotentes originam células progenitoras oligopotentes que podem ser progenitores linfóides comuns (PLC) ou mielóides (PMC) cujo nível de diferenciação é maior e a capacidade proliferativa mais limitada (3). As células progenitoras mielóides evoluem para megacariócitos (originam plaquetas), eritrócitos, granulócitos, monócitos/macrófagos e células dendríticas. Por outro lado, as células progenitoras linfóides dão origem a linfócitos T, linfócitos B, células *Natural-Killer* e também células dendríticas (3).



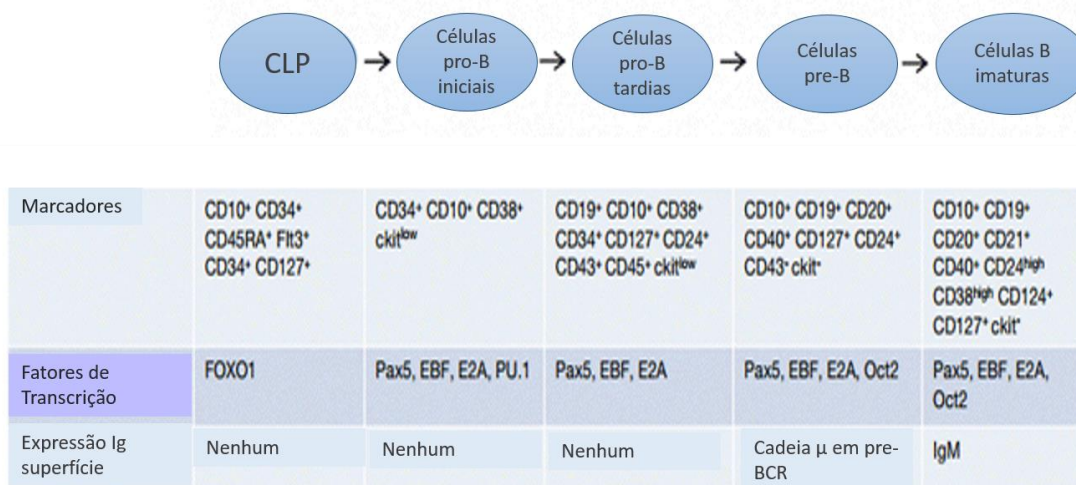
**Figura 1- Esquema da Hematopoiese.** As células estaminais dividem-se para originar novas células estaminais multipotentes ou células progenitoras comprometidas que são limitadas quanto ao número de divisões antes de originarem células sanguíneas maduras. As células progenitoras tornam-se progressivamente mais especializadas nos tipos de células às quais darão origem como se observa no esquema. [Adaptado de *Molecular Biology of the cell* (2015) (5)]

Quanto menor o número de vezes que uma CEH tem de se dividir, menor é o risco de ocorrência de mutações que podem originar clones persistentes de células mutantes no organismo e originar situações patológicas. Por exemplo, mutações que causem a produção excessiva de proteínas inibidoras da apoptose como a BCL-2 ou de proteínas envolvidas na proliferação celular, estão na base da manutenção da capacidade de divisão celular e da origem de leucemias (4).

## I.2. Desenvolvimento de células B

As diferentes populações de células hematopoiéticas apresentam perfis de expressão de genes específicos (6). Durante a diferenciação da linhagem linfóide B, as células progenitoras linfóides que originam as células B passam pelas fases de pro-linfócito B [inicial (pre-pro-linfócito B) e tardia], pre-linfócito B (precursoras B) e linfócito B imaturo, adquirindo a sua forma madura na corrente sanguínea (6)(7). Durante este processo, os recetores de antigénios (imunoglobulinas) e marcadores presentes à superfície das células mudam de acordo com a fase de desenvolvimento em que estas se encontram (6). Assim, as células iniciais da linfopoiese B expressam à superfície  $CD34^+CD19^-CD10^+$ . As células pro-B retêm a expressão dos marcadores CD34 e CD10 e expressam também CD19 ( $CD34^+CD19^+CD10^+$ ), já a expressão de CD34 cessa na transição para a fase pre-B ( $CD34^-CD19^+CD10^+$ ) (6)(7).

Vários fatores de transcrição foram já identificados como necessários para o comprometimento e desenvolvimento das células de linhagem B, nomeadamente o PU.1, E2A, EBF1 e PAX5, sendo a expressão destes fatores de transcrição variável ao longo das várias fases do desenvolvimento das células B (3). Por exemplo, a expressão do *Pax5* promove o comprometimento de células progenitoras que expressem E2A e EBF com a linhagem B sendo a sua expressão limitada às células iniciais, onde antagoniza a expressão do NOTCH1 e impede o comprometimento com a linhagem T (8). A evolução das células B pode ser observada na Figura 2.



**Figura 2- Estados iniciais do desenvolvimento de células B.** Ig, imunoglobulina; Pax5, *paired box gene 5*; EBF, *early B cell factor 1*; OCT2, *octamer transcription factor 2*; FOXO1, *forkhead box protein O1*. [Adaptado de An Overview of B Cells – from Discovery to Therapy (2016) (9)]

### **I.3. Leucemia Linfoblástica Aguda**

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é uma doença agressiva que pode afetar linfócitos B ou T e caracteriza-se pela acumulação de linfoblastos (células precursoras de linfócitos indiferenciadas) na medula óssea ou órgãos linfóides. A instalação da doença é rápida e apresenta sinais e sintomas associados à falência medular. É o subtipo de leucemia mais incidente em crianças (75-80%), principalmente nas crianças com idade inferior a 10 anos, sendo mais rara em adultos (10).

De uma forma geral, os doentes com LLA apresentam sintomas resultantes da insuficiência hematopoiética que se reflete na contagem de células sanguíneas. Quando há suspeita de LLA devem recolher e analisar-se as células da medula óssea. O diagnóstico diferencial passa pela análise citológica (morfologia), imunofenotípica e citogenética (1).

#### **I.3.1. Epidemiologia e Etiologia**

A LLA atinge principalmente pessoas com idade inferior a 20 anos, com um pico de ocorrência entre os 2 e os 5 anos de idade, após o qual há um declínio contínuo da incidência. Em indivíduos com mais de 50 anos a incidência volta a aumentar atingindo um novo pico perto dos 80 anos. O desenvolvimento de LLA em crianças com idade inferior a um ano está associado a um pior prognóstico. A doença desenvolve-se com maior frequência em indivíduos do sexo masculino (11) e a sua incidência varia também com a raça e etnia afetando frequentemente, por ordem crescente, indivíduos de raça negra, caucasianos e hispânicos (12). Nos Estados Unidos a incidência da LLA é cerca de 30 casos por cada milhão de pessoas (11).

A predisposição e suscetibilidade genética para o aparecimento da LLA prendem-se com a presença de alterações genéticas hereditárias (<5%), a ocorrência de translocações, deleções ou outras alterações cromossómicas, a coexistência de Síndrome de Down (trissomia 21) e alguns polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo, resposta imunológica e reparação do DNA (13). Muitas das mutações ligadas ao processo leucémico ocorrem em genes que regulam a diferenciação das células B e T (11). A maioria dos eventos que originam leucemias agudas em crianças ocorre, provavelmente, no feto num período pré-natal (antes do nascimento) sendo o elevado risco de aparecimento desta doença associado a alterações genéticas, como referido (13).

Além dos fatores genéticos, existem também fatores ambientais que contribuem para o desenvolvimento da LLA. No entanto, isoladamente, estes fatores de risco contribuem para uma minoria dos casos estando normalmente associados à preexistência de fatores genéticos (11). Entre os fatores ambientais associados ao desenvolvimento de LLA podem salientar-se a radiação ionizante (por exemplo a exposição a raios-X no primeiro trimestre de gravidez) assim como os agentes químicos e citotóxicos (como pesticidas, benzeno, poluentes ou contaminantes, entre outros). Por outro lado, os hábitos tabágicos e de consumo de álcool dos pais podem também contribuir para o desenvolvimento de LLA. Estes estilos de vida podem lesar o DNA das células germinativas induzindo por exemplo mutações na espermatogênese ou malformações no feto, que podem contribuir para o desenvolvimento de alguns casos. Por fim, a resposta a infecções apresenta um papel crucial no desenvolvimento de erros genéticos devido ao excesso de proliferação de células imunitárias principalmente em crianças que desenvolvem LLA-CPB (13).

### **1.3.2. Classificação**

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define a LLA em conjunto com o Linfoma Linfoblástico Agudo, agrupando estas patologias de acordo com as células de origem (14). A utilização de anticorpos na identificação dos marcadores à superfície dos linfoblastos permite distinguir a LLA de linfócitos B (LLA-B) ou LLA de linfócitos T (LLA-T) podendo as leucemias de células B ser de células precursoras B (LLA-CPB pro-B ou pre-B) ou células maduras (LLA-B) (1). As LLA-B são subclassificadas de acordo com as alterações citogenéticas presentes (cromossomas e/ou genes afetados) segundo a Tabela I (14). As principais alterações observadas são translocações cromossômicas que resultam na formação de genes que passam a codificar oncoproteínas e na perda ou ganho de cromossomas (poliploidias) (15).

**Tabela I- Classificação da Leucemia Linfoblástica Aguda pela OMS**

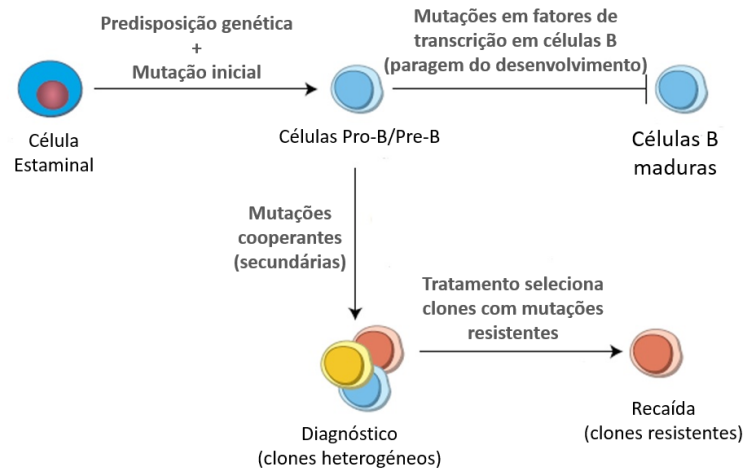
<b>Classificação da Leucemia Linfoblástica Aguda pela OMS</b>
Neoplasias de precursores linfóides
Leucemia (/Linfoma) Linfoblástica de células B, não especificada
Leucemia (/Linfoma) Linfoblástica de células B com alterações genéticas
Leucemia (/Linfoma) Linfoblástica de células B com t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL</i>
Leucemia (/Linfoma) Linfoblástica de células B com t(v;11q23); rearranjos do <i>MLL</i>
Leucemia (/Linfoma) Linfoblástica de células B com t(12;21)(p13;q22); <i>TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)</i>
Leucemia (/Linfoma) Linfoblástica de células B com hiperploídia
Leucemia (/Linfoma) Linfoblástica de células B com hipoploídia (hipoploídia ALL)
Leucemia (/Linfoma) Linfoblástica de células B com t(5;14)(q31;q32); <i>IL3-IGH</i>
Leucemia (/Linfoma) Linfoblástica de células B com t(1;19)(q23;p13.3); <i>E2A-PBX1 (TCF3-PBX1)</i>
Leucemia (/Linfoma) Linfoblástica de células T

**Tabela I- Classificação da Leucemia Linfoblástica Aguda pela Organização Mundial de Saúde (OMS).** [Adaptado de *The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: An overview with emphasis on the myeloid neoplasms* (2010) (14)]

A sequência de eventos associada ao surgimento da LLA-CPB está presente na Figura 3. As alterações iniciais, normalmente cromossômicas, que ocorrem nos progenitores linfóides de células B, associadas à predisposição genética dos indivíduos constituem o evento inicial no despontar da doença. Na sequência destes eventos ocorrem alterações secundárias que contribuem para uma interrupção no desenvolvimento da linhagem linfóide (B ou T) e para a perturbação das vias intracelulares, resultando na proliferação descontrolada das células precursoras B e na manifestação clínica da leucemia (I)(II). Aquando o diagnóstico da LLA, as células apresentam-se sob a forma clones heterogêneos que são eliminados, na sua maioria, durante o tratamento. No entanto, células com mutações que as tornam resistentes podem subsistir e ser responsáveis pela recaída dos doentes (II).

Exceto em crianças com alterações do *MLL* (*mixed lineage leucemia*) que normalmente necessitam apenas de uma única mutação inicial para iniciar o processo leucémico, todos os outros subtipos de LLA em crianças ocorrem devido a uma série de eventos genéticos nas células em que houve uma mutação principiante, frequentemente in útero (I).





**Figura 3 - Patogênese da LLA de células precursoras B.** [Adaptado de *Postgraduate Haematology* (2016) (1)]

### 1.3.2.1. Translocações do *MLL*

As alterações que envolvem a zona cromossômica 11q23 são características de uma grande variedade de doenças hematológicas incluindo a LLA-CPB, a LLA-T, a Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e a síndrome mielodisplásica (SMD) (15)(16). Um dos principais genes afetados pelas alterações cromossômicas 11q23 é o gene *MLL* (15). As translocações que envolvem o gene *MLL* são particularmente comuns em crianças com idade inferior a um ano, representando 75% dos casos de LLA nestas idades (10). Além da idade, a exposição a agentes químicos, particularmente inibidores da Topoisomerase II, está também ligada ao desenvolvimento de LLA por translocações cromossômicas do gene *MLL* (10). Os rearranjos do *MLL*, uma idade inferior a 6 meses e uma contagem de leucócitos superior a  $300 \times 10^9$  células por Litro estão associados a um prognóstico desfavorável da doença (17).

A proteína codificada pelo gene *MLL* participa numa das principais modificações epigenéticas da cromatina, a metilação das histonas. Esta proteína é uma histona metiltransferase pertencente à família H3K4 (histona 3, lisina 4) que torna o DNA acessível e passível de transcrição permitindo a expressão gênica, a proliferação e a diferenciação celular. A sua atividade é crucial para ativar genes *Homebox* (*Hox*), importantes em processos como a embriogênese, hematopoiese e neurogênese. As alterações do gene *MLL* condicionam as suas funções normais associadas à cromatina (18).

O gene *MLL* pode fundir-se com mais de 100 genes parceiros diferentes. Esses genes são conhecidos como TPGs, do inglês *translocation partner genes*, e após fusão com a porção terminal 5' do gene *MLL* originam genes de fusão que codificam diferentes proteínas de fusão (19)(20). As translocações do *MLL* mais frequentes em leucemias agudas são: t(11;19)(q23;p13.3) envolvendo o gene *MLLT1* (*ENL*); t(4;11)(q21;q23) o gene *MLLT2* (*AF4*); t(9;11)(p22;q23) o gene *MLLT3* (*AF9*); t(6;11)(q27;q23) o gene *MLLT4* (*AF6*); e t(10;11)(p12;q23) o gene *MLLT10* (*AF10*) (19). As translocações mais frequentes do *MLL* ocorrem com genes que expressam proteínas nucleares como a *AF4*, *AF9*, *ENL* e *AF10*, que atuam em complexos proteicos necessários para que a elongação pela RNA Polimerase II na fase de transcrição ocorra (20). Estes TPGs representam cerca de 85% dos rearranjos do *MLL* (19). Por exemplo, a proteína *ENL* (*eleven-nineteen-leukemia*) interage com a *AF4* e também com a *AF10* (21). O complexo formado pela *ENL*, por estas proteínas e ainda pelo pTEF (*positive transcription elongation factor*) que fosforila o domínio C-terminal da RNA Polimerase II, recruta e interage com a proteína *DOT1L* (*DOT1-like histone H3K79 methyltransferase*) que, por sua vez promove a metilação da H3K79 (lisina 79, histona 3) necessária para que a enzima RNA Polimerase II possa aceder ao DNA e iniciar o passo da elongação da transcrição (22).

A proteína de fusão *MLL-ENL* insere-se no conjunto das três fusões mais comuns em leucemias que envolvem o *MLL* juntamente com a *MLL-AF4* e a *MLL-AF9*. Esta é codificada pelo gene de fusão *MLL-ENL* resultante da translocação t(11;19) e inibe a diferenciação hematopoiética bloqueando os passos iniciais da maturação das células (21)(23). A *MLL-ENL* uma vez que estimula de forma anômala a formação do complexo proteico que promove a elongação e posterior transcrição exacerbada de genes alvo, os genes *Hoxa7*, *Hoxa9* e *Meis1* (*Meis Homeobox 1*), medeia assim a transformação das células e o início do processo leucêmico (22)(24).

#### **1.4. Vias de sinalização alteradas em LLA**

As translocações do gene *MLL* são muitas vezes suficientes para desencadear o processo de transformação maligna e desenvolvimento de LLA. No entanto, em alguns casos, observa-se a presença de mutações adicionais. As mutações nos genes que codificam o *FLT3* (*fms-related tyrosine kinase 3*) e a proteína *RAS* (*rat sarcoma*) são descritas como alterações adicionais nas LLA-CPB com translocações do *MLL* (25). Outra alteração que se pode verificar em LLA com alterações do *MLL* é desregulação do recetor tirosina cinase

EPHA7 que resulta fosforilação da proteína cinase ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) e desregulação da via em que esta intervém (*MAPK (mitogen activated protein kinases)/ERK*) (26).

#### **1.4.1. FLT3**

O FLT3 é um recetor tirosina cinase com um domínio transmembranar que está presente nas CEHs e portanto é importante para a hematopoiese, proliferação e diferenciação especialmente de células B linfóides (27). Este gene encontra-se desregulado na LLA e mutações no *FLT3* contribuem para a sua fosforilação e atividade contínua e, conseqüentemente, para o processo leucémico e para decisões celulares que induzem a expansão das células neoplásicas (28)(29)(30).

A ativação constitutiva do FLT3 é um dos principais eventos secundários associados à transformação das células precursoras de linfócitos B com alterações do *MLL*, em particular em subtipos com proteínas de fusão *MLL-AF4* e *MLL-ENL* (28). Apesar de não ser por si um evento determinante para o surgimento da leucemia, contribui para as características proliferativas das células (19). A estimulação do FLT3 resulta na ativação de várias vias de sinalização celular a jusante, nomeadamente das vias *MAPK/ERK* e *PI3K/AKT*, e envolve a ativação de diversas proteínas como por exemplo a *STAT5a (signal transducer and activator of transcription 5)* (27).

A estimulação da via *PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt (protein kinase B)* vai potenciar todos os processos regulados pelo *mTOR* e contribuir para a contínua proliferação e sobrevivência das células (31) assim como a via *MAPK/ERK* (32). Deste modo, a ativação contínua destas vias pelo FLT3 terá efeitos na proliferação e sobrevivência das células (27).

#### **1.4.2. RAS**

As proteínas da família *RAS*, como *H-RAS*, *K-RAS* e *N-RAS*, são importantes *GTPases* que iniciam e ativam várias vias de sinalização celular, nomeadamente as vias *PI3K/AKT* e *MAPK/ERK*. Como resultado é ativada a transcrição de genes envolvidos no controlo de processos celulares como o crescimento, progressão do ciclo celular, diferenciação e apoptose (32).

As mutações na proteína, principalmente na isoforma K-RAS, são muito frequentes em LLA-CPB especialmente com rearranjos do *MLL* contribuindo para a manutenção do processo leucémico. As alterações das proteínas RAS ativam constitutivamente as vias por elas reguladas como são as vias MAPK/ERK e PI3K/Akt potenciando o crescimento, proliferação e sobrevivência das células (33)(34). A via de sinalização RAS-PI3K encontra-se ativa em cerca de metade dos casos de LLA (35).

### 1.4.3. mTOR

Como já foi descrito anteriormente neste trabalho, as mutações principalmente do recetor FLT3 e das proteínas RAS contribuem para a manutenção da proliferação das células de pre-B de LLA com alterações do *MLL* pois ativam constitutivamente vias intracelulares como a via PI3K/Akt e a MAPK/ERK. A sinalização desencadeada por estas duas vias atua sobre a principal entidade controladora do crescimento celular: o mTOR (31)(32).

O mTOR é uma unidade enzimática que engloba dois complexos multiproteicos principais, o mTORC1 (*mTOR complex 1*) e o mTORC2 (*mTOR complex 2*) em que a subunidade catalítica comum aos dois complexos é o mTOR. O mTORC1 é altamente sensível à Rapamicina (ou Sirolimus) e contém uma proteína reguladora associada denominada RPTOR. Já o mTORC2 possui uma porção proteica insensível à Rapamicina chamada RICTOR (31).

O mTORC1 quando ativado atua sobre substratos intracelulares como o S6K1 (*S6 kinase 1*) e o 4E-BP1 (*4E binding protein 1*). A fosforilação e ativação da S6K1 e a fosforilação e inativação do repressor da translação de mRNA 4E-BP1 contribuem para a progressão do ciclo celular, para síntese proteica e para a proliferação celular (36). O mTORC2 é responsável por ativar substratos como SGK1 (*serum/glucocorticoid regulated kinase*) (37), algumas isoformas da PKC (*protein kinase C*) e a Akt (38), desempenhando funções na proliferação e diferenciação celular assim como na organização do citosqueleto (31).

A Figura 4 esquematiza a via de sinalização do mTOR e das vias que regulam a sua atividade. A via PI3K/AKT é a principal via reguladora da atividade do mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Esta via é ativada a montante por meio de recetores tirosina cinase como o FLT3 ou o recetor do IGF-1 (*insulin growth factor 1*) que são ativados por fatores de crescimento, hormonas, mutações, entre outros (39). Após a ativação do recetor de tirosina

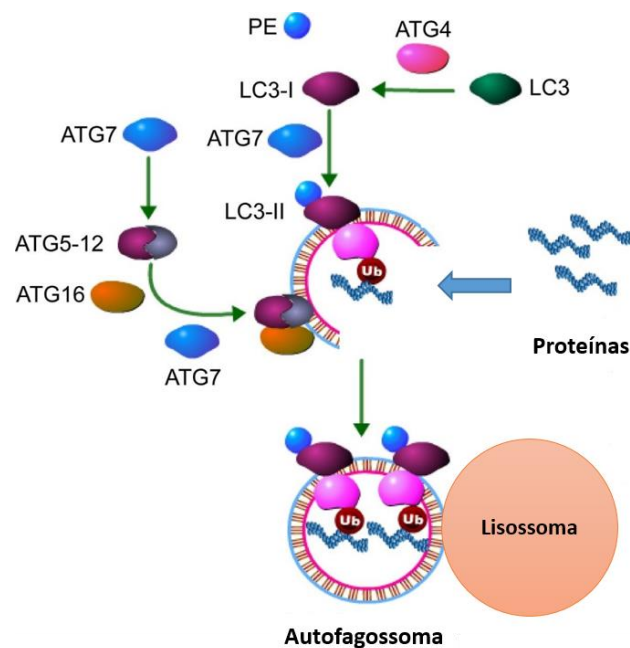
cinase, a enzima PI3KI é recrutada para a membrana citoplasmática da célula onde, uma vez ativada, converte o lípido PIP2 presente na membrana em PIP3. A acumulação deste segundo mensageiro recruta PDK1 e AKT, ocorrendo, desta forma, fosforilação da AKT mediada pela PDK1 (40). A AKT ativada, por sua vez, inibe a formação do complexo TSC1/TSC2 (*tuberous sclerosis complex 1/2*) permitindo a ativação do mTORC1 e da atividade dos seus substratos S6K1 e 4E-BP1 (41). O complexo TSC1/TSC2 parece, por um lado, inibir o mTORC1 e por outro ativar o mTORC2 (42).

Além da via PI3K/AKT também a via MAPK/ERK controla a atividade do mTOR e dos seus substratos. Esta via é igualmente ativada por fatores de crescimento que atuam sobre os recetores tirosina cinase da membrana e iniciam uma cascata de sinalização que resulta na transcrição de genes envolvidos no controlo do crescimento, progressão do ciclo celular, diferenciação e apoptose (31)(32). Perante um estímulo extracelular, as proteínas RAS são ativadas. Estas apresentam afinidade para um elevado número de proteínas efetoras. Começam por recrutar e ativar isoformas da proteína RAF que dá continuidade à cascata de sinalização fosforilando e ativando as proteínas MAPK MEK1/2 que, por sua vez, fosforilam e ativam as proteínas ERK1/2 (43). As proteínas ERK1/2 atuam sobre múltiplos substratos a nível citoplasmático, entre os quais proteínas da família RSK (*ribossomal S6 kinase*), proteínas MnK1/2, e a nível nuclear como fatores de transcrição, que estão, no seu conjunto, envolvidos em diversos processos celulares como a proliferação celular, diferenciação, sobrevivência, entre outros (32). As proteínas ERK têm a capacidade de fosforilar a proteína TSC2 pelo que inibem a existência do complexo TSC1/TSC2 (*tuberous sclerosis complex 1/2*) (44). Como foi já descrito anteriormente, a consequência da disrupção do complexo TSC1/TSC2 é a ativação do mTOR.

Além das funções relacionadas com o crescimento e proliferação das células, o mTOR pode ainda regular o processo autofágico por fosforilação e consequente inativação do complexo ULK (*Unc-51-like kinase*) inibindo a cascata de sinalização da autofagia (46).



conservada em leveduras, tem proteínas homólogas nos mamíferos, pertencentes às subfamílias de proteínas LC3 (*light chain 3*) e GABARAP (51). Uma segunda reação que envolve a formação da membrana do autofagossoma envolve a proteína LC3. A forma solúvel da LC3, a LC3-I, é conjugada com a fofatidiletanolamina (PE), passando à forma de LC3-II que é a forma lipídica desta proteína (ATG8-PE) que integra as membranas interna e externa do autofagossoma (47)(52). As proteínas da família GABARAP atuam mais tardiamente, possivelmente no encerramento da membrana dos autofagossomas e fusão com os lisossomas para formação de autolisossomas (51).



**Figura 5 - Representação esquemática da formação dos autofagossomas.** A LC3 é clivada pela ATG4 resultando na LC3-I. A ATG7 promove a conjugação da ATG5 com a ATG12 e participa na conjugação da PE com a LC3-I convertendo-a em LC3-II. A LC3-II medeia a elongação da membrana do autofagossoma, [Adaptado de *Impaired autophagy, chaperone expression, and protein synthesis in response to critical illness interventions in porcine skeletal muscle (2013)* (53)]

## 1.5. Tratamento

Existem vários protocolos aprovados internacionalmente para o tratamento de LLA que se baseiam em diferentes esquemas terapêuticos (17). De uma forma geral, o tratamento engloba 4 fases: indução (o objetivo primário é restaurar a hematopoiese normal), consolidação (tratamento direcionado ao Sistema Nervoso Central (SNC) cujo objetivo é evitar a reincidência e diminuir a doença residual mínima), reindução e

manutenção (decorre durante um período de tempo de 2 ou mais anos). Cada fase do tratamento tem diferentes durações e combinações farmacológicas (17)(54).

Os esquemas terapêuticos da LLA incluem fármacos glucocorticóides (Prednisona ou Dexametasona), Asparaginase, Vincristina e Ciclofosfamida que podem ser administrados nas diferentes fases do tratamento. A administração do fármaco Metotrexato (MTX) é feita normalmente via intratecal na fase de consolidação ou com a 6-mercaptopurina (6-MP) e a Citarabina (doentes com LLA com rearranjos do *MLL* normalmente são sensíveis a este fármaco) (17)(54). A opção de realizar transplante de células-estaminais hematopoiéticas (TCEH) é aplicada apenas a doentes específicos com remissão completa da doença, sendo uma opção ainda controversa especialmente em doentes com alterações do gene *MLL* (17)(54).

Apesar destes esquemas terapêuticos curarem cerca de 80% dos casos de LLA da criança, cerca de 20-25% das crianças acaba por recidivar (55). Neste sentido, começam a ser estudados novos potenciais alvos terapêuticos.

### **1.5.1. Novos alvos terapêuticos**

Como mencionado anteriormente, existe a necessidade de estudar alternativas terapêuticas que melhorem o tratamento da LLA. Assim, estas opções terapêuticas deverão ter em conta as alterações citogenéticas que estão na base do subtipo de LLA, de forma a seleccionar moléculas alvo direccionadas para as proteínas e vias alteradas. No caso da LLA com rearranjos do *MLL*, uma potencial estratégia terapêutica poderá estar relacionada com a inibição do mTOR. Os inibidores do mTOR, nomeadamente o Sirolimus e o Temsirolimus, poderão representar alternativas terapêuticas uma vez que inibem o principal efetor das vias PI3K/Akt e ERK/MAPK, vias normalmente alteradas neste tipo de doença (56).

#### **1.5.1.1. Sirolimus**

A Rapamicina (Sirolimus) e os seus análogos Temsirolimus e Everolimus são fármacos que inibem o mTOR, principalmente a subunidade mTORC1. O Sirolimus apresenta



potencial para integrar as opções terapêuticas da LLA uma vez que demonstrou aumentar a apoptose em células de LLA (57)(58).

Os principais substratos do mTOR são as proteínas S6K1 e 4E-BP1, que quando fosforiladas controlam a progressão do ciclo celular, o crescimento celular e a síntese proteica (34, 45). A fosforilação da S6K1 induz a translação e a síntese de ribossomas, bloqueia a apoptose por fosforilação a proteína anti-apoptótica enquanto a fosforilação do 4E-BP1 possibilita a translação de mRNAs que codificam proteínas como a c-MYC e a ciclina D que permitem a progressão do ciclo celular (59). A inibição do mTOR pelo Sirolimus ocorre pois, uma vez dentro da célula, este liga-se ao FKBP12 e o complexo Sirolimus-FKBP12 induz uma mudança conformacional no mTOR que bloqueia o acesso aos seus substratos S6K1 e 4E-BP1 e enfraquece a interação mTOR-RAPTOR (60) que inibe também a fosforilação dos seus substratos, inibindo consequentemente as suas ações no ciclo e sobrevivência celular (61). A inibição do mTOR, como já foi descrito, ativa a autofagia e este processo mostrou ser um mecanismo de morte que pode ser utilizado como estratégia terapêutica no tratamento de LLA (62) sendo esta mais uma evidência de que o Sirolimus pode ser um bom agente terapêutico no tratamento da doença.

O Sirolimus mostrou também atuar de forma sinérgica com outros agentes usados já no tratamento da LLA. Portanto, doentes com LLA cujo mecanismo da doença se deva a alterações que afetem as vias reguladoras do mTOR podem beneficiar do tratamento com o Sirolimus (63).

A sinalização do mTOR é um elemento chave que permite fazer a relação entre a Metformina, a ação sobre o AMPK (*AMP-activated protein kinase*) e os seus potenciais efeitos na terapia do cancro. Após conhecida a ação da Metformina sobre a AMPK e, consequentemente, sobre o mTOR, desenvolveram-se diversos estudos clínicos para testar o uso desta molécula no tratamento de algumas neoplasias como adjuvante da quimioterapia convencional assim como em combinação com novos agentes terapêuticos. Os estudos incidem principalmente em tumores sólidos, provavelmente devido ao microambiente da massa tumoral (hipoxia, etc.). Incidem também sobre doentes com diabetes ou outras alterações do metabolismo como a obesidade que parecem apresentar maior risco por para alguns tipos de cancro como, por exemplo, pancreático (64).

É importante avaliar a combinação de novos agentes terapêuticos com os fármacos usualmente utilizados para tratar doenças tumorais, nas quais se insere a LLA. Assim podem

traçar-se estratégias racionais, baseadas no mecanismo e ação dos fármacos e de que forma esse mecanismo pode ser direcionado para proteínas/vias alteradas (65).

### 1.5.1.2. Metformina

A Metformina atua principalmente por fosforilação e ativação da AMPK, produzindo efeitos no metabolismo da glucose e dos lípidos. Este composto induz oxidação de ácidos gordos, diminuição da expressão de genes lipogénicos, diminuição da produção de glucose a nível hepático e sensibilização das células à insulina, contribuindo para a recaptação da glucose diminuindo os seus níveis séricos. Deste modo, através da ação sobre o AMPK, surgem os efeitos benéficos da Metformina em doentes com Diabetes Mellitus tipo 2 (66).

No entanto, a proteína AMPK, uma serina/treonina cinase, funciona também como um importante sensor do estado energético dos organismos, contribuindo para a homeostase celular e para a manutenção do balanço energético e metabólico. A sua ação pode, por um lado, inibir processos anabólicos como a síntese de proteica, e, por outro, ativar processos catabólicos como a autofagia (67).

A existência de baixos níveis energéticos ativa o supressor tumoral LKB1 (*liver kinase B1*) que fosforila a AMPK (67). Esta intervém na dinâmica de controlo do mTOR, por fosforilação direta de componentes que regulam a sua atividade. Em condições energéticas desfavoráveis, a inibição do mTOR pela AMPK torna-se crítica para a conservação de energia e para a sobrevivência celular (68).

Os principais alvos de fosforilação da AMPK são as proteínas TSC2 (69) e Raptor (70). A fosforilação da TSC2 pela AMPK tem como consequência a limitação da ativação do mTORC1. Deste modo, a ativação da AMPK bloqueia a atividade do mTORC1 e a atividade dos seus substratos (69). A fosforilação da proteína Raptor é também necessária para que ocorra uma completa inibição da atividade do mTORC1. A fosforilação mediada pela AMPK de resíduos específicos de serina induz a ligação da Raptor a proteínas 14-3-3 e inibição do mTORC1 (70). Deste modo, a sinalização da AMPK, perante condições de stresse energético, induz a bloqueio do ciclo celular. Além da regulação destes mecanismos celulares, a AMPK é também responsável pela indução da autofagia através da fosforilação direta da ULK1 em resposta à privação de nutrientes e energia (71) existindo uma

coordenação da fosforilação do ULK1 entre o mTORC1 e a AMPK, isto é, uma alternância entre o mTOR e o AMPK na ativação da autofagia (72).

## **1.6. Objetivos**

A Leucemia Linfoblástica Aguda é uma das neoplasias pediátricas mais incidentes sobretudo em crianças com idades inferiores a 10 anos. Apesar de os níveis de cura terem vindo a aumentar nos últimos anos a percentagem de recaídas continua a ser elevada. Assim, torna-se necessário avaliar o potencial terapêutico de fármacos não convencionais de forma a melhorar a eficiência do tratamento.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial terapêutico do Sirolimus, um inibidor do mTOR, e da Metformina, um ativador da AMPK, em monoterapia e em combinação terapêutica na LLA. Além disso, pretendeu-se também analisar alguns dos processos moleculares envolvidos na ação dos fármacos, nomeadamente os mecanismos de morte celular e a autofagia.



## **Materiais e Métodos**





## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Caracterização e cultura da linha celular KOPN-8

Neste estudo foi utilizada a linha celular KOPN-8, gentilmente cedida pelo Instituto Português de Oncologia de Lisboa (IPOL). Esta linha foi estabelecida por Nakazawa e colaboradores em 1977, a partir de sangue periférico de uma criança do sexo feminino, de 3 anos de idade, com leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B do tipo B-III (pre-B) (73). Estas células são morfológicamente pequenas e ligeiramente ovais, apresentam elevada razão núcleo/citoplasma, e citoplasma de aspeto relativamente basófilo e apresentam a translocação cromossómica t(11;19)(q23;p13) que origina o gene de fusão *MLL-ENL*. As células KOPN-8 crescem em suspensão sem formação de agregados e o seu crescimento é relativamente lento sendo o tempo de duplicação de 48 horas (73)(74).

A linha celular KOPN-8 foi mantida em meio *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640) (Lonza), respeitando o pH fisiológico (7,4), contendo 2 mM de L-Glutamina, 20 mM de HEPES-Na, 1,5 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e enriquecido com soro fetal bovino (FBS) a 10% (Biowest). As células foram mantidas em cultura numa incubadora, à temperatura de 37°C numa atmosfera humedecida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, à sua densidade ótima de crescimento, ou seja, 0,5 milhões de células/mL (0,5x10<sup>6</sup> cel/mL).

### 2.2. Incubação da linha celular KOPN-8

As células KOPN-8 foram incubadas a uma densidade inicial de 0,5 milhões de células/mL em placas de cultura de 48 poços, na ausência (controlo) e na presença de Sirolimus (inibidor da mTOR) e/ou de Metformina (activador da AMPK), por um período de 72 horas, nas condições de temperatura, humidade e % de CO<sub>2</sub> referidas anteriormente. Os fármacos foram testados em monoterapia, em esquema de administração única e diária, e em combinação terapêutica. As concentrações de Sirolimus utilizadas em administração única foram: 250 nM, 500 nM, 750 nM, 1 µM, 5 µM, 7,5 µM, 10 µM e 15 µM. O esquema de administração diária testado comparou a adição de 250 nM de Sirolimus com a administração única de 750 nM. Para a avaliação do potencial terapêutico da Metformina nas células KOPN-8 incubaram-se as células na ausência e na presença de 1 mM, 2,5 mM, 5 mM

e 7,5 mM deste fármaco. Por fim, avaliou-se o potencial terapêutico da combinação farmacológica de 250 nM Sirolimus com 1 mM de Metformina em administração simultânea.

### **2.3. Avaliação da proliferação e viabilidade celular pelo teste de exclusão com azul de tripano**

O teste de exclusão do azul de tripano é um dos testes que permite determinar o número de células viáveis e inviáveis presentes numa suspensão de células. Assim, as células vivas apresentam-se translúcidas, uma vez que a sua membrana plasmática é impermeável ao azul de tripano, enquanto as mortas apresentam o citoplasma corado de azul uma vez que o comprometimento da membrana plasmática permite a incorporação do corante. Este teste permite avaliar os efeitos citostáticos e citotóxicos de um fármaco através da determinação, respectivamente, da densidade e da viabilidade celulares, a diferentes doses e tempos de incubação (75).

Para tal, a cada período de 24 horas foram retiradas alíquotas das células incubadas nas condições descritas anteriormente, às quais se adiciona um volume igual de azul tripano (Sigma). Essa mistura foi colocada numa Câmara de Neubauer, também conhecida como hemocitómetro, e observada por microscopia ótica através do microscópio invertido AE31 (Motic). A partir da contagem das células determinou-se a densidade e viabilidade celulares aplicando as seguintes fórmulas (76):

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

$$Viabilidade (\%) = \frac{\sum(n^{\circ} \text{ células vivas})}{\sum(n^{\circ} \text{ células totais})} \times 100$$

Os valores de densidade e viabilidade obtidos nos diferentes ensaios permitiram a construção de curvas de proliferação celular (densidade) e de dose-resposta (viabilidade).



## 2.4. Avaliação da morte celular por Citometria de Fluxo

A translocação da fosfatidilserina do folheto interno da membrana citoplasmática para o folheto externo é característica das células que estão a iniciar a apoptose (apoptose inicial). A Anexina V (AV), na presença de cálcio, tem a capacidade de se ligar a resíduos de fosfatidilserina, e quando conjugada com um fluorocromo permite detetar a apoptose inicial por citometria de fluxo. Por outro lado, o Iodeto de Propídeo (IP), composto intercalador de DNA, é apenas incorporado em células cuja integridade da membrana plasmática esteja comprometida, permitindo identificar células em necrose. Nesta situação, o IP consegue aceder e intercalar com o DNA, passando a emitir fluorescência (77).

Assim, através da técnica de citometria de fluxo com recurso à dupla marcação com AV e IP é possível analisar a viabilidade e o tipo de morte celular. Em suma, as células viáveis são negativas para ambas as marcações, as células em apoptose inicial são positivas para a AV mas negativas para o IP, as células em apoptose tardia/necrose são positivas para os dois marcadores e as células em necrose são exclusivamente positivas para o IP (77).

A morte celular foi avaliada, após um período de incubação de 72 horas, na ausência e na presença de Sirolimus (250 nM e 7,5  $\mu$ M), de Metformina (1 mM e 2,5 mM) e da associação destes fármacos (250 nM de Sirolimus e 1 mM de Metformina). Para tal, foram recolhidas  $1 \times 10^6$  células para cada tubo, sendo as células posteriormente lavadas com PBS (tampão fosfato) por centrifugação a 1250 xg durante 5 minutos, de forma a eliminar o meio de cultura. Após decantação, as células sedimentadas foram ressuspensas em 100  $\mu$ L de tampão de ligação da Anexina V de acordo com o fabricante (0,1 M HEPES (pH 7,4) 1,4 M NaCl, 25 mM  $\text{CaCl}_2$ ). Assim, as células foram incubadas com 2,5  $\mu$ L de Anexina V (BioLegends) e 2  $\mu$ L de IP (Immunostep), durante 15 minutos ao abrigo da luz. Em seguida adicionou-se 300  $\mu$ L de tampão de ligação da anexina V e analisaram-se as células num citómetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson) equipado com um laser de Hélio e Árgon (78).

Foram analisados 25 mil eventos através do programa CellQuest™ (BD Biosciences) e os dados foram estudados com recurso ao programa Paint-a-Gate™ (BD Biosciences) Os resultados são expressos em percentagem de células viáveis (AV-/PI-), em apoptose inicial (AV+/PI-), em apoptose tardia/necrose (AV+/PI+) e em necrose (AV-/PI), representando a média  $\pm$  erro padrão de 3 ensaios independentes.

## 2.5. Avaliação do ciclo celular por Citometria de Fluxo

De modo a avaliar a distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular, as células KOPN-8 foram incubadas na ausência e na presença dos compostos em estudo nas mesmas condições indicadas na secção anterior. Para tal, recorreu-se à citometria de fluxo com marcação das células pelo kit de deteção PI/RNase (ImmunoStep). Assim, recolheram-se  $1 \times 10^6$  células da suspensão celular que foram lavadas com PBS por centrifugação durante 5 min a  $1250 \times g$ . Adicionaram-se 200  $\mu\text{L}$  de etanol a 70% frio e incubou-se durante 30 min a  $4^\circ\text{C}$  (fixação das células). De seguida, as células foram novamente lavadas com PBS e, após decantação do sobrenadante, adicionaram-se 300  $\mu\text{L}$  de PI/RNase e incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente. No final deste período de incubação, as células foram analisadas no citómetro descrito anteriormente.

Foram adquiridas 50 mil células através do programa CellQuest™ (BD Biosciences) e a sua distribuição no ciclo celular foi avaliada com recurso ao programa Modfit™ (ModFit LT). Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da percentagem de células que se encontram em cada fase do ciclo celular (sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>/M), correspondente a 3 ensaios independentes. A presença de uma população sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> corresponde a células apoptóticas.

## 2.6. Avaliação da expressão de moléculas envolvidas na morte celular por Citometria de Fluxo

A avaliação de proteínas envolvidas no processo de morte celular permite inferir algumas conclusões sobre esse mesmo processo e sobre o mecanismo que lhe está associado. A utilização de anticorpos monoclonais associados a fluorocromos permite avaliar por citometria de fluxo a expressão dessas proteínas, entre as quais as caspases, enzimas com função pró-apoptótica essenciais ao processo de morte celular por apoptose.

Assim, a atividade das caspases foi avaliada nas células KOPN-8 incubadas na ausência e na presença dos compostos em estudo nas mesmas condições indicadas na Secção 2.4, através da utilização de um *kit* comercial, o ApoStat (R&D systems). Este *kit* permite identificar e quantificar a atividade de caspases em células apoptóticas por citometria de fluxo, sendo o aumento da fluorescência indicador da atividade das caspases. Para tal, após a lavagem de  $1 \times 10^6$  células, estas foram ressuspensas em 1 mL de PBS e incubadas com 2  $\mu\text{L}$  de ApoStat durante 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . De seguida, as células foram lavadas com 2 mL de PBS

por centrifugação a 1250 xg durante 5 minutos e ressuspensas em 300 µL do mesmo tampão.

A detecção foi efectuada por citometria de fluxo usando o equipamento descrito anteriormente. Foram adquiridas 25 mil células através do programa CellQuest™ (BD Biosciences) e os dados analisados com recurso ao programa Paint-a-Gate™ (BD Biosciences). Os resultados são expressos em percentagem de células positivas para as caspases ativadas e em média de intensidade de fluorescência (MIF) que representa os níveis de expressão das caspases. Os resultados representam a média ± erro padrão de 3 ensaios independentes.

## **2.7.Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\psi_{mit}$ ) por citometria de fluxo**

O potencial de membrana mitocondrial ( $\psi_{mit}$ ) foi determinado nas células incubadas na ausência e na presença dos compostos em estudo nas condições indicadas na Secção 2.4, usando a sonda fluorescente 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbo-cyanine iodide (JC-1). O JC-1 é uma sonda lipofílica catiónica capaz de entrar na mitocôndria quando há alteração do seu potencial de membrana. Quando ocorre diminuição do potencial de membrana mitocondrial (despolarização), a forma monomérica (M) do JC-1 permanece no citoplasma emitindo fluorescência verde no comprimento de onda 525 nm. Já quando o potencial aumenta, os monómeros entram na mitocôndria e formam agregados (A) reversíveis que são acompanhados por uma mudança de fluorescência para vermelho no comprimento de onda de 590 nm (79)(80).

Assim, após a incubação das células na ausência e na presença dos fármacos,  $1 \times 10^6$  células foram lavadas com tampão PBS e incubadas com 1 µL de JC-1 (Sigma- Aldrich; 5 mg/mL) durante 15 min a 37°C, no escuro. Seguidamente, as células foram lavadas com PBS por centrifugação durante 5 min a 1250 x g e ressuspensas em 300 µL do mesmo tampão. A detecção do potencial de membrana mitocondrial foi efectuada por citometria de fluxo usando o equipamento descrito anteriormente. Os resultados representam a média ± erro padrão dos MIFs da razão monómeros/agregados de JC-1 (Razão M/A) de 3 ensaios independentes.

## 2.8. Avaliação da morte celular por microscopia ótica

Além da avaliação da morte celular por citometria de fluxo procedeu-se também à análise das características morfológicas das células KOPN-8 por microscopia ótica recorrendo a esfregaços de células incubadas na ausência e na presença dos compostos em estudo nas condições indicadas na Secção 2.4, coradas por coloração de *May-Grünwald Giemsa*.

Os esfregaços de células foram realizados após recolha de  $5 \times 10^5$  de células, que foram posteriormente lavadas com PBS por centrifugação a  $1250 \times g$  e ressuspensas numa pequena quantidade de FBS (Biowest), de forma a facilitar a sua adesão às lâminas de vidro. Seguidamente, estes foram corados com a solução de *May-Grünwald* (Sigma-Aldrich) (preparada em 0,3% de metanol e diluída na proporção de 1:1 com água destilada, aquando da utilização) durante 3 minutos. Adicionou-se depois a solução *Giemsa* (Sigma-Aldrich) (1g de corante de Giemsa dissolvido em 66 mL de glicerol e 66 mL de metanol; diluído de 1:8 com água destilada, aquando da utilização) durante 15 minutos. Por fim, os esfregaços foram lavados com água destilada e secos à temperatura ambiente (78)(81).

A análise das características morfológicas das células foi efectuada utilizando um microscópio ótico Eclipse 80i (Nikon) acoplado a uma câmara digital Digital Camera DXm 1200F (Nikon), que permitiu a aquisição de imagens e o seu processamento no programa *NIS-Elements Microscope Imaging Software v4.3* (Nikon).

## 2.9. Avaliação da autofagia através da determinação da proteína LC3B por citometria de fluxo

A proteína LC3 é o principal marcador biológico que permite detetar a autofagia estando localizada nos autofagossomas nas células que realizam este processo. Esta proteína está normalmente localizada no citoplasma na forma de LC3I e adquire a forma de LC3II quando é clivada e lipídada sendo incorporada nesta forma nos autofagossomas (82).

Após um período de incubação de 72 horas na ausência e na presença de Sirolimus, Metformina e da associação terapêutica destes fármacos nas doses descritas na Secção 2.4, recolheram-se  $1 \times 10^6$  células que foram lavadas com PBS por centrifugação a  $1250 \times g$  durante 5 minutos. Ao sedimento de células adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de Solução A (Kit Intracell, Immunostep), seguido de incubação à temperatura ambiente durante 15 minutos.

Findo o período de incubação, lavaram-se novamente as células com PBS nas condições anteriores. Seguidamente, adicionaram-se 100 µL de Solução B (Kit Intracell; Immunostep) e 2 µL de anticorpo LC3B (D11) XP<sup>®</sup> Rabbit mAB (Cell Signaling Technology) e incubou-se durante uma hora à temperatura ambiente. Após lavagem, adicionaram-se 2 µL de anticorpo secundário (Santa Cruz Biotechnology Anti-rabbit IgG-PE) e incubou-se 30 minutos à temperatura ambiente. Finalizou-se a marcação da LC3B com lavagem das células com o mesmo tampão e nas condições de centrifugação referida anteriormente e ressuspenderam-se as células em 300 µL de PBS.

A detecção foi efectuada por citometria de fluxo usando o equipamento descrito anteriormente. Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) que corresponde à quantidade de LC3B detetada nas células. Os resultados representam a média ± erro padrão de 3 ensaios independentes.

## **2.10. Análise Estatística**

Na análise estatística dos dados obtidos nas curvas de proliferação e viabilidade assim como dos resultados da citometria de fluxo recorreu-se a análises de variância pelo teste *one-way ANOVA* e sempre que necessário, foram aplicados testes de comparações múltiplas. O teste de Dunnett foi aplicado para efetuar as comparações com a condição controlo enquanto o teste de Tukey foi utilizado quando se quiseram comparar todas as condições em estudo. Os resultados foram analisados através do *software* GraphPad 7.0 e apresentaram-se sob a forma de média ± erro padrão de 5 a 10 ensaios independentes no caso das curvas de proliferação e viabilidade celular e de 3 ensaios independentes para os dados da citometria de fluxo. Em todos os testes realizados considerou-se um nível de significância estatística de 95% ( $p < 0,05$ ).



## Resultados







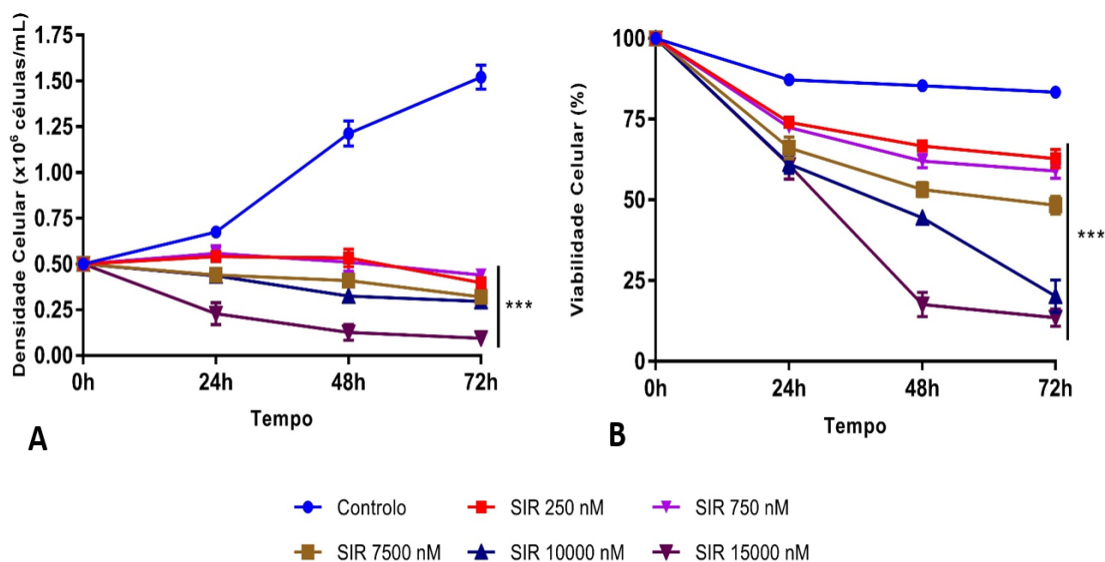
### 3. Resultados

#### 3.1. Avaliação do potencial terapêutico de um fármaco inibidor do mTOR

##### 3.1.1. Curvas de Viabilidade e Proliferação celular

O potencial terapêutico do inibidor do mTOR, Sirolimus (SIR), nas células KOPN-8 foi determinado através da avaliação da viabilidade e proliferação celular pelo teste de exclusão com azul de tripano usando concentrações de fármaco entre 250 nM e 1,5  $\mu$ M, nas respetivas condições descritas em Materiais e Métodos.

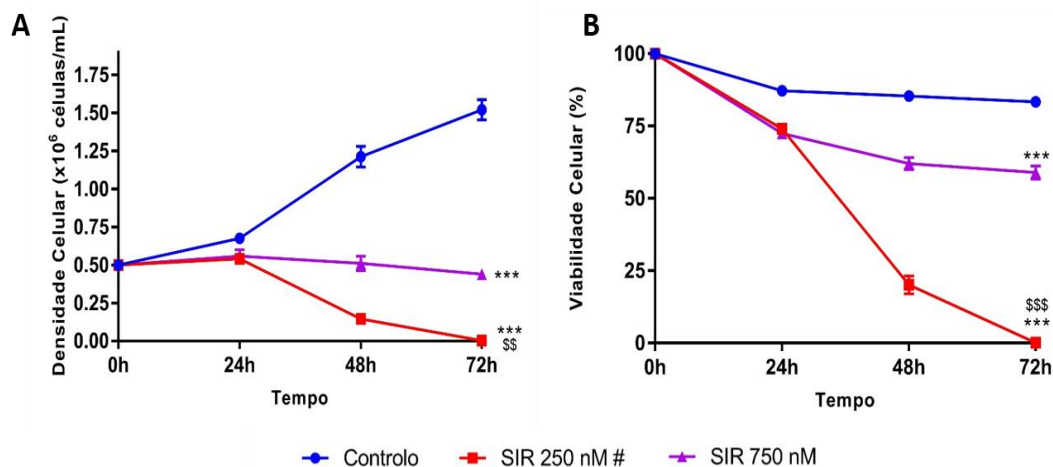
Na figura 6B observa-se o efeito citotóxico do Sirolimus. Este composto reduziu a viabilidade celular de forma dependente da dose e do tempo de exposição. A redução de aproximadamente 50% da viabilidade ( $IC_{50}$ ) foi atingida após 48h de exposição nas células tratadas com concentrações entre 7,5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M de fármaco. No entanto, após 72h de exposição o  $IC_{50}$  foi atingido nas células tratadas com 7,5  $\mu$ M deste fármaco. Além do efeito citotóxico, o SIR induziu também um efeito citostático (diminuição da densidade celular) ou antiproliferativo, que pode ser observado na figura. 6A. A diminuição da proliferação das células KOPN-8 expostas ao SIR é mais evidente a partir das 48h e, ao contrário do efeito citotóxico, não parece ser muito dependente da concentração e tempo de exposição.



**Figura 6– Efeito do Sirolimus na proliferação (A) e viabilidade (B) das células KOPN-8.** As células foram incubadas de acordo com o descrito na secção 2.2.. Durante um período de tempo de 72h foram retiradas amostras das suspensões celulares a cada 24h e efetuou-se o teste de exclusão com azul de tripano. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 5 a 10 independentes e estão expressos em  $10^6$  células/mL (A) e percentagem (B). A análise estatística foi efetuada por comparação à condição não tratada (Controlo) utilizando o teste de Dunnet, sendo \*\*\*  $p < 0,001$ .

Uma vez que o tratamento farmacológico efetuado nos doentes com neoplasias induz muitas vezes efeitos secundários em consequência das elevadas doses utilizadas nos esquemas terapêuticos ou subjacentes aos mecanismos de ação dos fármacos, avaliou-se a influência do modo de administração deste fármaco nas células KOPN-8. Assim, testou-se um esquema de administração diária de baixa concentração de SIR (250 nM) durante 3 dias. O efeito da administração diária, ou fracionada, foi comparado com a administração única da mesma concentração de fármaco, ou seja, com as células incubadas com 750 nM de SIR.

Como se pode observar na Figura 7 a adição diária de doses baixas de SIR induziu um efeito citotóxico muito mais acentuado (redução da viabilidade de cerca de  $83,22 \pm 2,5\%$ ) relativamente à administração única (redução da viabilidade de apenas  $24,41 \pm 3,9\%$ ;  $p < 0,0001$ ), sendo este efeito verificado logo após 48h de incubação. Além disso, a administração fracionada do SIR induziu também maior efeito citostático comparativamente à administração única.

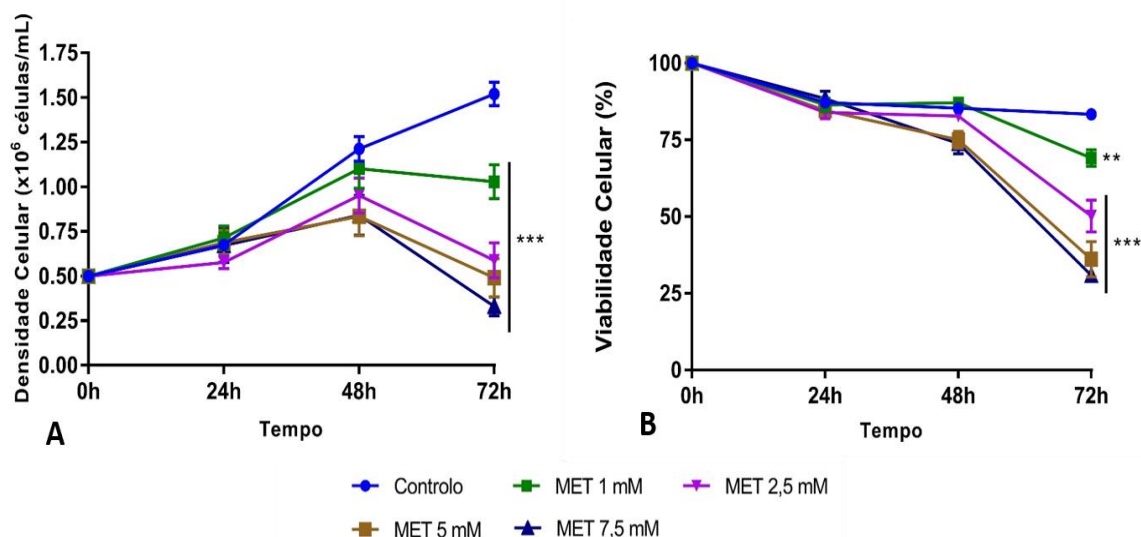


**Figura 7 – Efeito do Sirolimus em administração fracionada na proliferação (A) e viabilidade (B) das células KOPN-8.** As células foram incubadas de acordo com o descrito na secção 2.2. Durante um período de tempo de 72h foram retiradas amostras das suspensões celulares a cada 24h e efetuou-se o teste de exclusão com azul de tripano. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 5 a 10 ensaios independentes e estão expressos em  $10^6$  células/mL (A) e percentagem (B). # corresponde à dose em adição diária. A análise estatística foi efetuada por comparação à condição não tratada (Controlo) e às condições tratadas entre si utilizando o teste de Tukey, sendo \*\*\*  $p < 0,001$  por comparação com o Controlo e \$\$  $p < 0,01$  por comparação à condição SIR 750 nM. SIR, Sirolimus

## 3.2. Avaliação do potencial terapêutico de um fármaco ativador da AMPK

### 3.2.1. Curvas de Viabilidade e Proliferação celulares

O potencial terapêutico da Metformina (MET), que é um fármaco que ativa a AMPK, foi determinado por avaliação da viabilidade e da proliferação celular recorrendo ao teste de exclusão com azul de tripano. Como referido anteriormente (Secção 2.2), as células KOPN-8 foram incubadas na ausência e na presença de MET numa gama de concentrações entre 1 mM e 7,5 mM. Assim, tal como observado nas células tratadas com SIR, a MET induziu efeito citotóxico e citostático dependente da concentração (Figura 8). No entanto, estes efeitos foram observados mais tardiamente do que os induzidos pelo SIR. O  $IC_{50}$  foi apenas atingido após 72h de incubação nas células tratadas com concentrações entre 2,5 mM e 5 mM de MET.



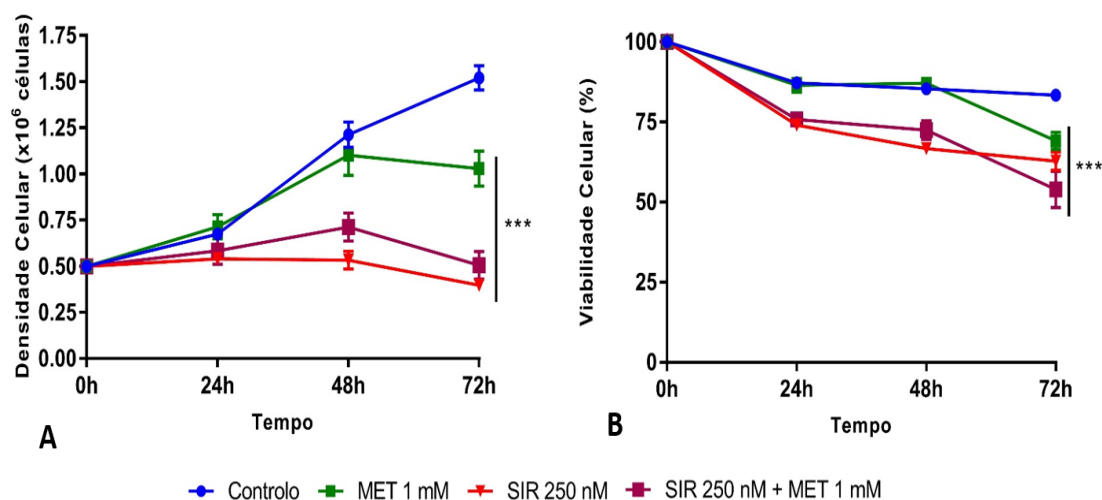
**Figura 8. – Efeito da Metformina na proliferação (A) e viabilidade (B) das células KOPN-8.** As células foram incubadas de acordo com o descrito na secção 2.2. Durante um período de tempo de 72h foram retiradas amostras das suspensões celulares a cada 24h e efetuou-se o teste de exclusão com azul de tripano. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 4 a 10 ensaios independentes e estão expressos em 10<sup>6</sup> células/mL (A) e percentagem (B). A análise estatística foi efetuada por comparação à condição não tratada (Controlo) utilizando o teste de Dunnet, sendo \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . MET, Metformina

### 3.3. Avaliação do potencial terapêutico da associação entre um fármaco inibidor do mTOR e um activador da AMPK

#### 3.3.1. Curvas de Viabilidade e Proliferação celular

Após a avaliação dos efeitos citotóxicos e citostáticos do Sirolimus e da Metformina em monoterapia, analisou-se a administração destes fármacos em associação simultânea. A concentração dos fármacos foi escolhida com base nos resultados obtidos em monoterapia no esquema de administração única. Assim selecionou-se a concentração de 250 nM de SIR e de 1 mM de MET, uma vez que induziam baixa citotoxicidade após 72h de incubação, aproximadamente  $20,6 \pm 3,6\%$  e  $14,28 \pm 4,25\%$ , respetivamente.

Como se pode observar na Figura 9, a combinação terapêutica do SIR e da MET não induziu efeito citotóxico nem citostático sinérgicos nas células KOPN-8. Após 72h de exposição, a combinação terapêutica aumentou apenas ligeiramente o efeito citotóxico do SIR (8,8%) e da MET (15,2%). Por outro lado, a diminuição da proliferação celular induzida pela associação SIR+MET foi inferior à redução induzida pelo SIR isoladamente.

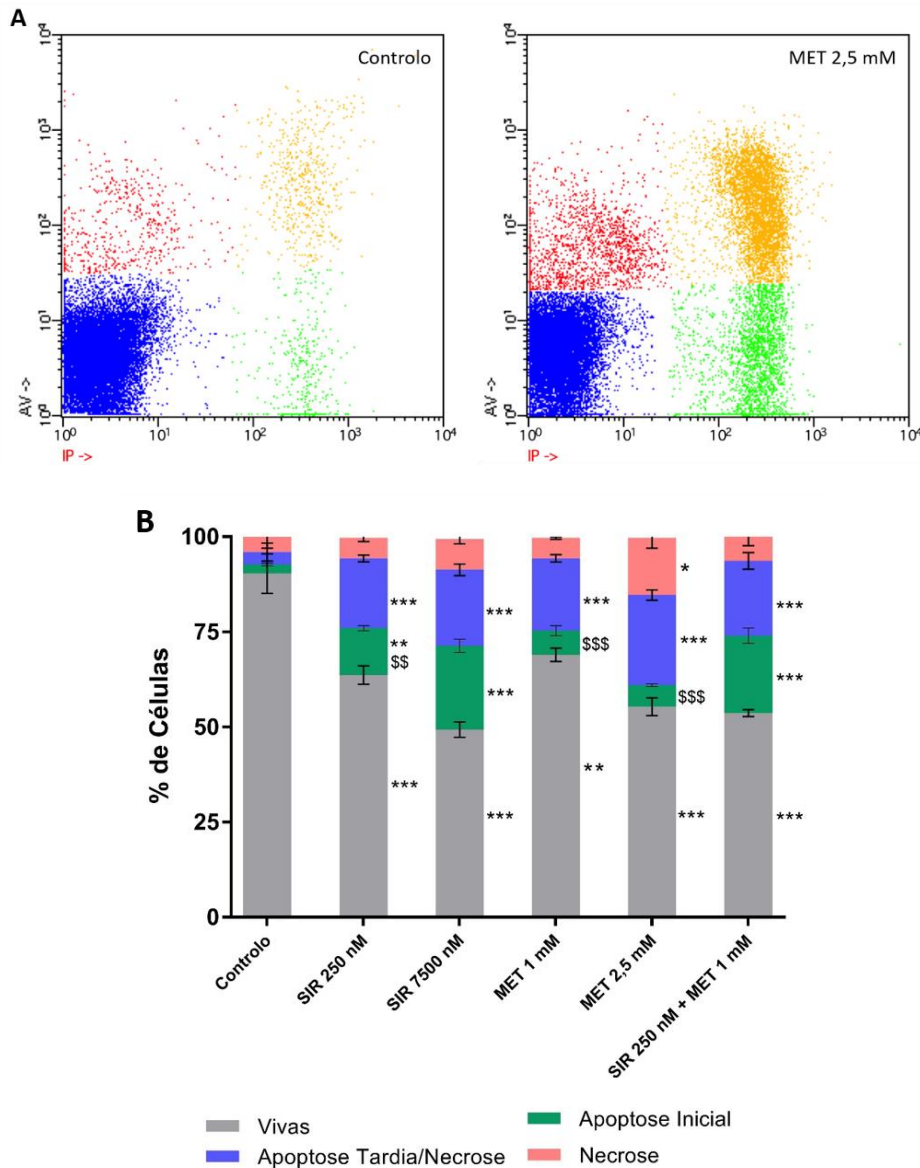


**Figura 9 – Efeito da combinação entre o Sirolimus e a Metformina na proliferação (A) e viabilidade (B) das células KOPN-8.** As células foram incubadas de acordo com o descrito na secção 2.2. Durante um período de tempo de 72h foram retiradas amostras das suspensões celulares a cada 24h e efetuou-se o teste de exclusão com azul de tripano. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 5 a 10 ensaios independentes e estão expressos em  $10^6$  células/mL (A) e percentagem (B). A análise estatística foi efetuada por comparação à condição não tratada (Controlo) utilizando o teste de Dunnet, sendo \*\*\*  $p < 0,001$ . SIR, Sirolimus; MET, Metformina.

### **3.4. Avaliação do tipo de morte celular por citometria de fluxo**

Após se estudarem os efeitos citotóxicos e citostáticos do Sirolimus e da Metformina em monoterapia, e da sua combinação, avaliou-se o tipo de morte celular induzido pelos fármacos. As células expostas a concentrações de 250 nM e 7,5  $\mu$ M de Sirolimus, 1 mM e 2,5 mM de Metformina e aos dois fármacos associados em simultâneo durante 72h, foram duplamente marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídeo como descrito na Secção 2.4 e analisadas por citometria de fluxo. Assim foi possível discriminar as células de acordo com o tipo de morte associado podendo distinguir-se as células vivas das mortas e avaliar o tipo de morte induzido pelas diferentes condições de fármacos (Figura 10).

Como se pode observar na Figura 10, as células KOPN-8 expostas aos fármacos em estudo, em monoterapia e em associação terapêutica, induziram morte celular maioritariamente por apoptose. O SIR em associação com a MET levou a um aumento da quantidade de células apoptóticas face aos fármacos individualmente. No entanto, o fármaco e a dose que induziram maior percentagem apoptose foi 7,5  $\mu$ M de SIR.



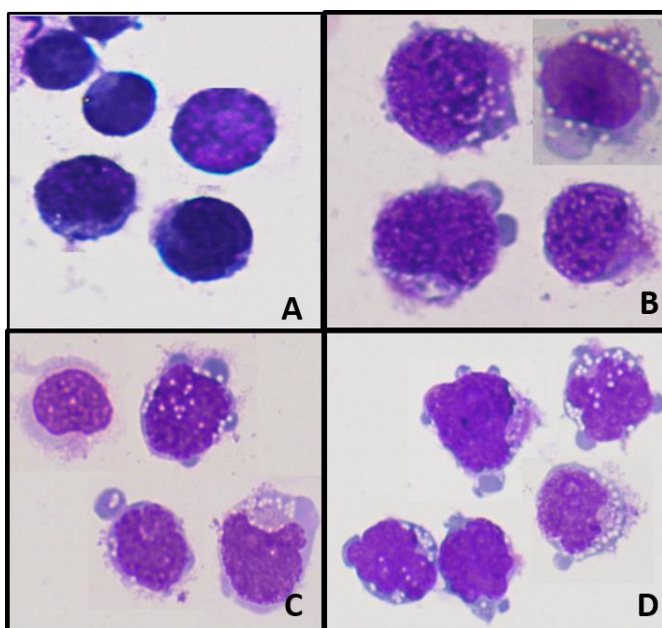
**Figura 10- Avaliação da morte celular na linha celular KOPN-8 por citometria de fluxo.** As linhas celulares foram incubadas com os fármacos de acordo com o descrito na secção 2.4., nas concentrações indicadas na legenda e marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídeo, tal como descrito também na mesma secção. **(A)** Exemplo representativo dos diagramas de pontos obtidos para a marcação com AV e IP por citometria de fluxo. **(B)** Os resultados apresentados são expressos em percentagem (%) e representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efetuada por comparação à condição não tratada (Controlo) e às condições tratadas entre si utilizando o teste de Tukey, sendo \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  por comparação com o Controlo e \$\$  $p < 0,01$  e \$\$\$  $p < 0,001$  por comparação à condição SIR 250 nM + MET 1 mM. SIR, Sirolimus; MET, Metformina.

### 3.5. Avaliação do tipo de morte por microscopia ótica

A morte celular induzida pelo SIR, pela MET e pelos dois fármacos em associação foi também avaliada por microscopia ótica através da observação de esfregaços corados com a solução de *May-Grünwald-Giemsa* de acordo com a descrição da Secção 2.8.. A visualização das características morfológicas das células na ausência e na presença de 7,5  $\mu\text{M}$  de SIR, 2,5

mM de MET e 250 nM e 1 mM de SIR e MET, respetivamente, em monoterapia e em associação, foi feita após 72h de incubação por microscopia ótica.

Na Figura 11 é possível observar que, nas doses referidas anteriormente, tanto a incubação com SIR e MET individualmente, como a exposição aos dois fármacos em simultâneo induz alterações morfológicas nas células que são características do processo de morte celular por apoptose. Esta constatação pode ser feita pois, em relação às células não tratadas, nas células em contacto com o fármaco ocorre *blebbing*, isto é, evaginações da membrana citoplasmática que encerram organelos celulares e fragmentos do núcleo e se destacam das células formando os corpos apoptóticos. Uma outra característica da apoptose que pode ser observada na Figura 11 é a contração e fragmentação nuclear. Os esfregaços observados apresentam ainda células com vacúolos no citoplasma que podem indicar o início do processo autofágico ou lisossómico. O aspeto morfológico das células expostas aos diferentes fármacos parece não variar entre as condições (exceto em relação ao controlo).



**Figura 11- Aspeto morfológico das células KOPN-8 na ausência (Controlo) e após o contacto com SIR, MET e os dois fármacos em associação.** A figura representa os aspetos morfológicos das células na ausência de qualquer fármaco (A) e após tratamento com 7,5 µM de SIR (B), 2,5 mM de MET (C) e 250 nM e 1 mM de SIR e MET em combinação (D). As células foram observadas ao microscópio ótico a uma ampliação de 50x.

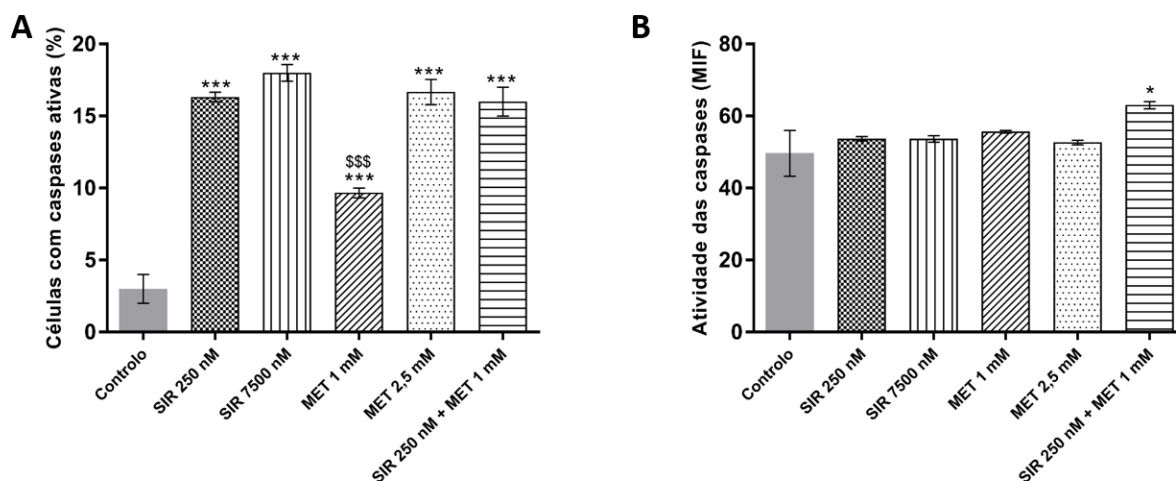
### **3.6. Avaliação dos mecanismos moleculares induzidos pelo Sirolimus e Metformina**

Depois de se concluir acerca do tipo de morte induzida pelo Sirolimus, Metformina e pelos dois quando associados, avaliaram-se os mecanismos moleculares pelos quais os fármacos podem induzir os referidos efeitos. Para tal, foram analisadas as células expostas durante 72h às concentrações de 250 nM e 7,5 µM de Sirolimus, 1 mM e 2,5 mM de Metformina e dos dois fármacos em associação.

#### **3.6.1. Avaliação da expressão de caspases por citometria de fluxo**

De forma a avaliar alguns dos mecanismos moleculares envolvidos na morte celular induzida pelo SIR e pela MET, quer em monoterapia quer em associação terapêutica, analisou-se a atividade das caspases por citometria de fluxo por marcação com a sonda ApoStat. Como se pode verificar na Figura 12A, as células tratadas com Sirolimus e Metformina em monoterapia e em combinação apresentam aumento significativo do número de células com caspases activas. Na presença de 250 nM e de 7,5 µM de SIR o número de células com caspases ativas aumentou aproximadamente 5,44x ( $p < 0,0001$ ) e 6x ( $p < 0,0001$ ) relativamente à expressão das células controlo. A exposição a 1 mM e 2,5 mM de MET levou a aumento de 3,22x ( $p = 0,0004$ ) e 5,56x ( $p < 0,0001$ ) e na presença de 250 nM de SIR juntamente com 1 mM de MET o número de células com caspases ativas em relação ao controlo aumentou 5,33x ( $p < 0,0001$ ). Esta associação revelou ainda um aumento face à condição MET 1 mM de 1,66x ( $p = 0,0007$ ). No entanto, o nível de expressão das caspases activas manteve-se sensivelmente o mesmo, exceto nas células expostas à associação de SIR e MET em que se verifica um ligeiro aumento das caspases ativadas, como se pode verificar na figura 12B.





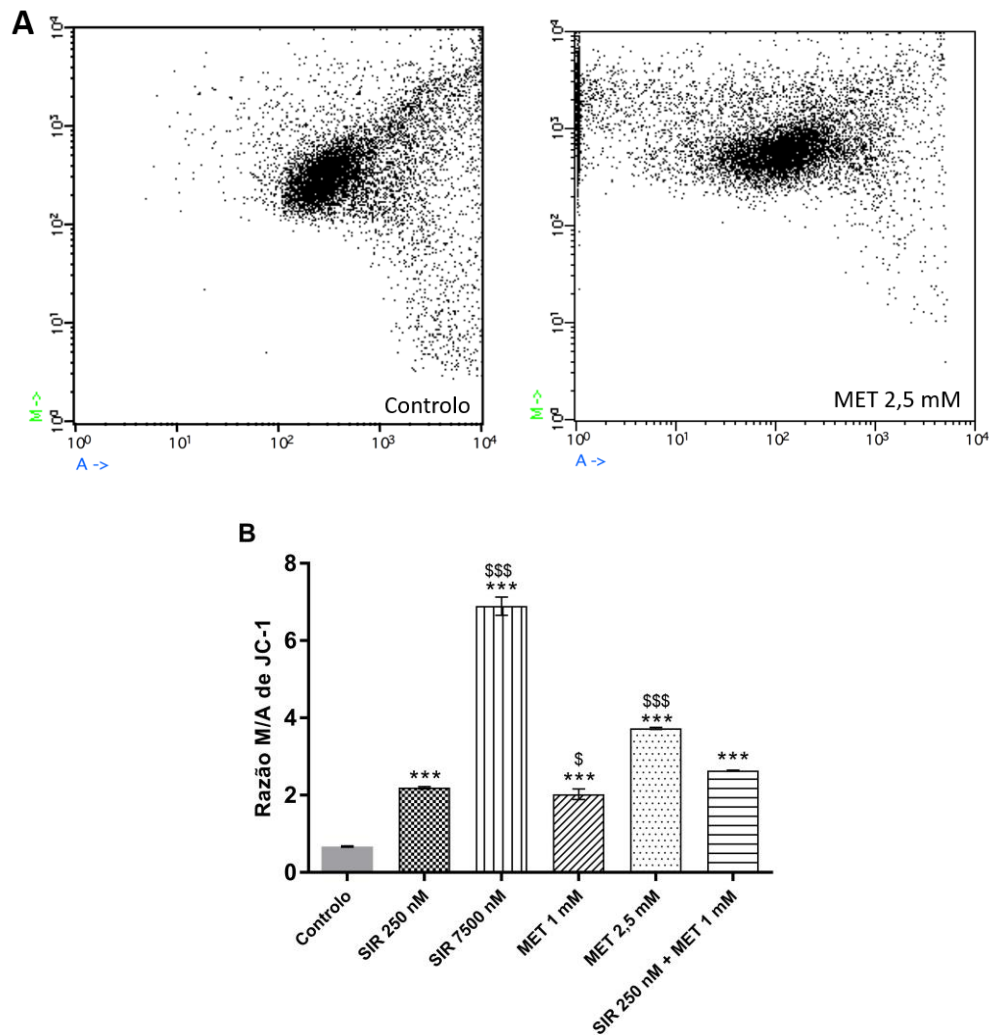
**Figura 12 – Análise da expressão de caspases na linha celular KOPN-8 por citometria de fluxo.** As linhas celulares foram incubadas com os fármacos de acordo com o descrito na secção 2.4. s, nas concentrações indicadas na legenda e marcadas com a sonda ApoStat tal como descrito também na secção 2.6.. Os resultados apresentados são expressos em % de células marcadas positivamente para a sonda **(A)** e em níveis de expressão expressos em MIF totais, os quais são diretamente proporcionais ao número de anticorpos associados ao alvo, na população total **(B)** e representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efetuada por comparação à condição não tratada (Controlo) e às condições tratadas entre si utilizando o teste de Tukey, sendo \*\*\*  $p < 0,001$  por comparação com o Controlo e \$\$\$  $p < 0,001$  por comparação à condição SIR 250 nM + MET 1 mM. SIR, Sirolimus; MET, Metformina.

### 3.6.2. Avaliação do potencial de membrana da mitocôndria por citometria de fluxo

De forma a avaliar o envolvimento mitocondrial na suscetibilidade aos fármacos, as células tratadas com Sirolimus, Metformina e com os dois fármacos combinados foram analisadas às 72h por citometria de fluxo após marcação com a sonda JC-1 e o potencial de membrana mitocondrial avaliado. O JC-1 pode coexistir na forma monomérica e na forma de agregado dependendo do potencial de membrana, correspondendo o aumento da razão monómero/agregado à diminuição do potencial de membrana mitocondrial (Figura 13).

Assim, e como se pode observar (Figura 13B), o SIR e a MET, em monoterapia e em associação terapêutica, induziram aumento da razão M/A de JC-1 em todas as condições testadas, comparativamente ao controlo. Na presença de 250 nM e 7,5  $\mu$ M de SIR a razão M/A de JC-1 aumentou 3,27x ( $p < 0,0001$ ) e 10,26x ( $p < 0,0001$ ) para a exposição a 1 mM e 2,5 mM de MET a razão aumentou 3,02x ( $p < 0,0001$ ) e 5,55x ( $p < 0,0001$ ). Já os dois fármacos associados induziram aumento de 3,93x ( $p < 0,0001$ ). As diferenças mais significativas em relação à associação foram as condições SIR 7,5  $\mu$ M e MET 2,5 mM cujas razões M/A se apresentaram 2,61x ( $p < 0,0001$ ) e 1,41x ( $p < 0,0001$ ) maiores. De salientar que as células

tratadas com 7,5  $\mu\text{M}$  de SIR apresentam aumento significativo da despolarização da membrana mitocondrial relativamente às restantes condições testadas.

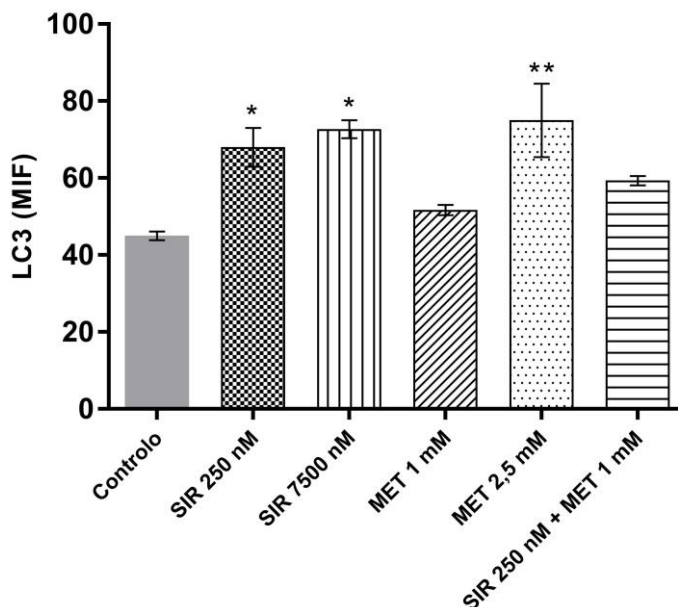


**Figura 13 – Análise do potencial de membrana mitocondrial na linha celular KOPN-8 por citometria de fluxo.** As linhas celulares foram incubadas com os fármacos de acordo com o descrito na secção 2.4., nas concentrações dos fármacos indicadas na legenda e marcadas com JC-1 tal como descrito também na secção 2.7.. **(A)** Exemplo representativo dos Dot-plots obtidos por citometria de fluxo. **(B)** Os resultados apresentados são expressos de acordo com a razão M/A (monómeros/agregados) de JC-1 e representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efetuada por comparação à condição não tratada (Controlo) e às condições tratadas entre si utilizando o teste de Tukey, sendo \*\*\*  $p < 0,001$  por comparação com o Controlo e \$  $p < 0,05$  e \$\$\$  $p < 0,001$  por comparação à condição SIR 250 nM + MET 1 mM. SIR, Sirolimus; MET, Metformina.

### 3.6.3. Avaliação da proteína autofágica LC3B por citometria de fluxo

Por fim, avaliaram-se os níveis de expressão da LC3B (Figura 14), um marcador do processo autofágico. No entanto as condições que apresentam diferença com significado estatístico são as duas doses de Sirolimus, 250 nM e 7,5  $\mu\text{M}$ , com um aumento da expressão

de LC3B face ao controlo de 5,44x ( $p=0,0366$ ) e 6x ( $p=0,0109$ ), e a dose 2,5 mM de Metformina que induz uma expressão de 5,56x ( $p=0,0060$ ) mais face ao controlo.



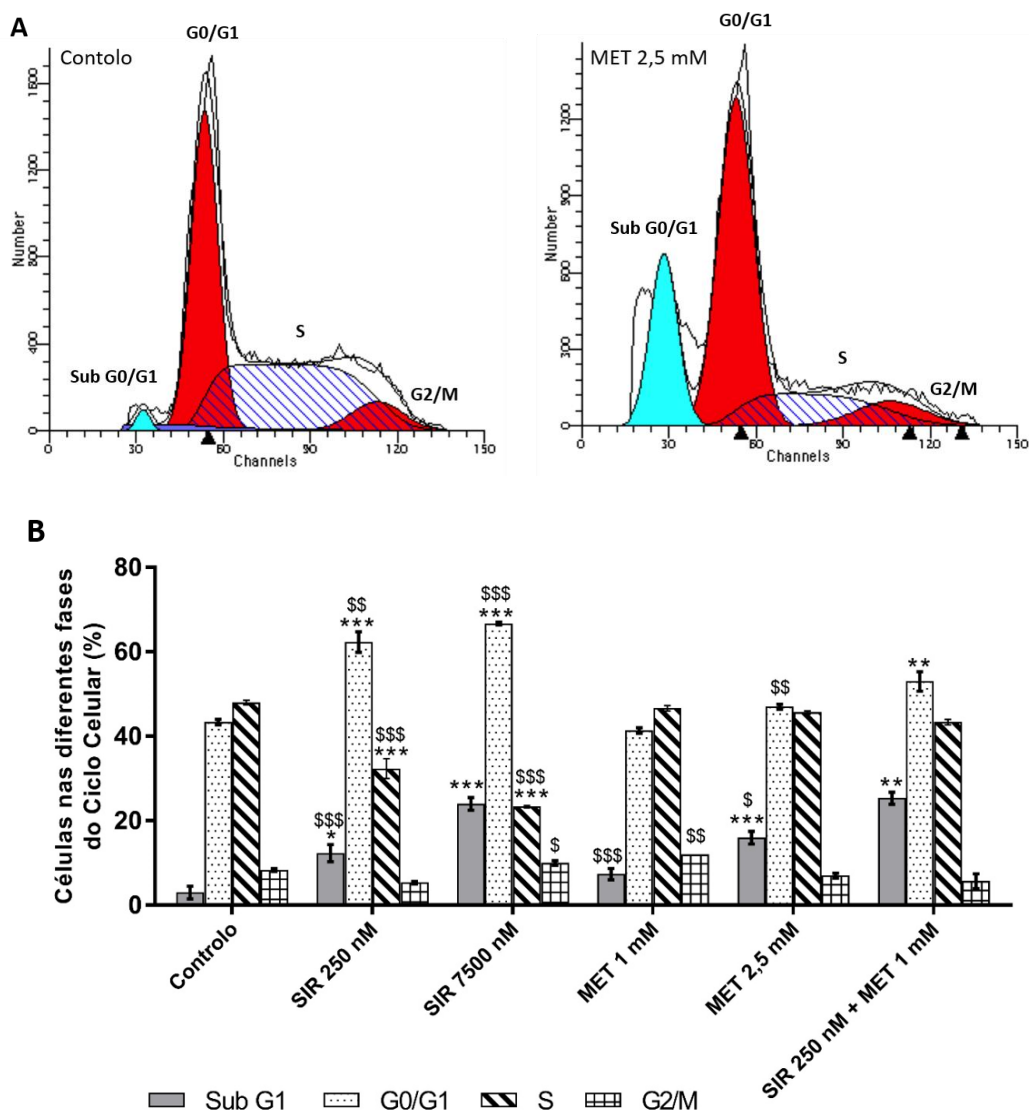
**Figura 14 – Análise da expressão de LC3B na linha celular KOPN-8 por citometria de fluxo.** As linhas celulares foram incubadas com os fármacos de acordo com o descrito na secção 2.4., nas concentrações indicadas na legenda e marcadas para a LC3B tal como descrito também na secção 2.9.. Os resultados são apresentados em % de células que expressam a LC3B e representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efetuada por comparação à condição não tratada (Controlo) e às condições tratadas entre si utilizando o teste de Tukey, sendo \*  $p<0,05$  e \*\*  $p<0,01$  por comparação com o Controlo. SIR, Sirolimus; MET, Metformina.

### 3.7. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo

O efeito citostático do Sirolimus, Metformina e dos dois fármacos combinados foi avaliado por citometria de fluxo após 72h nas condições de incubação descritas na secção 2.4., por marcação das células com solução de IP/RNAse que permite analisar o conteúdo de DNA das células a distribuição destas pelas diferentes fases do ciclo celular (Figura 15).

Como se pode verificar na Figura 15, as células incubadas com Sirolimus (250 nM e 7,5  $\mu$ M) apresentam bloqueio do ciclo celular em fase  $G_0/G_1$ , correspondendo ao aumento significativo de células de aproximadamente 1,44x ( $p<0,0001$ ) e 1,54x ( $p<0,0001$ ) nesta fase do ciclo celular. Nas células tratadas com os dois fármacos (SIR+MET) há um aumento de células em fase  $G_0/G_1$ .

Por outro lado, e como mencionado na Secção 2.5., esta análise permite também detectar e quantificar a presença de células em apoptose. Assim, foi possível confirmar que os fármacos em estudo induzem morte celular por apoptose. A exposição a 7,5  $\mu$ M de SIR e a 2,5 mM de MET induziu aumento significativo da percentagem de células apoptóticas (SIR  $21 \pm 2,23\%$ ; MET  $13 \pm 2,24\%$ ) comparativamente ao controlo (3%). Quando as células foram tratadas com os dois fármacos em simultâneo a percentagem de células em apoptose (pico sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) aumentou aproximadamente 8,5x ( $p < 0,0001$ ) relativamente ao controlo e 3,46x ( $p < 0,0001$ ) comparativamente às células tratadas com 1 mM de MET.



**Figura 15 – Análise do ciclo celular na linha celular KOPN-8 por citometria de fluxo.** As linhas celulares foram incubadas com os fármacos de acordo com o descrito na Secção 2.4., nas concentrações indicadas na legenda e marcadas com PI/RNase tal como descrito também na Secção 2.5.. **(A)** Exemplo representativo da distribuição das células pelas fases do ciclo celular obtido por citometria de fluxo. **(B)** Os resultados apresentados são expressos em percentagem de células em cada fase do ciclo celular e representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 ensaios independentes. A análise estatística foi efetuada por comparação à condição não tratada (Controlo) e às condições tratadas entre si utilizando o teste de Tukey, sendo \*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,001$  por comparação com o Controlo e \$  $p < 0,05$ , \$\$  $p < 0,01$  e \$\$\$  $p < 0,001$  por comparação à condição SIR 250 nM + MET 1 mM. SIR, Sirolimus; MET, Metformina.

## Discussão





## 4. Discussão

### 4.1. Avaliação do potencial terapêutico de um inibidor do mTOR e um ativador da AMPK em células precursoras B de leucemia linfoblástica aguda *in vitro*

A leucemia é a forma mais comum de doença nas crianças. A maioria dos casos de LLA surge devido à transformação que ocorrem em células precursoras B (83). Apesar dos avanços significativos atingidos a nível do tratamento desta doença neoplásica, a percentagem de casos de recaída torna necessária a contínua procura por novos agentes e estratégias terapêuticas para o tratamento da doença. Os inibidores do mTOR como o Sirolimus e os seus análogos ainda não estão aprovados pela FDA para nenhuma doença hematológica, no entanto, vários estudos demonstraram a eficácia destes compostos em alguns linfomas e leucemias fazendo desta classe de fármacos uma potencial opção de tratamento (84).

Neste estudo foi avaliado o efeito de um fármaco inibidor do mTOR, o Sirolimus, e de um ativador da AMPK, a Metformina, na linha celular KOPN-8, um modelo *in vitro* de LLA de células precursoras B. Os resultados demonstraram que o Sirolimus e a Metformina, em monoterapia, induzem efeito citotóxico dependente da concentração, do tempo e do esquema terapêutico, no caso do Sirolimus, sendo mais eficaz em administração diária. Este efeito é mediado por apoptose dependente de caspases com envolvimento da mitocôndria (perda de potencial mitocondrial). Além de induzirem apoptose, estes compostos parecem estimular a autofagia, podendo esta contribuir para a morte celular. Por outro lado, o Sirolimus revelou uma capacidade antiproliferativa uma vez que levou ao bloqueio do ciclo celular em fase  $G_0/G_1$ .

Uma vez estudados os efeitos do Sirolimus e da Metformina isoladamente, procedeu-se à avaliação do potencial terapêutico da combinação dos dois fármacos. Em termos de efeitos citotóxicos e citostáticos esta associação parece não potenciar nenhum dos dois. Apesar de desencadearem morte celular apoptótica e autofagia, o efeito nestes processos não é superior ao do Sirolimus ou da Metformina.

Em 1975, Sehgal e os seus colaboradores isolaram e caracterizaram o Sirolimus (Rapamicina) a partir da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*. Aquando a sua descoberta, foram-lhe atribuídas propriedades antifúngicas (85). Anos mais tarde, após se conhecer melhor o mecanismo de ação da Rapamicina, associado à inibição de vias ativadoras de

linfócitos B, nomeadamente a inibição da diferenciação e progressão do ciclo celular (86), foi descoberta a sua atividade imunossupressora (87)(88) sendo aprovado em 1999, pela FDA, o seu uso na profilaxia de doentes sujeitos a transplante renal (89). A utilização deste fármaco rapidamente evidenciou a sua atividade antitumoral uma vez que mostrou inibir *in vitro* o crescimento de vários tipos de tumores (90).

Por outro lado, a Metformina é um fármaco que permite o controlo dos níveis sanguíneos de glucose e a inibe o processo da gluconeogénese a nível hepático levando deste modo a uma inibição de situações de hiperglicémia. Além destes efeitos, melhora a sensibilidade das células musculares à insulina e parece contribuir para a perda de tecido adiposo em pessoas tratadas com este composto (91). Os efeitos da Metformina no metabolismo da glucose e ácidos gordos prendem-se com a sua atividade sobre a AMPK. Esta fosforila e ativa a AMPK tendo como consequência efeitos na glucose e na lipogénese (66). Devido a estes efeitos a Metformina é usada no tratamento de Diabetes Mellitus tipo 2, especialmente em doentes com excesso de peso, quando o controlo dietético e o exercício físico, por si só, não são capazes de proporcionar um controlo glicémico adequado (92). A Metformina mostrou também ter efeitos antitumorais através da ação da AMPK ativada sobre a via do mTOR em alguns cancros (93) e mostrou ser adjuvante na melhoria da sobrevivência em doentes oncológicos diabéticos (94) ou em cancros associados a disfunções metabólicas como o cancro pancreático (95).

Tal como observado no presente estudo, outros investigadores demonstraram a atividade antiproliferativa e citotóxica do Sirolimus sobre a LLA (57)(58). Este composto mostrou inibir a proliferação e induzir a morte por apoptose de células precursoras B de LLA *in vitro* e ser ativo *in vivo* em modelos de murinhos transgénicos LLA-CPB (58), Além disso, o Sirolimus induz apoptose em linfoblastos de crianças com LLA, sem induzir morte celular dos linfócitos normais da medula óssea, uma vez que atua em vias de sinalização celular que contribuem para a sobrevivência dos linfoblastos malignos, nomeadamente a via PI3K/Akt (57). As células neoplásicas de LLA necessitam então da sinalização do mTOR para sobreviverem sendo a consequência da sua inibição o bloqueio da proliferação e a apoptose (96). Estes efeitos ocorrem devido à consequente desfosforilação do seu substrato S6KI e inibição da síntese proteica (96). No entanto, Wang e os seus colaboradores (97) demonstraram que o Sirolimus induz efeito citostático mediado por bloqueio do ciclo celular em fase G0/G1 associado à indução de autofagia numa linha celular de LLA-CPB. Estas



diferenças sugerem que os mecanismos pelos quais o Sirolimus atua podem ser dependentes das alterações genéticas e do subtipo de LLA presente.

Como já referido, a administração diária de Sirolimus revelou ser mais eficaz do que a administração única, uma vez que se verificou a redução total das células viáveis com a utilização deste esquema terapêutico face às células expostas a uma dose equivalente administrada em toma única. Estas observações sugerem que os doentes com LLA-CPB podem beneficiar deste esquema terapêutico que possibilita a administração de doses mais baixas com efeitos citotóxicos e citostáticos superiores e possivelmente menores efeitos secundários.

A apoptose induzida pelo Sirolimus pode estar relacionada com a perda de potencial de membrana da mitocôndria que resulta na ativação de caspases que, por sua vez, medeiam elas próprias o processo e contribuem para a contínua perda de potencial (98). Como tal, a avaliação do potencial de membrana e da expressão de caspases tornou-se importante na compreensão dos mecanismos através dos quais o Sirolimus e também a Metformina induziram a apoptose. Assim como outros estudos já haviam demonstrado (57), os resultados presentes neste trabalho permitem concluir que a apoptose desencadeada pelo Sirolimus em células de LLA se deve à despolarização da membrana mitocondrial com ativação das caspases.

Normalmente, a despolarização da membrana mitocondrial está associada à morte celular por apoptose, no entanto, existem evidências de que a morte pode ocorrer por vias independentes da mitocôndria e da ação das caspases. Um dos processos que pode contribuir para o efeito citotóxico de fármacos inibidores do mTOR independentemente da mitocôndria é a autofagia (62)(99). A ocorrência de LLA de células B pode estar associada a baixos níveis de autofagia uma vez que neste tipo de células existe uma baixa expressão de alguns genes associados ao processo autofágico, como a *Beclin-1*, *Atg5/7* ou *LC3* (100). Yuan e colaboradores (100) demonstraram que a ativação do processo autofágico pelo Sirolimus induz bloqueio do ciclo celular dos linfoblastos na fase  $G_0/G_1$ , melhorando a sobrevivência de modelos animais com este tipo de leucemia. O bloqueio do ciclo celular induzido pelo Sirolimus pode ocorrer através do processo autofágico que atua sobre polimerases importantes para a síntese de DNA e RNA contribuindo assim para o seu efeito antiproliferativo (97).

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam um aumento da proteína LC3B induzido pelo Sirolimus e também pela Metformina que se correlaciona com o aumento da autofagia e da morte celular. A análise da morfologia também permite observar a existência de vacúolos no interior das células expostas a estes compostos que pode ser indicativa da presença dos autolisossomas característicos da autofagia. Infere-se então que este processo pode ter influência na morte das células em estudo. Isamel e os seus colaboradores (101) mostraram que a alteração das funções da mitocôndria pode originar morte celular por apoptose ou por autofagia. A relação entre o aumento da LC3B e a diminuição do potencial de membrana sugere que a autofagia também pode estar relacionada com alterações da mitocôndria em células precursoras B de LLA expostas ao Sirolimus.

Perante estas ocorrências, e com base nos estudos referidos anteriormente, pode colocar-se a hipótese de a estimulação do processo autofágico ser uma estratégia terapêutica contra a progressão da LLA-CPB. Como tal, no presente estudo utilizou-se a Metformina que mostrou já através da sua ação indireta sobre o mTOR, contribuir para a estimulação da autofagia e, deste modo, aumentar a resposta tumoral a outros antineoplásicos (102).

Os efeitos antitumorais da Metformina têm sido associados principalmente a tumores sólidos, no entanto, Scotland e os seus colaboradores mostraram que este composto pode ter também um efeito antiproliferativo e pró apoptótico promissor sobre células leucémicas (103). Apesar das evidências até agora descobertas de que a Metformina apresenta atividade antitumoral são necessários mais estudos no sentido de clarificar o tipo de células cancerígenas em que é eficaz e os mecanismos de morte que lhe estão associados.

Assim, no estudo da atividade antitumoral da Metformina em LLA de células precursoras B no presente trabalho, observou-se o efeito citotóxico dependente da dose associado à morte principalmente por apoptose. A ação antitumoral da Metformina deve-se sobretudo à sua inibição indireta do mTOR, mediada pela fosforilação do seu alvo principal, a AMPK (102). No entanto, a ativação da AMPK pode não ser essencial para os efeitos antiproliferativos da Metformina sendo possível que a Metformina module outras vias oncogénicas através da ação do LKB1 (104). O aumento da expressão de caspases, associado à despolarização da membrana mitocondrial, indicam que a morte das células estudadas neste trabalho também ocorreu pela via mitocondrial quando expostas à Metformina o que vai de encontro às observações já feitas por outros investigadores em células de LLA (105).

Apesar de as curvas dose-respostas obtidas no presente trabalho evidenciarem um efeito antiproliferativo da Metformina, a análise do ciclo celular não revelou bloqueio do ciclo celular. No entanto, outros autores demonstraram que a Metformina inibe a progressão do ciclo de células de LLA de fase S para G<sub>2</sub>/M (105)(106).

Além da indução de morte por apoptose, a Metformina mostrou já induzir morte em linhas celulares de LLA por autofagia (106). No presente estudo, e tal como observado nas células tratadas com Sirolimus, verificou-se que a Metformina induz aumento da proteína LC3B, proporcional à concentração do fármaco, e o desenvolvimento de vacúolos *in vitro* na linha celular KOPN-8, possivelmente autolisossomas, sugerindo que o mecanismo de ação subjacente à Metformina está associado à ativação da autofagia, o que pode contribuir para os efeitos citotóxicos e citostáticos do fármaco. Além disso, o facto do aumento da LC3B ser inversamente proporcional ao potencial de membrana da mitocôndria sugere que as alterações mitocondriais induzidas por este fármaco podem estar relacionadas com a indução da autofagia.

Para testar a hipótese de, em células precursoras B de LLA, a Metformina funcionar como adjuvante na ação citotóxica e citostática de inibidores do mTOR e poder expandir as possibilidades de tratamento de neoplasias, tal como já foi feito noutros estudos (106), no presente estudo associou-se a administração de Metformina e de Sirolimus.

O papel da autofagia na terapêutica antitumoral permanece ainda por esclarecer. Apesar de a autofagia se inserir nos mecanismos de morte das células, pode também demonstrar uma ação protetora das mesmas podendo contribuir para a quimiorresistência, dependendo do tipo de tumor. Existem diversos estudos clínicos nos quais a inibição da autofagia é utilizada como estratégia terapêutica na melhoria dos efeitos dos quimioterápicos em alguns tumores, no entanto, o processo autofágico pode também demonstrar ser necessário para um efeito antitumoral mais eficaz (108). Yuan e colaboradores (100) sugeriram que a autofagia funcionar como estratégia no tratamento da LLA-CPB e na melhoria da sobrevivência destes doentes. Uma vez que a Metformina, além de inibir a atividade do mTOR também potencia a autofagia, a associação deste fármaco com um inibidor do mTOR parece ser uma estratégia letal para as células leucémicas (109). Esta hipótese foi já testada em alguns tipos de tumores. Contudo, no presente estudo, a associação entre os dois fármacos não evidenciou uma potenciação dos efeitos citotóxicos e citostáticos do Sirolimus e da Metformina em monoterapia nem revelou exacerbar os efeitos na autofagia. Este resultado vai contra as expectativas pois conhecendo o mecanismo de

ação dos dois fármacos seria de esperar que o reforço da inibição do mTOR potenciase os efeitos antineoplásicos nestas células. Apesar das evidências de que a estimulação da AMPK poderia ser uma estratégia terapêutica, surgiram também evidências de que alguns doentes com LLA-CPB com alterações do *MLL* podem apresentar uma hiperativação da AMPK que conduz à ativação de proteínas BCL-2 anti-apoptóticas, associadas a um mau prognóstico. Nestes casos seria importante inibir a atividade da AMPK de forma a inibir os estímulos de sobrevivência das células neoplásicas que resultam da consequente ativação da BCL-2. (110) e não ativar a AMPK como foi feito no presente estudo uma vez que a sua ativação poderá contribuir para a sobrevivência das células e resistência à ação de outros fármacos, neste caso o Sirolimus. Futuramente, novos estudos poderão então passar pela avaliação de proteínas BCL-2 que atuam devido a alterações da mitocôndria e estão envolvidas tanto na apoptose como na autofagia, interligando estes dois processos (111). Estas proteínas antiapoptóticas têm a capacidade de inibir a autofagia por interação com a proteína Beclin-1, que intervém nos passos iniciais da formação dos autofagossomas, e de bloquear a morte independente das caspases (112). Torna-se necessária a realização de mais estudos na presença dos dois fármacos de forma a clarificar a ocorrência da autofagia, a via pela qual esta ocorre e a atuação das proteínas envolvidas na morte celular em LLA-CPB.

Como já foi referido, as caspases intervêm sobretudo na morte celular apoptótica. No entanto, estas proteínas, uma vez ativas, são também capazes de interferir na autofagia pois que clivam a proteína Beclin-1 em fragmentos, eliminando a sua atividade pro-autofágica. A quantidade de autofagossomas, que se traduz posteriormente nos níveis de autofagia, pode ser diminuída quer pela proteína Bax (pro-apoptótica) por meio da ativação das caspases e clivagem da Beclin-1, quer por proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2, como a BCL-xL, por ligação e inibição da Beclin-1, dependendo dos níveis de expressão de cada uma (113). Estas evidências podem constituir uma explicação para que no presente estudo se tenha verificado que a associação entre o Sirolimus e a Metformina induz um aumento da expressão de caspases associada a um decréscimo do nível de autofagia, face aos fármacos em monoterapia. Mais estudos serão necessários para verificar o efeito desta associação terapêutica em células precursoras B de LLA. Por exemplo, poderá ser necessário administrar desfasadamente os dois fármacos para que se observe efeito sinérgico. Além disso, a ordem de administração dos fármacos poderá ter um papel importante na eficácia desta associação.

**Conclusão**





## 5. Conclusão

As principais conclusões deste trabalho que se centrou na avaliação do potencial do sirolimus e da metformina num modelo *in vitro* de LLA de células precursoras B foram as seguintes:

- ✓ O Sirolimus induz efeito citotóxico e citostático depende da dose, do tempo e do esquema de administração, sendo mais eficaz em administração diária;
- ✓ Os efeitos do Sirolimus são exercidos por indução de apoptose mediada por caspases e por bloqueio do ciclo celular na fase G<sub>1</sub>, podendo o processo autofágico estar também envolvido;
- ✓ A Metformina induz efeito citotóxico e citostático em células precursoras B de LLA, associado sobretudo a apoptose mediada por caspase e, provavelmente, à ativação de autofagia;
- ✓ A associação terapêutica de Sirolimus e Metformina não mostrou potenciar nenhum dos efeitos dos fármacos.

Assim, este estudo sugere que o Sirolimus e a Metformina em monoterapia apresentam efeito antitumoral em LLA-CPB. No entanto, o esquema de associação utilizados no presente estudo não potenciou o efeito dos fármacos. Futuramente uma administração desfasada, avaliando a melhor sequência de administração, deve ser avaliada de forma a concluir a influência do esquema de administração na potenciação do efeito terapêutico da associação do Sirolimus com a Metformina.





## **Referências Bibliográficas**

---

---



## 6. Referências Bibliográficas

- 1) Postgraduate Haematology. 7<sup>a</sup> Ed. UK: JohnWiley & Sons Ltd (2016) ISBN 978-1-118-85432-7.
- 2) CHOTINANTAKUL, Kamonnaree; LEEANANSAKSIRI, Wilairat. Hematopoietic stem cell development, niches, and signaling pathways. Bone marrow research (2012).
- 3) FIEDLER, Katja; BRUNNER, Cornelia. Mechanisms Controlling Hematopoiesis. INTECH Open Access Publisher, 2012.
- 4) POUZOLLES, Marie [et al.] Hematopoietic stem cell lineage specification. Current opinion in hematology (2016) 23.4: 311-317.
- 5) The Molecular Biology of the Cell. 6<sup>a</sup> Ed. United States of America: Garland Science (2015) ISBN 978-0-8153-4432-2.
- 6) HYSTAD, Marit E. [et al.] Characterization of early stages of human B cell development by gene expression profiling. The Journal of Immunology (2007) 179.6: 3662-3671.
- 7) SANZ, Eva, et al. Ordering human CD34+ CD10- CD19+ pre/pro-B-cell and CD19- common lymphoid progenitor stages in two pro-B-cell development pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences (2010) 107.13: 5925-5930.
- 8) SOUABNI, Abdallah [et al.] Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. Immunity (2002) 17.6: 781-793.
- 9) An Overview of B Cells – from Discovery to Therapy. BioRad (2016) [Acedido em 29 de Agosto de 2016]. Disponível na Internet: <https://www.bio-rad-antibodies.com/static/2016/b-cell/minireview/an-overview-of-b-cells---from-discovery-to-therapy-mini-review.pdf>.
- 10) Inaba, H., Greaves, M., & Mullighan, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet (2013) 381(9881).

- 11) HUNGER, Stephen P.; MULLIGHAN, Charles P. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *The New England Journal of Medicine* (2015) 1541-1552
- 12) LIM, Joshua Yew-Suang [et al.] Genomics of racial and ethnic disparities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* (2014) 120.7: 955-962.
- 13) EDEN, Tim. Aetiology of childhood leukaemia. *Cancer treatment reviews* (2010) 36.4: 286-297.
- 14) VARDIMAN, James W. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chemico-biological interactions* (2010) 184.1: 16-20.
- 15) MOORMAN, Anthony V. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood reviews* (2012) 26.3: 123-135.
- 16) FERRANDO, Adolfo A. [et al.] Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood* (2003) 102.1: 262-268.
- 17) PIETERS, Rob [et al.] A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *The Lancet* (2007) 370.9583: 240-250.
- 18) BALLABIO, Erica; MILNE, Thomas A. Molecular and epigenetic mechanisms of MLL in human leukemogenesis. *Cancers* (2012) 4.3: 904-944.
- 19) MEYER, C. [et al.] The MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* (2006) 20.5: 777-784.
- 20) MEYER, Claus [et al.] New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* (2009) 23.8: 1490-1499.

- 21) ZEISIG, Deniz T. [et al.] The eleven-nineteen-leukemia protein ENL connects nuclear MLL fusion partners with chromatin. *Oncogene* (2005) 24.35: 5525-5532.
- 22) MUELLER, Dorothee [et al.] A role for the MLL fusion partner ENL in transcriptional elongation and chromatin modification. *Blood* (2007) 110.13: 4445-4454.
- 23) ZEISIG, Bernd B. [et al.] The oncoprotein MLL–ENL disturbs hematopoietic lineage determination and transforms a biphenotypic lymphoid/myeloid cell. *Oncogene* (2003) 22.11: 1629-1637.
- 24) ZEISIG, Bernd B. [et al.] Hoxa9 and Meis1 are key targets for MLL-ENL-mediated cellular immortalization. *Molecular and cellular biology* (2004) 24.2: 617-628.
- 25) ZHANG, Jinghui [et al.] Key pathways are frequently mutated in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood* (2011) 118.11: 3080-3087.
- 26) NAKANISHI, Hiroshi, et al. ALL1 fusion proteins induce deregulation of EphA7 and ERK phosphorylation in human acute leukemias. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2007) 104.36: 14442-14447.
- 27) ANNESLEY, Colleen E.; BROWN, Patrick. The biology and targeting of FLT3 in pediatric leukemia. *Frontiers in oncology* (2014) 4: 263.
- 28) TAKETANI, Takeshi [et al.] FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperdiploidy. *Blood* (2004) 103.3: 1085-1088.
- 29) XU, F. [et al.] Tandem duplication of the FLT3 gene is found in acute lymphoblastic leukaemia as well as acute myeloid leukaemia but not in myelodysplastic syndrome or juvenile chronic myelogenous leukaemia in children. *British journal of haematology* (1999) 105.1: 155-162.

- 30) ARMSTRONG, Scott A. [et al.] FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* (2004) 103.9: 3544-3546.
- 31) PÓPULO, Helena; LOPES, José Manuel; SOARES, Paula. The mTOR signalling pathway in human cancer. *International journal of molecular sciences* (2012) 13.2: 1886-1918.
- 32) SANTARPIA, Libero; LIPPMAN, Scott M.; EL-NAGGAR, Adel K. Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets* (2012) 16.1: 103-119.
- 33) LIEDTKE, Michaela; CLEARY, Michael L. Therapeutic targeting of MLL. *Blood* (2009) 113.24: 6061-6068.
- 34) LIANG, Der-Cherng [et al.] K-ras mutations and N-ras mutations in childhood acute leukemias with or without mixed-lineage leukemia gene rearrangements. *Cancer* (2006) 106.4: 950-956.
- 35) ANDERSSON, Anna K. [et al.] The landscape of somatic mutations in infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias. *Nature genetics* (2015) 47.4: 330-337.
- 36) FINGAR, Diane C. [et al.] mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Molecular and cellular biology* (2004) 24.1: 200-216.
- 37) GARCÍA-MARTÍNEZ, Juan M.; ALESSI, Dario R. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum-and glucocorticoid-induced protein kinase I (SGK1). *Biochemical Journal* (2008) 416.3: 375-385.
- 38) IKENOUE, Tsuneo [et al.] Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *The EMBO journal* [2008] 27.14: 1919-1931.

- 39) O'REILLY, Kathryn E. [et al.] mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer research* (2006) 66.3: 1500-1508.
- 40) ENGELMAN, Jeffrey A.; LUO, Ji; CANTLEY, Lewis C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics* (2006) 7.8: 606-619.
- 41) POTTER, Christopher J.; PEDRAZA, Laura G.; XU, Tian. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nature cell biology* (2002) 4.9: 658-665.
- 42) HUANG, Jingxiang e[t al.] The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Molecular and cellular biology* (2008) 28.12: 4104-4115.
- 43) UDELL, Christian M. [et al.] Mechanistic principles of RAF kinase signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* (2011) 68.4: 553-565.
- 44) MA, Li [et al.] Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk: implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* (2005) 121.2: 179-193.
- 45) International Institute of Molecular and Cell Biology in Warsaw. Laboratory of Molecular and Cellular Neurobiology: Jaworski Laboratory. [Acedido a 3 de Setembro de 2016]. Disponível na Internet: <http://www.iimcb.gov.pl/Jaworski-Laboratory-research-focus.html>.
- 46) JUNG, Chang Hwa [et al.] mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters* (2010) 584.7: 1287-1295.
- 47) BANERJI, Versha; GIBSON, Spencer B. Targeting metabolism and autophagy in the context of haematologic malignancies. *International journal of cell biology* (2012)
- 48) NAZARKO, Volodymyr Y.; ZHONG, Qing. ULK1 targets Beclin-1 in autophagy. *Nature cell biology* (2013) 15.7: 727-728.
- 49) RUSSELL, Ryan C. [et al.] ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nature cell biology* (2013) 15.7: 741-750.

- 50) ROMANOV, Julia [et al.] Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5–Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *The EMBO journal* (2012) 31.22: 4304-4317.
- 51) WEIDBERG, Hilla [et al.] LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *The EMBO journal* (2010) 29.11: 1792-1802.
- 52) NAIR, Usha [et al.] A role for Atg8–PE deconjugation in autophagosome biogenesis. *Autophagy* (2012) 8.5: 780-793.
- 53) BANDUSEELA, Varuna C. [et al.] Impaired autophagy, chaperone expression, and protein synthesis in response to critical illness interventions in porcine skeletal muscle. *Physiological genomics* (2013) 45.12: 477-486.
- 54) VROOMAN, Lynda M.; SILVERMAN, Lewis B. Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. *Current opinion in pediatrics* (2009) 21.1: 1-8.
- 55) NGUYEN, Kim [et al.] Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Leukemia* (2008) 22.12: 2142-2150.
- 56) LEE-SHERICK, Alisa B. [et al.] Targeting paediatric acute lymphoblastic leukaemia: novel therapies currently in development. *British journal of haematology* (2010) 151.4: 295-311.
- 57) AVELLINO, Raffaella [et al.] Rapamycin stimulates apoptosis of childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* (2005) 106.4: 1400-1406.
- 58) BROWN, Valerie I. [et al.] Rapamycin is active against B-precursor leukemia in vitro and in vivo, an effect that is modulated by IL-7-mediated signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2003) 100.25: 15113-15118.



- 59) TEACHEY, David T.; GRUPP, Stephan A.; BROWN, Valerie I. Mammalian target of rapamycin inhibitors and their potential role in therapy in leukaemia and other haematological malignancies. *British journal of haematology* (2009) 145.5: 569-580.
- 60) YIP, Calvin K. [et al.] Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Molecular cell* (2010) 38.5: 768-774.
- 61) OSHIRO, Noriko [et al.] Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes to Cells* (2004) 9.4: 359-366.
- 62) NERI, L. M. [et al.] Targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in B-precursor acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic potential. *Leukemia* (2013) 28.4: 739-748.
- 63) DINNER, Shira; PLATANIAS, Leonidas C. Targeting the mTOR Pathway in Leukemia. *Journal of cellular biochemistry* (2016).
- 64) KOURELIS, Taxiarchis V.; SIEGEL, Robert D. Metformin and cancer: new applications for an old drug. *Medical Oncology* (2012) 29.2: 1314-1327.
- 65) BARRETT, David [et al.] Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling axis in children with hematologic malignancies. *Pediatric Drugs*, 2012, 14.5: 299-316.
- 66) ZHOU, Gaochao [et al.] Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of clinical investigation* (2001) 108.8: 1167-1174.
- 67) SHAW, Reuben J. [et al.] The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2004) 101.10: 3329-3335.
- 68) INOKI, Ken; KIM, Joungmok; GUAN, Kun-Liang. AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annual review of pharmacology and toxicology* (2012) 52: 381-400.

- 69) INOKI, Ken; ZHU, Tianqing; GUAN, Kun-Liang. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* (2003) 115.5: 577-590.
- 70) GWINN, Dana M. [et al.] AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell* (2008) 30.2: 214-226.
- 71) LEE, Jong Woo, et al. The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PLoS one* (2010) 5.11: e15394.
- 72) KIM, Joungmok, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology* (2011) 13.2: 132-141.
- 73) MATSUO, Yoshinobu; DREXLER, Hans G. - Establishment and characterization of human B cell precursor-leukemia cell lines. *Leukemia research* (1998) 22.7: 567-579.
- 74) DREXLER, H. G.; QUENTMEIER, H.; MACLEOD, R. A. F.- Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of MLL gene alterations. *Leukemia* (2004) 18.2: 227-232.
- 75) STROBER, Warren. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology* (2001) 111:A3.B.1-A3.B.3.
- 76) DURKIN, Walter J. [et al.] A methodological approach to the prediction of anticancer drug effect in humans. *Cancer research* (1979) 39, 402-407.
- 77) VAN ENGELAND, Manon [et al.] Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* (1998) 31.1:1-9.
- 78) MENDES, José [et al.] L744, 832 and Everolimus Induce Cytotoxic and Cytostatic Effects in Non-Hodgkin Lymphoma Cells. *Pathology & Oncology Research* (2016) 22.2: 301-309.
- 79) ALMEIDA, Sandra [et al.] Evidence of apoptosis and mitochondrial abnormalities in peripheral blood cells of Huntington's disease patients. *Biochemical and biophysical research communications* (2008) 374.4: 599-603.

- 80) REERS, Martin [et al.] Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods in enzymology*, 1995, 260: 406-417.
- 81) HOUWEN, Berend. Blood film preparation and staining procedures. *Clinics in laboratory medicine* (2002) 22.1: 1-14.
- 82) WARNES, Gary. Measurement of autophagy by flow cytometry. *Current Protocols in Cytometry* (2014) 9.45. 1-9.45. 10.
- 83) TERAS, Lauren R. [et al.] 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* (2016).
- 84) YOUNES, Anas; SAMAD, Nousheen. Utility of mTOR inhibition in hematologic malignancies. *The oncologist* (2011) 16.6: 730-741.
- 85) SEHGAL, S. N.; BAKER, H.; VÉZINA, Claude. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *The Journal of antibiotics* (1975) 28.10: 727-732.
- 86) AAGAARD-TILLERY, Kjersti M.; JELINEK, Diane F. Inhibition of human B lymphocyte cell cycle progression and differentiation by rapamycin. *Cellular immunology*. (1994) 156.2: 493-507.
- 87) CALNE, R. Y. [et al.] Rapamycin for immunosuppression in organ allografting. *The Lancet* (1989) 334.8656: 227.
- 88) WICKER, Linda S. [et al.] Suppression of B cell activation by cyclosporin A, FK506 and rapamycin. *European journal of immunology* (1990) 20.10: 2277-2283.
- 89) Food and Drug Administration. Rapamune (Sirolimus) Oral Solution, 1999. [Acedido a 15 de Agosto de 2016]. Disponível na Internet: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/99/21083A.cfm](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/99/21083A.cfm).

- 90) HUANG, Shile; HOUGHTON, Peter J. Inhibitors of mammalian target of rapamycin as novel antitumor agents: from bench to clinic. *Current Opinion in Investigational Drugs* (2002) 3.2: 295-304.
- 91) STUMVOLL, Michael [et al.] Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine* (1995) 333.9: 550-554.
- 92) INFARMED. Resumo das Características do Medicamento (2012) [Acedido a 4 de Setembro de 2016]. Disponível na Internet: [http://www.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=45023&tipo\\_doc=rcm](http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=45023&tipo_doc=rcm)
- 93) DOWLING, Ryan J O [et al.] Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer research* (2007) 67.22: 10804-10812.
- 94) LEE, Jin Ha, [et al.] The effects of metformin on the survival of colorectal cancer patients with diabetes mellitus. *International Journal of Cancer* (2012) 131.3: 752-759.
- 95) KEFAS, Benjamin A. [et al.] Metformin-induced stimulation of AMP-activated protein kinase in  $\beta$ -cells impairs their glucose responsiveness and can lead to apoptosis. *Biochemical pharmacology* (2004) 68.3: 409-416.
- 96) TEACHEY, David T. [et al.] The mTOR inhibitor CCI-779 induces apoptosis and inhibits growth in preclinical models of primary adult human ALL. *Blood* (2006) 107.3: 1149-1155.
- 97) WANG, Zhijian [et al.] Rapamycin inhibits pre-B acute lymphoblastic leukemia cells by downregulating DNA and RNA polymerases. *Leukemia research* (2014) 38.8: 940-947.
- 98) LAKHANI, Saquib A. [et al.] Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* (2006) 311.5762: 847-851.

- 99) BARAZ, Rana [et al.] mTOR inhibition by everolimus in childhood acute lymphoblastic leukemia induces caspase-independent cell death. *PLOS one* (2014) 9.7: e102494.
- 100) YUAN, N. [et al.] Autophagy collaborates with ubiquitination to downregulate oncoprotein E2A/Pbx1 in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood cancer journal* (2015) 5.1: e274.
- 101) SAMUDIO, Ismael [et al.] Inhibition of mitochondrial metabolism by methyl-2-cyano-3, 12-dioxooleana-1, 9-diene-28-oate induces apoptotic or autophagic cell death in chronic myeloid leukemia cells. *Molecular cancer therapeutics* (2008) 7.5: 1130-1139.
- 102) SHI, W. Y. [et al.] Therapeutic metformin/AMPK activation blocked lymphoma cell growth via inhibition of mTOR pathway and induction of autophagy. *Cell death & disease* (2012) 3.3: e275.
- 103) SCOTLAND, S. [et al.] Mitochondrial energetic and AKT status mediate metabolic effects and apoptosis of metformin in human leukemic cells. *Leukemia* (2013) 27.11: 2129-2138.
- 104) RATTAN, R. [et al.] Metformin attenuates ovarian cancer cell growth in an AMP-kinase dispensable manner. *Journal of cellular and molecular medicine* (2011) 15.1: 166-178.
- 105) RODRÍGUEZ-LIRIO, A. [et al.] Metformin Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Drug-Resistant Leukemia Cells. *Leukemia research and treatment* (2015).
- 106) PAN, Jingxuan, et al. Differential impact of structurally different anti-diabetic drugs on proliferation and chemosensitivity of acute lymphoblastic leukemia cells. *Cell Cycle* (2012) 11.12: 2314-2326.
- 107) GRIMALDI, C. [et al.] AMP-dependent kinase/mammalian target of rapamycin complex I signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia: therapeutic implications. *Leukemia* (2012) 26.1: 91-100.

- 108) THORBURN, Andrew; THAMM, Douglas H.; GUSTAFSON, Daniel L. Autophagy and cancer therapy. *Molecular pharmacology* (2014) 85.6: 830-838.
- 109) SUJOBERT, Pierre [et al.] Co-activation of AMPK and mTORC1 induces cytotoxicity in acute myeloid leukemia. *Cell reports*, 2015, 11.9: 1446-1457.
- 110) ACCORDI, Benedetta [et al.] Functional protein network activation mapping reveals new potential molecular drug targets for poor prognosis pediatric BCP-ALL. *PLoS One* (2010) 5.10: e13552.
- 111) EL-KHATTOUTI, Abdelouahid, et al. Crosstalk between apoptosis and autophagy: molecular mechanisms and therapeutic strategies in cancer. *Journal of cell death* (2013) 6: 37.
- 112) PATTINGRE, Sophie [et al.] Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* (2005) 122.6: 927-939.
- 113) RATTAN, R. [et al.] Metformin attenuates ovarian cancer cell growth in an AMP-kinase dispensable manner. *Journal of cellular and molecular medicine* (2011) 15.1: 166-178.