

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

AUGUSTO FARIA ANDRADE

**Avaliação dos efeitos antineoplásicos da Zebularina em linhagens
pediátricas de leucemia linfóide aguda**

Ribeirão Preto - SP

2012

AUGUSTO FARIA ANDRADE

Avaliação dos efeitos antineoplásicos da Zebularina em
linhagens pediátricas de leucemia linfóide aguda

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Genética

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone

Ribeirão Preto - SP

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Andrade, Augusto Faria

Efeitos de Zebularina em associação com quimioterápicos em linhagens pediátricas de leucemia linfóide aguda. Ribeirão Preto, 2012.

62f.:il.;30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.
Área de concentração: Genética.

Orientador: Luiz Gonzaga Tone

1. leucemia linfóide aguda; 2. zebularina; 3. metilação; 4. epigenética;
5. combinação de drogas.

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- ✓ Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 2010/14378-7).
- ✓ Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- ✓ Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto/USP – FAEPA.
- ✓ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Augusto Faria Andrade

Avaliação dos efeitos antineoplásicos da Zebularina em linhagens pediátricas de leucemia linfóide aguda

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Genética

Aprovado em: ___/___/___

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho à minha família: Rosana, Adnilson e Cássio e à minha namorada Alecssandra por todo amor e apoio dado em todos os momentos. Vocês são minha base e espelho. E aos amigos sempre presentes.

Agradecimentos

Agradeço a **Deus** pelo dom da vida e por sempre mostrar qual caminho seguir, mesmo quando eu não acreditava ser capaz.

Ao prof. Dr. **Luiz Gonzaga Tone**, meu orientador, que confiou em mim e me mostrou como ser um profissional eficiente e humano. Sou imensamente grato pela atenção e disponibilidade durante todo o processo da minha formação.

Ao prof. Dr. **Carlos Alberto Scrideli** pelo apoio desde a minha chegada ao laboratório e pela ajuda dispensada sempre que necessário.

Ao prof. Dr. **Ademilson Espencer Egea Soares**, coordenador do curso de pós-graduação do Departamento de Genética, pela atenção e auxílio durante o mestrado.

Às profs. Dr^a **Andrea de Oliveira Cecchi** e Dr^a **Denise Crispim Tavares** pela iniciação na ciência, o incentivo e acima de tudo pela confiança.

À Dra. **Rosane Gomes de Paula Queiroz e Veridiana Kill Suazo Sant'Anna**, pela amizade e por sempre contribuir com uma boa vontade imensa para todas as minhas atividades no laboratório. E pela paciência e risadas, claro.

Às minha queridas amigas Dr^a **Maria Sol Brassesco Annichini** e Dr^a **Vanessa da Silva Silveira**, exemplos de profissionalismo e competência. Muito obrigado pelas sugestões e pelo carinho e amizade durante a realização deste trabalho.

Aos meus grandes amigos **Kleiton, Maurício, Gustavo e Daniel**, obrigado pela paciência e ensino durante todo este tempo. Obrigado pelas discussões, vocês fazem ciência de verdade. Vocês são exemplos de amigos e profissionais. *Brows* de verdade.

Às meus queridos amigos de laboratório **Andressa, Fernanda, Guilherme, Jaqueline, Julia, Paola, Priscila, Régia**. Fazem do ambiente de trabalho um local familiar. Obrigado pela torcida e pelo apoio em todos os momentos durante a realização deste trabalho.

Às técnicas do laboratório de Citogenética do Departamento de Puericultura e Pediatria **Aide Barbosa, Sônia Scandusi, Maria Luisa Machado e Lucimar Fernandes** pelo apoio e agradável convivência.

Às secretárias do Departamento de Genética **Susie Adriana Penha Nalon e Silvia Sant'anna Consiglieri** e à secretária do Laboratório de Puericultura e Pediatria **Evelize Visconte**, pela atenção e amizade durante o mestrado.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Apoio do Estado de São Paulo (Fapesp)** pela concessão da bolsa de mestrado.

À **Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA)** pelo auxílio financeiro.

Ao meu pai, **Adnilson**, por me ensinar a estudar, ser disciplinado e por todo amor e suporte; à minha mãe, **Rosana**, por todo carinho, cuidado, por me mostrar a honestidade e a bondade e como batalhar pelos meus sonhos; ao meu irmão, **Cássio**, por todo seu bom humor e por me mostrar a amizade pelo próximo. Vocês são essenciais na minha vida.

À minha namorada **Alecssandra Aparecida Campos**, por acreditar em mim, pela sua confiança, pelo apoio incondicional e por todo amor e carinho. Muito obrigado por estar ao meu lado!

Aos meus **avós, tios e primos** que sempre torceram e me deram tantos momentos de alegria.

Aos meus queridos amigos **André, Ygor, Thiago, Nickson e Murilo**, obrigado pela torcida e amizade de tanto tempo. E aos amigos **Natanael, Ciro, Clarissa, Erna, Thais e João Paulo** que me ajudaram com a convivência nessa nova cidade.

À **todos** que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

“O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto.”

Thomas Huxley.

RESUMO

ANDRADE, A.F. **Avaliação dos efeitos antineoplásicos da Zebularina em linhagens pediátricas de leucemia linfóide aguda.** 2012, 62f. Tese de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

A leucemia linfóide aguda (LLA) é a neoplasia hematológica mais comum na infância e representa uma doença heterogênea em relação à biologia e ao prognóstico e seu tratamento consiste principalmente em quimioterapia. Apesar dos avanços no tratamento, cerca de 20% dos pacientes apresentam recaída da doença e/ou óbito indicando a necessidade de terapias diferenciadas para esse grupo. Recentemente, drogas epigenéticas como inibidores de DNA metiltransferases (iDNMTs) tem mostrado efeitos anti-neoplásicos promissores para o tratamento de diversos tipos de neoplasias incluindo a LLA. Nos tumores, a hipermetilação gênica é encontrada em vários genes, incluindo genes de reparo do DNA, reguladores do ciclo celular e apoptose. Sendo assim, drogas desmetilantes estão sendo apontadas como promissores agentes para o tratamento do câncer. A Zebularina (ZB) é um iDNMT análogo de citidina que inibe a metilação do DNA. Esta droga tem mostrado resultados animadores para o tratamento de diversas neoplasias, incluindo glioblastoma, leucemia mielóide aguda, câncer de mama, próstata e outros. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento com a ZB, associada ou não à quimioterápicos, em linhagens celulares pediátricas de LLA, por meio de ensaios funcionais como proliferação celular, capacidade clonogênica, apoptose e ciclo celular. Além disso, foi analisada a capacidade desmetilante da droga e a expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b* após o tratamento com a ZB. A ZB inibiu a proliferação celular de maneira dose e tempo-dependente e agiu sinergicamente quando combinada com o MTX em ambas as linhagens. Ela também diminuiu a capacidade clonogênica e aumentou a taxa de apoptose nas duas linhagens estudadas. Além disso, o tratamento com ZB causou uma parada na fase S do ciclo celular na linhagem ReH. A ZB foi capaz de desmetilar parcialmente o gene *AhR* e reduzir a expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b*. Todos os dados encontrados no presente trabalho sugerem que as drogas desmetilantes podem ser interessantes agentes para o tratamento da LLA pediátrica.

Palavras chave: leucemia linfóide aguda, Zebularina, Epigenética, metilação, combinação de drogas.

ABSTRACT

ANDRADE, A.F. **Evaluation of antineoplastic effects of Zebularine on childhood acute lymphoblastic leukemia cell lines.** 2012, 62f. Master's degree dissertation – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common hematologic malignancy in childhood and represents a heterogeneous disease regarding its biology and prognosis. Its treatment consists mainly of chemotherapy. Despite advances in treatment, about 20% of patients experience disease recurrence and/or death indicating the need for differentiated therapies for this group. Recently, epigenetic drugs such as DNA methyltransferases inhibitors (iDNMTs) has shown antineoplastic and promising results for several types of tumors including ALL. Gene hypermethylation is found in several genes in tumors cells, including genes responsible for DNA repair, cell cycle and apoptosis regulators. Therefore, demethylating agents may be promising agents for cancer treatment. Zebularine (ZB) an iDNMT is a cytidine analogue that inhibits DNA methylation. This drug has shown promising results for the treatment of many cancers, including glioblastoma, acute myeloid leukemia, breast and prostate cancer and others. The aim of this study was to evaluate the effects of ZB treatment, associated or not with chemotherapeutic agents, in childhood ALL cell lines through functional tests such as cell proliferation, clonogenic capacity, apoptosis and cell cycle. In addition, we examined the demethylating ability of ZB and the expression of *DNMT1*, *DNMT3a* and *DNMT3b* genes after treatment with this agent. ZB inhibited cell proliferation in a dose- and time-dependent manner and showed synergistic effects when combined with MTX in both cell lines. ZB treatment also reduced clonogenic capacity and increased the number of apoptotic cells in both cell lines studied. Furthermore, treatment with ZB caused an S phase cell cycle arrest in ReH cell line. ZB was able to partially demethylate *AhR* gene and reduce the expression of genes *DNMT1*, *DNMT3a* and *DNMT3b*. These results suggest that demethylating drugs may be interesting agents for the treatment of childhood ALL.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia, zebularine, epigenetics, methylation, drug combination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análise da proliferação celular após o tratamento das linhagens Jurkat e ReH com Zebularina após os tempos de 24, 48 e 72h	35
Figura 2. Análise da redução de colônias após o tratamento com Zebularina	39
Figura 3. Número de células anexina-V positivas após o tratamento com Zebularina	40
Figura 4. Número de células anexina-V positivas após o tratamento com ZB, MTX e combinação ZB+MTX	41
Figura 5. Número de células anexina-V positivas após o tratamento com ZB, VCR e combinação ZB+VCR	41
Figura 6. Análise do ciclo celular nas linhagens ReH e Jurkat, antes e após o tratamento com Zebularina	42
Figura 7. Análise de metilação do promotor do gene <i>AhR</i> nas linhagens ReH e Jurkat, antes e após o tratamento com Zebularina	43
Figura 8. Análise da expressão dos genes <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3a</i> e <i>DNMT3b</i> nas linhagens ReH (A) e Jurkat (B), antes e após o tratamento com Zebularina	44
Figura 9. Relação entre a via de metilação do DNA e modo de ação do MTX	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Doses necessárias para atingir 50% de inibição do crescimento celular (IC50) após tratamento de 48h com as drogas ZB, MTX e VCR	36
Tabela 2. Fa, CI e DRI para as linhagens ReH e Jurkat tratadas com ZB em combinação com o quimioterápico MTX	37
Tabela 3. Fa, CI e DRI para as linhagens ReH e Jurkat tratadas com ZB em combinação com o quimioterápico VCR	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>ABL</i>	Abelson
5-Aza-C	5-azacytidine
5-aza-dC	5-aza-2'-deoxycytidine
<i>AhR</i>	aryl hydrocarbon receptor
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CH ₃	Grupamento metil
CI	Índice de combinação
CpG	citossina fosfato guanina
DAPK	Death-associated protein kinase
DHFR	Dihidrofolato redutase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMT	DNA metiltransferase
DNMT1	DNA metiltransferase 1
DNMT3a	DNA metiltransferase 3a
DNMT3b	DNA metiltransferase 3b
DRI	Índice de redução de dose
Fa	Fração afetada
FDA	Food and Drug Administration
GBTLI	Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil
HDAC	Histona desacetilase
kb	Kilobase
LLA	Leucemia linfóide Aguda
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
MLL	mixed-lineage leukemia
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MS-PCR	PCR específica para a metilação
MTX	Metotrexato
MTXPG	Poliglutamatos de metotrexato
NaOH	Hidróxido de Sódio
PBS	Tampão salina fosfato

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	iodeto de propídio
qRT-PCR	Real Time quantitative reverse transcription PCR
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAM	S-adenosilmetionina
SBF	Soro fetal bovino
TDG	Timina DNA glicosilase
TFH	Tetrahidrofolato
UDG	Uracil DNA glicosilase
VCR	Vincristine
XTT	Sodium 3'-[1- (phenylaminocarbonyl)- 3,4- tetrazolium]-bis (4-methoxy- 6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate
ZB	Zebularina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Leucemia Linfóide Aguda	16
1.2 Metilação do genoma	19
1.2.1 Metilação e câncer	21
1.3 Zebularina e seus análogos	23
2. OBJETIVOS	27
2.1 Geral.....	27
2.2 Específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Linhagens Celulares e Condições de Cultura	28
3.2 Preparação das drogas.....	28
3.3 Ensaio Funcionais.....	28
3.4 Extração de RNA e análise da expressão gênica por qRT-PCR.....	30
3.5 Análise de metilação <i>in vitro</i>	31
3.6 Análise Estatística.....	32
3.7 Análise de Sinergismo entre drogas.....	33
4. RESULTADOS	34
4.1 Efeitos da ZB e sua combinação na proliferação celular.....	34
4.2 Capacidade Clonogênica.....	38
4.3 Efeitos da ZB e sua combinação na indução de apoptose	39
4.4 Ciclo Celular	42
4.5 Análise da metilação do gene AhR por MS-PCR após o tratamento com ZB	43
4.6 Avaliação da expressão dos genes <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> e <i>DNMT3B</i> após o tratamento com ZB.....	43
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÕES.....	51
7. REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia Linfóide Aguda

As leucemias são neoplasias que se originam a partir de células transformadas na medula óssea, e assim como em outros tipos de câncer, essa transformação resulta de múltiplos processos. Acredita-se que a transformação leucêmica pode envolver interações complexas entre diversos fatores genéticos, hereditários, imunológicos, epigenéticos e ambientais (Irons, Stilmann, 1996; Belson et al., 2007). A previsão é que aproximadamente 10.000 casos de LLA sejam diagnosticados no Brasil em 2010 (INCA, 2010), e apesar dos avanços obtidos nas técnicas de diagnóstico e tratamento, os aspectos etiológicos da LLA ainda não estão bem claros.

As leucemias podem ser classificadas em agudas ou crônicas, de acordo com o grau de maturação das células neoplásicas, e em mielóides ou linfóides de acordo com a origem celular (Pui, 1999). A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é caracterizada pela proliferação clonal e pelo acúmulo de linfócitos imaturos na medula óssea, resultando na supressão da hematopoiese normal, podendo acometer vários órgãos, principalmente o fígado, baço, linfonodos, timo, meninges e as gônadas (Pui, Jeha, 2007). Embora possa ocorrer em qualquer idade, tem incidência maior em crianças com idade entre 2 e 5 anos, representando o tipo mais comum de câncer infantil (Pedrosa, Lins, 2002; Pui, Evans, 2006). Além disso, representa uma doença heterogênea em relação à biologia e ao prognóstico (Kebriaei, Larson, 2003).

Em contraste, a ocorrência deste tipo de leucemia é pouco frequente em adultos e parece haver um aumento da incidência em indivíduos com mais de 50 anos (Kebriaei, Larson, 2003), sendo que há um pior prognóstico com o aumento da idade (Pui, Evans, 2006). As características clínicas e biológicas da doença são diferentes entre crianças, adultos e pacientes com idade mais avançada (Larson, 2005).

Embora a LLA em pacientes lactentes, com menos de 1 anos de idade, compreende apenas 2-3%, este grupo tem uma sobrevida inferior devido, em parte, a fatores de alto risco como: contagem leucocitária alta, doença extramedular, negativo para CD10 e células pré-B imaturas, adicionalmente apresenta alta incidência de efeitos tóxicos relacionados com o tratamento (Pui et al., 2002). 80% dos lactentes com LLA possuem rearranjo do gene *MLL* localizado no cromossomo 11q23. O gene *MLL* tem um papel fundamental na hematopoiese,

regulando o grupo de genes *HOX*, que influenciam a renovação hematopoiética de células tronco e a leucemogênese (Krivtsov, Amrstrong, 2007).

Apesar da identificação de diversas alterações genéticas que podem apresentar importância em relação ao prognóstico dos pacientes com LLA, a idade e a contagem de leucócitos no diagnóstico são os fatores mais importantes (Pui, Evans, 2006). Aproximadamente 90% das crianças com LLA apresentam anormalidades cromossômicas, sendo as numéricas as mais frequentemente encontradas. Aproximadamente metade de todos os casos de hiperdiploidia está associada com bom prognóstico, enquanto a hipodiploidia é considerada de mau prognóstico e representa cerca de 8% dos casos pediátricos (Nachman et al., 2007; Bhojwani et al., 2009).

As anormalidades estruturais representadas por translocações cromossômicas, resultam em proteínas quiméricas que estão implicadas com a gênese das LLAs. Estudos já demonstraram que as translocações podem ser os primeiros eventos nas leucemias, sendo que alguns subtipos ocorrem durante o desenvolvimento fetal (Wiemels et al., 1999; Greaves, 2003). Dentre elas, a mais comum, encontrada em aproximadamente em 25% dos casos, é a fusão dos genes *TEL-AML1* que é considerada como fator prognóstico favorável. A translocação t(9,22) (cromossomo Filadélfia), resultante da fusão BCR-ABL, é encontrada em aproximadamente 5% das crianças com LLA e está associada a um prognóstico desfavorável, assim como a translocação t(4,11) (q21,23), que pode ser observada em cerca de 3% das LLAs em crianças, principalmente nos lactentes (Raynaud et al., 1996; Pui et al., 2002; Pui et al., 2003; Bhojwani et al., 2009).

O sucesso no tratamento da LLA tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas e com as novas estratégias de tratamento obteve-se uma taxa de cura de mais de 80% para os pacientes pediátricos. Apesar disso, muitos pacientes sofrem recaída da doença e desenvolvem sérias complicações decorrentes dos efeitos colaterais do tratamento (Pui, 2004; Pui, Evans, 2006). Assim, novas estratégias no tratamento podem aumentar os índices de cura e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Entre estas estratégias inclui-se uma classificação mais precisa dos grupos de risco, o melhoramento das terapias atuais por estudos de farmacodinâmica e farmacogenômica, e o desenvolvimento de terapias específicas (Rubnitz, Pui, 2003; Pui, Jeha, 2007; Meeker et al., 2010).

De acordo com o protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil (GBTLI-99), os critérios básicos para estratificação de grupo de risco dos pacientes são idade, contagem leucocitária e resposta inicial ao tratamento, a doença pode ser então classificada em duas categorias de risco; alto e baixo, que são estabelecidas através de parâmetros clínicos

e biológicos e que vão determinar a intensidade da terapia (Smith et al., 1996). Outros fatores prognósticos, como índice de DNA da célula leucêmica, anormalidades citogenéticas e imunofenótipo, também tem sido utilizados na estratificação dos pacientes nos grupos de risco. Além destes outro fator de extrema importância é a presença de doença residual mínima (DRM) (Pui, Evans, 1998; Scrideli et al., 2009; Pui, Thiel, 2009).

O tratamento utilizado para LLA consiste em basicamente em quimioterapia ou transplante (Pui et al., 2008). O tratamento determina o uso da poliquimioterapia, que é baseada na combinação de drogas com diferentes mecanismos de ação, e a administração da quimioterapia intratecal e da radiação do crânio como medida de profilaxia para o sistema nervoso central. A radioterapia craniana, antes utilizada extensivamente, tem sido substituída por regimes de quimioterapia sistêmica e intratecal mais intensivos, com o objetivo de diminuir as complicações neurológicas e a incidência de neoplasias secundárias (Pui et al., 2008; Pui, Robison, 2008).

O tratamento quimioterápico é constituído pelas etapas de indução, consolidação da remissão, intensificação, consolidação tardia e manutenção. Utiliza-se uma combinação de drogas como alquilantes, antimetabólitos, antracíclicos, epipodofilotóxicos, entre outros dependendo do grupo de risco do paciente. Na indução geralmente é utilizado: dexametasona, vincristina, asparaginase e daunorrubicina; intensificação: metotrexato, 6-mercaptopurina, doxorrubicina, asparaginase, ciclofosfamida; consolidação tardia: dexametasona, vincristina, doxorrubicina, asparaginase, ciclofosfamida e 6-tioguanina; manutenção: vincristina, 6-mercaptopurina, metotrexato e dexametasona. A duração do tratamento pode compreender de 2 a 3 anos e depende do grupo de risco (GBTLI, 2000).

Atualmente, as terapias contra o câncer procuram não somente a cura para LLA, mas também em aumentar a qualidade de vida dos pacientes, diminuindo a morbidade aguda e sequelas a longo tempo (Pui, Robinson, 2008). A toxicidade do tratamento representa a maior dificuldade e preocupação em relação ao tratamento de pacientes com LLA. Neutropenia e imunossupressão com infecções bacterianas contribuem significativamente com a morbidade, hospitalizações e uma incidência de 1.7 a 4.7% de mortes na remissão. A toxicidade dos quimioterápicos geralmente requer uma diminuição da dose, reduzindo assim a eficácia do tratamento (Hunger et al., 2005).

Duas drogas são tradicionalmente utilizadas para o tratamento de LLA: a vincristina (VCR) e o metotrexato (MTX). A VCR é um alcalóides proveniente da vinca, age no fuso mitótico, inibindo a polimerização dos microtúbulos. Assim as células que estavam em divisão, ficam paradas na mitose com os cromossomos condensados, fazendo com que as

células morram por apoptose (Jordan, Wilson, 2004). Estes alcalóides possuem ainda outros efeitos bioquímicos como inibição da síntese protéica e de ácidos nucléicos e alteram o metabolismo dos lipídios (Jordan, 2002).

O MTX é um antimetabólito que age como um forte inibidor da enzima dihidrofolato redutase (DHFR) e degrada o tetrahidrofolato intracelular (TFH), a forma ativa do folato. Os folatos são essenciais para muitas reações intracelulares, incluindo síntese de nucleotídeos purina e pirimidina, sendo assim essenciais para a síntese de DNA e divisão celular. A inibição de DHFR por MTX leva a redução da síntese de DNA e inibe a divisão celular (Uga et al., 2006). Dentro das células leucêmicas, o MTX é metabolizado em formas de poliglutamato (MTXPGs). Comparado à sua forma monoglutamato, os MTXPGs são retidos por mais tempo dentro das células, já que não são prontamente eliminados pelos transportadores ABC (Uga et al., 2006; Schipper et al., 2007; Vezmar et al., 2009).

Apesar dos avanços no tratamento da LLA e os bons resultados obtidos através do uso intensivo de diferentes quimioterápicos, 20 a 30% dos pacientes sofrem recaída e/ou não respondem bem aos tratamentos quimioterápicos convencionais e as causas dessas falhas ainda permanecem não definitivas (Reiter et al., 1994; Karathanasis et al., 2009). Como dito anteriormente, a transformação leucêmica pode ser relacionada com diversos fatores incluindo genéticos e ambientais (Belson et al., 2007). Fatores epigenéticos também estão relacionados com o processo de leucemogênese (Irons, Stilmann, 1996).

1.2 Metilação do genoma

O termo epigenética pode ser definido como um fenômeno que envolve a alteração herdável da expressão gênica que não implica em alteração da sequência de nucleotídeos e sim, uma modificação da conformação do DNA (Verma, Sristava, 2002; Fazzari, Grealley, 2004). Um dos principais mecanismos que acarretam a alteração da estrutura tridimensional da molécula de DNA é o processo de metilação (Waggoner, 2007).

A metilação do DNA envolve a adição covalente do grupo metil (CH₃), que advém do doador S-adenosilmetionina (SAM), ao carbono 5' da citosina, formando 5-metilcitosina (Singal, Ginder, 1999). As citosinas metiladas correspondem a 0,75-1% do total de bases do DNA (Worm, Gulberg, 2002). Em geral, as citosinas adjacentes a uma guanina (no contexto 5'CG3'), conhecidos como dinucleotídeos CpGs (a letra *p* entre as bases citosina e guanina denota o grupo fosfato), são passíveis de serem metiladas (Bird, 2002).

Os dinucleotídeos CpGs são pouco representados ao longo do genoma e a grande maioria destes (cerca de 70% a 90%), com exceção dos CGs presentes nas ilhas de CpGs, encontra-se metilado no genoma humano e na maioria dos vertebrados (Singal, Ginder, 1999; Nakao, 2001; Hellebrekers et al., 2007).

Os dinucleotídeos são encontrados em maiores concentrações nas ilhas de CpG, as quais estão geralmente presentes na região 5'UTR dos genes, especialmente no promotor e no primeiro éxon. As ilhas são regiões com cerca de 1 kb de tamanho, presente em mais da metade dos genes em humanos, ocorrem em média a cada 100 kb e possuem frequência de dinucleotídeos CpG aproximadamente 10 vezes maior que o restante do genoma (Robertson, Jones, 2000; Bird, 2002; Das, Singal, 2004).

A metilação é catalisada por um grupo de enzimas, denominadas de DNA metiltransferases (DNMTs). Há três enzimas envolvidas na metilação: DNMT1, DNMT3a e DNMT3b. A DNMT1 reconhece preferencialmente substratos de DNA que se apresentam metilados em apenas uma fita, possibilitando que, durante a replicação, ocorra a propagação do padrão de metilação às fitas recém sintetizadas (Bird, 2002). A DNMT3a e a DNMT3b metilam com igual eficiência o DNA hemimetilado e não metilado, *in vitro* e *in vivo* e são altamente expressos em células tronco-embrionárias (Yang et al., 2001). Estas enzimas geralmente atuam no processo de metilação *de novo*, adicionando grupos metil em locais do DNA em que não existe metilação (Das, Singal, 2004).

Os padrões de metilação são estabelecidos nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário pelas DNMT3a e DNMT3b e são copiados nas células somáticas pela DNMT1 de manutenção (Bird, 2002; Turker, 2002). Após ocorrer a fertilização, inicia-se uma onda de desmetilação durante a clivagem, seguido pela metilação *de novo* do genoma principalmente após a implantação do blastocisto e, esse processo pode continuar lentamente durante o restante do desenvolvimento (Turker, 2002; Jaenisch, Bird, 2003). Acredita-se que esse processo de desmetilação-remetilação converte os padrões de metilação específicos dos gametas para os específicos de tecidos somáticos (Bird, 2002). Assim, com a diferenciação do embrioblasto, genes tecidos específicos são desmetilados de maneira tecido-específica, enquanto os genes constitutivos permanecem desmetilados (Yang et al., 2001; Turker, 2002).

Fabbri et al. (2007) demonstraram a expressão de um microRNA (miR-29b) sendo inversamente correlacionada com a expressão de DNMT3a e -3b em câncer de pulmão e que o miR-29b diretamente usa como alvo tanto DNMT3a como a DNMT3b. E essa hiperexpressão do miR-29b, em linhagens de câncer de pulmão, juntamente com baixos níveis de expressão das DNMTs, restaurou os padrões normais de metilação do DNA e inibiu a

tumoregenicidade tanto *in vitro* quanto *in vivo*, mostrando a importância do controle da expressão das DNMTs no desenvolvimento normal das células.

A metilação do DNA é importante nos processos de silenciamento do cromossomo X inativo das mulheres, no *imprinting* genômico e também está vinculada ao mecanismo de silenciamento gênico (Baylin, 2005). A metilação da citosina pode afetar a expressão dos genes por impedir estericamente a ligação de fatores de transcrição a seus sítios de reconhecimento presentes na região reguladora de seus respectivos genes. Por exemplo, a metilação inibe a ligação dos fatores de transcrição myc, E2F e NF- κ B, que reconhecem sequências que apresentam dinucleotídeos CpGs (Singal, Ginder, 1999). Tem sido verificado, inclusive, que as DNMTs podem suprimir a atividade transcricional dos genes por recrutar diretamente as histonas desacetilases (HDACs) (Rountree et al., 2001).

1.2.1 Metilação e câncer

Acredita-se que os mecanismos epigenéticos também são importantes para a iniciação da tumorigênese e para a manutenção do estado alterado das células tumorais. Embora o padrão de metilação seja estabelecido durante o desenvolvimento embrionário e seja mantido durante a vida do indivíduo, sabe-se que a idade, bem como a dieta, podem modificar esse padrão, comprometendo o controle normal da expressão dos genes e levando à instabilidade genética (Yoo, Jones, 2006). Uma dieta pobre em folato, por exemplo, tem sido associada à indução de câncer de fígado vinculado à hipometilação genômica e aumento da expressão de oncogenes, como o *kras* e o *myc* (Jaenisch, Bird, 2003).

A neoplasia é epigeneticamente caracterizada pela desmetilação global do DNA, com hipermetilação localizada de genes específicos (Yoo, Jones 2006; Wilson et al., 2007), bem como altos níveis de expressão de HDACs e conseqüentemente hipoacetilação das histonas (Lane, Chabner, 2009). O silenciamento epigenético pode predispor a eventos mutacionais durante a progressão do câncer, por exemplo, através da inativação de genes de reparo do DNA. O gene de reparo *MLH1* é frequentemente hipermetilado em tumores que possuem instabilidade de microssatélite, como o colorretal (Nakagawa et al., 2009). O gene de reparo *O₆-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT)* também é silenciado por hipermetilação em vários tipos de tumores (Esteller et al., 2001)

Em leucemias, a metilação anormal do DNA tem sido encontrada em vários genes, incluindo receptores de estrogênio (Issa et al., 1996), *E-cadererina* (Corn et al., 2000) e *calcitonin* (Melki et al., 2000). Sato et al. (2010) mostraram que genes importantes como

SHPI (regulador da via JAK/STAT), *p16* (gene supressor de tumor), *DAPK* (apoptose) e *HCAD* (metástase e adesão) estavam hipermetilados nos diferentes estágios de leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL), e que a quantidade de genes hipermetilados mostrou uma correlação positiva de acordo com a progressão dos estágios da ATLL.

A hipermetilação dos genes que regulam o ciclo celular frequentemente ocorre nas células leucêmicas. A expressão das proteínas p73, p15 e p57Kip2, que são reguladoras do ciclo celular e frequentemente possuem hipermetilação gênica, foi associada com um prognóstico favorável em um estudo de LLA em adultos, indicando que a inativação da expressão dessas proteínas tem um papel patogênico importante em LLA (Bueso-Ramos et al., 2005). O silenciamento do gene supressor de tumor *FHIT* é também comum em LLA, especialmente em crianças com rearranjo do gene *MLL* (Stam et al., 2006; Zheng et al., 2004).

Adicionalmente, Matsushita et al. (2004) verificaram que os genes *MGMT* e *p16* estavam hipermetilados (56% e 22% respectivamente) em casos de LLA recidivadas. Yang et al. (2003) também relataram a metilação anormal de genes em LLA, como *p15*, *p16* e *FHIT*, tanto em adultos quanto em crianças, porém a hipermetilação foi maior em adultos.

A metilação pode influenciar a tumorigenicidade por aumentar a probabilidade da ocorrência de mutações de transição C-T, como verificado com o gene supressor de tumor *p53*, em que 50% das mutações pontuais incidem nas citosinas metiladas (Jones, Baylin, 2002). Tais mutações ocorrem em função dos resíduos de 5-metilcitosina serem mais susceptíveis à desaminação. A desaminação da citosina forma a uracila, a qual é rapidamente reconhecida e reparada pela uracil DNA glicosilase (UDG); mas a desaminação da 5-metilcitosina gera timina, que por ocorrer naturalmente no DNA é mais difícil de ser detectada e reparada pela timina DNA glicosilase (TDG) (Yang et al., 2001). O estudo da metilação pode ser muito útil para o diagnóstico precoce e para definição do tratamento de vários tipos de tumores. O perfil de metilação permite distinguir entre tipos e sub-tipos de tumores e auxilia na escolha do agente quimioterapêutico para o tratamento. A metilação do gene de reparo *MGMT*, por exemplo, aumenta a sensibilidade dos gliomas ao tratamento com agentes alquilantes (Esteller et al., 2000).

Como a metilação das ilhas de CpG é mais frequente nas células tumorais, pois em geral nas células normais os dinucleotídeos encontram-se desmetilados, a metilação pode ser um alvo importante na terapia anti-tumoral (Baylin, 2005). Além disso, ao contrário das alterações genéticas, a possibilidade de reverter as modificações epigenéticas torna viável o tratamento epigenético do câncer (Yoo, Jones, 2006; Hellebrekers et al., 2007).

Ao contrário das DNMTs, as desmetilases atuam ativamente promovendo a desmetilação do DNA. A 5-metilcitosina glicosilase, por exemplo, remove a citosina metilada do DNA e o resíduo de citosina é novamente adicionado, através do mecanismo de reparo (Das, Singal, 2004).

Dentre as substâncias empregadas na terapia do câncer estão os análogos de nucleosídeos que inibem a metilação. Ambos possuem o carbono 5 do anel da citosina modificado e são metabolizados por quinases que os convertem a nucleotídeos trifosfato para posterior incorporação ao RNA ou DNA (Yoo, Jones, 2006).

Com o aumento do conhecimento sobre a importância das alterações epigenéticas no desenvolvimento do câncer, o interesse nos inibidores de DNMT como os análogos de citidina (decitabina) vem aumentando. Vários estudos relatam a habilidade desses análogos em reinduzir a expressão de genes específicos inibindo a metilação do DNA, mas poucos estudos analisam seus efeitos em células leucêmicas e os efeitos globais dessas drogas (Suzuki et al., 2001; Liang et al., 2002; Shi et al., 2003).

O principal análogo usado no tratamento do câncer é o 5-Aza-2'-desoxicitina (5-Aza-dC). Este é capaz de inibir a metilação do DNA mesmo em concentrações micromolares, mas apresenta-se instável em soluções aquosas, o que dificulta sua administração (Kopelovich et al., 2003; Yoo, Jones, 2006).

1.3 Zebularina e seus análogos

Ao contrário das alterações genéticas em câncer, mudanças causadas por hipermetilação são potencialmente revertidas por inibição farmacológica da metilação do DNA (Egger et al., 2004). Os análogos de citidina são capazes de reativar genes supressores de tumores ou genes envolvidos com o reparo celular que foram silenciados por hipermetilação. Estes compostos agem através da inibição das DNMTs (Yoo, Jones, 2006). Nas malignidades hematológicas é onde os agentes desmetilantes tiveram o maior sucesso (Egger et al., 2004; Esteller, 2005; Hackanson et al., 2005).

Muitos desses inibidores mostraram resultados promissores na terapia do câncer (Baylin, 2005; Li et al., 2005) e alguns mais especificamente no tratamento de malignidades mielóides (Wijermans et al., 2000). O 5-Aza-dC tem sido descrito como reativador da expressão de uma variedade de genes incluindo supressores de tumores em células malignas *in vitro* e *in vivo* inibindo as DNMTs (Daskalakis et al., 2002). Schmelz et al. (2005) demonstraram que 5-Aza-dC foi mais eficiente contra células de leucemia mielóide aguda

(LMA) do que em células epiteliais ou células sanguíneas não-malignas, inibindo sua proliferação dose e tempo dependente em linhagens *in vitro*.

Em um estudo recentemente realizado com pacientes que apresentavam síndrome mielodisplásica (MDS), o 5-Aza-C aumentou a sobrevida dos pacientes em um estudo de fase III (Fenaux et al., 2009). Em estudos recentes, o uso de baixas doses de 5-Aza-dC como agente terapêutico mostrou-se muito encorajador em pacientes com síndrome MDS e LMA (Wijermans et al., 2000; Issa et al., 2004). Em 2004, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o análogo 5-Aza-C para o tratamento de todos os subtipos de MDS. Dados recentes mostraram que o DNA incorporado com 5-Aza-dC não só inativa e liga-se as DNMTs como também age como um inibidor da metilação das histonas, sendo que ambas modificações levam a reativação de genes (Kondo et al., 2003).

5-Aza-C e 5-Aza-dC vem sendo estudados como terapias experimentais e vem demonstrando atividade clínica significativa no tratamento das malignidades mielóides (Issa, 2003; Gore, 2005). A aplicação clínica desses agentes ainda é limitado devido a propriedades tóxicas das drogas, instabilidade química e administração oral (Christman, 2002; Issa et al., 2004; Kantarjian et al., 2006), sendo assim, estudos que relatem os efeitos dessas drogas se tornam de grande importância. Todos esses agentes também são citotóxicos em altas doses, interferindo diretamente com a síntese de DNA (Christman et al., 2002), portanto um agente que tivesse a mesma forma de ação porém sem os efeitos citotóxicos encontrados seria mais apropriado.

A Zebularina (ZB) (1-[β -D-Ribofuranosil]-1,2-dihidropirimidina-2-1) também é um análogo de citidina que contém um anel 2-(1H) pirimidinona (Marquez et al., 2005) e inibe as DNMTs e conseqüentemente inibe a metilação do DNA (Cheng et al., 2003; Cheng et al., 2004; Pompéia et al., 2004).

A droga também inibe a enzima CR desaminase (Lemaire et al., 2009). Esta é uma enzima chave no catabolismo de análogos de nucleosídeos de citosina, pois a desaminação desta resulta na perda de sua atividade farmacológica (Cheng et al., 2004; Momparler, 2005). Tem sido relatado que as células tumorais, em humanos, aumentam a atividade de CR desaminase como um mecanismo de resistência a drogas antineoplásicas como o 5-AZA-dC (Momparler et al., 1996; Eliopoulos et al., 1998; Momparler, 2005). É possível que o uso da ZB em combinação com outras drogas possa vir a ser uma abordagem para resolver o problema de resistência a drogas. Lemaire et al. (2009) propõem que o principal mecanismo pelo qual a ZB aumenta a ação antineoplásica de 5-AZA-dC é inibindo CR desaminase. Estes

achados enfatizam a necessidade de realizar estudos que investiguem a ação de drogas combinadas.

A ZB possivelmente pode vir a ser um agente promissor para ser administrado oralmente devido à suas propriedades farmacêuticas, que incluem grande estabilidade química em solução aquosa e baixa citotoxicidade, que foram observadas durante experimentos *in vitro* e *in vivo* (Cheng et al., 2003; Cheng et al., 2004). Além disso, a ZB inibe a proliferação celular, induz para do ciclo celular em G2/M e induz apoptose em leucemia mielóide aguda *in vitro* (Scott et al., 2007).

Estudos demonstram que a ZB possui atividade antitumoral, incluindo atividade antileucêmica (Cheng et al., 2003; Cheng et al., 2004; Herranz et al., 2006; Scott et al., 2007). Em um estudo realizado por Herranz et al. (2006), camundongos receberam injeções da linhagem MOLT-4 (linhagem T de leucemia linfóide aguda) e foram tratados com ZB. O grupo tratado demonstrou baixa tumorigenicidade, enquanto o grupo não-tratado desenvolveu tumores rapidamente, enfatizando a eficácia da ZB no contexto genético em linfomas de células-T em humanos. Também mostraram que a ZB é eficaz contra o desenvolvimento de linfoma tímico, promovendo uma sobrevida maior. Estas mudanças terapêuticas ocorrem sem toxicidade para o organismo, hipometilação genômica global e a depleção da proteína DNMT1.

O tratamento de T24 (células de câncer de bexiga) com ZB causa a depleção das proteínas das DNMTs (Cheng et al., 2004). Administração oral da droga em camundongos reduziu significativamente o crescimento de tumores e resultou na desmetilação e re-expressão do gene supressor de tumor $p16^{INK4A}$ (Cheng et al., 2003).

Em neoplasias hematopoéticas humanas, análises de *microarray* dos efeitos globais da ZB em linhagens de mieloma múltiplo, identificaram vários genes envolvidos no crescimento e sobrevivência celular que foram silenciados por metilação do DNA (Pompéia et al., 2004). Scott et al. (2007) destacam a ZB como um potencial agente terapêutico contra o câncer, sozinho ou em combinação com outras drogas como inibidores de HDAC e outros quimioterápicos.

Todos estes dados enfatizam a necessidade em associar novas terapias com as já existentes. Embora alguns agentes possuam atividade antileucêmica, os resultados que eles induzem podem ser tóxicos e certamente não se estendem à todos os pacientes. Assim, é importante que se amplie o potencial de alvos terapêuticos analisando a farmacogenética da leucemia, fazendo com que a seleção das drogas e doses utilizadas seja otimizada, evitando o

tratamento excessivo ou precário dos pacientes individualmente (Cheng et al., 2005; Rocha et al., 2005; Cheok, Evans, 2006).

A partir desses dados, a proposta do presente trabalho foi avaliar os efeitos da ZB associada ou não com os quimioterápicos VCR e MTX, por meio de ensaios funcionais, em linhagens celulares de leucemia linfóide aguda infantil.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o potencial terapêutico da droga Zebularina em linhagens celulares de leucemia linfóide aguda pediátrica.

2.2 Específicos

- Avaliar o efeito antineoplásico da ZB em linhagens de LLA pediátrica através das técnicas de proliferação celular, capacidade clonogênica, apoptose e ciclo celular;
- Avaliar o potencial quimio-sensibilizante da ZB em linhagens de LLA pediátrica através da combinação deste com o metotrexato e vincristina;
- Avaliar o padrão de metilação do gene AhR após o tratamento com ZB nas linhagens de LLA pediátrica;
- Avaliar a expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b* em linhagens de LLA pediátrica antes e após o tratamento com ZB.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Pediatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

3.1 Linhagens Celulares e Condições de Cultura

Foram utilizadas as linhagens de leucemia linfóide pediátrica Jurkat e ReH, gentilmente cedidas pelo Prof.º Dr. José Andres Yunes do Centro Infantil Boldrini de Campinas. Estas linhagens celulares foram cultivadas em meio RPMI (Gibco BRL, Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 1% de glutamina, 100 mg/ml de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina, e 10% de soro bovino fetal (pH 7.2–7.4), em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. Na realização dos experimentos, a contagem foi determinada utilizando o teste de exclusão do azul de Trypan.

3.2 Preparação das drogas

Uma solução estoque de 100mM de Zebularina (Tocris Bioscience, Avonmouth, United Kingdom) e uma solução de 21,6µM do quimioterápico vincristina (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) foram preparadas em PBS. Para o metotrexato, foi preparada uma solução em DMSO de 40mM. As soluções foram estocadas em alíquotas conforme recomendação do fabricante. As drogas foram adicionadas em meio de cultura imediatamente antes de serem aplicadas nas células. Para o tratamento controle do MTX utilizou-se DMSO a 0,1%.

3.3 Ensaio Funcionais

a) Ensaio de Proliferação Celular utilizando o KIT XTT

O ensaio com o kit XTT é um método de determinação colorimétrico do número de células metabolicamente ativas *in vitro*, medindo a proliferação e a viabilidade celular. A clivagem do sal amarelo tetrazolium XTT pelas células metabolicamente ativas produz o corante formazan de coloração alaranjada. Um aumento no número de células resulta no aumento da atividade global de desidrogenases mitocondriais na amostra, que é diretamente

correlacionado com a quantidade de formazan produzido e com diferenças na absorvância da solução.

Para o ensaio de proliferação, as células foram semeadas em densidades iniciais de 1×10^4 em placas de 96 poços e mantidas em condições de cultura por 24h. Após este período, as células foram tratadas e incubadas com os diferentes tratamentos por 24, 48 e 72 horas. A cada intervalo de tratamento foi adicionado 10 μ L de XTT preparado conforme recomendações do fabricante. As placas foram incubadas por 2 horas em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. A leitura da absorvância de 450nm com onda de referência de 650nm foi realizada utilizando o aparelho iMark Microplate Absorbance reader (BioRad Laboratories, Inc, CA, EUA). Os experimentos foram realizados em triplicata em pelo menos três tempos diferentes.

b) Ensaio de capacidade clonogênica

Para este ensaio, foi utilizado o método de cultura em meio semi-sólido com metilcelulose como descrito anteriormente por Carew et al. (2007) com algumas alterações. Dessa forma, 1×10^3 células foram semeadas em placas de cultura de seis poços e logo em seguida tratadas com as diferentes concentrações de ZB por 48h. Após este período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS, centrifugadas a 1000 rpm por 5 min a 18°C, ressuspensas em 400 μ L de meio RPMI e semeadas em 4mL de meio de metilcelulose Methocult (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC). Após passar pelo vortex, adicionou-se 1mL desse meio em cada poço da placa. As células foram incubadas por 14 dias em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C.

As colônias foram contadas com microscópio invertido, sendo consideradas somente aquelas com pelo menos 50 células. Os experimentos foram realizados em triplicata em dois tempos diferentes.

c) Ensaio de Apoptose

O ensaio para detecção de morte celular foi realizado através da marcação de células apoptóticas com Anexina V - Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD Biosciences Pharmingen, USA) e células necróticas com iodeto de propídio. Anexina V é uma molécula que apresenta alta afinidade pela fosfatidilserina, se ligando a esta especificamente. A fosfatidilserina é um fosfolipídio presente na face interna da membrana das células. Sua

externalização ocorre durante o processo de apoptose e serve como um sinal para que as células sejam removidas. A marcação positiva com iodeto de propídio indica que as células perderam a integridade da membrana.

Após o tratamento com os diferentes tratamentos, $1,5 \times 10^5$ células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1000 rpm por 5 min a 4°C, lavadas com PBS gelado e depois ressuspendidas em 300µL de tampão de ligação 1X (BD Biosciences Pharmigen, USA). As células foram então coradas com 5µL de anexina e 50µL de uma solução de iodeto de propídio (PI) e incubadas, protegidas da luz, em temperatura ambiente. As células foram analisadas com um citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Os experimentos foram realizados em triplicata em pelo menos dois tempos diferentes.

d) Ciclo Celular

O ensaio de ciclo celular foi realizado com o kit Cell Cycle Test Plus DNA Reagent Kit (BD Biosciences, San Jose, USA), conforme recomendações do fabricante. Brevemente, $1,5 \times 10^5$ de células foram adicionadas em placas de 6 poços e tratadas com 25µM ou 300 µM de ZB, após 48h de tratamento. As células foram lavadas com PBS e centrifugadas a 1000 rpm por 5 min a 4°C; depois foram tratadas com tripsina e RNase para a digestão das proteínas e RNA celulares e o DNA das células corado com PI.

As células foram analisadas com um citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Os dados foram analisados utilizando o *software* ModFit LT (Verity Software House, Topsham, USA). Os experimentos foram realizados em triplicata em dois tempos diferentes.

3.4 Extração de RNA e análise da expressão gênica por qRT-PCR

O mRNA das culturas celulares foi extraído por meio do Trizol Reagent (Invitrogen Inc, Carsdab, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado e armazenado em freezer -80°C até a sua utilização. Foi sintetizado o cDNA dos mRNAs-alvo por meio do kit High capacity (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O qRT-PCR foi realizado utilizando o aparelho ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os *primers* e as sondas TaqMan® para os genes *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b* foram adquiridas pelo sistema *on-demand* da Applied Biosystems. A concentração final dos *primers* foi de 900 nM e a concentração para as sondas Taq-Man foi de 300 nM. O

volume final para cada reação foi de 20 μ L incluindo 9 μ L de amostra investigada diluída (1/10), 10 μ L Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 1 μ L de sonda. Como controle endógeno foi utilizado o gene *ABL* (Abelson). A quantificação relativa da expressão gênica foi determinada utilizando o método $\Delta\Delta$ CT (Livak, Schmittgen, 2001).

3.5 Análise de metilação *in vitro*

Para a validação do efeito da droga nas linhagens leucêmicas, foi verificado o padrão de metilação do DNA do gene *AhR* (aryl hydrocarbon receptor - receptor aril hidrocarboneto) para comprovação do efeito desmetilante da droga. Essa análise foi feita por meio da PCR específica para a metilação (MS-PCR) que utiliza a modificação do DNA com bissulfito de sódio, sendo capaz de discriminar a presença de metilação no DNA.

a) Modificação do DNA com Bissulfito de Sódio

Esta técnica tem por finalidade converter *in vitro* as citosinas presentes na molécula de DNA em uracila, porém, esta conversão não ocorre quando as citosinas encontram-se metiladas. Por meio dessa reação, é possível analisar o padrão de metilação com base na presença de citosinas que permanecem no DNA após a modificação com bissulfito de sódio (citosinas metiladas) (Herman et al.,1996). As amostras de DNA das linhagens ReH e Jurkat, após tratamento com ZB nas concentrações de 300 e 500 μ M por 48 e 72h, foram extraídas utilizando o kit Wizard DNA Genomics (Promega), conforme recomendações do fabricante. Após a extração, 1 μ g de DNA genômico foi diluído em 80 μ L de água ultra pura (Milli Q) estéril. A seguir, foram adicionados 8 μ L de NaOH 3M para a desnaturação do DNA e as amostras foram incubadas a 37°C por 15 minutos seguido de 94°C por 5 minutos. Terminado o tempo de incubação, as amostras foram imediatamente colocadas em gelo e, a cada tubo, acrescentou-se 1mL de uma solução constituída por bissulfito de sódio 2,7M, hidroquinona 0,6mM e NaOH 0,36M. A seguir as amostras foram incubadas a 56°C, no escuro, por 16 horas (utilizou-se 100 μ L de óleo mineral para evitar a evaporação das amostras) e posteriormente purificadas a partir do kit de purificação Wizard DNA Clean –up System (Promega).

Terminada a purificação, ao DNA foi adicionado 5 μ L de NaOH 3M e incubado a 37°C por 15 minutos. A seguir, o DNA foi novamente precipitado em 5 μ L de acetato de sódio 3M

pH 5,2 e 100 μ L de etanol absoluto e incubado a -20°C overnight. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 13000rpm por 20 minutos e lavadas com etanol 70% seguido de centrifugação a 13000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi então desprezado, e após secar, o DNA modificado foi ressuspendido em 30:1 de água ultra pura (Milli Q) estéril.

b) PCR específica para a metilação (MS-PCR)

O princípio da MS-PCR consiste na amplificação específica de fragmentos metilados e não-metilados de uma determinada região do DNA modificada por bissulfito de sódio (Herman et al., 1996). Para tal, utiliza-se *primers* específicos capazes de discriminarem e hibridarem apenas a um tipo de fragmento.

Após a modificação por bissulfito de sódio, as citosinas não-metiladas convertidas em uracilas são reconhecidas pela Taq Polimerase como timina, devido à similaridade estrutural. Dessa forma, para a amplificação do fragmento metilado foi utilizado o *primer* denominado “M” (hibridação em fragmento que contém citosinas não convertidas – CG) e para a amplificação do fragmento não metilado o *primer* “U” (hibridação em fragmento que contém timinas - TG).

Ambas as reações foram realizadas em KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM; Tris HCl (pH 8,4); 10 mM; dNTP (0,1mM de cada nucleotídeo); *primer* 0,2 mM (de cada); Taq DNA Polimerase 1U e 0,1 μ g de DNA genômico, no aparelho termociclador PTC-200 (MJ Research, Inc, EUA). A ciclagem para amplificação do fragmento M consistiu de uma fase de denaturação do DNA a 94°C por 5 min e de 40 ciclos de 94°C por 1 min; 62°C por 1min e 30 seg e 72°C por 1 minuto, seguido por uma fase final de extensão de 72°C por 10 min. O mesmo foi utilizado para o controle *β -actina*. Para o fragmento U foi realizada uma denaturação a 94°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 1 min; 61°C por 1min e 30 seg e 72°C por 1 min, seguido por uma fase final de extensão de 72°C por 10 min. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídio (0.2%).

3.6 Análise Estatística

Na análise estatística, a média dos experimentos foi comparada pelo teste One- e Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni e Teste T de Student utilizando-se o pacote estatístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 15.0 software (SPSS, Inc, EUA).

3.7 Análise de Sinergismo entre drogas

Para a análise do efeito da combinação das drogas utilizadas nos experimentos utilizou-se o software CalcuSyn (Biosoft, Cambridge, U.K.). O efeito dessas combinações pode ser expresso como índice de combinação (CI).

O CI é um método usado para quantificar o sinergismo causado pelos efeitos citotóxicos da combinação de diferentes drogas. Este método é baseado na lei da ação das massas e no princípio do efeito-médio derivado de modelos de cinética enzimática desenvolvido por Chou and Talalay (Cho, Talalay, 1984), sendo amplamente utilizado para a análise de interações de drogas, principalmente as antineoplásicas. Com o uso do CI, sinergismo é definido como um efeito aditivo mais que o esperado, enquanto que antagonismo é definido como um efeito aditivo menos que o esperado. Sendo assim, por meio desse método, um CI igual a 1 indica um efeito aditivo, um CI maior que 1 indica antagonismo, enquanto que um CI menor que 1 indica sinergismo (Chou, Talalay, 1984; Chou, 2006). Embora sinergismo e citotoxicidade possam estar relacionados, um CI indicando alto nível de sinergismo não necessariamente implica em um alto grau de citotoxicidade absoluta (i.e. alta fração afetada (Fa)), até porque o antagonismo também pode gerar um alto nível de citotoxicidade (Keshelava et al., 2007).

O *software* CalcuSyn também foi utilizado para calcular o índice de redução de dose (DRI) das combinações. O DRI estima o quanto a dose de um ou mais agentes, usados na combinação, pode ser reduzido para atingir um efeito que seja comparável com os obtidos utilizando os agentes individuais. As combinações que agem sinergicamente podem ser identificadas como aquelas que mostrem valores significantes de DRI.

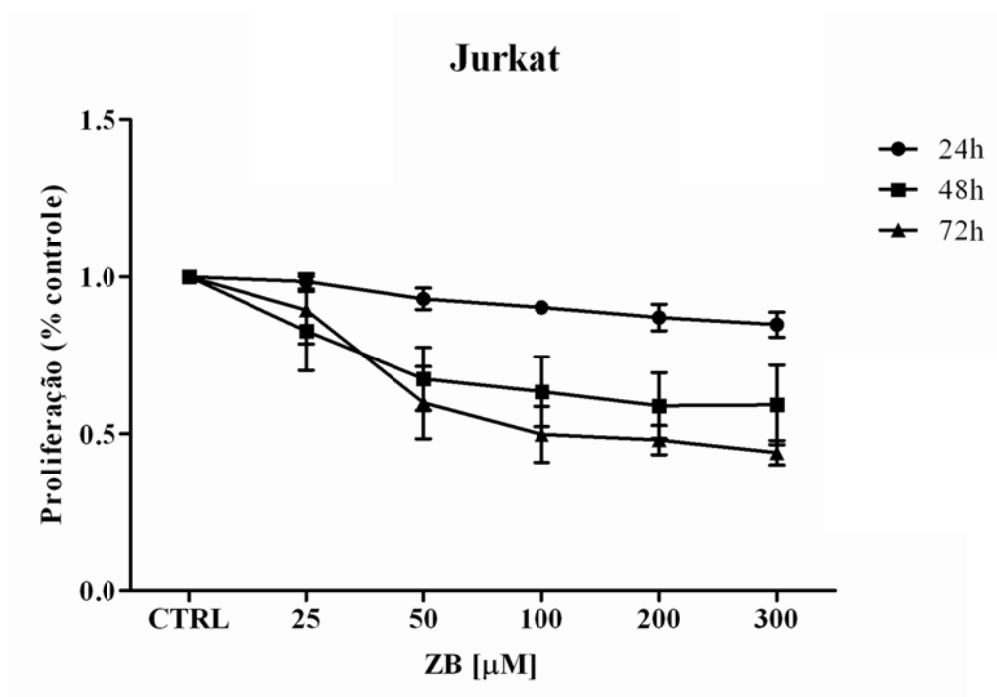
4. RESULTADOS

4.1 Efeitos da ZB e sua combinação na proliferação celular

Os efeitos da ZB na proliferação celular das linhagens Jurkat e ReH, após diferentes doses de tratamentos e tempos de incubação (24, 48 e 72h), estão representados na Fig. 1. Observou-se um efeito significativo da ZB dose e tempo dependentes em ambas as linhagens ($p < 0.05$). Tanto para a Jurkat quanto para a ReH, foi encontrada uma diferença significativa entre os tempos de 24 e 48h, porém não houve diferença significativa entre 48 e 72h. Além disso, as duas linhagens sofreram uma inibição significativa já na dose de $50\mu\text{M}$ após 24h de tratamento e ambas após 72h de tratamento não apresentam diferença nos efeitos da inibição acima da dose de $300\mu\text{M}$.

A determinação dos valores que causavam 50% de inibição do crescimento celular (IC50), de acordo com o *software* CalcuSyn, mostrou que a linhagem ReH é mais sensível aos efeitos da ZB quando comparada com a Jurkat. Os valores do IC50 para ReH são $1740 \pm 500,6$, $129,8 \pm 65,2$ e $45,1 \pm 16,7\mu\text{M}$; para a Jurkat são: $2219,3 \pm 729,3$, $364 \pm 84,1$ e $175 \pm 35,6\mu\text{M}$, após 24, 48 e 72h de tratamento, respectivamente.

A)



B)

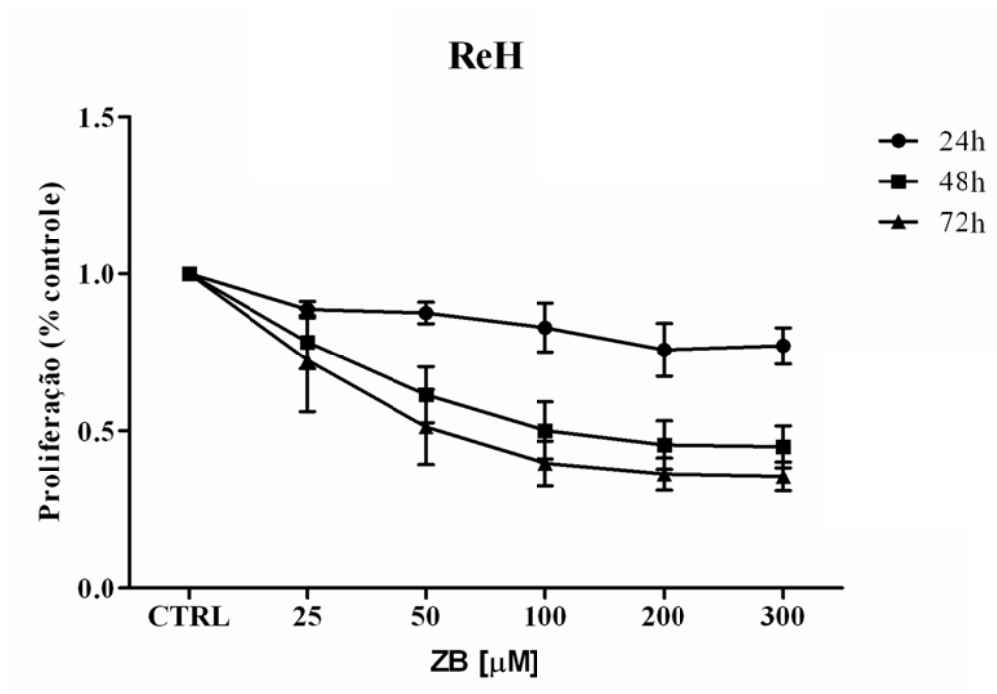


Figura 1 – Análise da proliferação celular após o tratamento das linhagens Jurkat (A) e ReH (B) com Zebularina após os tempos de 24, 48 e 72h.

Para obter as doses de combinação das drogas, testes de proliferação celular foram realizados com os quimioterápicos MTX e VCR após 48h de incubação, obtendo-se assim os valores de IC50 apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Doses necessárias para atingir 50% de inibição do crescimento celular (IC50) após tratamento de 48h com as drogas ZB, MTX e VCR.

Drogas	IC50 (μM)	
	ReH	Jurkat
Zebularina	129,8 \pm 65,2	364 \pm 84,1
Metotrexato	2,1 \pm 0,95	1,22 \pm 0,09
Vincristina	0,0044 \pm 0,0005	0,0293 \pm 0,018

Dois tipos de combinações foram realizadas, a simultânea e a seqüencial. Para o primeiro tipo de tratamento, as células foram tratadas com a ZB e os quimioterápicos concomitantemente por 48h. Para o tratamento seqüencial, primeiramente as células foram tratadas com diferentes doses de ZB por 24h e após este tempo, realizou-se o tratamento com as outras drogas por mais 24h.

Com os resultados obtidos para as combinações, foi possível observar que há uma notável diferença na resposta entre as linhagens e entre as diferentes formas de administração das drogas (Tabela 2). A combinação entre ZB e MTX, para a linhagem ReH, mostrou-se sinérgica para todas as doses utilizadas (baixos valores de CIs), isso ocorreu tanto no modo seqüencial como no simultâneo, gerando também altos valores de DRIs. Contudo, o modo seqüencial foi mais sinérgico que o simultâneo, uma vez que no seqüencial é possível observar os maiores valores de fração afetada, os maiores valores de DRI (chegam a mais de 1000 vezes para o MTX) e os menores CIs. Com isso, é possível inferir que a ZB tem a capacidade de sensibilizar as células para o MTX, principalmente quando aplicada antes deste quimioterápico.

Já para a linhagem Jurkat, somente as menores doses na combinação simultânea com o MTX foram sinérgicas, e nas doses maiores, efeitos antagônicos foram observados. Já o modo seqüencial de combinação com o MTX não foi sinérgico em nenhuma das doses aplicadas nessa linhagem, e os valores de CI dessa combinação foram bem maiores que os valores apresentados na simultânea.

Quando analisada a combinação entre ZB e VCR (Tabela 3), verifica-se que em ambas as formas de tratamentos, todas as doses utilizadas mostraram-se antagônicas para as

linhagens estudadas, exceto para as duas menores doses usadas no tratamento simultâneo para a Jurkat, onde foram observados efeitos sinérgicos. Na ReH, apesar de não ter sido encontrado valores de sinergia, chama a atenção que diferentemente da Jurkat, as doses menores apresentaram-se mais antagônicas que as doses maiores.

Em geral, observa-se que, para as combinações realizadas, as menores doses utilizadas foram mais sinérgicas, demonstrando que possivelmente a ZB tenha um melhor efeito nas combinações quando utilizada em doses menores, já que estas se mostraram com menores valores de CI e maiores valores de DRIs e Fa.

Tabela 2: Fa, CI e DRI para as linhagens ReH e Jurkat tratadas com ZB em combinação com o quimioterápico MTX.

Linhagem	Doses ZB:MTX [μ M]	Modo de administração					
		Simultâneo			Sequencial		
ReH	Proporção 75:1	Fa	CI	DRI MTX	Fa	CI	DRI MTX
	18,75:0,25	0,58	0,09	46,0	0,86	0,01	>1000
	37,5:0,5	0,59	0,17	25,8	0,84	0,01	>1000
	75:1	0,61	0,28	22,2	0,8	0,05	>1000
	150:2	0,64	0,41	26,9	0,75	0,15	>1000
	300:4	0,68	0,72	20,7	0,73	0,35	273,8
	450:6	0,69	0,86	29,9	0,72	0,07	128,7
Jurkat	Proporção 75:1						
	18,75:0,25	0,61	0,16	7,3	0,17	1,31	1,33
	37,5:0,5	0,62	0,31	3,8	0,23	1,80	0,88
	75:1	0,62	0,63	1,8	0,37	1,69	0,8
	150:2	0,59	1,24	0,94	0,38	3,22	0,41
	300:4	0,59	2,74	0,43	0,38	6,48	0,21
	450:6	0,55	4,15	0,28	0,42	8,39	0,15

Tabela 3: Fa, CI e DRI para as linhagens ReH e Jurkat tratadas com ZB em combinação com o quimioterápico VCR.

Linhagem	Doses ZB:VCR [μ M]	Ordem de administração					
		Simultâneo			Sequencial		
	Proporção	Fa	CI	DRI VCR	Fa	CI	DRI VCR
ReH	35000:1						
	77:0,0022	0,15	13,3	0,23	0,16	6,6	0,47
	119:0,0034	0,36	3,6	0,64	0,40	1,8	1,23
	157,5:0,0045	0,47	2,4	0,86	0,47	1,8	1,16
	234,5:0,0067	0,50	2,9	0,68	0,51	1,9	1,05
	315:0,009	0,54	3,2	0,61	0,55	2,2	0,89
Jurkat	16000:1						
	96:0,006	0,44	0,79	2,29	0,39	1,2	1,39
	192:0,012	0,48	1,1	1,7	0,43	1,7	1,03
	288:0,018	0,41	3,0	0,56	0,42	2,9	0,6
	400:0,25	0,43	3,4	0,52	0,41	4,1	0,43
	592:0,37	0,39	7,7	0,21	0,43	5,2	0,34

4.2 Capacidade Clonogênica

Com o objetivo de analisar a capacidade de formar colônias após a administração da ZB, foi realizado o teste em meio semi-sólido de metilcelulose (Figura 2). Analisou-se a redução no número de colônias após o tratamento com as doses de 100, 200 e 300 μ M de ZB por 48h.

A análise mostrou existência de diferença significativa na quantidade de colônias após os tratamentos quando comparado com o controle. Isto ocorreu para todos os tratamentos nas linhagens utilizadas ($p < 0.001$). Ambas foram similarmente afetadas pelo tratamento de ZB, porém o efeito foi maior na linhagem Jurkat, com uma redução que atinge a 99,7% na dose de 300 μ M, enquanto que para ReH esta atinge à 88,2%.

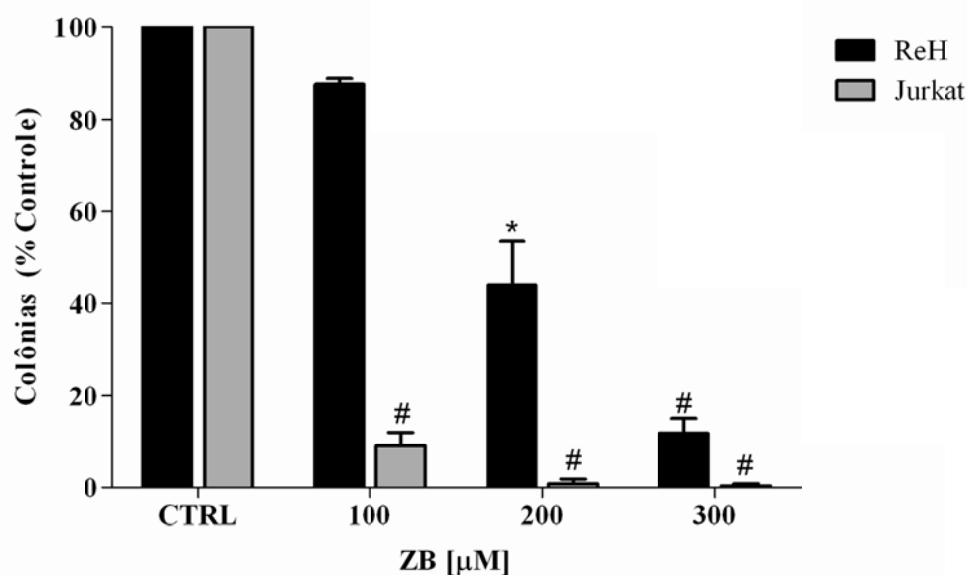


Figura 2 – Análise da redução de colônias após o tratamento com Zebularina. * $p < 0.05$; # $p < 0.001$ comparado ao controle.

4.3 Efeitos da ZB e sua combinação na indução de apoptose

Para avaliar se os efeitos citotóxicos encontrados não representavam somente diminuição da proliferação celular como também morte celular, foi avaliada a porcentagem de células apoptóticas após a marcação com anexina-V e PI. Em todas as doses, as células tratadas com as diferentes doses de ZB (50-300µM) apresentaram uma porcentagem significativamente maior ($p < 0.05$) de células apoptóticas quando comparadas com as que não receberam nenhum tratamento (Figura 3). Após 48h de incubação, foi possível observar com a maior concentração testada (300µM), um aumento em aproximadamente 70% e 50% no número de células anexina-V positivas nas linhagens Jurkat e ReH, respectivamente, quando comparado ao controle (Figura 3).

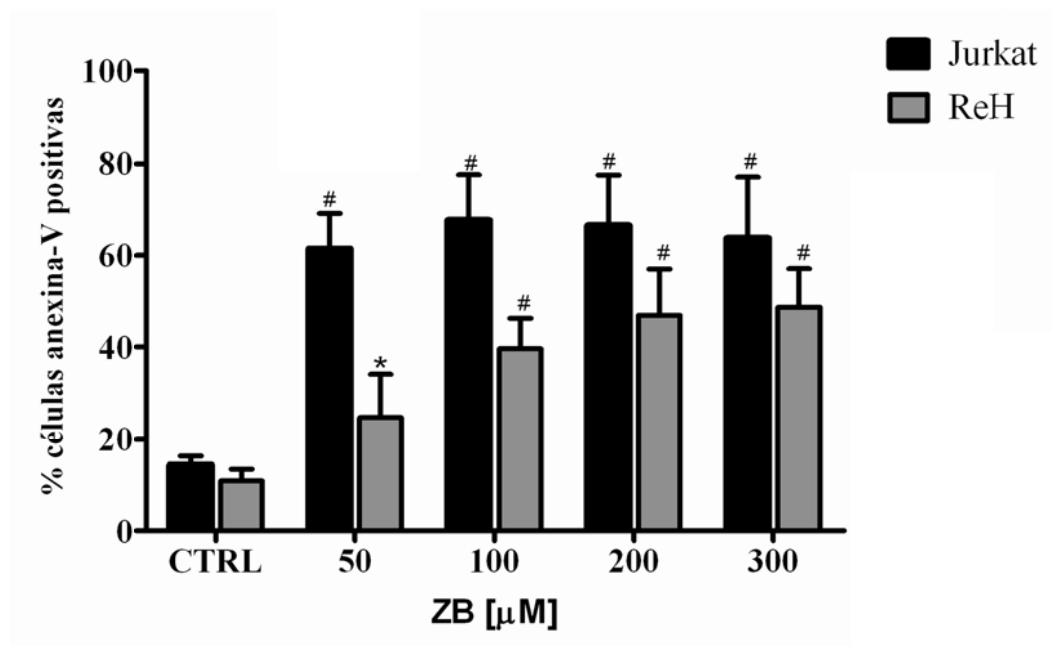


Figura 3 – Número de células anexina-V positivas após o tratamento com Zebularina. * $p < 0.05$; # $p < 0.001$ quando comparado ao controle.

Após a verificação da indução de apoptose pela ZB, foi avaliada se a combinação entre ZB e os quimioterápicos MTX e VCR alteraria o padrão de morte celular antes encontrado.

Foi possível observar que a combinação, na linhagem ReH, entre ZB e MTX e ZB e VCR, aumentou o número de células apoptóticas, porém esse aumento não foi significativo (Figuras 4 e 5).

A combinação entre a ZB e MTX na Jurkat mostrou-se capaz de induzir apoptose de forma significativa quando comparada ao controle, porém seu efeito foi similar ao encontrado na dose de MTX sozinho (Figuras 4 e 5). Para a combinação entre ZB e VCR, a combinação foi estatisticamente diferente do controle e também diferente da dose de VCR sozinha, embora não tenha sido diferente da dose de ZB sozinha (Figuras 4 e 5).

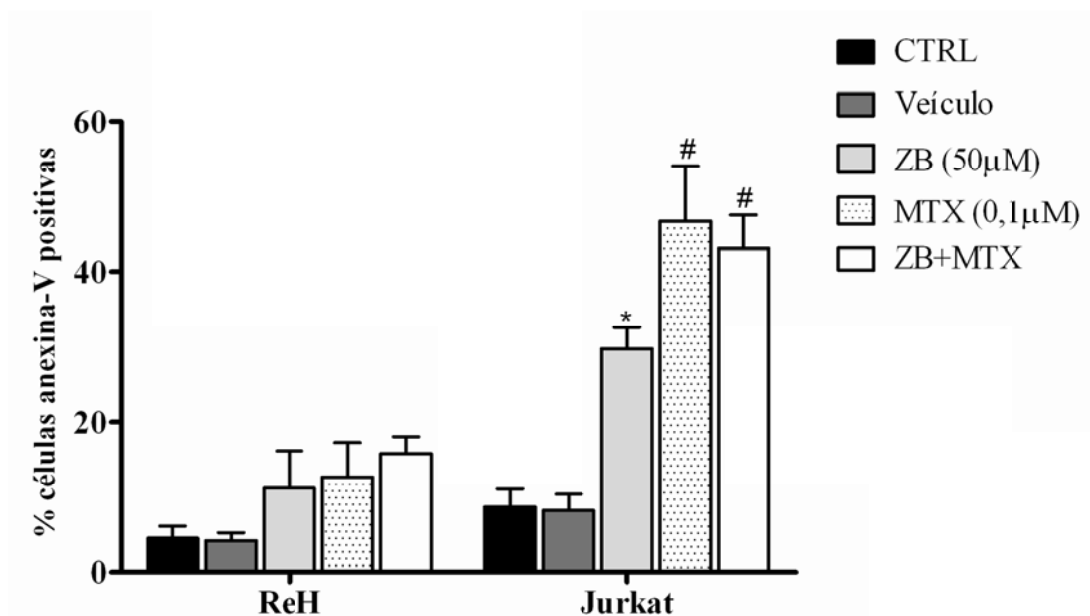


Figura 4 – Número de células anexina-V positivas após o tratamento com ZB, MTX e combinação ZB+MTX. * $p < 0.05$; # $p < 0.001$, comparado ao controle.

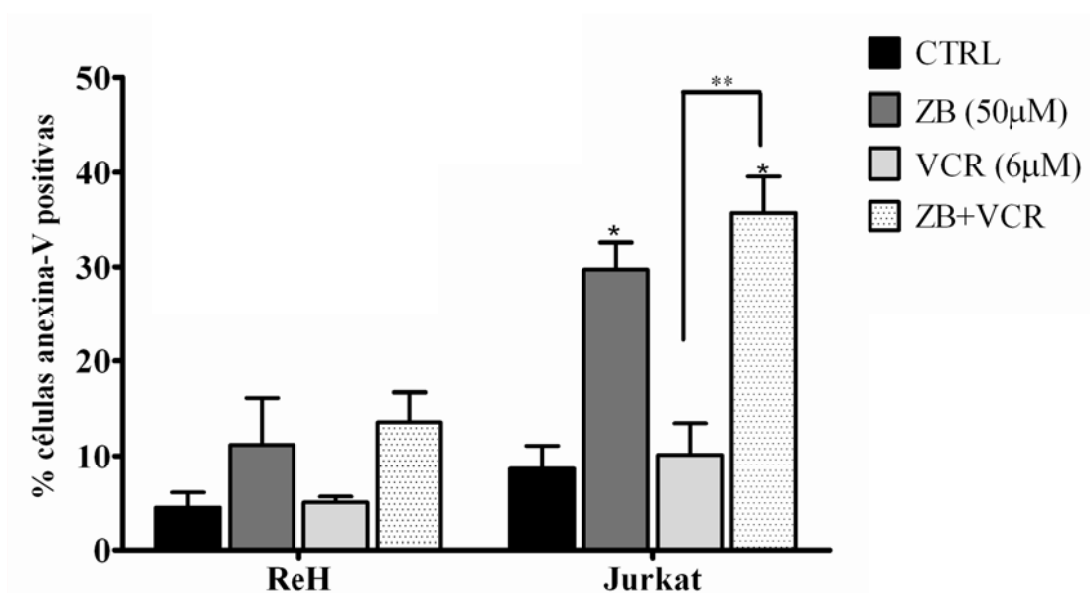
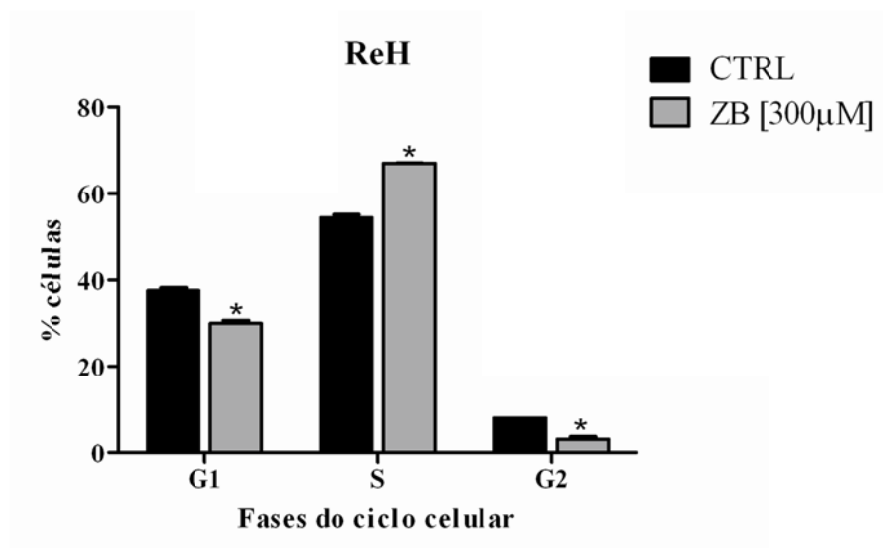


Figura 5 – Número de células anexina-V positivas após o tratamento com ZB, VCR e combinação ZB+VCR. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, comparado ao controle.

4.4 Ciclo Celular

Baseando-se na porcentagem de células apoptóticas após o tratamento com ZB e no ensaio de análise da metilação, foram escolhidas as doses de 300 e 25 μ M, na linhagem ReH e Jurkat, respectivamente, para avaliar o efeito da ZB no ciclo celular. Após 48h de incubação, para a linhagem ReH, houve um acréscimo significativo na porcentagem de células na fase S após o tratamento, enquanto na Jurkat não houve diferença significativa após o tratamento com ZB (Figura 6).

A)



B)

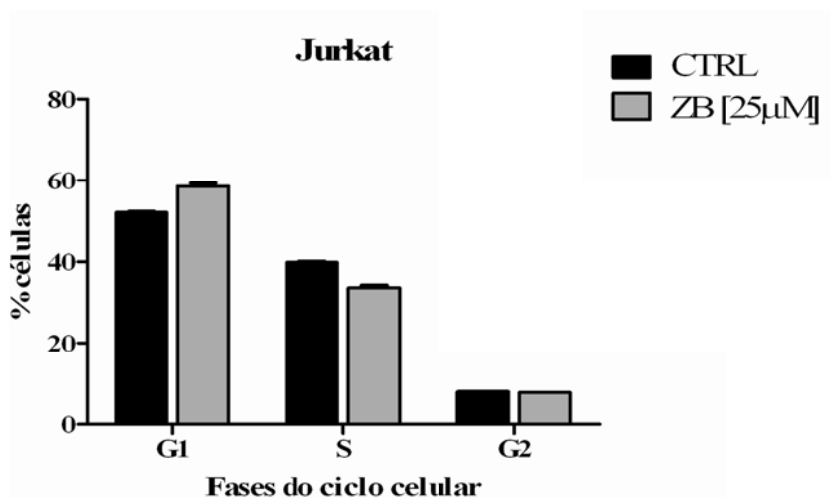


Figura 6 – Análise do ciclo celular nas linhagens ReH (A) e Jurkat (B), antes e após o tratamento com Zebularina. * $p < 0.05$, comparado ao controle.

4.5 Análise da metilação do gene *AhR* por MS-PCR após o tratamento com ZB

Devido à capacidade desmetilante da ZB, foi analisado se após o tratamento com a droga, o status de metilação do promotor do gene *AhR* seria alterado nas linhagens.

As linhagens foram tratadas com 300 e 500 μ M de ZB após 48 e 72h de incubação e em seguida o DNA foi extraído e modificado com bissulfito. A sequência do gene *AhR* foi amplificada por meio da técnica MS-PCR, usando primers específicos para as regiões metilada e não-metilada e os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídio (0.2%) (Figura 7). A linhagem ReH foi utilizada como controle positivo, já que está possui o promotor deste gene densamente metilado (Mulero-Navarro et al., 2006).

O tratamento de ambas as linhagens resultou na presença de DNA não-metilado após o tratamento com ZB. Contudo, sob nenhum dos tratamentos foi possível eliminar totalmente o DNA hipermetilado.

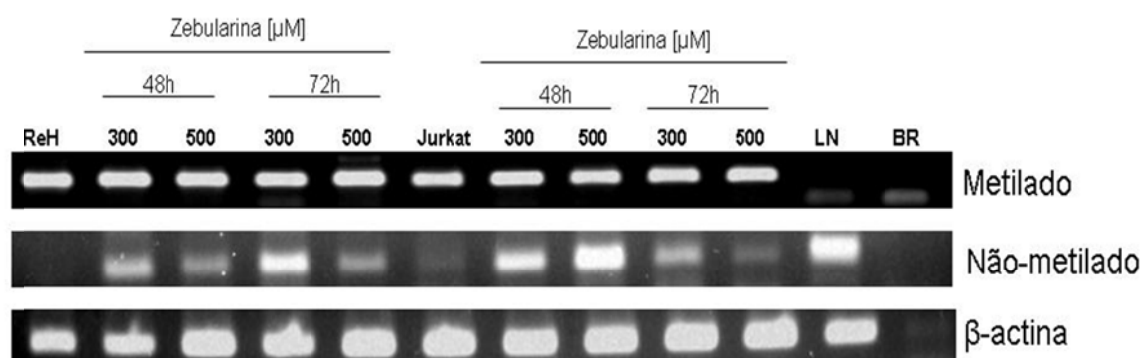


Figura 7 – Análise de metilação do promotor do gene *AhR* nas linhagens ReH e Jurkat, antes e após o tratamento com Zebularina. LN: linfócitos normais; BR: branco.

4.6 Avaliação da expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* após o tratamento com ZB

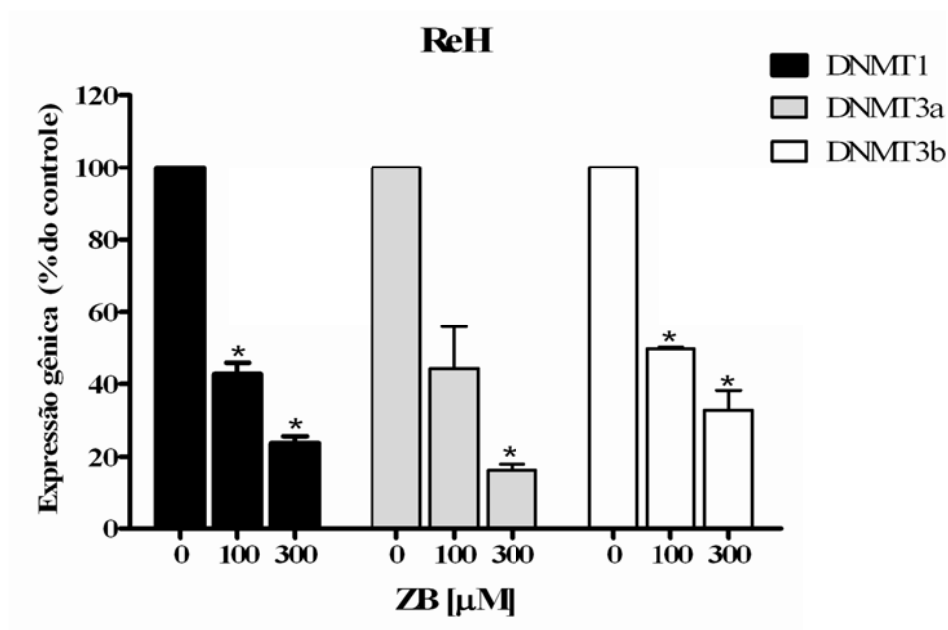
Para a avaliação do padrão de expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b* após o tratamento com ZB, ambas as linhagens foram tratadas com doses de 100 e 300 μ M e incubadas por 48h. O gene *ABL* foi utilizado como controle endógeno e como calibrador trabalhou-se com uma amostra de medula óssea normal.

O tratamento com ZB, em ambas as linhagens, reduziu de forma significativa a expressão dos genes (Figura 8). Para a linhagem ReH, a redução da expressão gênica após os

tratamentos de 100 e 300 μ M foi significativa para os genes *DNMT1* e *DNMT3b*, enquanto que para o gene *DNMT3a*, a redução somente foi significativa para dose de 300 μ M (Figura 8).

Na linhagem Jurkat a redução da expressão foi significativa em ambas as doses somente para o gene *DNMT3a*. O gene *DNMT1* reduziu, de forma significativa, somente após o tratamento com 100 μ M, enquanto que para o *DNMT3b* somente a dose de 300 μ M de ZB diminuiu sua expressão de forma significativa (Figura 8).

A)



B)

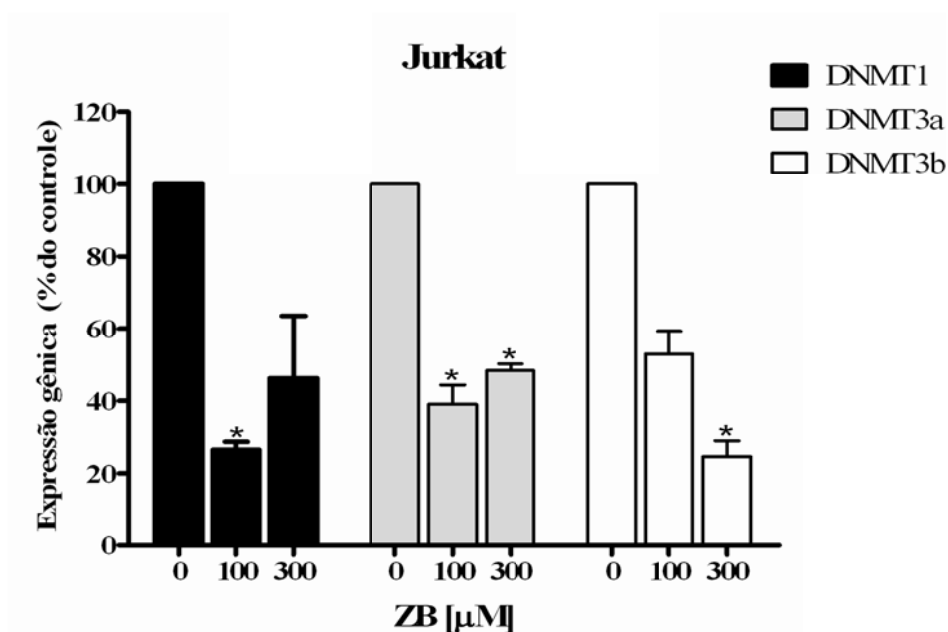


Figura 8 – Análise da expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b* nas linhagens ReH (A) e Jurkat (B), antes e após o tratamento com Zebularina. * $p < 0.05$, comparado ao controle.

5. DISCUSSÃO

Nas leucemias, a hipermetilação é encontrada em vários genes, incluindo genes de reparo do DNA (*hMLH1*, *MGMT*); envolvidos no ciclo celular (*p16*, *p15*, *p14*) e apoptose (*DAPK*) (Corn et al., 2000; Esteller et al., 2005; Bueso-Ramos et al., 2005). Drogas inibidoras da metilação do DNA, como os inibidores de DNMTs 5-Aza-C e 5-Aza-dC, demonstraram resultados clínicos promissores contra diversos tipos de neoplasias (Issa, 2003; Gore, 2005), incluindo as neoplasias hematológicas (Fenaux et al., 2009). Contudo, o uso clínico destes agentes ainda é pouco viável devido às suas propriedades tóxicas e instabilidade em soluções aquosas, levando à busca por novos agentes que tenham o mesmo modo de ação e características mais apropriadas para uso terapêutico (Cheng et al., 2003; Cheng et al., 2004).

A ZB é um análogo de citidina que inibe sua desaminação e a metilação do DNA. Estudos pré-clínicos demonstraram que a ZB é estável em meio aquoso e possui uma toxicidade tolerável, o que faz desta droga uma ótima candidata à administração oral (meia-vida >500h em pH 7,4) (Marquez et al., 2003; Yoo et al., 2008; van Bemmelen et al., 2009). A especificidade constitui um dos principais vieses quando se trata de agentes antineoplásicos e drogas epigenéticas. Contudo, Cheng et al. (2004) demonstraram que a ZB possui uma preferência por células tumorais em comparação à células normais. A droga preferencialmente inibiu a proliferação das células cancerosas, foi incorporada ao DNA destas células em maiores níveis e alterou de forma substancial a expressão de vários genes como o *p21* e o *p16*.

As linhagens celulares de LLA pediátrica, ReH e Jurkat, foram usadas no estudo representando os fenótipos pré-B e T, respectivamente. No presente estudo, foi verificado que a ZB causa a inibição da proliferação de ambas as linhagens, de maneira dose e tempo-dependente. Outros estudos, também investigando os efeitos da ZB, verificaram resultados semelhantes em diferentes neoplasias. Chiam et al. (2011) relataram uma redução significativa na proliferação de células de câncer de próstata a partir das doses 100 e 200µM e que a ZB foi capaz de inibir totalmente a proliferação na dose de 400µM. Estudos mostram que a inibição da proliferação ocorreu juntamente com a alteração da expressão de genes envolvidos na proliferação celular como o *p16* (Yoo et al., 2008; Suzuki et al., 2009). Dados semelhantes foram observados também em células de leucemia miélode aguda (Scott et al., 2007), glioblastoma (Meador et al., 2010), câncer de pulmão (Chen et al., 2010), câncer de mama (Billam et al., 2010) e outros.

A capacidade de formar colônias das linhagens celulares ReH e Jurkat após o tratamento com ZB também foi reduzida quando comparada ao controle, sendo esta

diminuição dose dependente. Em concordância com os dados encontrados neste trabalho, Scott et al. (2007) relataram que células de câncer de mama também sofreram redução na capacidade clonogênica após serem tratadas com ZB. O mesmo foi encontrado em células de glioblastoma (Meador et al., 2010).

A indução do aumento da apoptose é um dos efeitos procurados pelo tratamento de células tumorais com drogas específicas (Collins, Workman 2006; Portugal et al., 2009). Neste trabalho, foi encontrado um grande número de células apoptóticas após o tratamento com ZB, chegando a 60% de células apoptóticas. O aumento no número de células apoptóticas tem sido relatado em diferentes células tumorais após o uso de drogas epigenéticas, em especial a ZB (Cheng et al., 2003; Cheng et al., 2004; Suzuki et al., 2007; Ruiz-Magan et al., 2011). A apoptose é um processo altamente controlado de morte celular que tem um importante papel no desenvolvimento e na prevenção do câncer (Cotter, 2009), sendo o mecanismo que evita o descontrole celular causado pelas alterações em oncogenes e supressores tumorais (Felsher, 2004).

A exposição a agentes desmetilantes pode causar um aumento da expressão de genes associados ao ciclo celular, tais como *p14*, *p15* ou *p73*, e de genes relacionados à indução de apoptose como *caspase-8* ou *Apaf-1*, que são silenciados por hipermetilação (Baylin, 2005; Boulwood, Wainscoat, 2007; Sigalotti et al., 2007). Como consequência, estes agentes induzem parada no ciclo celular e apoptose, além de poder sensibilizá-las a outros agentes quimioterápicos (Ruiz-Magan et al., 2011).

O modo de ação pelo qual a ZB induz a apoptose é descrito sendo tanto pela via intrínseca como pela extrínseca. Em um estudo realizado, utilizando linhagens de câncer de mama, foi verificado que, após o tratamento com ZB, na linhagem MCF-7, a apoptose foi induzida através da via mitocondrial intrínseca, enquanto que na linhagem MDA-MB-231, foi induzida por ambas as vias (Billam et al., 2010). Ruiz-Magan et al. (2011) mostraram em células leucêmicas T *p53* deficientes, que o tratamento com ZB ativou a via apoptótica intrínseca, induzindo alterações mitocondriais como ativação de Bak, perda do potencial transmembrana, além de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Além disso, em células neoplásicas de câncer pancreático houve a hipoexpressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e hiperexpressão de Bax após o tratamento com ZB (Neureiter et al., 2007).

Devido aos diferentes modos de indução de apoptose causado pela ZB, estudos que detalhem o modo de indução da apoptose em LLA ainda devem ser realizados para melhor explicar os resultados aqui encontrados. Porém, acredita-se que a re-expressão de gene pró-apoptóticos causado pela desmetilação promovida pela ZB, seja comum à vários tipos de câncer (Cheng et al., 2004; Billam et al., 2010), incluindo a LLA.

Neste estudo, foi observado um maior efeito de inibição da proliferação na linhagem ReH quando comparada com a linhagem Jurkat. Enquanto que nos outros ensaios funcionais, como capacidade clonogênica e apoptose, a Jurkat se mostrou mais sensível aos efeitos da ZB. Esta discrepância de resultados ainda não possui uma explicação clara na literatura, talvez se deva a mecanismos tecido-específicos, ou vias genéticas diferentes presentes nessas linhagens (Kamb et al., 2007). As linhagens estudadas possuem diferenças significativas como o *status* do *p53*, fenótipos distintos e taxas de proliferação diferentes (Drexler, 2010), além de possuírem um padrão de metilação gênica diferente (Agrelo et al., 2005; Mulero-Navarro et al., 2006), suportando assim em parte os resultados aqui encontrados, porém outros estudos devem ser realizados.

Outro objetivo foi avaliar se os resultados aqui encontrados foram em consequência de alterações no ciclo celular. As linhagens foram tratadas com diferentes doses de ZB e tiveram seu ciclo celular avaliado. Devido ao grande número de células apoptóticas encontradas na linhagem Jurkat, foi escolhido a dose de 25 μ M para realizarmos o teste nessa linhagem, enquanto para a ReH, a dose de 300 μ M foi a escolhida, pois esta foi a maior dose utilizada nos ensaios funcionais e foi a partir dessa dose que encontramos uma desmetilação significativa do gene *AhR*.

Foi possível observar que, após o tratamento, houve um aumento significativo no número de células na fase S na ReH enquanto que não houve diferença significativa para a linhagem Jurkat. Billam et al. (2010) encontraram resultados similares em linhagens de câncer de mama, onde a parada do ciclo ocorreu na fase S, porém só foi evidente acima de 200 μ M de ZB, o que explicaria a diferença encontrada aqui entre as linhagens. Além disso, Ruiz-Magan et al. (2011) mostraram que na Jurkat, o tratamento com 50 μ M de ZB não alterou o ciclo celular, o que vai de acordo com os resultados aqui encontrados.

A parada na fase S pode acontecer devido a vários eventos, como repressão na síntese de histonas, erro na montagem da cromatina e deficiências no checkpoint (Nelson et al., 2002; Ye et al., 2003). Ainda, é relatado que o *knock-down* da DNMT1 também causa parada na fase S (Milutinovic et al., 2003), o que vai de acordo com os resultados aqui encontrados, já que a ZB causa a diminuição das DNMTs, especialmente a DNMT1 (Bird, 2002; Yoo, Jones, 2006; Issa et al., 2007).

A ZB é descrita como um agente capaz de re-expressar genes supressores tumorais, além de possuir uma preferência por células neoplásicas (Cheng et al., 2004). Sendo assim, é proposto o uso da ZB como um agente quimiosensibilizante em ação conjunta com outras drogas antineoplásicas (Suzuki et al., 2007). Para avaliar se os mecanismos epigenéticos da ZB podem

alterar a resposta celular quando combinada com outras drogas antineoplásicas, foi realizado os ensaios de proliferação celular e apoptose combinando as drogas VCR ou MTX com ZB.

Neste estudo, a combinação entre ZB e MTX resultou em doses sinérgicas e uma grande diminuição no DRI, principalmente nas menores doses no ensaio de proliferação celular. O que reforça o uso da ZB como quimiosensibilizante no tratamento anticâncer, obtendo um maior efeito quando aplicada antes do MTX. Suzuki et al. (2007) ao combinar a ZB com cisplatina obtiveram resultados sinérgicos em células de carcinoma de células escamosas bucal, indicando também que baixas doses de ZB já seriam suficientes para sensibilizar estas células para o tratamento com o quimioterápico.

No ensaio de apoptose, para a linhagem Jurkat, a combinação das drogas foi estatisticamente diferente do controle, embora possa ser devido ao efeito do MTX sozinho e não da combinação em si. Enquanto que para a ReH, a diferença na combinação não foi significativa, talvez porque as doses escolhidas não causaram um efeito significativo na linhagem.

O MTX inibe a enzima DHFR reduzindo assim o nível da principal forma do folato, o 5-metiltetrahidrofolato (5-metil-THF). Essa diminuição, acarreta diminuição do nível de metionina, reduzindo assim a formação do doador do grupamento metil para as DNMTs, o SAM, afetando então a metilação do DNA (Figura 9) (Schipper et al., 2007; Vezmar et al., 2009). A forma pela qual a combinação entre o MTX e a ZB resulta em sinergismo, ainda não está clara, porém dados na literatura sugerem que o MTX, através do seu mecanismo de ação, altera a metilação no DNA, agindo dessa forma em conjunto com a ZB.

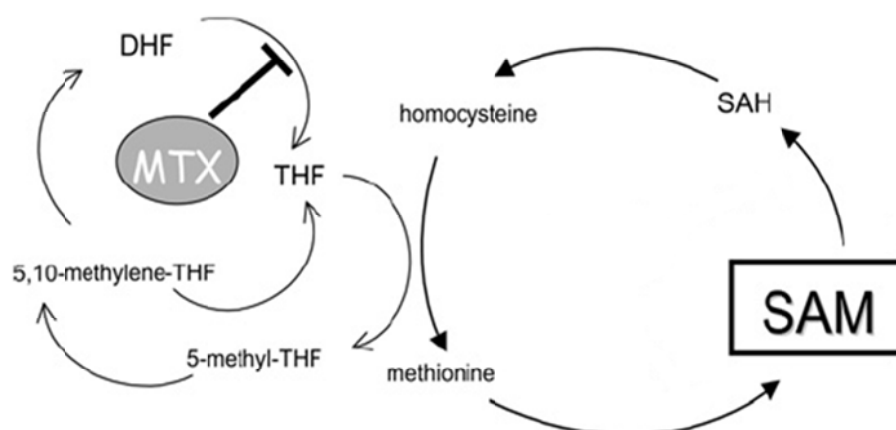


Figura 9 – Relação entre a via de metilação do DNA e modo de ação do MTX. Figura adaptada de Schipper et al., 2007.

Além disso, estudos mostram que a ZB possui a capacidade de re-expressar genes que diminuem a resistência a droga contribuindo para o aumento da quimiosensibilidade (Stumpel et al., 2009; Meador et al., 2010). Gonen et al., (2008) relataram que o gene *PCFTA*, envolvido no transporte do folato, está hipermetilado em células de LLA-T e recomendam o uso de agentes desmetilantes para transpor a resistência aos antifolatos.

Já a combinação entre ZB e VCR no ensaio de proliferação celular, mostrou uma pequena redução no DRI, porém resultou em doses antagônicas no geral, enquanto que no ensaio de apoptose a combinação não se mostrou diferente das drogas sozinhas, não havendo antagonismo nem sinergismo.

A VCR é um quimioterápico utilizado no tratamento de uma grande variedade de tumores que induz a desestabilização da tubulina, bloqueando a polimerização dos microtúbulos (Jordan, Wilson, 2004). A droga causa bloqueio do ciclo celular na fase G2/M, causando então a morte celular por apoptose (Jordan, Wilson, 2004). Sui e Fan (2005) e Kumar et al. (2007) estudando o efeito da VCR juntamente com radiação em linhagens de meduloblastoma, relataram que houve um grande antagonismo na combinação destes e propõem que este antagonismo seja ciclo dependente, o mesmo é proposto por outros estudos que também encontraram antagonismo entre outras drogas (El-Awady et al., 2005). Sendo assim, o antagonismo aqui encontrado pode também ser ciclo dependente. A ZB causou parada na fase S, enquanto que a VCR causa parada em G2/M, sendo assim, as células não atingem a fase do ciclo onde a VCR age, causando então o antagonismo. Contudo, outros ensaios são necessários para um melhor entendimento da relação entre as duas drogas.

Confirmando a importância da metilação do DNA na tumorigênese, estudos já relataram que os genes *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3b* se encontram hiperexpresso em vários tipos de neoplasias (Robertson et al., 2000; McCabe et al., 2005). Sendo assim, para verificar se houve alteração na expressão gênica desses genes após o tratamento com ZB, foi realizado a análise por meio da qRT-PCR. Os três genes diminuíram significativamente a expressão do mRNA após o tratamento de 48h com ZB em ambas as linhagens.

A ZB é um inibidor de DNMTs e estudos sugerem que a capacidade desmetilante da ZB ocorra graças à depleção das proteínas DNMTs, sem alterar a expressão de seus respectivos genes (Billam et al., 2010; Meador et al., 2010). O modo de ação da ZB é amplamente aceito como sendo pós-traducional (Cheng et al., 2003; Cheng et al., 2004), porém, neste trabalho houve a alteração na expressão destes genes. Esta alteração, talvez, não esteja relacionada ao modo de ação da droga, mas sim a capacidade desmetilante que esta possui, resultando em alterações gênicas globais. Meador et al. (2010) relataram que o gene

DNMT3b aumentou sua expressão após o tratamento com ZB, e supõem que sua hiperexpressão seja devido a uma reposta aos danos no DNA causados pelo tratamento.

Para validar o efeito desmetilante da droga nas linhagens, foi realizada a análise de metilação por MS-PCR. O promotor do gene *AhR* apresenta-se metilado em uma alta frequência em pacientes com LLA, inclusive na linhagem ReH e age como um regulador transcricional, envolvido no ciclo celular e no processo de inflamação (Mulero-Navarro et al., 2006; Casado et al., 2010).

Após o tratamento com ZB, foi verificado que houve a desmetilação do gene *AhR* nas linhagens, o que reforça o uso da ZB como agente desmetilante em malignidades hematológicas. Estudos relatam que a ZB possui a capacidade de reduzir a metilação e expressar genes até então silenciados. Scott et al. (2007) demonstraram a re-expressão do gene *p15* em leucemia mielóide aguda. Suzuki et al., (2007) relataram uma diminuição de 34% no nível de citosina metilada no DNA após o tratamento com 220 μ M de ZB em carcinoma de células escamosas bucal.

Altas doses de ZB foram necessárias para que ocorresse níveis de desmetilação suficiente para uma amplificação detectável do AhR. Estas observações são consistentes com outros estudos que analisaram a metilação de outros genes após o tratamento com a ZB utilizando doses similares (Cheng et al., 2003; Cheng et al., 2004; Dote et al., 2005). A MS-PCR continua sendo a técnica mais comum para se determinar o *status* de metilação, contudo, ela somente analisa um pequeno número de locais CpG e não é uma técnica quantitativa. Sendo assim, dependendo do objetivo da investigação, outras técnicas devem ser aplicadas para confirmar o *status* de metilação gênica.

Os dados mostrados neste trabalho confirmam que drogas epigenéticas, como a ZB, são potenciais agentes para o tratamento da LLA. A potencialidade de reverter o estado de metilação do DNA e a consequente reexpressão dos genes afetados é uma opção atrativa para ser explorada.

Nossos resultados permitem entender melhor as consequências da metilação na LLA e assim traçar uma forma mais apropriada para a utilização de drogas desmetilantes sozinhas ou em combinação com outros agentes terapêuticos já existentes. Entretanto, outros estudos devem ser realizados, como a expressão em larga escala e análise da expressão protéica após o tratamento com ZB, tendo em vista ampliar os dados aqui discutidos. Além disso, testes *in vivo* devem ser realizados, inclusive associando quimioterápicos, a fim de validar os efeitos aqui encontrados.

6. CONCLUSÕES

- A ZB inibiu a proliferação celular de linhagens de LLA pediátrica de maneira dose e tempo-dependente, sendo que o efeito mais intenso foi observado na linhagem pré-B ReH;
- Reduziu também a capacidade das células em formar colônias em ambas as linhagens;
- A ZB aumentou a taxa de apoptose em ambas as linhagens estudadas, sendo mais eficiente na linhagem T Jurkat;
- A ZB agiu sinergicamente com MTX aumentando os efeitos na inibição da proliferação em ambas as linhagens;
- O tratamento com ZB causou uma parada em S na linhagem ReH e reduziu significativamente a expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3a* e *DNMT3*.
- A ZB se mostrou eficiente em desmetilar o gene *AhR* após tratamento;
- Todos os dados encontrados no presente trabalho sugerem que as drogas desmetilantes podem ser interessantes agentes para o tratamento da LLA pediátrica, sozinhas ou em combinação com outros quimioterápicos.

7. REFERÊNCIAS

- Agrelo R, Setien F, Espada J, et al. Inactivation of the lamin A/C gene by CpG island promoter hypermethylation in hematologic malignancies, and its association with poor survival in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005; 23(17):3940-7.
- Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005; 2 Suppl 1:S4-11.
- Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect*. 2007;115(1):138-45.
- Bhojwani D, Howard SC, Pui CH. High-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2009;9 Suppl 3:S222-30.
- Billam M, Sobolewski MD, Davidson NE. Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 120(3):581-92.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002;16(1):6-21.
- Boulton J, Wainscoat JS. Gene silencing by DNA methylation in haematological malignancies. *Br J Haematol*. 2007;138(1):3-11.
- Bueso-Ramos C, Xu Y, McDonnell TJ, et al. Protein expression of a triad of frequently methylated genes, p73, p57Kip2, and p15, has prognostic value in adult acute lymphoblastic leukemia independently of its methylated status. *J Clin Oncol*. 2005;23(17):3932-9.
- Carew JS, Nawrocki ST, Kahue CN, et al. Targeting autophagy augments the anticancer activity of the histone deacetylase inhibitor SAHA to overcome Bcr-Abl-mediated drug resistance. *Blood*. 2007;110(1):313-22.
- Casado FL, Singh KP, Gasiewicz TA. The aryl hydrocarbon receptor: regulation of hematopoiesis and involvement in the progression of blood diseases. *Blood Cells Mol Dis*. 2010;44(4):199-206.
- Chen M, Voeller D, Marquez VE, et al. Enhanced growth inhibition by combined DNA methylation/HDAC inhibitors in lung tumor cells with silenced CDKN2A. *Int J Oncol*. 2010;37(4):963-71.

Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, et al. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(5):399-409.

Cheng JC, Weisenberger DJ, Gonzales FA, et al. Continuous zebularine treatment effectively sustains demethylation in human bladder cancer cells. *Mol Cell Biol.* 2004;24(3):1270-8.

Cheng Q, Yang W, Raimondi SC, et al. Karyotypic abnormalities create discordance of germline genotype and cancer cell phenotypes. *Nat Genet.* 2005;37(8):878-82.

Cheek MH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(2):117-29.

Chiam K, Centenera MM, Butler LM, et al. GSTP1 DNA methylation and expression status is indicative of 5-aza-2'-deoxycytidine efficacy in human prostate cancer cells. *PLoS One.* 2011;6(9):e25634.

Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships — the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors . *Adv Enzyme Regul* 1984; 2 : 27 – 55 .

Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 2006;58:621-81.

Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'- deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene.* 2002; 21:5483–95.

Collins I, Workman P. New approaches to molecular cancer therapeutics. *Nat Chem Biol.* 2006; 2(12): 689-700.

Corn PG, Smith BD, Ruckdeschel ES, et al. E-cadherin expression is silenced by 50 CpG island methylation in acute leukemia. *Clin Cancer Res.* 2000;6:4243–8.

Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(7):501-7.

Das PM, Singal R. DNA methylation in cancer. *Journal of Clini Onco,* 2004;22:4632-42.

Daskalakis M, Nguyen TT, Nguyen C, et al. Demethylation of a hypermethylated p16 INK4B gene in patients with myeloblastic syndrome by 5-Aza-20-deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood* 2002;100:2957–2964.

Daskalakis M, Nguyen TT, Nguyen C, et al. Demethylation of a hypermethylated p16 INK4B gene in patients with myeloblastic syndrome by 5-Aza-20-deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood*, 2002;100:2957–64.

Dote H, Cerna D, Burgan WE, et al. Enhancement of in vitro and in vivo tumor cell radiosensitivity by the DNA methylation inhibitor zebularine. *Clin Cancer Res*. 2005;11(12):4571-9.

Drexler HG: *Guide to Leukemia- Lymphoma Cell Lines*, 2nd Edition. Braunschweig, 2010.

Egger G, Liang G, Aparicio A, et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;27:429, 457-63.

El-Awady RA, Saleh EM, Ezz M, et al. Interaction of celecoxib with different anti-cancer drugs is antagonistic in breast but not in other cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011;255(3):271-86.

Eliopoulos N, Cournoyer D, Momparler RL. Drug resistance to 5-aza-2-deoxycytidine, 2,2-diXuorodeoxycytidine, and cytosine arabinoside conferred by retroviral-mediated transfer of human cytidine deaminase cDNA into murine cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1998;42:373–8.

Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*. 2000;343(19):1350-4.

Esteller M, Risques RA, Toyota M, et al. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*. 2001;15:61,4689-92.

Esteller M. DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations. *Curr Opin Oncol*. 2005;17:55-60.

Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104:15805-10.

Fazzari MJ, Grealley JM. Epigenomics: beyond CpG islands. *Nature*, 5, 446-5, 2004.

Felsher DW. Putting oncogenes into a developmental context. *Cancer Biol Ther*. 2004; 3(10): 942-4.

Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* 2009;10:223-32.

Gonen N, Bram EE, Assaraf YG. PCFT/SLC46A1 promoter methylation and restoration of gene expression in human leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;376(4):787-92.

Gore SD. Combination therapy with DNA methyltransferase inhibitors in hematologic malignancies. *Nat Clin Pract Oncol.* 2005;2:30–35.

Greaves M. Pre-natal origins of childhood leukemia. *Rev Clin Exp Hematol.* 2003;7(3): 233-45.

Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil. GBTLI LLA-99 – protocolo de tratamento da leucemia linfóide aguda em crianças. Campinas: [s.n]; 2000.188p.

Hackanson B, Robbel C, Wijermans P, et al. In vivo effects of decitabine in myelodysplasia and acute myeloid leukemia: review of cytogenetic and molecular studies. *Ann. Hematol.* 2005;84:32-8.

Hellebrekers DMEI, Griffioen AW, Engeland MV. Dual targeting of epigenetic therapy in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2007;1775:76-91.

Herranz M, Martin-Caballero J, Fraga MF, et al. The novel DNA methylation inhibitor zebularine is effective against the development of T-cell lymphoma. *Blood.* 2006;107: 1174–7.

Hunger SP, Winick NJ, Sather HN, et al. Therapy of low-risk subsets of childhood acute lymphoblastic leukemia: When do we say enough? *Pediatr Blood Cancer.* 2005;45:876-80.

Instituto Nacional de Câncer, [homepage na Internet]. Rio de Janeiro (Brasil): Instituto Nacional de Câncer [citado em 2010 Mai 05]. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=tabelaestados.asp&UF=BR>

Irons RD, Stillman WS. Impact of benzene metabolites on differentiation of bone marrow progenitor cells. *Environ. Health Perspect.* 1996;104:1239-46.

Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, et al. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-20-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood.* 2004;103:1635-40.

Issa JP, Zehnbaauer BA, Civin CI, et al. The estrogen receptor CpG island is methylated in most hematopoietic neoplasms. *Cancer Res.* 1996;56:973–7.

Issa JP. Decitabine. *Curr Opin Oncol.* 2003;15(6):446-51.

Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature.* 2003;33:245-54.

Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(4):253-65.

Jordan MA. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2002;2(1):1-17.

Kamb A, Wee S, Lengauer C. Why is cancer drug discovery so difficult? *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(2):115-20.

Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer.* 2006;106:1794–1803.

Karathanasis NV, Choumerianou DM, Kalamanti M. Gene polymorphisms in childhood ALL. *Pediatr. Blood Cancer.* 2009;52:318-23.

Kebriaei P, Larson RA. Progress and challenges in the therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Hematol.* 2003;10:284-9.

Keshelava N, Davicioni E, Wan Z, Ji L, Sposto R, Triche TJ, Reynolds CP. Histone deacetylase 1 gene expression and sensitization of multidrug-resistant neuroblastoma cell lines to cytotoxic agents by depsipeptide. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(14):1107-19.

Kondo Y, Shen L, Issa JP. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. *Mol Cell Biol.* 2003;23:206–15.

Kopelovich L, Crowell JA, Fay JR. The epigenome as a target for cancer chemoprevention. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(23):1747-57.

Krivtsov AV, Armstrong S.A. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(11):823-33.

Kumar KS, Sonnemann J, Hong le TT, et al. Histone deacetylase inhibitors, but not vincristine, cooperate with radiotherapy to induce cell death in medulloblastoma. *Anticancer Res.* 2007;27(1A):465-70.

Lane AA, Chabner BA. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J Clin Oncol.* 2009;27(32):5459-68.

Larson RA. Acute lymphoblastic leukemia: older patients and newer drugs. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 131-6, 2005.

Lemaire M, Momparler LF, Raynal NJ, et al. Inhibition of cytidine deaminase by zebularine enhances the antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009;63(3):411-6.

Li LC, Carroll PR, Dahiya R. Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(2):103-15.

Liang DC, Shih LY, Hung IJ, et al. Clinical relevance of internal tandem duplication of the FLT3 gene in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer.* 2002;94(12):3292-8.

Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 2001; 25:402-408.

Marquez VE, Kelley JA, Agbaria R, et al. Zebularine: a unique molecule for an epigenetically based strategy in cancer chemotherapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1058:246-54.

Matsushita C, Yang Y, Takeuchi S, et al. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Rep.* 2004;12(1):97-9.

McCabe MT, Davis JN, Day ML. Cancer Regulation of DNA methyltransferase 1 by the pRb/E2F1 pathway. *Res.* 2005;65(9):3624-32.

Meador JA, Su Y, Ravanat JL, et al. DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)-deficient human glioblastoma cells are preferentially sensitized by Zebularine. *Carcinogenesis.* 2010;31(2):184-91.

Meeker ND, Yang JJ, Schiffman JD. Pharmacogenomics of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Expert Opin Pharmacother.* 2010;11(10):1621-32.

Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Cancer-specific region of hypermethylation identified within the HIC1 putative tumour suppressor gene in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 1999;13:877–83.

Milutinovic S, Zhuang Q, Niveleau A, et al. Epigenomic stress response. Knockdown of DNA methyltransferase 1 triggers an intra-S-phase arrest of DNA replication and induction of stress response genes. *J Biol Chem*. 2003;278(17):14985-95.

Momparler RL, Eliopoulos N, Bovenzi V, et al. Resistance to cytosine arabinoside by retrovirally mediated gene transfer of human cytidine deaminase into murine fibroblast and hematopoietic cells. *Cancer Gene Ther*. 1996 t;3(5):331-8.

Momparler RL. Pharmacology of 5-aza-2-deoxycytidine (decitabine). *Semin Hematol*. 2005;42:9–16.

Mulero-Navarro S, Carvajal-Gonzalez JM, Herranz M, et al. The dioxin receptor is silenced by promoter hypermethylation in human acute lymphoblastic leukemia through inhibition of Sp1 binding. *Carcinogenesis*. 2006;27(5):1099-104.

Nachman JB, Heerema NA, Sather H, et al. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2007;110(4):1112-5.

Nakagawa H, Nagasaka T, Cullings HM, et al. Efficient molecular screening of Lynch syndrome by specific 3' promoter methylation of the MLH1 or BRAF mutation in colorectal cancer with high-frequency microsatellite instability. *Oncol Rep*. 2009;21(6):1577-83.

Nakao M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene*. 2001;278(1-2):25-31.

Nelson DM, Ye X, Hall C, et al. Coupling of DNA synthesis and histone synthesis in S phase independent of cyclin/cdk2 activity. *Mol Cell Biol*. 2002;22(21):7459-72.

Neureiter D, Zopf S, Leu T, et al. Apoptosis, proliferation and differentiation patterns are influenced by Zebularine and SAHA in pancreatic cancer models. *Scand J Gastroenterol*. 2007;42(1):103-16.

Pedrosa F, Lins M. Leucemia linfóide aguda: uma doença Curável. *Rev bras saúde matern infant*. 2002;2:63-8.

Pompéia C, Hodge DR, Plass C, et al. Microarray analysis of epigenetic silencing of gene expression in the KAS-6/1 multiple myeloma cell line. *Cancer Res*. 2004;4:3465-73.

- Portugal J, Bataller M, Mansilla S. Cell death pathways in response to antitumor therapy. *Tumori*. 2009; 95(4): 409-21.
- Pui CH, Chessells JM, Camitta B, et al. Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. *Leukemia*. 2003;17(4):700-6.
- Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2006 Jan 12;354(2):166-78.
- Pui CH, Gaynon PS, Boyett JM, et al. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet*. 2002;359(9321):1909-15.
- Pui CH, Jeha S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(2):149-65.
- Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008;371(9617):1030-43.
- Pui CH, Robison LL, Look AT: Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008;371:1030-43.
- Pui CH, Thiel E. Central nervous system disease in hematologic malignancies: historical perspective and practical applications. *Semin Oncol*. 2009;36(4 Suppl 2):S2-S16.
- Pui CH. Childhood Leukemia. 1999;2:19-37.
- Pui CH. Recent advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Formos Med Assoc*. 2004;103(2):85-95.
- Raynaud S, Mauvieux L, Cayuela JM, et al. TEL/AML1 fusion gene is a rare event in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1996;10(9):1529-30.
- Reiter A, Schrappe M, Ludwig WD, et al. Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. *Blood*. 1994;84(9):3122-33.
- Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):461-7.

Robertson KD, Keyomarsi K, Gonzales FA, et al. Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b during the G(0)/G(1) to S phase transition in normal and tumor cells. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(10):2108-13.

Rocha JC, Cheng C, Liu W, et al. Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2005;105(12):4752-8.

Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, et al. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene.* 2001;20(24):3156-65.

Rubnitz JE, Pui CH. Recent advances in the treatment and understanding of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Cancer Treat Rev.* 2003;29(1):31-44.

Ruiz-Magaña MJ, Rodríguez-Vargas JM, Morales JC, et al. The DNA methyltransferase inhibitors zebularine and decitabine induce mitochondria-mediated apoptosis and DNA damage in p53 mutant leukemic T cells. *Int J Cancer.* 2012;130(5):1195-207.

Sato H, Oka T, Shinnou Y, et al. Multi-step aberrant CpG island hyper-methylation is associated with the progression of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Am J Pathol.* 2010;176(1):402-15.

Schipper RG, van den Heuvel LP, Verhofstad AA, et al. Polyamines and DNA methylation in childhood leukaemia. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 2):331-5.

Schmelz K, Sattler N, Wagner M, et al. Induction of gene expression by 5-Aza-2'-deoxycytidine in acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) but not epithelial cells by DNA-methylation-dependent and -independent mechanisms. *Leukemia.* 2005;19(1):103-11.

Scott SA, Lakshimikuttysamma A, Sheridan DP, et al. Zebularine inhibits human acute myeloid leukemia cell growth in vitro in association with p15INK4B demethylation and reexpression. *Exp Hematol.* 2007;35(2):263-73.

Scrideli CA, Assumpcao JG, Ganazza MA, et al. A simplified minimal residual disease polymerase chain reaction method at early treatment points can stratify children with acute lymphoblastic leukemia into good and poor outcome groups. *Haematologica.* 2009;94(6):781-9.

Shi B, Hsu HL, Evens AM, et al. Expression of the candidate MCT-1 oncogene in B- and T-cell lymphoid malignancies. *Blood.* 2003;102(1):297-302.

Sigalotti L, Fratta E, Coral S, et al. Epigenetic drugs as pleiotropic agents in cancer treatment: biomolecular aspects and clinical applications. *J Cell Physiol.* 2007;212(2):330-44.

Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood.* 1999;93:4059-70.

Smith M, Arthur D, Camitta B, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 1996;14(1):18-24.

Stam RW, den Boer ML, Passier MM, et al. Silencing of the tumor suppressor gene FHIT is highly characteristic for MLL gene rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2006;20(2):264-71.

Stumpel DJ, Schneider P, van Roon EH, et al. Specific promoter methylation identifies different subgroups of MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia, influences clinical outcome, and provides therapeutic options. *Blood.* 2009;114(27):5490-8.

Sui M, Fan W. Combination of gamma-radiation antagonizes the cytotoxic effects of vincristine and vinblastine on both mitotic arrest and apoptosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;61(4):1151-8.

Suzuki A, Ohyashiki K, Kimura Y, et al. Frequent association between trisomy 15 and t(8;21)(q22;q22) in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001;126(2):169-70.

Suzuki M, Shinohara F, Endo M, et al. Zebularine suppresses the apoptotic potential of 5-fluorouracil via cAMP/PKA/CREB pathway against human oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009;64(2):223-32.

Suzuki M, Shinohara F, Nishimura K, et al. Epigenetic regulation of chemosensitivity to 5-fluorouracil and cisplatin by zebularine in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2007;31(6):1449-56.

Turker MS. Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation. *Oncogene.* 2002;21:5388-93.

Uga H, Kuramori C, Ohta A, et al. A new mechanism of methotrexate action revealed by target screening with affinity beads. *Mol Pharmacol.* 2006;70:1832-1839.

van Bommel DM, Brank AS, Eritja R, et al. DNA (Cytosine-C5) methyltransferase inhibition by oligodeoxyribonucleotides containing 2-(1H)-pyrimidinone (zebularine aglycon) at the enzymatic target site. *Biochem Pharmacol.* 2009;78(6):633-41.

Verma M, Srivastava S. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. *Lancet Oncol.* 2002;3(12):755-63.

Vezmar S, Schüsseler P, Becker A, et al. Methotrexate-associated alterations of the folate and methyl-transfer pathway in the CSF of ALL patients with and without symptoms of neurotoxicity. *Pediatr Blood Cancer.* 2009;52(1):26-32.

Waggoner, D. Mechanisms of disease: epigenesis. *Semin Pediatr Neurol.* 2007;14:7-14.

Wiemels JL, Pagnamenta A, Taylor GM, et al. A lack of a functional NAD(P)H:quinone oxidoreductase allele is selectively associated with pediatric leukemias that have MLL fusions. United Kingdom Childhood Cancer Study Investigators. *Cancer Res.* 1999;59(16):4095-9.

Wijermans P, Lübbert M, Verhoef G, et al. Low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients. *J Clin Oncol.* 2000;18(5):956-62.

Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1775(1):138-62.

Worm J, Guldborg P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *J Oral Pathol Med.* 2002;31(8):443-9.

Yang X, Yan L, Davidson NE. DNA methylation in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2001;8(2):115-27.

Ye X, Franco AA, Santos H, et al. Defective S phase chromatin assembly causes DNA damage, activation of the S phase checkpoint, and S phase arrest. *Mol Cell.* 2003;11(2):341-51.

Yoo CB, Chuang JC, Byun HM, et al. Long-term epigenetic therapy with oral zebularine has minimal side effects and prevents intestinal tumors in mice. *Cancer Prev Res (Phila).* 2008;1(4):233-40.

Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(1):37-50.

Zheng S, Ma X, Zhang L, et al. Hypermethylation of the 5' CpG island of the FHIT gene is associated with hyperdiploid and translocation-negative subtypes of pediatric leukemia. *Cancer Res.* 2004;64(6):2000-6.