

Valdemar Baptista da Silva Leal

Fármacos que têm por alvo o epigenoma

Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013



Valdemar Baptista da Silva Leal

Fármacos que têm por alvo o epigenoma

Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

Valdemar Baptista da Silva Leal

Fármacos que têm por alvo o epigenoma

Atesto à originalidade do trabalho:

---

Trabalho apresentado à Universidade Fernando  
Pessoa como parte dos requisitos para obtenção  
do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador:

Professora Doutora Fernanda Leal

Porto, 2013

## Resumo

A epigenética pode ser definida pelas modificações no genoma, que são herdadas durante a divisão celular, não havendo no entanto modificações na sequência do DNA. Estas modificações genómicas são apoiadas em dois grandes mecanismos epigenéticos: metilação do DNA e modificação de histonas. São colocadas diferentes marcas epigenéticas que têm como função regular a transcrição genética, pois quando existe algum tipo de mutação nestes processos, esta desencadeia-se em diversas patologias como o cancro.

Os avanços tecnológicos existentes no final do século XX e principalmente no início do século XXI permitiram a descoberta de diversos tipos de fármacos que apresentam a capacidade para reverter a ação das enzimas que participam nos diferentes tipos de processos epigenéticos. A tarefa encontrada pelos investigadores foi e continua a ser de grau elevado, uma vez que, existe uma excessiva variedade de enzimas e uma maior diversidade de mutações epigenéticas que podem acontecer. Embora o nível de dificuldade seja elevado, não é menos importante e, pelo contrário, a descoberta destes novos fármacos é também a resolução de variadas patologias, sendo que algumas não apresentavam ainda a possibilidade de tratamento.

Nesta monografia pretende-se demonstrar o funcionamento dos processos epigenéticos e uma visão geral da epigenética, como também, apresentar os diferentes fármacos que se encontram em ensaios clínicos, bem como, aqueles que já se encontram no mercado.

## **Abstract**

Epigenetics may be defined as changes in the genome that are inherited during cell division, however without modify the DNA sequence. These genomic changes are supported by two major epigenetic mechanisms: DNA methylation and histone modification. Different epigenetic marks are placed which function is regulate gene transcription, because when there is some kind of mutation in these processes, this triggers in various diseases such as cancer.

Technological advances over existing late twentieth century and especially in the beginning of twentieth-first century led to the discovery of several types of drugs that have the ability to reverse the action of enzymes that participate in different types of epigenetic processes. The task was found by researchers and remains at high level, because there are an excessive variety of enzymes and a greater diversity of epigenetic changes that may occur. While the level of difficulty is high, and not less important, on the contrary, the discovery of these new drugs are also the resolution of several diseases, some of which had not yet able to treatment.

This monograph intend to demonstrate the functioning of epigenetic processes and an overview of epigenetics, but also present the different drugs that are in clinical trials, as well as those who are already in the market.

## Dedicatórias

À minha Marta, por ter estado presente em todos os momentos, por me ter acompanhado e ajudado ao longo de todo o percurso escolar académico, por ser a pessoa que me faz feliz todos os dias e para além de ser a minha melhor amiga, orgulho-me de poder dizer que é a pessoa que mais amo no mundo.

Aos meus pais, Zeza e Valdemar, pelo esforço que lhes coloquei, pelo carinho e amor que me despendem diariamente, por estarem presentes em todos os momentos, por fazerem de mim o homem que sou hoje, acima de tudo obrigado por serem PAIS, MEUS PAIS.

Às minhas irmãs de quatro patas, Petra e Lara, companheiras de alegrias e tristezas que apesar de não conseguirem falar, as atitudes e gestos eram, foram e serão suficientes em determinadas alturas.

À minha avó Glória, por todo o amor que tem por mim, por todo o carinho e por além de ser uma avó fantástica é a minha amiga de sempre, que me ouve quando tenho problemas e que me aconselha sempre da melhor forma.

A toda a minha família, tios e primos, obrigado por me amarem e se preocuparem tanto como eu vos amo. A família não se escolhe mas eu fui abençoado.

À minha segunda família: Sr. Carlos, D. Mi, D. Maria Augusta, Tânia, Fernando e Afonso, obrigado por existirem na minha vida, obrigado pela presença constante e ativa, e pela amizade e amor.

A todos os meus amigos, eles sabem quem são, obrigado pela amizade, pelo carinho e pelo apoio em todos os momentos, sejam eles alegres ou tristes.

## **Agradecimentos**

Agradeço a minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Doutora Fernanda Leal, pela disponibilidade por me ter aceite como seu orientando numa fase terminal do prazo de entrega, por toda a ajuda à minha pessoa e pelo profissionalismo e seriedade que colocou na minha dissertação.

Agradeço também a ti Marta, por toda a ajuda, paciência, amizade e amor que me concedeste para a elaboração da minha tese, sem ti, nunca teria tido força para concluir esta etapa da minha vida.

O meu obrigado a todos os professores que eu encontrei no meu caminho escolar, pelos conteúdos programáticos, pela partilha de experiências e fundamentalmente por me terem ajudado a crescer a um nível profissional como também a um nível pessoal.

Por fim, agradeço à instituição Universidade Fernando Pessoa, por ter sido a minha segunda casa ao longo dos anos de estudante e por tudo que colocou a minha disponibilidade de forma a esta estadia ter sido confortável e acima de tudo produtiva.

## Índice

<b>I.</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>Desenvolvimento .....</b>	<b>3</b>
	2.1. Processos Epigenéticos.....	3
	ii.i.i. Metilação do DNA.....	4
	ii.i.ii. Modificação de histonas .....	6
	ii.i.iii. Interação entre a metilação do DNA e a modificação de histonas .....	9
	2.2. Influência de fatores ambientais na epigenética.....	11
	2.3. Fármacos usados na epigenética.....	13
	ii.iii.i. Moduladores que atuam no processo de modificação de histonas.....	14
	ii.iii.i.i. Inibidores HDAC .....	14
	ii.iii.i.ii. Inibidores HAT .....	25
	ii.iii.i.iii. Inibidores HMT .....	27
	ii.iii.i.iv. Inibidores HDM .....	30
	ii.iii.i.v. Inibidores DNMT.....	31
<b>III.</b>	<b>Conclusão e perspectivas futuras .....</b>	<b>39</b>
<b>IV.</b>	<b>Bibliografia .....</b>	<b>40</b>

## Lista de Abreviaturas

COMT – Catecol-o-metiltransferase  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
DNMTs – Dimetiltransferases  
EMA – European Medicines Agency  
FAD – Dinucleótido adenina flavina  
FDA – Food and Drug Administration  
HAT – Histona acetiltransferase  
HDAC – Histonas desacetilases  
HDM – Histonas desmetilases  
HMT – Histonas metiltransferases  
HP1 – Proteína heterocromatina 1  
KMT – Lisina metiltransferases  
LSD1 – Desmetilase específica de lisina 1A  
MAO – Monoaminoxidases  
MBD – Domínio de ligação ao metilo CpG  
NAD<sup>+</sup> – Dinucleótido adenina nicotinamida oxidado  
NADH – Dinucleótido adenina nicotinamida reduzido  
*Pc – Polycomb*  
RMT – Arginina metiltransferases  
RNA – Ácido ribonucleico  
ROS – Espécies reativas de oxigénio  
SAH – S-adenosil-homocisteína  
SAM – S-adenosilmetionina  
SET – *Trithorax*  
VPA – Ácido valpróico

## Índice de Figuras

Figura 1: Representação conformacional da heterocromatina e da eucromatina .....	3
Figura 2: Processo de metilação do DNA.....	4
Figura 3: Processo de acetilação de histonas .....	7
Figura 4 : Processo de metilação de histonas.....	9
Figura 5 : Mecanismo de interação entre a metilação de DNA e a modificação de histonas	10
Figura 6 : Esquemática da influência dos fatores ambientais na epigenética e na seleção natural .....	12
Figura 7 : Fórmulas químicas dos ácidos gordos de cadeia curta.....	16
Figura 8: Fórmula química dos ácidos hidroxâmicos .....	17
Figura 9: Fórmula química das benzamidas .....	20
Figura 10: Fórmula química do inibidor Romidepsin.....	21
Figura 11: Fórmula química dos inibidores de HAT, garcinol e ácido anacárdico .....	26
Figura 12: Fórmula química dos inibidores de HMT, subclasse dos inibidores de origem natural .....	29
Figura 13: Fórmula química dos inibidores de HMT, subclasse das moléculas de tamanho reduzido.....	29
Figura 14: Fórmula química do inibidor de HDM, Tranilcipromina.....	31
Figura 15: Fórmula química dos inibidores de DNMT, da subclasse dos análogos nucleósidos .....	33
Figura 16: Fórmula química dos inibidores de DNMT, da subclasse das moléculas pequenas, procainamida.....	36
Figura 17: Fórmula química dos inibidores de DNMT, da subclasse das moléculas pequenas, RG108.....	37

Figura 18: Fórmula química do inibidor de DNMT, da subclasse das moléculas naturais, EGCG.....38

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Ensaios clínicos em curso dos ácidos gordos de cadeia curta .....	15
Tabela 2: Ensaios clínicos em curso do inibidor Vorinostat.....	17
Tabela 3: Ensaios clínicos em curso de alguns inibidores do grupo dos ácidos hidroxâmicos .....	18
Tabela 4: Ensaios clínicos em curso de inibidores do grupo das benzamidas.....	21
Tabela 5: Ensaios clínicos em curso do inibidor do grupo dos péptidos cíclicos, Romidepsin .....	22
Tabela 6: Ensaios clínicos em curso do ativador de sirtuinas, resveratrol.....	25
Tabela 7: Ensaios clínicos em curso do inibidor de HAT, curcumina.....	27
Tabela 8: Ensaios clínicos em curso do inibidor de DNMT, decitabine .....	34
Tabela 9: Ensaios clínicos em curso do inibidor de DNMT, decitabine em terapia combinada .....	35

## I. Introdução

A epigenética é uma palavra que tem como origem etimológica as palavras *epi*, deriva do grego e significa sobre, e a palavra genética, vocábulo também oriundo do grego *genno* e que significa fazer nascer. O significado apresentado pode parecer de interesse mas na prática, a epigenética é um universo que contempla variadas situações associadas ao nosso quotidiano, incluindo a maior prioridade da maior parte dos seres humanos, a sua saúde.

A primeira definição apesar de existir há cerca de cem anos, prossegue um eterno desacordo sobre qual o real significado da epigenética hoje em dia. A definição original é atribuída a Conrad Hal Waddington em 1947, que define a epigenética como “um campo da biologia que estuda as interações causais entre genes e seus produtos que são responsáveis pela produção do fenótipo”. Esta é a definição mais elementar, devido a carência da investigação existente na altura mas é a definição mais genuína uma vez que foi a primeira a ser publicada (Jablonka e Lamb, 2002).

Esta definição, como tudo no universo, sofreu evoluções pontuais, acentuadas e até algumas variâncias do próprio significado, mediante cada nova descoberta. A primeira grande alteração da definição apareceu no livro *Epigenetics: a Treatise on Theoretical Biology* em 1974, autoria de Soren Lovtrup, que utilizou a expressão “eventos epigenéticos” preferencialmente à palavra epigenética, sendo esta última associada às ocorrências evolutivas da biologia (Lovtrup, 1974).

A maior alteração da definição apareceu com a evolução dos estudos sobre mecanismos celulares que controlam a atividade dos genes e a herança dos fenótipos celulares. Estes estudos foram iniciados com o biólogo molecular britânico Robin Holliday que em 1975 apresentou a metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA) como um mecanismo importante no controlo da expressão dos genes (Jablonka e Lamb, 2002). Após alguns anos Holliday apresentou finalmente a sua definição final para o termo epigenética definindo-a como “o estudo das alterações na expressão de genes, que ocorrem em organismos com células diferenciadas e a herança mitótica de determinados padrões de expressão genética” (Jablonka e Lamb, 2002). Através desta evolução de significado podemos afirmar que a definição original de Conrad Hal Waddington está actual uma vez que ambas compreendem o centro da questão: vias de desenvolvimento alternativas, crescimento

sustentado em estabilidade e flexibilidade e a influência dos factores ambientais nos mecanismos celulares e no organismo.

A compreensão da influência de todos os mecanismos epigenéticos nas doenças humanas é um assunto chave de forma a podermos reverter ou pelo menos estagnar o avanço dessas doenças.

Ao longo do trabalho ir-se-á demonstrar como muitos dos processos epigenéticos funcionam, como os diferentes ambientes influenciam os processos epigenéticos, as doenças que são potenciadas pelo aparecimento de mutações nos diferentes processos epigenéticos e por fim os tratamentos já aprovados ou em fase de estudo para as doenças atrás referidas.

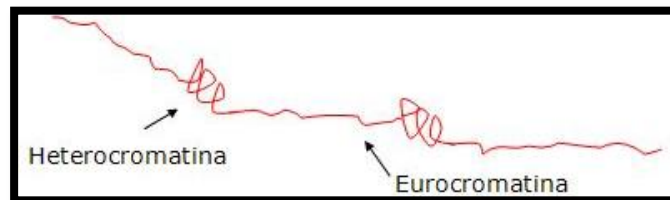
Como metodologia utilizada na pesquisa para a elaboração do presente trabalho, foi realizada uma pesquisa bibliográfica em livros científicos e também em fontes de pesquisa disponíveis na internet, que foram: B-on, Pubmed e Science Direct. As palavras-chave utilizadas foram “Epigenetics”, “DNA methylation”, “Histone modifications” e “Epidrugs”, tendo sido a pesquisa maioritariamente feita em inglês, com acesso aos artigos de modo integral e realizada entre 24/10/2012 e 28/08/2013.

## II. Desenvolvimento

### 2.1. Processos Epigenéticos

Num conceito mais científico do universo geral do organismo humano, nos organismos pluricelulares, as células contêm sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA) idênticas, apesar de apresentarem diferentes fenótipos. Como referido anteriormente, a base da epigenética é a alteração herdável na expressão genética que não é acompanhada por mudanças na sequência de DNA (Verbrugge et al., 2011).

Na sequência de DNA este encontra-se envolto em proteínas denominadas de histonas e coadjuvado de outras proteínas presentes que forma a cromatina (Kooistra e Helin, 2012). A cromatina apresenta-se como unidade base do nucleossoma, que é constituído por 147 pares de bases de DNA, dividida por duas espirais, envoltas em quatro pares de histonas (H2A, H2B, H3 e H4) (Verbrugge et al., 2011). A cromatina pode apresentar dois estados conformacionais distintos (Figura 1): a heterocromatina, que se encontra em estado condensado e associado a regiões genómicas transcricionalmente silenciosas e a eucromatina, que apresenta uma conformação mais distendida e por consequência mais habilitada à transcrição (Hake et al., 2004).



**Figura 1:** Representação conformacional da heterocromatina e da eucromatina (Núcleo – Assunto Novo, 2011).

A epigenética apresenta-se ao mundo através do controlo do estado conformacional da cromatina, que confere os diferentes padrões de transcrição, sendo que esse controlo é feito pelos dois maiores mecanismos epigenéticos conhecidos: metilação do DNA e modificações pós-translacionais das histonas (Guil e Esteller, 2009).

### ii.i.i. Metilação do DNA

A metilação do DNA é um processo epigenético que consiste na adição de um grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) ao carbono localizado na quinta posição da base de DNA citosina, através de uma ligação covalente (Figura 2). Esta adição é efetuada em locais onde a citosina é precedida da base de DNA guanina, sendo estes locais denominados de sítios CpG. Estes dinucleótidos juntos apresentam grande incidência em determinadas zonas sendo uma delas no promotor dos genes e são denominadas de ilhas CpG. Existem também outros locais onde existem ilhas CpG tais como intrões, centrómeros ou elementos de transposição. Embora nestes locais as ilhas CpG existam em quantidade elevada, não são considerados uma vez que estes locais são denominados de regiões não codificantes (Turner, 2011; Vaissière et al., 2008).

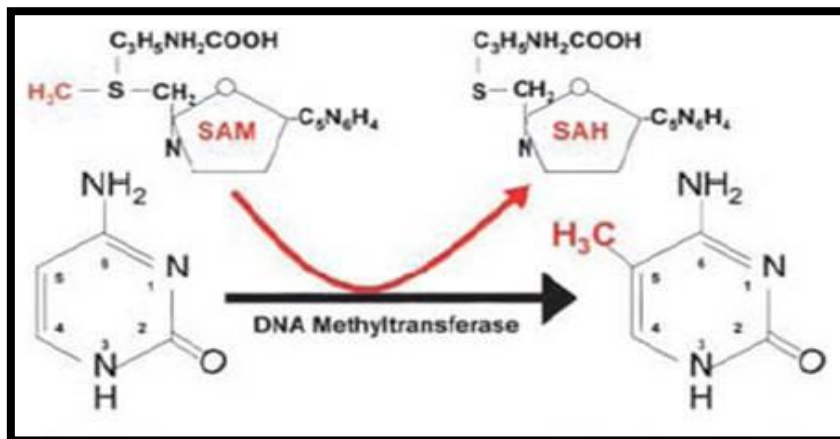


Figura 2: Metilação do DNA (Azacitadina, 2010).

O processo de metilação do DNA é mediado pelas enzimas dimetiltransferases (DNMTs) que transferem os grupos metilo para a posição 5 da base de DNA citosina, tendo como doador do grupo metilo a S-adenosilmetionina (SAM). São conhecidos dois tipos distintos de DNMTs: As primeiras são as DNMT1, também denominadas de manutenção, uma vez que atuam predominantemente nos processos de divisão celular, fazendo a cópia do padrão de metilação do DNA já existente. As segundas estão divididas em DNMT3A e DNMT3B, também denominadas de *de novo*, uma vez que o seu papel é centrado na adição de grupos metilo a sequências de DNA que ainda não foram modificadas (Vaissière et al., 2008).

Todo o processo de metilação do DNA é um processo abrangente e não está somente ligado à regulação de expressão de genes estando também implicado no processo de imprinting genômico e no processo de inativação do cromossoma X. Além da interação com diferentes processos, as diferentes fases de desenvolvimento do ser humano, e por consequência das suas células, são determinados pela existência de um padrão de metilação elevado ou não, ou até de alguma mutação. Numa fase inicial do desenvolvimento, o nível de metilação global é baixo. Seguidamente, após as várias divisões celulares e após o desenvolvimento dos tecidos, os padrões de metilação vão existindo em maior abundância nos locais CpG, abrangendo quase a totalidade desses mesmos locais (Vaissière et al., 2008).

A metilação efetuada no DNA é por norma uma modificação estável, apesar que mediante certas condições fisiológicas específicas possa sofrer a reversão ou também denominada de desmetilação. De acordo com Morgan et al. (2005) (*cit. in.* Turner 2011) existe o exemplo que após a fertilização o genoma paterno do zigoto do rato é rapidamente desmetilado. Este processo da desmetilação é uma modificação dispendiosa em termos de energia gasta, uma vez que tem como função o rompimento das ligações carbono-carbono (C-C). Este mecanismo ainda não foi totalmente elucidado mas segundo Gehring et al. (2009) (*cit. in.* Turner 2011) e Ooi et al. (2008) (*cit. in.* Turner 2011) o mecanismo talvez consista na remoção da base metilada e substituída por intermédio das enzimas do sistema reparador de DNA por uma base não metilada (Turner, 2011).

O fundamento base de todo o processo de metilação do DNA passa por inibir a transcrição dos genes. Neste processo, embora estejam conhecidos muitos intervenientes do mesmo, não é definitivo o modo como ele se desenvolve, havendo duas hipóteses distintas para dar resposta a todo o mecanismo, inibição direta e inibição indireta. No primeiro caso entende-se que a ligação por parte dos fatores de transcrição às zonas que contém grande incidência de locais CpG metilados está impedida. Já na inibição indireta existe a envolvimento de proteínas como a MePC2, que são especializadas em se ligar ao DNA metilado através do domínio de ligação ao metil CpG (MBD) (Vaissière et al., 2008). A função dos MBD é ligar-se ao DNA metilado, protegendo a própria metilação do DNA e pensa-se que são responsáveis pelo recrutamento das enzimas histonas desacetilases (HDAC), e da sua atividade, para o processo de metilação de DNA, resultando num estado da cromatina que não permite a ligação dos fatores de transcrição à região do promotor (Vaissière et al., 2008).

### **ii.i.ii. Modificação de histonas**

O processo de modificação de histonas afeta diretamente a organização estrutural da cromatina, dividindo-se nos estados conformacionais de heterocromatina e eucromatina, como referido anteriormente, como também está implícito na interação entre as proteínas reguladoras da transcrição com o DNA localizado na cromatina (Vaissière et al., 2008).

As histonas no universo deste processo, já não são conhecidas como simples suporte do DNA, mas sim como reguladoras de toda a versatilidade que as próprias histonas apresentam, sendo também responsáveis pela dinâmica associada aos estados conformacionais que pode obter como também de todas as ligações que pode efetuar (Füllgrabe et al., 2011).

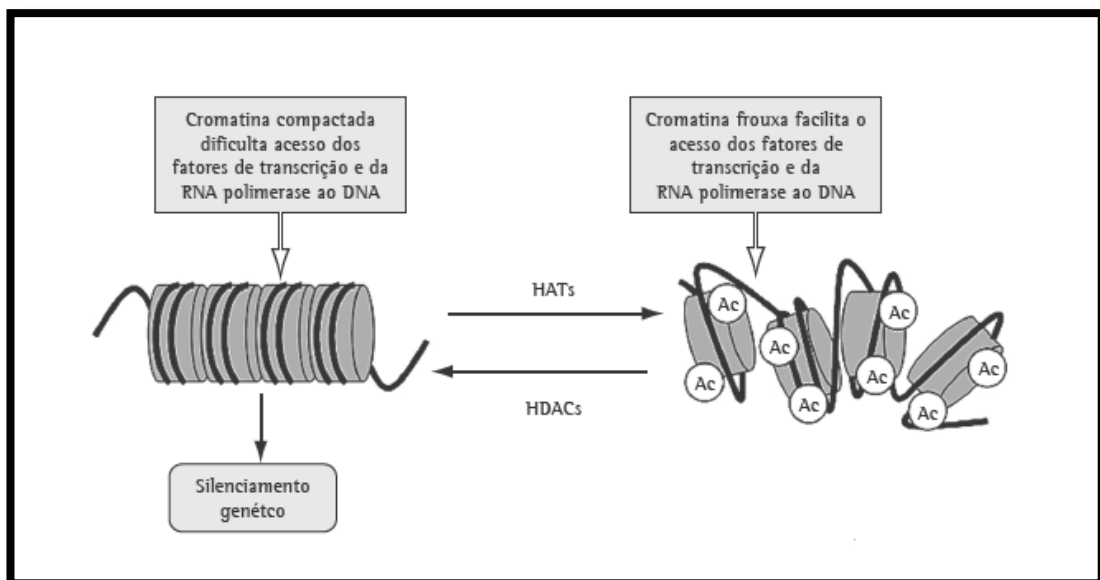
As histonas apresentam estrutura idêntica entre elas, sendo compostas por uma região interna hidrofóbica e uma região terminal formada por um grupo amina ( $\text{NH}_2$ ) que sobressai através do nucleossoma. A região terminal é responsável por todas as modificações relativas à estrutura da cromatina e por consequência dos processos de regulação celular que acontecem (Kooistra e Helin, 2012). Segundo Khorasanizadeh (2004) (*cit. in.* Füllgrabe 2011), existem diversos tipos de modificações entre elas: acetilação de lisina, metilação de lisina e arginina, fosforilação de serina e treonina, ubiquitinação de lisina, glicosilação, sumoilação, ribosilação da adenosina difosfato e carbonilação (Füllgrabe et al., 2011).

As diferentes modificações possíveis que se podem verificar em diferentes posições, possibilitam uma enormidade de combinações, resultando todas elas em diferentes interpretações por parte dos diferentes fatores celulares (Egger et al., 2004).

A modificação de histonas pode afetar a função dos cromossomas através de dois mecanismos distintos: o primeiro atua alterando a carga electrostática, por adição ou remoção de grupos orgânicos nas terminações amina, alterando a conformação da histona ou a sua ligação ao DNA. O segundo supõe que essas modificações são locais aos quais se vão ligar módulos de reconhecimento de proteínas, entre eles os domínios “bromo” e os domínios “cromo”, também denominados de “*writers*”, uma vez que são responsáveis pelo reconhecimento das marcas de acetilação ou de metilação no aminoácido lisina, respectivamente (Füllgrabe, 2011).

Entre todas as possíveis modificações ao nível das histonas a mais estudada é a acetilação de histonas (Hake et al., 2004) (Figura 3). O processo de acetilação da lisina é

obtido através do balanço de duas enzimas predominantes, histona acetiltransferase (HAT) também denominadas de “*writers*”, uma vez que conferem a marca de acetilação a um local, e HDAC, também denominadas de “*erasers*” devido a serem responsáveis pela eliminação dessa mesma marca. Como foi referido anteriormente, a HAT tem como função adicionar um grupo acetilo, proveniente da molécula acetil-CoA, ao grupo amina da lisina localizado na região terminal, reduzindo as interações entre os nucleossomas próximos, promovendo a activação da cromatina (eucromatina), permitindo a transcrição dos genes. A enzima HDAC funciona no sentido oposto, restabelecendo a carga positiva das terminações amina, possibilitando uma maior proximidade entre as histonas e o DNA, bloqueando os locais de ligação aos promotores e alterando a conformação da cromatina para um estado de repressão (heterocromatina), logo inibindo a transcrição de genes (Dell’Aversana et al., 2012).



**Figura 3:** Processo de acetilação de histonas (O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas, 2009).

A modificação denominada de metilação de histonas não é de todo tão linear como a modificação referente à acetilação de histonas. A metilação ocorre igualmente nas terminações amina, tanto do aminoácido lisina como do aminoácido arginina, permitindo diferentes locais de metilação e até múltiplas adições de grupos metilo no mesmo aminoácido. A metilação de histonas difere do processo de acetilação uma vez que apesar de alterar também a carga das terminações dos aminoácidos, vai alterar a sua basicidade e a sua hidrofobicidade (Verbrugge et al., 2011).

No processo de metilação de histonas (Figura 4) intervêm dois tipos de enzimas: as histonas metiltransferases (HMT), que promovem a transferência do grupo metilo proveniente da SAM até aos aminoácidos arginina e lisina. O outro tipo de enzimas interveniente neste processo são as histonas desmetilases (HDM) que é constituído por duas famílias, desmetilase específica de lisina 1A (LSD1) e Jumonji, sendo ambas responsáveis pela retirada dos grupos metilo dos aminoácidos anteriormente referidos (Verbrugge et al., 2011).

A diversidade atingida pelas diferentes modificações é vasta, podendo incidir também nos diferentes aminoácidos que contêm a terminação amina, dando uma enormidade de opções de regulação celular. Como diferentes exemplos temos a lisina 4 da histona 3 que após metilada pela HMT, que contém um grupo proteico denominado *Trithorax* (SET), vai ligar-se a determinados genes e ativá-los. Como caso contrário temos o silenciamento de genes após a metilação da lisina 9 e 27 da histona 3. Os centros proteicos responsáveis pela leitura das marcas de metilação impostas pela HMT são a proteína heterocromatina 1 (HP1) e *Polycomb* (Pc), respectivamente (Hake et al., 2004). Podemos então afirmar que estes grupos proteicos em conjunto com as enzimas são responsáveis pela manutenção das modificações verificadas e por consequência pela cromatina silenciada ou heterocromatina (HP1 e Pc) levando ao silenciamento de genes ou também pela cromatina ativa ou eucromatina (SET) levando à ativação de determinados genes (Hake et al., 2004).

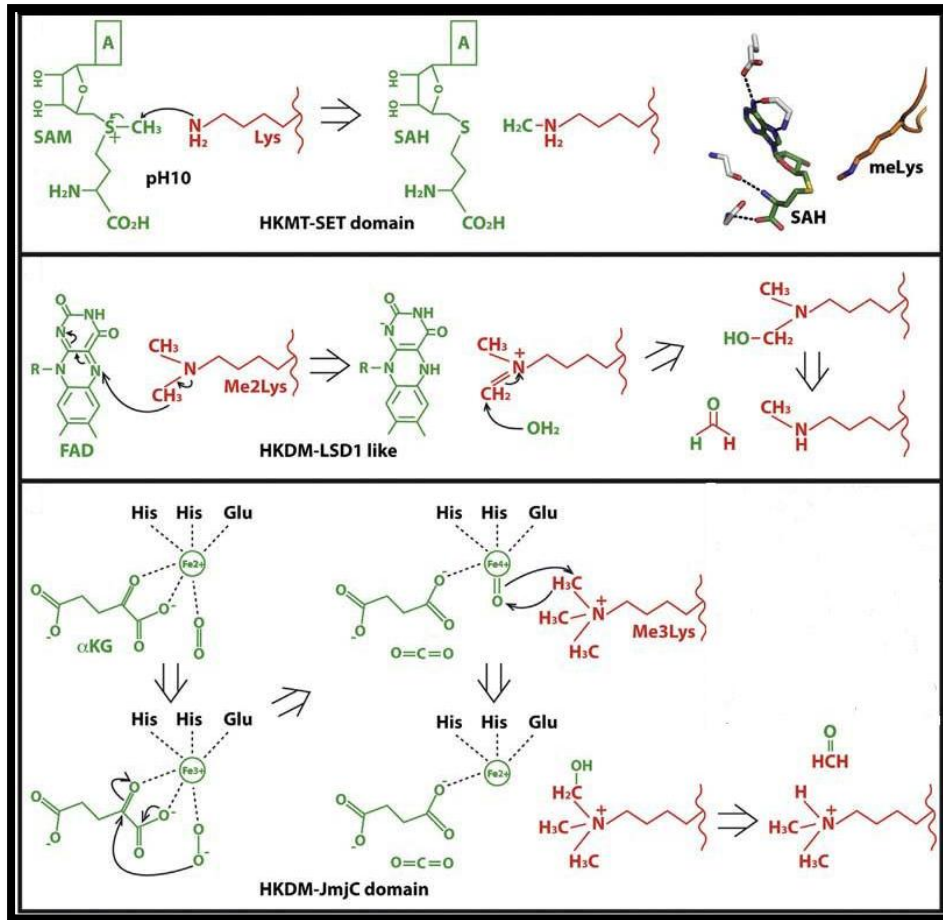
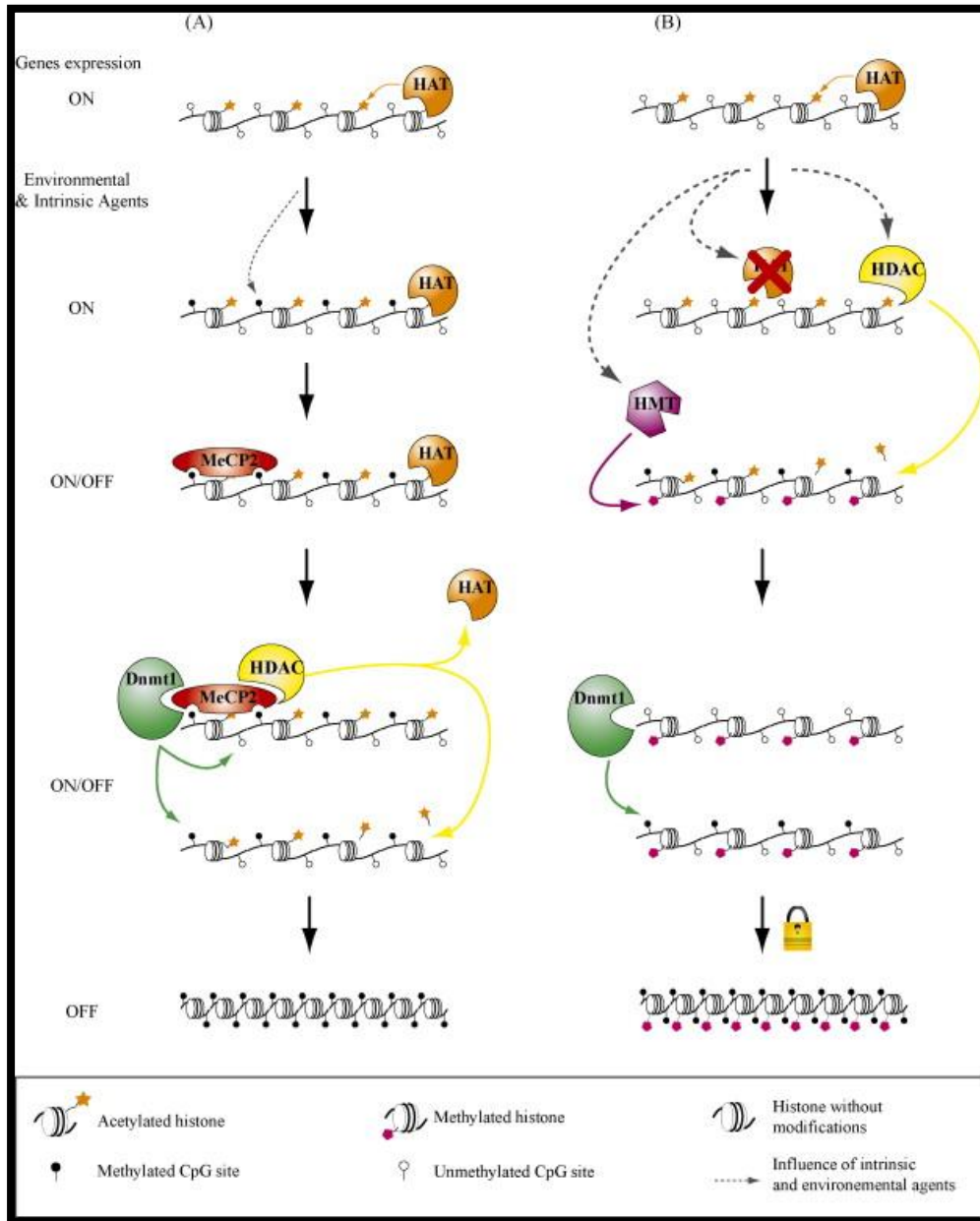


Figura 4 : Processo de metilação de histonas (Luo, 2013).

### ii.i.iii. Interação entre a metilação do DNA e a modificação de histonas

A metilação do DNA e a modificação de histonas são processos que têm como finalidade a regulação da expressão de genes. A relação entre estes dois mecanismos tem sido estudada, evidenciada e comprovada por alguns estudos ao longo dos tempos.

A questão pertinente que se coloca é se estes mecanismos são a causa da inativação dos genes ou se os mecanismos são uma consequência da própria inativação dos genes. A resposta é dada através de duas diferentes hipóteses: uma primeira na qual a metilação do DNA é o estado precursor que despoleta o estado de heterocromatina, estado este que impede a expressão dos genes (Figura 5A). Já a segunda hipótese incide sobre a perda acetilação nas histonas vai influenciar a ação da DNMT e induzir uma hipermetilação do DNA no local (Figura 5B) (Vaissière et al., 2008).



**Figura 5:** Mecanismo de interação entre a metilação de DNA e modificação de histonas. (Vaissière et al., 2008).

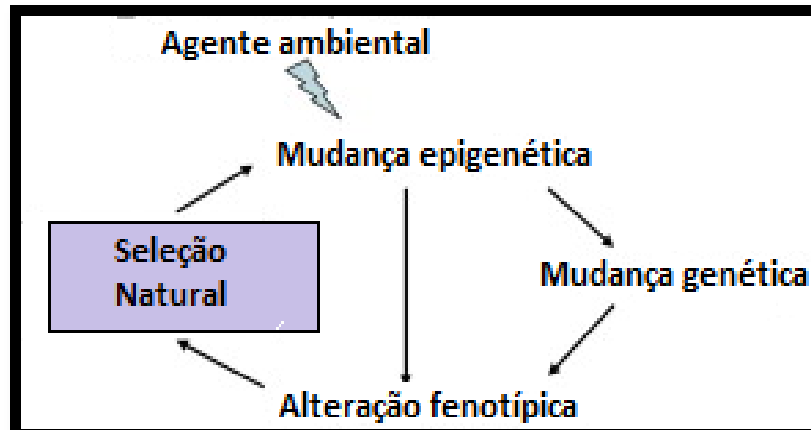
A Figura 5A é explicada através de que numa primeira instância vai existir uma metilação parcial do DNA nos locais CpG devido a sinais intrínsecos e ambientais. As MBP (MePC2) vão-se ligar aos aminoácidos metilados sendo que após esta ligação as MBP vão recrutar HDAC resultando numa desacetilação das histonas. A presença das MBP e de HDAC no local vão ser reforçadas com a recruta de DNMT, em especial DNMT1, aumentando o estado de inativação e aumentando o estado de silenciamento dos genes.

O caso da Figura 5B apresenta o mesmo resultado final sendo que o desenvolvimento é distinto da Figura 5A. Neste modelo um estado de acetilação de histona vai induzir a metilação do DNA durante o processo de silenciamento de genes. Neste processo vai desencadear-se um estado de hipoacetilação de histonas, devido à falta de atividade das enzimas HAT e HDAC que deveriam apresentar-se em equilíbrio, mas por ação de fatores ambientais adversos ou efeitos endógenos não se encontram. O estado de hipoacetilação verificado na cromatina vai ser reconhecido pelas DNMT *de novo*, sendo por isso novamente metilados os locais CpG da região do promotor do gene, apresentando um estado de silenciamento de genes irrevogável (Vaissière et al., 2008).

Como casos concretos, foi registado que a metilação nas lisinas 9 e 27 da histona 3 pode aumentar os níveis de metilação do DNA em fungos *Neurospora crassa*, na planta *Arabidopsis*. Foi também descoberto níveis de H3K4m3 bloqueiam a ação das DNMT, protegendo as ilhas CpG da metilação do DNA (Turner, 2011).

## **2.2. Influência de fatores ambientais na epigenética**

Este tópico apresenta uma elevada importância uma vez que os fatores ambientais são também considerados de fatores desencadeadores de diversas anomalias no nosso corpo humano. Este está continuamente exposto a diversos fatores, como por exemplo a metais como níquel, arsénio e cádmio, radiação, fumo do tabaco, agentes infecciosos como HPV e *Helicobacter pylori* e também abusos e ansiedade em idades precoces. Estes fatores são prejudiciais ao funcionamento do nosso organismo, e são provenientes do nosso estilo de vida, das condições laborais e até da poluição. Estes fatores ambientais são também responsáveis pela desregulação dos processos epigenéticos, levando a mutações (Feinberg e Tycko, 2004, *cit. in.* Vaissière et al., 2008) (Figura 6).



**Figura 6:** Esquemática da influência dos fatores ambientais na epigenética e na seleção natural (adaptado de: Turner, 2011).

Existem diversas situações relatadas em diferentes estudos sobre a alteração dos padrões de expressão dos genes. Segundo Belinsky et al. (2004) (*cit. in.* Vaissière et al., 2008) a radiação ionizante está diretamente ligada ao aumento do risco de carcinoma do pulmão sendo este risco mediado pela metilação do DNA na região do promotor de supressores tumorais como p16 (CDKN2A). De salientar também que a ligação existente entre a radiação ionizante e a instabilidade cromossômica, provavelmente resulta de metilação anômala nas regiões não metiladas iniciais do DNA (Hande et al., 2003, *cit. in.* Vaissière et al., 2008). Outro estudo, epidemiológico e clínico, dirigido por Johnson e Farmer (*cit. in.* Vaissière et al., 2008) e Miller e Weinstock (*cit. in.* Vaissière et al., 2008) afirma que as partículas UV provocam cancro de pele melanoma e não-melanoma.

A influência do cádmio e do arsênio é outro exemplo de como fatores ambientais e externos podem influenciar os mecanismos epigenéticos. Segundo Takiguchi et al. (2003) (*cit. in.* Vaissière et al., 2008), o elemento cádmio é um conhecido inibidor enzimático e conduz à hipometilação, devido à inibição das DNMTs. O cádmio é também associado a diferentes tipos de cancro como do pulmão, fígado, próstata, rim e estômago (Waalkes, 2000, *cit. in.* Vaissière et al., 2008). O arsênio por sua vez está associado a diferentes tipos de tumor como do pulmão (Mabuchi et al., 1979, *cit. in.* Vaissière et al., 2008), fígado (Chiang et al., 1993, *cit. in.* Vaissière et al., 2008), bexiga e rim (Chen et al., 1992, *cit. in.* Vaissière et al., 2008). O arsênio atua ao nível epigenético provocando um decréscimo da enzima SAM, sendo esta enzima extremamente necessária para o processo de metilação do DNA (Zhao et al., 1997, *cit. in.* Vaissière et al., 2008).

Um tema particularmente interessante é o caso de como os abusos físicos e psicológicos em idades precoces e ambiente familiar e social envolvente, pode influenciar o futuro do ser humano e de que modo a epigenética está relacionada com essas alterações. Segundo McGowan et al. (2008) (*cit. in.* Franklin e Mansuy, 2010), existe evidências que os abusos físicos e psicológicos quando presentes na infância, estão relacionados a uma metilação anormal no cérebro humano na fase adulta. Foi detetado neste mesmo estudo que a metilação na região do promotor de recetores glucocorticoides neuroespecíficos de pessoas que sofreram qualquer tipo de abusos na idade infantil e cometeram suicídio numa idade mais tardia, estava aumentada relativamente a pessoas que cometeram suicídio mas não foram vítimas de qualquer tipo de abuso na infância. É importante salientar que o aumento da metilação está associado ao decréscimo da expressão dos receptores glucocorticoides, logo a uma maior predisposição para cometer suicídio (McGowan et al., 2008, *cit. in.* Franklin e Mansuy 2010).

### **2.3. Fármacos usados na epigenética**

Esta dissertação apresenta como tema os fármacos que têm por alvo o epigenoma sendo que neste capítulo ir-se-á incidir precisamente nessa classe de fármacos.

As mutações epigenéticas são muito importantes uma vez que são processos reversíveis e devido a esse fato a existência de moduladores dessas mutações, e a sua ação, podem ser utilizados no tratamento de diversas doenças. Existem diversos tipos de moduladores, sendo que como principal mecanismo de ação destes é atuar sobre as enzimas envolvidas nos processos epigenéticos. Os moduladores podem ser distinguidos em duas grandes classes: moduladores que atuam no processo de modificação de histonas e inibidores das enzimas DNMTs, referentes ao processo de metilação de DNA. A primeira grande classe de moduladores apresenta cinco sub-classes referentes principalmente às enzimas envolvidas no processo de modificação de histonas sendo estas subclasses as seguintes: inibidores HDAC, inibidores HDAC classe III, inibidores HAT, inibidores HMT e inibidores HDM. A segunda classe de moduladores apresenta também quatro sub-classes diferentes tais como: análogos de nucleosídeos, pequenas moléculas, moléculas naturais e oligonucleosídeos antisense inibidores de DNMTs (Nebbioso et al., 2012).

### **ii.iii.i. Moduladores que atuam no processo de modificação de histonas**

#### **ii.iii.i.i. Inibidores HDAC**

As HDAC, também conhecidas como “erasers” no processo de modificação de histonas, que são responsáveis por retirar a “marca” de acetilação das histonas, sendo que uma hipacetilação está por norma associada a uma transcrição de genes reduzida, enquanto a hiperacetilação está relacionada a uma transcrição de genes aumentada. A hiperacetilação é também por norma associada à ação dos inibidores das HDAC, sendo estes também responsáveis por diferentes processos celulares, principalmente ligados com a replicação e diferenciação. Estes inibidores apresentam mecanismos de ação bastante complexos e ainda não completamente elucidados. No entanto, diversos efeitos biológicos que resultam da alteração dos padrões de acetilação e de proteínas, estão envolvidos em diversas atividades como a regulação de expressão de genes, apoptose, progressão do ciclo celular, mitose ou até reparação do DNA (Blackwell et al., 2008; Bolden et al., 2006; Dokmanovic et al., 2007; Gloczak e Seto, 2007; Jones e Baylin, 2007; Minucci e Pelicci, 2006; Shankar e Srivastava, 2008; Xu et al., 2007).

Os inibidores das HDAC podem ainda ser subdivididos, uma vez que apresentam estruturas químicas distintas, nas seguintes categorias: ácidos gordos de cadeia curta, ácidos hidroxâmicos, benzamidas e péptidos cíclicos (Nebbioso et al., 2012).

#### *Ácidos gordos de cadeia curta*

O mecanismo de ação dos ácidos gordos de cadeia curta tem como princípio a ação do grupo carboxílico, que ocupa um espaço sob forma de túnel cedido pela libertação do grupo acetato, e que deste modo, pode assim realizar duas funções: formar uma ligação com o íon  $Zn^{2+}$  ou competir com o grupo acetato anteriormente libertado por desacetilação (Mai e Altucci, 2009).

Os dois ácidos gordos de cadeia curta que se encontram na fase de ensaios clínicos são o ácido valproico (VPA), que é um conhecido anticonvulsivante e antiepiléptico que apresenta também ação inibitória das HDAC, e o fenilbutirato de sódio que é um fármaco utilizado em perturbações do ciclo da ureia e no excesso de produção de amónia. Estes dois

compostos têm sido testados sozinhos ou em combinações com outro tipo de fármacos para as mais diversas doenças como se pode verificar na Tabela 1 (Nebbioso et al., 2012).

**Tabela 1:** Ensaios clínicos em curso dos ácidos gordos de cadeia curta (Nebbioso et al., 2009).

Drug	Conditions	Recruitment	NCT number	Phases
Valproic acid & fludarabine	Chronic lymphocytic leukemia	Terminated	NCT00524667	Phase 2
Azacitidine, valproic acid	Advanced cancers	Completed	NCT00496444	Phase 1
Temozolomide + valproic acid	Brain metastases	Terminated	NCT00437957	Phase 1
5-Azacitidine + valproic acid + ATRA	Myelodysplastic syndromes	Completed	NCT00439673	Phase 2
5 azacytidine + valproic acid + retinoic acid	AML, MDS	Completed	NCT00339196	Phase 2
Enfuvirtide + valproic acid	HIV infections	Terminated	NCT00312546	Phase 1
Valproic acid	HTLV-I-associated myelopathy	Terminated	NCT00519181	N/A
Karenitecin + valproic acid	Malignant melanoma	Terminated	NCT00358319	Phase 1, 2
Valproic acid	ALPS hypersplenism lymphadenopathy	Completed	NCT00605657	Phase 1, 2
Raltegravir + valproic acid	HIV infections	Terminated	NCT00614458	Phase 2
Hydralazine + magnesium valproate	Cervical cancer	Completed	NCT00404326	Phase 2
Hydralazine + magnesium valproate	Locally advanced breast cancer	Terminated	NCT00395655	Phase 2
Hydralazine + magnesium valproate	Refractory solid tumors	Completed	NCT00404508	Phase 2
Sodium phenylbutyrate	Huntington's disease	Completed	NCT00212316	Phase 2
Sodium phenylbutyrate	Amyotrophic lateral sclerosis	Completed	NCT00107770	Phase 1, 2
Pivanex	Leukemia, lymphocytic, lymphoma, small lymphocytic	Terminated	NCT00083473	Phase 2
Pivanex	Malignant melanoma	Terminated	NCT00087477	Phase 1, 2
Pivanex/docetaxel	Carcinoma, non-small-cell lung	Completed	NCT00073385	Phase 2

O VPA (Figura 7) tem sido testado em doentes com doenças como infeção por HIV, síndrome linfoproliferativa autoimune (Dowdell et al., 2009), síndrome mielodisplásica e leucemia mieloide aguda (Kuendgen et al., 2011). Existem associações específicas como por exemplo a hidralazina, utilizado vulgarmente como anti-hipertensor e vasodilatador de artérias mas também com ação desmetilante do DNA, com o valproato de magnésio para o tratamento do cancro da mama (Arce et al., 2006) e cancro do colo do útero (Candelaria et al., 2010).

O fenibutirato de sódio (Figura 7) encontra-se em ensaios clínicos para o tratamento de duas diferentes doenças: doença de Huntington (Hogarth et al., 2007, *cit. in* Nebbioso et al., 2012) e esclerose lateral amiotrófica (Cudkowicz et al., 2009, *cit. in* Nebbioso et al., 2012).

Existe também um composto denominado de butirato de pivaloiloximetil ou Pivanex (Figura 7), que é um pró-fármaco do ácido butírico, que se encontra em ensaios clínicos para o tratamento de doenças como melanoma maligno (Tarasenko et al., 2008, *cit. in* Nebbioso et

al., 2012) e leucemia linfocítica crônica e linfoma (Rabizadeh et al., 2007, *cit. in* Nebbioso et al., 2012).

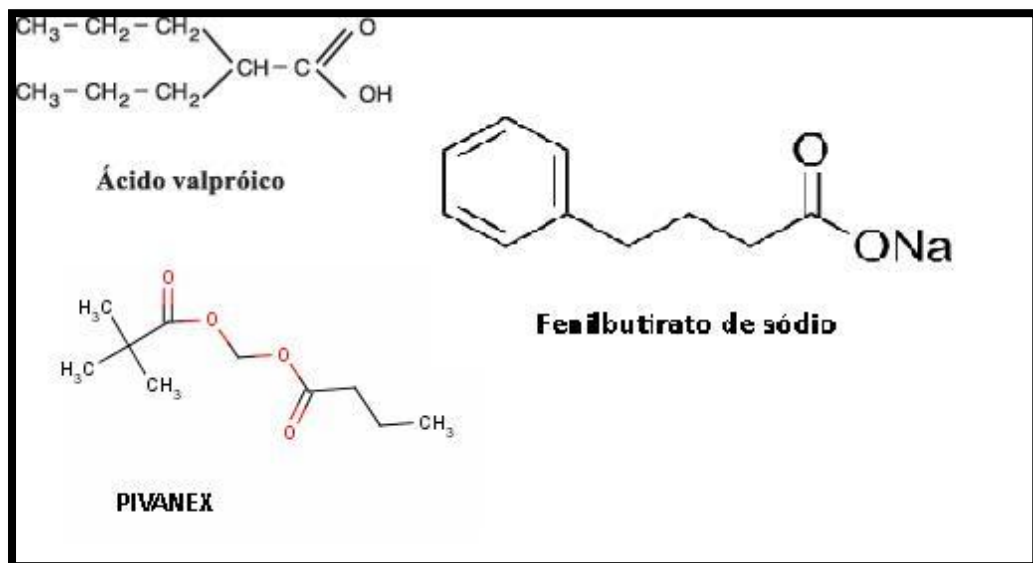


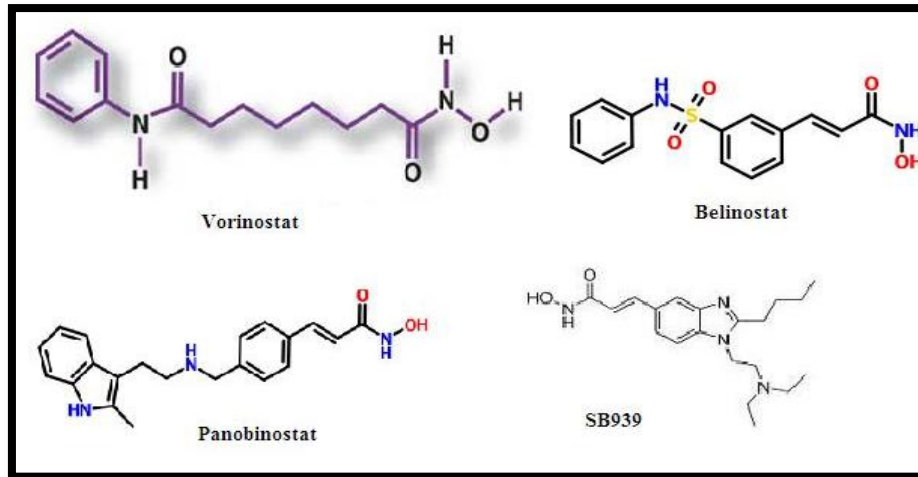
Figura 7: Fórmulas químicas dos ácidos gordos de cadeia curta (Anticonvulsivantes na medicina dentária, 2006;Pivanex, 2007 e Sodium phenylbutyrate, 2007)

### Ácidos hidroxâmicos

A classe dos ácidos hidroxâmicos apresenta-se como aquela que apresenta maior quantidade de ensaios clínicos para as mais diversas doenças. É também uma classe que apresenta um agente, Vorinostat, aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) e pela European Medicines Agency (EMA) para o tratamento de linfoma cutâneo de células T. Esta classe apresenta na sua constituição um grupo polar (Nebbioso et al., 2012).

Na classe dos ácidos hidroxâmicos podemos destacar fármacos como o Vorinostat, Panabinostat (LBH589), CHR-3996, CHR-2845, SB939, Givinostat (ITF2357) e Belinostat (PXD101) (Figura 8) (Nebbioso et al., 2012).

Fármacos que têm por alvo o epigenoma



**Figura 8:** Fórmula química dos ácidos hidroxâmicos (Flush the hidden Hiv out..., 2012; Belinostat, 2003; Panobinostat, 2010 e Pracinostat, 2012).

Segundo Siegel et al. (2009) (*cit. in.* Nebbioso et al., 2012) o Vorinostat, como o fármaco mais evoluído na classe dos inibidores das enzimas HDAC, apresenta uma diversidade de ensaios clínicos, sozinho ou em associação, para as mais diversas doenças como nos mostra a Tabela 2 (Nebbioso et al., 2012).

**Tabela 2:** Ensaios clínicos em curso do inibidor Vorinostat (Nebbioso et al., 2009)

Drug	Conditions	Status	NCT number	Phases
Vorinostat	Glioblastoma, gliosarcoma, brain tumor	Completed	NCT00641706	Phase 2
Vorinostat	Ovarian cancer, primary peritoneal cavity cancer	Completed	NCT00132067	Phase 2
Vorinostat	Lymphoma	Completed	NCT00771472	Phase 1
Vorinostat	Leukemia, myelodysplastic syndromes	Completed	NCT00305773	Phase 2
Vorinostat	Advanced cancer relapsed and refractory	Completed	NCT00632931	Phase 1
Vorinostat	Carcinoma, non-small-cell lung	Terminated with result	NCT00251589	Phase 1, 2
Vorinostat	Glioblastoma, gliosarcoma, brain tumor	Completed	NCT01647100	Phase 2
Vorinostat	Mesothelioma lung cancer	Completed	NCT00128102	Phase 3
Vorinostat	Breast cancer	Completed	NCT00132002	Phase 2
Vorinostat	Lung cancer	Completed	NCT00138203	Phase 2
Vorinostat	Brain and central nervous system tumors	Completed	NCT00238303	Phase 2
Vorinostat	Myelodysplastic syndromes	Completed	NCT00776503	Phase 1, 2
Vorinostat	Cancer	Completed	NCT00045006	Phase 1
Vorinostat	Head and neck cancer	Completed	NCT00134043	Phase 2
Vorinostat	Pelvic cancer radiotherapy	Completed	NCT00455351	Phase 1
Vorinostat	Hematologic and solid cancer	Terminated	NCT01116154	Phase 1
Vorinostat	Tumors	Completed	NCT00127127	Phase 1
Vorinostat	Brain, CNS, intestine tumors, lymphoma	Completed	NCT00499811	Phase 1
Vorinostat	MDS, blood and bone marrow disease	Terminated	NCT00486720	Phase 2
Vorinostat	Advanced cancer	Completed	NCT00907738	Phase 2
Vorinostat	Lymphoma	Completed	NCT00127140	Phase 1
Vorinostat	Colorectal cancer	Completed	NCT00336141	Phase 1
Vorinostat	Hematologia and solid cancer	Completed	NCT00005634	Phase 1
Vorinostat	Kidney cancer	Completed	NCT00354250	Phase 2

Como se pode verificar na Tabela 2, o Vorinostat está em fase de ensaios clínicos em diversas doenças como linfoma, síndromes mielodisplásicas, tumores do cérebro e do sistema nervoso central, cancro do rim, cancro colo-rectal, cancro da mama, cancro do pâncreas, cancro da próstata ou cancro do pulmão de não-pequenas células (Nebbioso et al., 2012). É importante referir também que o Vorinostat apresenta um importante papel na reativação do vírus VIH que se encontra em estado de latência nas linhas celulares crónicas e nas células primárias (Edelstein et al., 2009). Este passo é bastante importante para a cura *in vivo* do vírus do VIH uma vez que inibidores das enzimas HDAC são importantes para o primeiro passo do tratamento que depois é prosseguido com a terapia de combinação antirretroviral (Durand et al., 2012, *cit. in* Buchholz e Hauber, 2013). Esta descoberta é ainda recente daí a informação disponível ainda ser rudimentar, sendo necessários mais estudos e ensaios clínicos para comprovar a veracidade dos primeiros estudos efetuados.

Existem outras moléculas do grupo dos ácidos hidroxâmicos que também apresentam grande relevância para o tratamento de doenças e que se apresentam como novos fármacos bastante promissores como podemos ver na Tabela 3 (Nebbioso et al., 2012).

**Tabela 3:** Ensaios clínicos em curso de alguns inibidores do grupo dos ácidos hidroxâmicos (Nebbioso et al., 2009)

Drug	Conditions	Recruitment	NCT number	Phases
Panobinostat (LBH589)	Breast cancer	Terminated	NCT00993642	Phase 0
Panobinostat (LBH589)	Cutaneous T-cell lymphoma	Completed	NCT00490776	Phase 2, 3
Panobinostat (LBH589)	Non-Hodgkin's lymphoma	Terminated	NCT01090973	Phase 2
Panobinostat (LBH589)	Leukemia	Completed	NCT00723203	Phase 2
Panobinostat (LBH589)	Cancer, advanced solid tumor	Completed	NCT00739414	Phase 1
Panobinostat (LBH589)	Lymphoma, leukemia, multiple myeloma	Completed	NCT00621244	Phase 1, 2
LBH589 + trastuzumab + paclitaxel	HER-2 positive breast cancer, metastatic breast cancer	Completed	NCT00788931	Phase 1
Panobinostat + trastuzumab	Breast cancer	Completed	NCT00567879	Phase 1
Panobinostat (LBH589)	Cancer	Completed	NCT00570284	Phase 1
Panobinostat (LBH589)	Cutaneous T-cell lymphoma, leukemia-lymphoma	Terminated	NCT00699296	Phase 2
Panobinostat (LBH589)	Tumors, cutaneous T-cell lymphoma	Completed	NCT00412997	Phase 1
Panobinostat (LBH589)	Recurrent malignant gliomas	Terminated	NCT00848523	Phase 2
Panobinostat (LBH589)	Non-Hodgkin lymphoma, neoplasms	Completed	NCT00503451	Phase 1
Panobinostat (LBH589)	Small cell lung carcinoma	Completed	NCT01222936	Phase 2
CHR-3996	Solid tumor	Completed	NCT00697879	Phase 1
CHR-2845	Hematological disease, lymphoid malignancies	Completed	NCT00820508	Phase 1
ITF2357 (givinostat)	Hodgkin's lymphoma	Terminated	NCT00496431	Phase 1, 2
ITF2357 (givinostat)	Myeloproliferative diseases	Completed	NCT00606307	Phase 2
ITF2357 (givinostat)	Chronic lymphocytic leukemia	Terminated	NCT00792831	Phase 2
ITF2357 (givinostat)	Hodgkin's lymphoma	Completed	NCT00792467	Phase 1, 2
ITF2357 (givinostat)	Polycythemia vera	Completed	NCT00928707	Phase 2
Belinostat or PXD101	De novo myelodysplastic syndromes	Completed	NCT01647009	Phase 2
Belinostat	Myelodysplastic syndromes	Completed	NCT00357162	Phase 2
PXD101 dexamethasone	Multiple myeloma	Completed	NCT00131261	Phase 2
Belinostat, carboplatin, paclitaxel and bevacizumab	Non-small-cell lung carcinoma	Terminated	NCT01090830	Phase 1, 2
Belinostat + erlotinib	Non small cell lung cancer	Terminated	NCT01188707	Phase 1, 2
JNJ-26481585	Hematologic cancer	Terminated	NCT00676728	Phase 1
SB939	Solid tumor	Completed	NCT00504296	Phase 1
SB939 + azacitidine	Solid tumors and hematologic malignancies	Completed	NCT00741234	Phase 1

Como se pode verificar através da Tabela 3, o Panabinostat ou LBH589, encontra-se também em fase adiantada dos ensaios clínicos no caso principalmente do linfoma cutâneo das células T, como também do linfoma não-Hodgkin, em leucemia, linfoma e também mieloma múltiplo (Nebbioso et al., 2012).

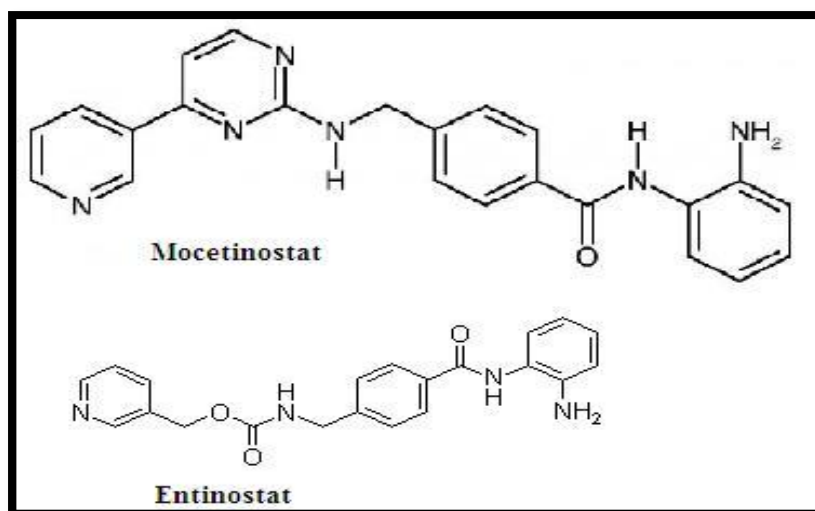
A classe dos ácidos hidroxâmicos apresenta ainda outras moléculas mais recentes e por conseguinte também mais seletivas como a CHR-3996, que é um inibidor seletivo da classe I de HDAC e que apresenta uma potencial atividade antineoplásica, estando já em ensaios clínicos para o tratamento de tumores em estado avançado, e a SB939 que é um inibidor de HDAC com propriedades físico-químicas e farmacocinéticas melhoradas, resultando num fármaco que não interfere com outras enzimas que apresentem a ligação zinco favorecendo a sua atividade anti proliferativa contra diversos tipos de tumores e em doenças hematológicas.

Por fim, podemos referir mais dois fármacos, o ITF2357 ou Givinostat e o PDX101 ou Belinostat, ambos inibidores da classe I e II das enzimas HDAC, que apresentam com um leque promissor de ensaios clínicos no tratamento de doenças hematológicas no caso do primeiro (Galli et al., 2010, *cit in*, Nebbioso et al. 2012), e síndrome mielodisplásica, (Cashen et al., 2012, *cit in*, Nebbioso et al. 2012) e mieloma múltiplos no caso do segundo (Feng et al., 2007, *cit in*, Nebbioso et al., 2012).

### *Benzamidas*

As benzamidas são uma classe de inibidores das enzimas HDAC que apresentam uma estrutura composta por 2-aminoanilida, que contacta com aminoácidos específicos presentes no sítio ativo em forma de túnel situados no núcleo deste tipo de enzimas, com participação ou não do ião zinco (Nebbioso et al., 2012). Esta classe apresenta como fármacos principais o MS-275 (SNDX-275 ou Entinostat) e MGCD0103 (Mocetinostat) (Figura 9).

Ambos os fármacos são seletivos para a classe I das enzimas HDAC (Nebbioso et al., 2012).



**Figura 9:** Fórmula química das benzamidas (Mocetinostat, 2008 e Entinostat, 2008)

O Entinostat inibe as enzimas HDAC através da sua ligação ao local ativo com ou sem a quelatação do ião zinco (Pontiki e Hadjipavlou-Litina, 2012, *cit. in* Nebbioso et al., 2012). A atividade do Entinostat resulta na promoção de acetilação de histonas e na regulação dos genes envolvidos na diferenciação e na apoptose (Stumpp et al., 2007, *cit. in* Dell'Aversana et al., 2012). O Entinostat apresenta diversos estudos clinicos em curso para diversas doenças como neoplasias, leucemia, melanoma e cancro colo-rectal (Tabela 4) (Nebbioso et al., 2009).

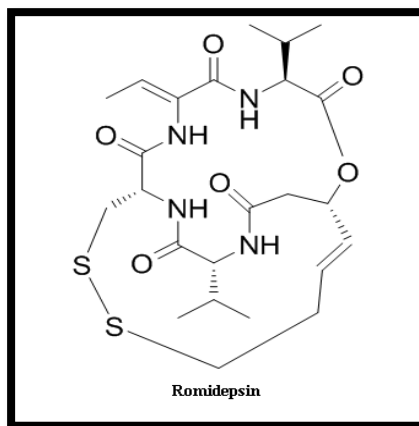
O fármaco Mocetinostat apresenta mecanismo idêntico ao Entinostat, resultando numa indução de hiperacetilação de histonas e apoptose como também atividade antiproliferativa de diversas linhas celulares de tumores (Founel et al., 2008, *cit. in* Dell'Aversana et al., 2012). A sua atividade antiproliferativa está a ser bastante valorizada e reflete-se através de uma diversidade de ensaios clínicos em curso ao nível de diferentes tipos de cancro como linfoma, leucemia e outros tipos de tumores (Tabela 4) (Nebbioso et al., 2009).

**Tabela 4:** Ensaios clínicos em curso de inibidores do grupo das benzamidas (Nebbioso et al., 2009)

Drug	Condition	Status	NCT number	Phases
Entinostat	Melanoma	Completed	NCT00185302	Phase 2
Entinostat	Cancer	Completed	NCT00020579	Phase 1
Entinostat	Leukemia, multiple myeloma and plasma cell neoplasm, MDS	Completed	NCT00015925	Phase 1
Entinostat + isotretinoin	Lymphoma, small intestine cancer	Completed	NCT00098891	Phase 1
Azacitidine + entinostat	Leukemia, myelodysplastic syndromes	Completed	NCT00101179	Phase 1
Azacitidine + entinostat	Colorectal cancer	Completed	NCT01105377	Phase 2
MGCD0103 + docetaxel	Solid cancer	Terminated	NCT00511576	Phase 1
Azacitidine + MGCD0103	Acute myeloid leukemia (AML) myelodysplastic syndrome (MDS)	Terminated	NCT00666497	Phase 2
MGCD0103	Hodgkin's lymphoma	Terminated	NCT00358982	Phase 2
MGCD0103	Myelodysplastic syndrome, acute myelogenous leukemia	Completed	NCT00324220	Phase 1, 2
MGCD0103	Leukemia, myelodysplastic syndromes	Completed	NCT00324129	Phase 1
MGCD0103	Tumors, non-Hodgkin's lymphoma	Completed	NCT00323934	Phase 1
MGCD0103	Lymphocytic leukemia, chronic	Completed	NCT00431873	Phase 2
MGCD0103	Lymphoma	Completed	NCT00359086	Phase 2
MGCD0103	Leukemia, myelodysplastic syndromes	Completed	NCT00324194	Phase 1
MGCD0103	Myelogenous leukemia, acute, myelodysplastic syndromes	Terminated	NCT00374296	Phase 2
MGCD0103 + gemcitabine	Tumors	Completed	NCT00372437	Phase 1, 2
MGCD0103 + azacitidine	Hodgkin lymphoma	Terminated	NCT00543582	Phase 2

### *Péptidos cíclicos*

A classe dos péptidos cíclicos apresenta-se como uma opção bastante viável, uma vez que apresenta fármacos como o Romidepsin (Depsipeptide ou FK228) (Figura 10) já aprovados pela FDA para o tratamento do linfoma cutâneo das células T. Esta classe é composta por um tetrapéptido cíclico que pode apresentar um grupo funcional denominado de AOE (2-amino-8-oxo-9,10-epoxi-decanoil) ou não. É comum os inibidores de enzimas HDAC hidrofóbicos apresentarem na sua constituição o aminoácido L-AOE (ácido S-2-amino-9,10-epoxi-8-oxodecanóico). Provavelmente o grupo epoxicetona é o responsável essencial pela atividade, tal como a redução ou o ataque nucleofílico, que resultou na inativação destes compostos (Nebbioso et al., 2012).

**Figura 10:** Fórmula química do inibidor Romidepsin (Romidepsin, 2011)

O Romidepsin (Istodax®) é o fármaco mais conhecido desta classe sendo a sua constituição um péptido cíclico sem o grupo Aoe, sendo este fármaco inicialmente isolado da bactéria *Chromobacterium violaceum*. O Romidepsin é considerado um pró-fármaco uma vez que o seu mecanismo de ação envolve a redução da ligação dissulfito existente, transformando-o na sua forma ativa, um ditiol monocíclico, só após a sua captação por parte das células (Nebbio et al., 2012). Segundo Sato et al. (2004) o Romidepsin apresenta atividade induzindo a diferenciação, a paragem de crescimento e apoptose podendo também conferir ação inibitória relativamente ao aparecimento de metástases e de angiogénese (Dell'Aversana, 2012).

Na Tabela 5 são apresentados os ensaios clínicos em curso para o Romidepsin.

Tabela 5: Ensaios clínicos em curso do inibidor do grupo dos péptidos cíclicos, Romidepsin (Nebbio et al., 2009).

Drug	Conditions	Recruitment	NCT number	Phases
Romidepsin + bortezomib	Multiple myeloma	Terminated	NCT00765102	Phase 2
Romidepsin + ketoconazole	Hematologic cancer	Completed	NCT01324310	Phase 1
Romidepsin (FR901228)	Mycosis fungoides, CTCL, neoplasms	Terminated	NCT01445340	Phase 1
Romidepsin	Peritoneal, epithelial, ovarian cancer	Completed	NCT01645670	Phase 2
Romidepsin + rifampin	Hematologic cancer	Completed	NCT01324323	Phase 1
Romidepsin (FR901228)	Lymphoma	Completed	NCT00383565	Phase 2
Romidepsin + gemcitabine	Pancreatic cancer	Completed	NCT00379639	Phase 1, 2
Romidepsin (depsipeptide, FK228)	Cutaneous T-cell lymphoma	Completed	NCT00106431	Phase 2
Depsipeptide, FR901228, FK228	Neoplasms	Completed	NCT00048334	Phase 1
Romidepsin + rituximab + fludarabine	Lymphoma	Completed	NCT00079443	Phase 2
Romidepsin	Brain and nervous system tumors	Completed	NCT00085540	Phase 2
Romidepsin	Lung cancer	Completed	NCT00086827	Phase 2
Romidepsin	Colorectal cancer	Completed	NCT00077337	Phase 2
Romidepsin	Bladder, renal pelvis and urethral cancer	Terminated	NCT00087295	Phase 2
Romidepsin	Leukemia, lymphoma	Completed	NCT00024180	Phase 1
Romidepsin	Lymphoma	Completed	NCT00019318	Phase 1
Romidepsin	Leukemia, lymphoma, MDS syndrome	Completed	NCT00042822	Phase 2
Romidepsin + decitabine	Leukemia, lymphoma, MDS syndrome	Completed	NCT00114257	Phase 1
Romidepsin	Breast cancer	Completed	NCT00098397	Phase 2
Romidepsin	Esophageal cancer, gastric cancer	Suspended	NCT00098527	Phase 2
Romidepsin	Ovarian, primary peritoneal cavity cancer	Completed	NCT00091195	Phase 2
Romidepsin	Lymphoma	Completed	NCT00077194	Phase 2
Romidepsin	Head and neck cancer	Completed	NCT00098813	Phase 2
Decitabine + depsipeptide	Small cell lung carcinoma	Completed	NCT00037817	Phase 1
Romidepsin	Nervous system tumors, leukemia	Completed	NCT00053963	Phase 1
Romidepsin (depsipeptide, FK228)	Prostate cancer, metastases	Completed	NCT00106418	Phase 2
Romidepsin (FR901228)	Small cell lung carcinoma	Completed	NCT00020202	Phase 2
Romidepsin (depsipeptide, FK228)	Renal cell carcinoma, metastases	Completed	NCT00106613	Phase 2

### Sirtuínas

As sirtuínas são o nome comum que se atribui à classe III das enzimas HDAC. Segundo Carafa et al. (2012) (*cit. in* Nebbio et al., 2012) a família de sirtuínas identificadas nos mamíferos compreendem sete proteínas diferentes (SirT1-7), que apresentam diferentes localizações na célula, diferentes atividades e também diversas

funções, sendo divididas em quatro classes distintas. A classe das sirtuínas difere de todas as outras uma vez que apresenta uma dependência direta da diferença celular de dinucleótido adenina nicotinamida oxidado ( $\text{NAD}^+$ ) e reduzido ( $\text{NADH}$ ). O  $\text{NAD}^+$  funciona como ativador, enquanto que a nicotinamida e o  $\text{NADH}$  atuam como inibidor da atividade (Nebbioso et al., 2012).

A classe das sirtuínas catalisa duas diferentes reações: desacetilação e ADP-ribosilação. As sub-classes SirT1, 2, 3, 5 e 7 catalizam a reação de desacetilação, enquanto que as restantes, SirT 4 e 6 catalizam a reação de ADP-ribosilação (Nebbioso et al., 2012). Segundo McGuinness et al. (2011) a subclasse das sirtuínas SirT1, 2, 3 e 6 apresenta também um papel fundamental na regulação da cromatina. Num plano particular a SirT1 é responsável pela formação da heterocromatina através do processo de desacetilação.

As sirtuínas apresentam-se como uma classe de inibidores de HDAC bastante promissora uma vez que abrange uma diversidade de processos biológicos como a regulação de expressão de genes, processos de controlo metabólico, apoptose e sobrevivência das células, neuroproteção e inflamação. A consequência desta abrangência é obrigatoriamente uma envolvimento em diversos tipos de doenças como doenças metabólicas, neurodegenerativas e cancro (Nebbioso et al., 2012).

As diferentes classes de sirtuínas apresentam diferentes funções no nosso organismo. A SirT1, a sub-classe mais estudada, apresenta um papel divergente relativamente às suas funções, podendo-se apresentar como supressor ou promotor de tumores. Segundo McGuinness et al. (2011) a atividade promotora é derivada ao efeito repressivo que a SirT1 tem sobre a proteína citoplasmática e supressora tumoral p53. Todas as outras classes de sirtuínas apresentam papéis divergentes, como exemplos, a SirT3 apresenta redução em diversos tipos de cancro, levando ao aumento da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e consequente aumento do tumor. A SirT2 confere um caráter de supressor tumoral, sendo esta hipótese apoiada num número baixo de enzimas SirT2 encontrado num número elevado de linhas celulares de tumores cerebrais humanos, como na doença de Parkinson e na doença de Huntington (Outeiro et al., 2007), e também no seu envolvimento na progressão do ciclo celular. Uma elevada expressão da SirT5 está ligada a um estudo efetuado no cancro pancreático (Kim et al., 2010, *cit. in* Nebbioso et al., 2012).

As sirtuínas apresentam, como se referiu anteriormente, um papel ativo nas doenças de envelhecimento como as doenças metabólicas, doenças neurodegenerativas e a própria

esperança média de vida (Nebbioso et al., 2012). Estudos confirmam que existe uma envolvimento direta entre uma elevada expressão de Sir2, ou nos seus ortólogos, e um aumento de esperança média de vida (Vaquero et al., 2009). Existe outro fator preponderante associado às sirtuínas que é a restrição de calorias, sabendo-se que este fator em associação, aumenta a esperança média de vida, como foi descrito na *Saccharomyces cerevisiae* (Nebbioso et al., 2012). Segundo Westphal et al. (2007) (*cit. in* Nebbioso et al., 2012) podemos afirmar que após os estudos efetuados na levedura anteriormente mencionada, as sirtuínas também assumem um papel ativo nos processos de envelhecimento dos organismos maiores. A um nível genético mais aprofundado, sabemos que o processo de envelhecimento está relacionado com o encurtamento dos telómeros, sendo que as sirtuínas SirT1 e SirT6 estão diretamente implicadas nesse processo. A ausência ou uma redução de SirT6 pode resultar numa disfunção dos telómeros ou até em sintomas análogos ao síndrome de Werner, síndrome caracterizado por um envelhecimento prematuro (McGuinness et al., 2011).

A sirtuína SirT1, como referido anteriormente, pode apresentar um papel supressor ou promotor de tumores, e por consequência é importante referir todos os compostos químicos atuam inibindo ou ativando a SirT1 (Nebbioso et al., 2009).

Os compostos capazes de inibir a SirT1 são diversos, normalmente associados a terapia anticancerígena, como exemplo existe a nicotinamida, que é um inibidor fisiológico, e outros inibidores químicos como a splitomicina e os seus análogos como as tenovinas, AGK2, sirtinol, suramina, EX-257, salermida e UVI5008. Alguns destes fármacos apresentam-se como inibidores não-específicos de sirtuínas, sendo conhecida a sua utilização no tratamento de outras doenças como infeções por parasitas, nomeadamente na doença do sono (Nebbioso et al., 2009).

Existem também outro tipo de compostos que têm como função ativar as sirtuínas de forma a conferirem benefícios para os diversos tipos de patologias como as neurodegenerativas, inflamatórias, autoimunes e até diversos tumores. Os compostos associados à ativação de sirtuínas são derivados do fenol como quercetina, piceatannol e resveratrol (Alcain e Villalba, 2009). Destes compostos o ativador de sirtuínas com ação mais potente é o resveratrol, sendo este composto um polifenol encontrado por exemplo em uvas ou em produtos que contenham uvas. O mecanismo de atuação dos ativadores de SirT1, segundo Borra et al. (2005) não podem ser utilizados na sua forma original uma vez que não apresentam qualquer tipo de atividade, simplesmente só quando ligados a um substrato

marcado com fluorescência e posteriormente lido através de um ensaio de fluorescência. O resveratrol apresenta diversos benefícios estando ensaios clínicos para as mais diversas doenças como demonstra na Tabela 6 (Borra et al., 2005, *cit. in* Nebbioso et al., 2012).

**Tabela 6:** Ensaios clínicos em curso do ativador de sirtuínas, Resveratrol (Nebbioso et al., 2009).

Drug	Conditions	Status	NCT number	Phases
Resveratrol and midazolam	Healthy	Completed	NCT01173640	
Resveratrol	Cognitive and cerebral blood flow	Completed	NCT01010009	
Resveratrol	Cardiovascular diseases	Completed	NCT01449110	Phase 2
Resveratrol	Colon cancer	Completed	NCT00256334	Phase 1
Resveratrol	Chronic subclinic inflammation	Completed	NCT01492114	Phase 3
Resveratrol	Type 2 diabetes mellitus	Completed	NCT01038089	
Resveratrol	Healthy	Completed	NCT01331382	
Resveratrol	Sports concussion	Completed	NCT01321151	Phase 1
Resveratrol	Neoplasms, colorectal cancer	Completed	NCT00920803	Phase 1
Resveratrol	Sedentary lifestyle	Completed	NCT01615445	Phase 2
Resveratrol	Melanoma (skin)	Completed	NCT00721877	Phase 1
Resveratrol	Metabolic syndrome, obesity	Completed	NCT01150955	
Resveratrol	Multiple myeloma	Terminated	NCT00920556	Phase 2
Resveratrol	Healthy	Completed	NCT01640197	Phase 1
Resveratrol	Colorectal cancer	Completed	NCT00433576	Phase 1
Resveratrol	Unspecified adult solid tumor	Completed	NCT00098969	Phase 1
Resveratrol	Obesity, metabolic syndrome, diabetes	Completed	NCT00823381	
Resveratrol	Obesity	Completed	NCT00998504	
Resveratrol	Cardiovascular disease	Completed	NCT01199549	
Resveratrol	Cellulite (orange peel skin)	Terminated	NCT01321268	
Resveratrol	Type 2 diabetes	Completed	NCT00937222	

O resveratrol apresenta entre os seus benefícios uma capacidade preventiva relativamente às doenças cardiovasculares, uma habilidade para induzir a vasodilatação devido à sua interação com o óxido nítrico, apresenta-se como uma solução possível para o cancro ou para uma maior sensibilização ao quimioterápicos quando o organismo desenvolve resistência aos mesmos. Entre os tipos de tumores que o resveratrol atua estão, cancro dos pulmões e do peito, leucemia promielocítica, cancro da próstata e também cancro pancreático. O mecanismo de atuação do resveratrol, segundo Talero et al. (2012) pensa-se que poderá ser através do bloqueio do crescimento de células tumorais, bloqueio do ciclo celular, apoptose ou através do aumento da atividade anti-inflamatória e anti-oxidante (Talero et al., 2012 *cit in* Nebbioso et al., 2009).

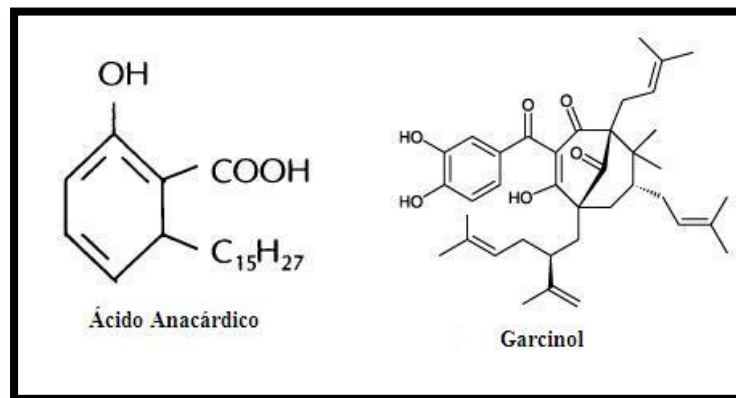
### ii.iii.i.ii. Inibidores HAT

As enzimas HAT, como já foi referido anteriormente, apresentam-se em destaque quando o assunto é a regulação transcricional. Regularmente associamos o estado ativo de

transcrição de genes quando as histonas se encontram acetiladas, pelas enzimas HAT, em sentido contrário quando as histonas estão desacetiladas, pelas enzimas HDAC, o estado de transcrição de genes encontra-se reprimido. O balanço entre estes dois estados nas histonas regula a transcrição de genes. Quando existe disfunção de uma das enzimas envolvidas por norma está associado a diversas doenças como asma, cancro ou até doenças coronárias.

Segundo Yang (2004), as HAT são classificadas em três grandes classes: família GNAT, composta por Gcn5e PCAF, grupo MYST, constituído por MOZ, YBF2/SAS3 e TIP60) e a família p300/CBP (Yang, 2004 *cit in* Nebbioso et al., 2009).

Os primeiros inibidores de HAT a serem isolados foram o ácido anacárdico proveniente da casca da castanha de cajú, *Anacardium occidentale*, e o garcinol, proveniente da planta *Garcinia indica* (Figura 12), apresentando em comum inibição não específica para as famílias p300/CBP e para família GNAT em especial para a enzima PCAF e também o fato de facilmente penetrarem células em cultura (Balasubramanyam et al., 2004). Após o isolamento dos primeiros inibidores de HAT, surgiu a curcumina, que confere a coloração alaranjada à planta açafrão-da-Índia, *Curcuma longa*, e surge também como um composto ativo da própria planta.



**Figura 11:** Fórmula química dos inibidores de HAT, garcinol e ácido anacárdico (Garcinol, 2010 e Ácido anacárdico, 2013)

A eficácia da curcumina encontra-se em fase de ensaios clínicos em variadas doenças inflamatórias, cancro, diabetes, doenças cardiovasculares, doença de Alzheimer, psoríase e numa fase mais adiantada no síndrome do cólon irritável, como se pode ver na Tabela 7.

**Tabela 7:** Ensaios clínicos em curso do inibidor de HAT, curcumina (Nebbioso et al., 2009).

Drugs	Conditions	Recruitment	NCT number	Phases
Curcumin	Atopic asthma	Completed	NCT01179256	N/A
Curcumin + bioperine	Multiple myeloma	Completed	NCT00113841	N/A
Curcumin	Irritable bowel syndrome	Completed	NCT00779493	Phase 4
Curcumin	Healthy	Completed	NCT00181662	N/A
Curcumin	Healthy	Completed	NCT00895167	Phase 1
Curcumin	Breast cancer	Completed	NCT01042938	Phase 2
Curcumin	Alzheimer's disease	Completed	NCT00164749	Phase 1 and 2
Curcumin	Inflammatory bowel disease/ulcerative colitis/Crohn's disease	Completed	NCT00889161	Phase 1
Curcumin + bioperine	Chronic obstructive pulmonary disease	Completed	NCT01514266	N/A
Curcumol	Chemotherapy induced mucositis	Completed	NCT00475683	Phase 3
Curcumin + bioperine	Mild cognitive impairment	Completed	NCT00595582	N/A
Curcumin C3 complex	Alzheimer's disease	Completed	NCT00099710	Phase 2
Curcumin + fluoxetine	Major depressive disorder	Completed	NCT01022632	N/A
Curcumin + gemcitabine	Pancreatic cancer	Completed	NCT00192842	Phase 2
Curcumin	Familial adenomatous polyposis	Terminated	NCT00248053	Phase 2
Curcumin	Colorectal cancer	Completed	NCT0027495	Phase 1
Curcumin	Aberrant crypt foci	Terminated	NCT00176618	N/A
Curcumin	Healthy, no evidence of disease	Completed	NCT00768118	N/A
Curcumin + quercetin + sulindac	Colorectal cancer	Terminated	NCT00003365	N/A
Observational study	Diabetes	Completed	NCT01029327	N/A
Curcumin C3 complex	Psoriasis	Completed	NCT00235625	Phase 2
Curcuminoids	Oral lichen planus	Completed	NCT00525421	Phase 2
Standardized turmeric root extract	Cystic fibrosis	Completed	NCT00219882	Phase 1
Carbohydrate drink	Nutrition processes	Completed	NCT00799630	N/A

A curcumina é um inibidor de HAT específico para a família p300/CBP que consegue penetrar a célula. Este apresenta-se também como um agente terapêutico bastante promissor devido aos efeitos secundários, verificados ao longo dos diversos ensaios, apresentarem níveis muito baixos. O seu mecanismo de ação é a inibição da atividade da p300 relativamente à conformação da cromatina e não na transcrição do molde de DNA.

### ii.iii.i.iii. Inibidores HMT

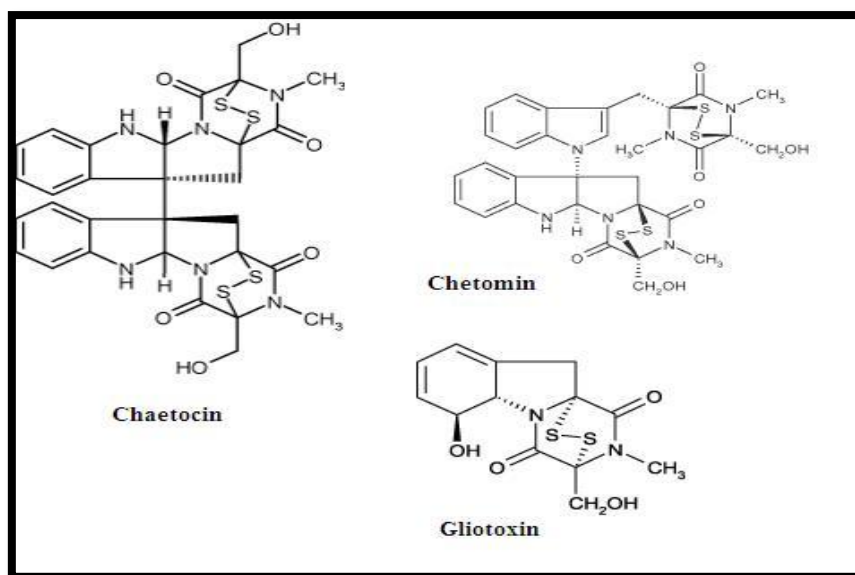
As HMT são outro tipo de enzimas que estão diretamente ligadas à modificação de histonas e por consequência à regulação de genes. Como referido anteriormente estas enzimas podem atuar em diferentes aminoácidos, na lisina ou na arginina, localizados na zona terminal das histonas. Ao atuar em diferentes aminoácidos advém uma obrigatoriedade em dividir as HMT em duas diferentes famílias, lisina metiltransferases (KMT) ou arginina metiltransferases (RMT), uma vez que as diferentes ligações vão originar uma variabilidade de combinações que resultam em ativação dos genes ou silenciamento. Quando a metilação é efetuada no aminoácido arginina principalmente na H3m2, H3m17, H3m26 e H4m3 estamos perante uma ativação transcricional. No caso de o aminoácido metilado ser a lisina entre os quais H3m4, H3m36 e H3m79, existe ativação transcricional e em contraste em H3m9, H3m27e H4m20 predomina o silenciamento transcricional (Nebbioso et al., 2009).

Em suma, como anteriormente foi referido, existe uma grande diversidade de locais de ligação, podendo este ser mono-, di- e tri-metilado no caso da lisina e mono- ou di-metilado quando o aminoácido em questão é a arginina. Esta variabilidade apresenta-se como uma dificuldade acrescida para o estudo das combinações possíveis e para os diferentes inibidores das HMT e das HDM, resultando num atraso longínquo relativamente aos outros tipos de inibidores ou até a possíveis ensaios clínicos (Nebbioso et al., 2009).

O primeiro inibidor de HMT a ser utilizado foi SAM, fármaco já utilizado na terapia anticancerígena, sendo que segundo Spannhoff et al. (2009) o fármaco interfere não só na classe de HMT como também em outras classes, estando o seu uso demasiado limitado devido à sua baixa especificidade. O mecanismo de atuação, que inclui a passagem de SAM a S-adenosil-homocisteína (SAH), apresenta como consequência uma diminuição do sinal do supressor tumoral p53, resultando um crescimento abrupto de células malignas e uma progressão acentuada da doença em geral (Spannhoff et al., 2009, *cit. in* DeCarlo e Hadden, 2012).

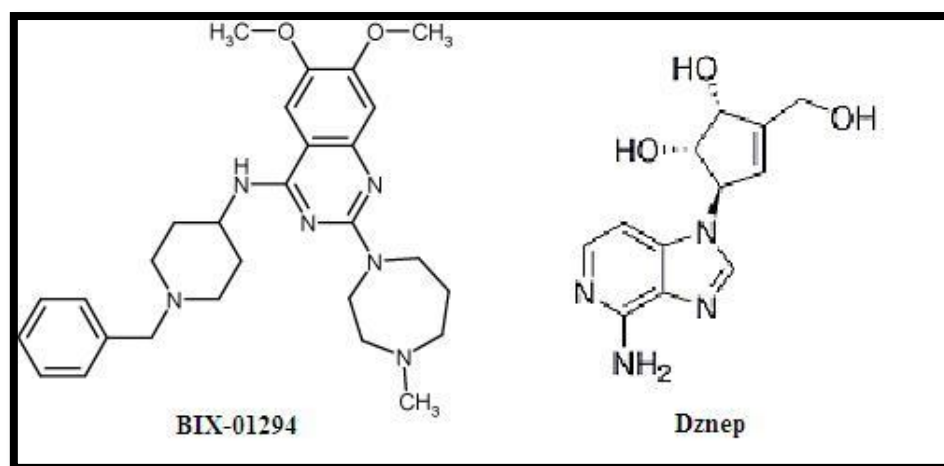
Seguidamente, pode-se dividir os inibidores de HMT em duas classes distintas: inibidores de origem natural e inibidores caracterizados pelas moléculas de tamanho reduzido.

Na primeira classe, distingue-se uma micotoxina, denominada de chaetocin (Figura 13), que a concentrações baixas apresenta um elevado poder inibitório na enzima HMT SUV39H1, assim como em outras KMT, H3K9, que incluem a enzima G9a no rato e a enzima DIM 5 no fungo *Neurospora crassa* (DeCarlo e Hadden, 2012). O chaetocin apresenta-se também um mecanismo competitivo relativamente ao co-substrato SAM. A ação desta micotoxina segundo Isham et al. (2007) (*cit. in* Nebbioso et al., 2012) prende-se com a indução de stress oxidativo celular, uma morte seletiva de células cancerígenas e células primárias que rapidamente proliferam. Existem outras moléculas, tais como gliotoxin e chetomin (Figura 13), que contêm uma ligação dissulfito (S-S), ligação esta preponderante para uma atividade inibitória de KMT.



**Figura 12:** Fórmula química dos inibidores de HMT, sub-classe dos inibidores de origem natural (Chaetocin, 2007; Chetomin, 2007 e Gliotoxin, 2011)

Na classe dos inibidores caracterizados pelas moléculas de tamanho reduzido, podemos destacar diversos fármacos como o BIX-01294, Dznep (Figura 14) e AMI-1. Os dois primeiros são baseados na estrutura do composto quinazolina enquanto os dois últimos são inibidores relacionados com a ação do SAM (DeCarlo e Hadden, 2012).



**Figura 13:** Fórmula química dos inibidores de HMT, sub-classe das moléculas de tamanho reduzido (BIX-01294, 1986 e Dznep, 2007)

O BIX-01294 apresenta-se, de acordo com Shi et al. (2008) como um inibidor específico do G9a de acordo com os ensaios *in vitro* sem qualquer consequência no SUV39H1 e PRMT1. No mecanismo de ação do BIX-01294 foi constatado uma redução da H3K9 desmetilada sem qualquer alteração nas outras histonas ou ao nível de outro tipo de metilação. De salientar também que o BIX-01294 necessita do co-factor SAM para se ligar a G9a (Shi et al., 2008, *cit. in* Nebbioso et al., 2012).

A importância dada à KMT6 ou metiltransferase lisina EZH2 é elevada uma vez que cataliza a trimetilação da lisina 27 na histona 3 estando esta envolvida na proliferação de células agressivas associadas a células neoplásicas. De acordo com Tseng et al. (1989) (*cit. in* Nebbioso et al., 2012), o Dznep é uma molécula que foi sintetizada com o intuito de inibir a SAH hidrolase. Importante referir também que segundo Fiskus et al. (2009) (*cit. in* Nebbioso et al., 2012) o Dznep apresenta resultados inibitórios relativamente aos níveis de EZH2 e inibe H3K27m3 em células humanas em cultura que contem leucemia mielóide aguda.

A metiltransferase arginina AMI-1 é o inibidor melhor conhecido desta classe. Apresenta permeabilidade relativamente à célula e apresenta um importante grupo sulfonilureia que atua como um potente e específico inibidor não competitivo do composto SAM da RMT sem efeitos nas KMT. Importante referir que esta enzima inibe o receptor responsável pela ativação da linha celular do adenocarcinoma humano do peito e também pela HIV-1 RT polimerase (Nebbioso et al., 2009).

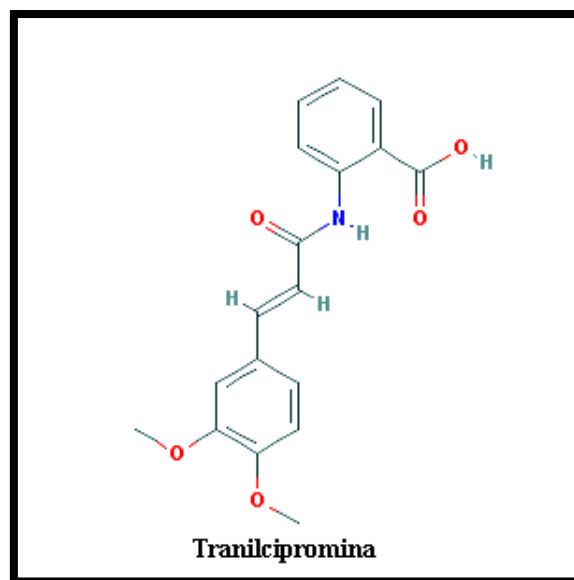
Todos os inibidores de HMT referidos anteriormente ainda carecem de ensaios clínicos havendo simplesmente ensaios pré-clínicos e os resultados apresentados ainda apresentam baixa especificidade relativamente aos seus alvos e também elevados níveis de toxicidade por parte dos compostos (Nebbioso et al., 2009).

#### **ii.iii.i.iv. Inibidores HDM**

As HDM são responsáveis pela remoção do grupo metilo das histonas. Atualmente são conhecidas duas grandes famílias de HDM, LSD1 e JmjC histonas desmetilases (PHF8 e JHDM1D).

A LSD1, de acordo com Forneris et al. (2005) (*cit. in* Nebbioso et al., 2012) através de uma reação oxidativa dependente de dinucleótido adenina flavina (FAD), remove os grupos metilo especificamente da H3K4 e H3K9. A LSD1 partilha os locais ativos com as monoaminooxidases (MAO) A e B, sendo que a inibição destes locais é usada clinicamente para o tratamento de doenças como a depressão, ansiedade e doença de Parkinson (Lee et al., 2006 *cit in* Nebbioso et al., 2009).

A tranilcipromina (Figura 15) é um medicamento inibidor das MAO irreversível já lançado no mercado sobre o nome de Parnate pela GlaxoSmithKline para o tratamento da depressão maior, sendo também um composto capaz de inibir a desmetilação de histonas *in vivo*. Os efeitos colaterais presentes na tranilcipromina são o simples fato de inibir as MAO a concentrações mais baixas do que quando inibem a desmetilação de histonas (Schmidt e McCafferty, 2007 *cit in* Nebbioso et al., 2009).



**Figura 14:** Fórmula química do inibidor de HDM, Tranilcipromina (Tranilcipromina, 2013)

#### **ii.iii.i.v. Inibidores DNMT**

A metilação de DNA é um mecanismo epigenético muito importante e como referido anteriormente, o mais estudado. É um mecanismo que se encontra envolvido no controlo da expressão de genes, na regulação do *imprinting*, na inativação da estabilização do cromossoma X e em geral na manutenção da integridade do genoma. Segundo Di Croce et al. (2002) a metilação do DNA está também implícito no desenvolvimento do sistema imune,

reprogramação celular e também no funcionamento do cérebro (Di Croce et al., 2002, *cit. in* Nebbioso et al., 2012).

O mecanismo epigenético de metilação de DNA consiste na transferência de grupos metilo do SAM para o aminácido citosina nos locais CpG, sendo esta reação catalizada pelas enzimas DNMT. Até hoje foram identificadas duas enzimas metiltransferases “*de novo*”, DNMT3A e DNMT3B, e uma enzima metiltransferase de manutenção, DNMT1, sendo esta última a mais abundante e ativa de todas (Goll e Bestor, 2005 *cit in* Nebbioso et al., 2009).

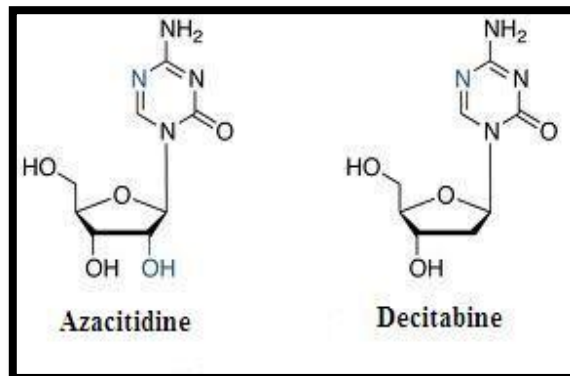
A ação dos inibidores de DNMT vai ser incidir sobre todas as atividades anormais ligadas as DNMT e corrigi-las como o silenciamento do gene supressor de tumores. Sabe-se que estas atividades anormais estão ligadas a diferentes doenças, nomeadamente neoplasias. Importante referir que a metilação de DNA está inteiramente ligada à modificação de histonas. Esta relação transmite-se através das seguintes hipóteses: uma cromatina inativa ou heterocromatina, está enriquecida com uma hipermetilação de DNA enquanto que na cromatina ativa ou eucromatina predomina a hipometilação de DNA. Uma situação recorrente é o uso combinado de fármacos inibidores de DNMT e fármacos que afetam a cromatina de forma a potencializar o efeito. Na classe dos inibidores de DNMT podemos salientar 4 sub-classes: análogos nucleósidos, pequenas moléculas, moléculas naturais e oligonucleótidos antisense inidores de DNMT (Nebbioso et al., 2009).

#### *Análogos nucleósidos*

Esta subclasse de inibidores é composta por nucleósidos análogos que são fosforilados posteriormente por cinases celulares. Estes nucleótidos incorporam-se no DNA, formando uma ligação covalente com a enzima DNMT, tornando a enzima inviável para novas metilações que possam acontecer, resultando numa desmetilação de DNA que surge de novo (Szyf, 2009).

Os inibidores testados clinicamente e já lançados no mercado que compõe esta subclasse são o decitabine (Dacogen®) e o azacitidine (Vidaza®) (Figura 15). Como referido atrás, depois de fosforilados, os nucleótidos incorporam-se no DNA, sendo que, de acordo com Leone et al. (2002) o decitabine é incorporado no DNA enquanto que o azacitidine é incorporado preferencialmente no RNA (Leone et al., 2002 *cit in* Nebbioso et al., 2009).

Ambos compostos podem ser, segundo Galmarini et al. (2001), inativados através de desaminação pela citidina desaminase (Galmarini et al., 2001 *cit in* Nebbioso et al., 2009).



**Figura 15:** Fórmula química dos inibidores de DNMT, da sub-classe dos análogos nucleósidos (Epigenetics, 2013)

Estes compostos já se encontram exaustivamente estudados e, como antes mencionado, até já se encontram no mercado para o tratamento de síndrome mielodisplásica (Marks, 2012). Existem também ainda ensaios clínicos dos compostos que decorrem para diferentes doenças como leucemia, leucemia mielóide aguda, cancro do pulmão, cancro do esófago, cancro da mama e melanoma, como podemos ver na Tabela 8.

**Tabela 8:** Ensaios clínicos em curso do inibidor de DNMT, decitabine (Nebbioso et al., 2009)

Drug	Conditions	Status	NCT number	Phases
Decitabine	MDS/CML	Completed	NCT00067808	Phase 2
Decitabine	Thalassemia	Completed	NCT00661726	Phase 2
Decitabine	Lymphoma, intestinal neoplasms	Completed	NCT00089089	Phase 1
Decitabine	AML	Completed	NCT00866073	Phase 2
Decitabine	AML, MDS	Completed	NCT00760084	Phase 2
Decitabine	MDS, CML	Terminated	NCT00113321	Phase 2
Decitabine	Leukemia	Completed	NCT01378416	Phase 1
Decitabine	CML	Completed	NCT01098084	Phase 2
Decitabine	AML	Completed	NCT00398983	Phase 2/3
Decitabine	MDS	Completed	NCT00043381	Phase 3
Decitabine	AML	Completed	NCT00538876	Phase 1
Decitabine	MDS	Terminated	NCT00282399	Phase 1/2
Decitabine	CML	Completed	NCT00042003	Phase 2
Decitabine	CML	Completed	NCT00042016	Phase 2
Decitabine	CML	Completed	NCT00041990	Phase 2
Decitabine	MDS	Completed	NCT00260065	Phase 2
Decitabine	MDS	Completed	NCT01041846	N/A
Decitabine	MDS	Completed	NCT00796003	Phase 1
Decitabine	AML	Completed	NCT00358644	Phase 2
Decitabine	Leukemia, MDS	Completed	NCT00003361	Phase 2
Decitabine	Leukemia, MDS	Completed	NCT00049582	Phase 1
Decitabine	MDS, secondary myelofibrosis	Terminated	NCT00630994	Phase 2
Decitabine	Bladder cancer, breast cancer, melanoma	Completed	NCT00030615	Phase 1
Decitabine	Esophageal, lung cancer, malignant mesothelioma	Completed	NCT00019825	Phase 1
Decitabine	Leukemia	Completed	NCT00042796	Phase 1
Decitabine	MDS, leukemia, lymphoma, MM	Completed	NCT00002980	Phase 1

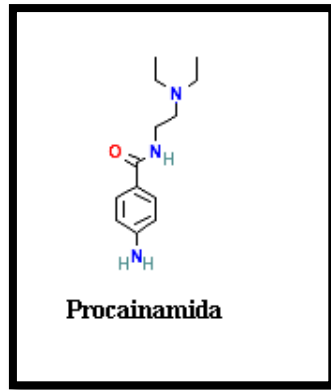
Embora a terapia dos compostos em singular esteja a ter boas conclusões, a terapia combinada parece ser a mais promissora e com melhores registos, especialmente quando associados com inibidores de HDAC. Na Tabela 9 estão alguns exemplos de diversos ensaios clínicos para a terapia combinada com decitabine.

**Tabela 9:** Ensaios clínicos em curso do inibidor de DNMT, decitabine em terapia combinada (Nebbio et al., 2009).

Drug	Conditions	Status	NCT number	Phases
Decitabine + vorinostat	Myeloproliferative disorders, leukemia	Completed	NCT00357708	Phase 1
Decitabine + interferon alfa-2b	Renal cell carcinoma	Terminated	NCT00561912	Phase 2
Decitabine + filgrastim + cyclosporine	Leukemia, MDS	Completed	NCT00002832	Phase 1/2
Decitabine + VPA	Leukemia, MDS	Completed	NCT00075010	Phase 1/2
Decitabine + cytarabine or supportive care	AML	Completed	NCT00260832	Phase 3
Decitabine + carboplatin	Fallopian tube, ovarian, peritoneal cavity cancer	Terminated	NCT00748527	Phase 2
Decitabine + azacitidine	MDS	Terminated	NCT01011283	Phase 4
Decitabine + arsenic trioxide + ascorbic acid	MDS	Completed	NCT00621023	Phase 2
Decitabine + PEG-interferon alfa-2b	Unspecified adult solid tumor	Completed	NCT00701298	Phase 1
Decitabine + pegylated interferon-alfa 2b	Cancer	Terminated	NCT00886457	Phase 1
Decitabine + chemotherapy	AML	Terminated	NCT00943553	Phase 2
Decitabine + VPA	Lymphoma	Completed	NCT00109824	Phase 1
Decitabine + romidepsin	SCC mesothelioma NSCLC	Completed	NCT00037817	Phase 1
Decitabine + vorinostat	Leukemia MDS	Completed	NCT00479232	Phase 1
Decitabine + filgrastim + pegfilgrastim + cyclophosphamide + doxorubicin hydrochloride	Neuroblastoma, childhood solid tumor	Completed	NCT00075634	Phase 1
Decitabine + imatinib mesylate	Leukemia	Completed	NCT00054431	Phase 2
Decitabine + romidepsin	Leukemia, MDS	Completed	NCT00114257	Phase 1
Decitabine + filgrastim + busulfan + cyclophosphamide + cyclosporine + methotrexate + methylprednisolone + tacrolimus	Leukemia	Completed	NCT00002831	Phase 1/2
Decitabine + AMG 531 (romiplostim) + azacitidine	MDS, thrombocytopenia	Completed	NCT00321711	Phase 2
Decitabine deferoxamine + deferiprone + arginine + sildenafil	Hematologic diseases, osteoporosis, hypertension	Completed	NCT00000623	N/A

### *Moléculas pequenas*

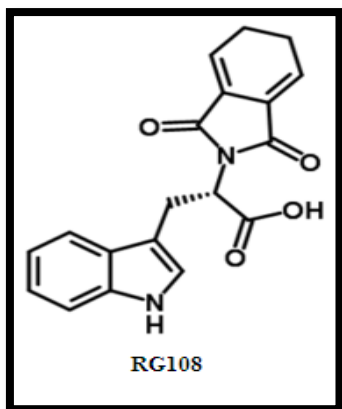
A subclasse de moléculas pequenas inclui as moléculas hidralazina, fármaco com nome comercial de Nepresol®, já aprovado para o tratamento da hipertensão e a procainamida (Pronestyl®) (Figura 16), fármaco aprovado para o tratamento de arritmia (Peng et al., 2010). O mecanismo de ação destes fármacos é o fato de se apresentarem como inibidores competitivos da DNMT1, reduzindo a afinidade da DNMT1 com os seus substratos, DNA e SAM, sendo que posteriormente a DNMT1 dissocia-se. Esta ligação por parte dos inibidores aos locais CpG interfere com a translocação de DNMT ao longo da cadeia de DNA. Este mecanismo ainda está sob investigação (Nebbio et al., 2009).



**Figura 16:** Fórmula química dos inibidores de DNMT, da sub-classe das moléculas pequenas, procainamida (Procainamida, 2013)

O estudo destes fármacos está em fase de estudos pré-clínicos mas algumas conclusões já foram retiradas relativamente à hidralazina nomeadamente o fato que a hidralazina induz a re-expressão de vários genes supressores de tumores, em pacientes com cancro do colo do útero. Existem também ainda ensaios clínicos em terapia combinada de hidralazina com valproato de magnésio para o tratamento de diversos tumores. O maior entrave revelado pelos ensaios pré-clínicos foi as altas concentrações necessárias para se conseguir a desmetilação do DNA, levando a um elevado número de efeitos tóxicos (Nebbioso et al., 2009).

Existe outro fármaco com atividade muito promissora denominado de RG108 (Figura 17), que de acordo com Suzuki et al. (2010), é o primeiro inibidor de DNMT1 que apresenta desmetilação *in vivo* e *in vitro* (Suzuki et al., 2010 *cit in* Nebbioso et al., 2009). Esta molécula é responsável pela re-expressão de genes silenciados por hipermetilação. Embora apresente uma atividade e resultados estupendos, o RG108 ainda se encontra em fase de estudos pré-clínicos.

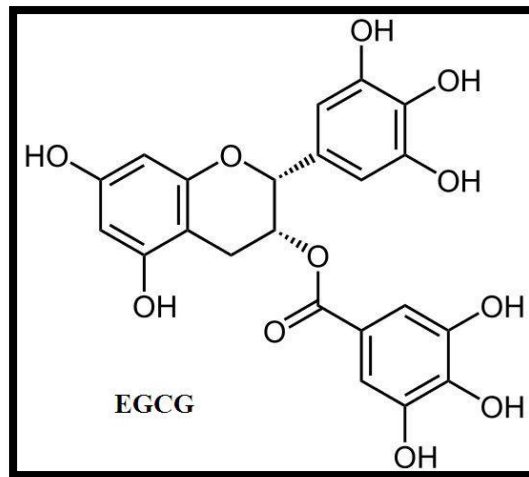


**Figura 17:** Fórmula química dos inibidores de DNMT, da sub-classe das moléculas pequenas, RG108 (RG108, 2005)

### *Moléculas naturais*

A sub-classe das moléculas naturais apresenta neste momento algumas alternativas para a quimioprevenção do cancro. Moléculas como psammaplins, encontradas numa esponja marinha apresentam inibição para DNMT1 e para HDAC, através dum mecanismo, que mesmo em concentrações baixas, apresenta um poderoso efeito citotóxico na linha de células tumorais humanas e impede a progressão de células tumorais, segundo um ensaio realizado com o pulmão de um rato. Importante referir que que neste mesmo estudo a inibição de DNMT não foi seguida de desmetilação de DNA e re-expressão de genes supressores tumorais, indicando que poderá existir outro alvo intracelular diferente da enzima DNMT1 responsável pelo efeito citotóxico da molécula (Baud et al., 2012).

Existe outro composto de origem natural pertencente à classe de polifenóis presentes no chá denominado de EGCG (Figura 18), que apresenta um poder inibitório bastante elevado para a enzima catecol-O-metiltransferase (COMT), sendo esta uma enzima de estrutura similar às DNMT, e como já provado em estudos pré-clínicos apresenta uma forte ação inibitória de DNMT, induzindo a necrose e apoptose celular em diversos tipos de cancro (Gu et al., 2009 *cit in* Nebbioso et al., 2009).



**Figura 18:** Fórmula química do inibidor de DNMT, da sub-classe das moléculas naturais, EGCG (EGCG – The amazing antioxidante found in green tea,1985)

A principal preocupação relativamente aos produtos naturais prende-se com o processo de obtenção, uma vez que poderão existir diversas fontes e por consequência tipos de extratos de diferentes origens que podem não conter a atividade desejada (Nebbioso et al., 2009).

#### *Oligonucleótidos antisense inibidores de DNMT*

Os oligonucleótidos antisense são sequências curtas complementares ao mRNA, que quando se ligam inativam-no e bloqueiam a transcrição. O intuito da utilização destes oligonucleótidos foi criar um que se ligue especificamente à enzima DNMT1 uma vez que as células tumorais aumentam os níveis de DNMTs (Nebbioso et al., 2009).

Existe um inibidor específico de DNMT denominado de MG98 que além de bloquear a expressão de DNMT1, inibe a replicação de DNA em geral. Em geral o problema encontrado nos ensaios clínicos até agora realizados foi uma estimulação de genes específicos de tecidos levando ao aparecimento de tumores ou pela ausência de resposta no caso de cancro do rim.

### **III. Conclusão e perspectivas futuras**

As diferentes modificações pós-traducionais, que acontecem nos diferentes mecanismos epigenéticos, quando são efetuadas de forma aberrante, originam diferentes patologias, nomeadamente cancro. Os fármacos que intervêm inibindo as enzimas presentes nesses mesmos mecanismos, apresentam atividade indutora relativamente à diferenciação e apoptose celular, tornando-se uma alternativa fiável para o tratamento de diversos tipos de cancro. Além dos diferentes mecanismos de ação, os fármacos que tem por alvo o epigenoma apresentam diversos mecanismos de forma a ativar o complexo mediador da atividade transcricional, resultando numa reativação dos genes supressores de tumores e na repressão dos oncogenes.

Os fármacos descritos nesta Dissertação apresentam diversas características e por todos os seus efeitos, a terapia ligada à epigenética apresenta-se como uma aposta confiável. Existem já diversos ensaios clínicos em curso e até já existem fármacos aprovados pela FDA e pela EMEA para o tratamento de linfoma cutâneo de células T, como é o caso do vorinostat. No entanto, a terapia combinada entre os diversos tipos de fármacos epigenéticos apresenta-se como a melhor alternativa, uma vez que, os resultados indicados por esses mesmos estudos demonstram melhorias, tais como, um aumento da tolerância, requerem menor dosagens de cada um dos fármacos envolvidos e os efeitos adversos são reduzidos quando estes são utilizados em conjunto, como podemos verificar no caso dos inibidores de DNMT, subclasse dos análogos nucleósidos, nomeadamente no decitabine.

A terapia personalizada apresenta-se como uma inovação ainda em curso, mas apresenta novidades como o fato de ter em conta as diferenças existentes ao nível de cada paciente, aumentando a eficácia em valores significativos, evitando o uso desnecessário ao nível monetário e evitando ao máximo a toxicidade provocada pelos diferentes fármacos. Na terapia anticancerígena esta alternativa à terapia generalizada exige a descoberta de um método que consiga prever a eficácia dos diferentes fármacos de forma a haver uma aplicação clínica com as diferentes vantagens associadas.

Em suma, os fármacos que tem por alvo o epigenoma apresentam demasiados benefícios para caírem em esquecimento ou até em desuso, sendo apenas necessário uma pesquisa mais intensiva relativamente a estes fármacos de forma a colmatar deficiências na terapêutica existentes nas diversas patologias.

## Bibliografia

Ácido Anacárdico. [Em Linha]. Disponível em <<http://www.sct.embrapa.br/500p500r/Resposta.asp?CodigoProduto=00063740&CodigoCapitulo=31&CodigoTopico=&CodigoPR=1032>>. [Consultado em 9/9/2013].

Alcain, F.J. e Villalba, J.M. (2009). Sirtuins inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 19, pp. 283-294.

Anticonvulsivantes na medicina veterinária. [Em Linha]. Disponível em <<http://www.infoescola.com/farmacologia/anticonvulsivantes-na-medicina-veterinaria/>>. [Consultado em 9/9/2013].

Arce, C. *et alii*. (2006). A proof-of-principle study of epigenetic therapy added to neoadjuvant doxorubicin cyclophosphamide for locally advanced breast cancer. *PLoS One*, 1, e 98.

Azacitadina – Mecanismo de ação. [Em Linha]. Disponível em <[http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0910/azacitidina/azacitidina\\_ficheiros/page0005.htm](http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0910/azacitidina/azacitidina_ficheiros/page0005.htm)>. [Consultado em 9/9/2013].

Balasubramanyam, K. *et alii*. (2004). Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, pp. 51163-51171.

Baud, M.G. *et alii*. (2012). Defining the mechanism of action and enzymatic selectivity of psammaplin A against its epigenetic targets. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55, pp. 1731-1750.

Belinostat. [Em Linha]. Disponível em <<http://www.exchemistry.com/histone-deacetylase-inhibitors/PXD101.html>>. [Consultado em 9/9/2013].

Bix-01294. [Em Linha]. Disponível em <<http://www.enzolifesciences.com/ALX-270-473/bix-01294/>>. [Consultado em 9/9/2013].

Blackwell, L. *et alii.* (2008). The use of diversity profiling to characterize chemical modulators of histone deacetylases. *Life Sciences*, 82, pp. 1050-1058.

Bolden, J.E., Peart, M.J. e Johnstone, R.W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, pp. 769-784.

Buchholz, F. e Hauber, J. (2013). Engineered DNA modifying enzymes: Components of a future strategy to cure HIV/AIDS. *Antiviral Research*, 97, pp. 211-217.

Candelaria, M. (2010). Epigenetic therapy and cisplatin chemoradiation in FIGO stage IIIB cervical cancer. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 31, pp. 386-391.

Chaetocin. [Em Linha]. Disponível em <<http://www.enzolifesciences.com/BML-GR349/chaetocin/>>. [Consultado em 9/9/2013].

Chetomin. [Em Linha]. Disponível em <<http://www.enzolifesciences.com/ALX-350-128/chetomin/>>. [Consultado em 9/9/2013].

DeCarlo, D. e Hadden, M.K. (2012). Oncoepigenomics: Making histone lysine methylation count. *European Journal of Medical Chemistry*, 56, pp. 179-194.

Dell'Aversana, C, Lepore, I. e Altucci, L. (2012). HDAC modulation and cell death in the clinic. *Experimental Cell Research*, 318, pp. 1229-1244.

Dokmanovic, M., Clarke, C. e Marks, P.A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Molecular Cancer Research*, 5, pp. 981-989.

Dowdell, K.C *et alii.* (2009). Valproic acid (VPA), a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, diminishes lymphoproliferation in the Fas<sup>-</sup>deficient RL/lpr<sup>(-/-)</sup> murine model of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Experimental Hematology*, 37, pp. 487-494.

Dznep. [Em Linha]. Disponível em <<http://www.selleckchem.com/products/3-deazaneplanocin-a-dznep.html>>. [Consultado em 9/9/2013].

Edelstein, L.C. *et alii.* (2009). Short Communication: Activation of Latent HIV Type 1 Gene Expression by Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA), an HDAC Inhibitor Approved for Use to Treat Cutaneous T Cell Lymphoma. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 25(9), pp. 883-887.

EGCG – The amazing antioxidant found in green tea. [Em Linha]. Disponível em <<http://www.myjapanesegreentea.com/egcg>>. [Consultado em 9/9/2013].

Egger, G. *et alii.* (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429(6990), pp. 457-463.

Entinostat. [Em Linha]. Disponível em <<http://www.chemnet.com/dict/dict--209783-80-2--in.html>>. [Consultado em 9/9/2013].

Epigenetics. [Em Linha]. Disponível em <<http://www.atdbio.com/content/56/Epigenetics>>. [Consultado em 9/9/2013].

Flush the hidden Hiv out. [Em Linha]. Disponível em <<http://varuncnmicro.blogspot.pt/2012/03/flush-hidden-hiv-out.html>>. [Consultado em 9/9/2013].

Frankin, T.B. e Mansuy, I.M. (2011). The involvement of epigenetic defects in mental retardation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96, pp. 61-67.

Fullgrabe, F., Kavanagh, E. e Joseph, B. (2011). Histone onco-modifications. *Oncogene*, 30, pp. 3391-3403.

Garcinol. [Em Linha]. Disponível em <<http://www.enzolifesciences.com/BML-GR343/garcinol/>>. [Consultado em 9/9/2013].

Gliotoxin. [Em Linha]. Disponível em <<http://www.enzolifesciences.com/BML-PI129/gliotoxin/>>. [Consultado em 9/9/2013].

Glozak, M.A. e Seto, E. (2007). Histone deacetylases and cancer. *Oncogene*, 26, pp. 5420-5432

Guil, S. e Esteller, M. (2009). DNA methylomes, histone codes and miRNAs: Tying it all together. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41, pp. 87-95.

Hake, S. B., Xiao, A. e Allis, C.D. (2004). Linking the epigenetic "language" of covalent histone modifications to cancer. *British Journal of Cancer*, 90, pp. 761-769.

Jablonka, E. e Lamb, M.J. (2002). The Changing Concept of Epigenetics. *Annals New York Academy of Sciences*, 981, pp. 82-96.

Jones, P.A. e Baylin, S.B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* 128, pp. 683-692.

Kooistra, S.M. e Helin, K. (2012). Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, pp. 297-311.

Kuendgen, A. *et alii*. (2011). Treatment of poor-risk myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with a combination of 5-azacytidine and valproic acid. *Clinical Epigenetics*, 2, pp. 389-399.

Lovtrup, S. (1974). *Epigenetics: A Treatise on Theoretical Biology*. Londres. John Wiley & Sons.

Mai, A. e Altucci, L. (2009). Epi-drugs to fight cancer: from chemistry to cancer treatment, the road ahead. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(1), pp. 199-213.

Marks, P.W. (2012). Decitabine for acute myeloid leukemia. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 12, pp. 299-305.

McGuinness, D. *et alii.* (2011). Sirtuins, bioageing and cancer. *Journal of Aging Research*, 235754.

Minucci, S. e Pelicci, P.G. (2006). Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6, pp. 38-51.

Mocetinostat. [Em linha]. Disponível em <[http://www.antialabs.com/product.php?id\\_product=334](http://www.antialabs.com/product.php?id_product=334)>. [Consultado em 9/9/2013].

Nebbioso, A. *et alii.* (2012). Trial with "epigenetic" drugs: An update. *Molecular Oncology*, 6, pp. 657-682.

Núcleo - Assunto novo. [Em linha]. Disponível em <<http://estudodavida-guada.blogspot.pt/2011/04/nucleo-assunto-novo.html>>. [Consultado em 9/9/2013].

O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. [Em linha]. Disponível em <[http://www.jornaldepneumologia.com.br/detalhe\\_artigo.asp?id=449](http://www.jornaldepneumologia.com.br/detalhe_artigo.asp?id=449)>, [Consultado em 9/9/2013].

Outeiro, T.F. *et alii.* (2007). Sirtuin 2 Inhibitors Rescue  $\alpha$ -Synuclein-Mediated Toxicity in Models of Parkinson's Disease. *Science*, 317, pp. 516-519.

Panobinostat. [Em linha]. Disponível em <<http://www.exchemistry.com/histone-deacetylase-inhibitors/LBH-589.html>>. [Consultado em 9/9/2013].

Peng, X., Pentassuglia, L. e Sawyer, D.B. (2010). Emerging anticancer therapeutic targets and the cardiovascular system: is there cause for concern? *Circulation Research*, 106, pp. 1022-1034.

Pivanex. [Em linha]. Disponível em <<http://www.chemnet.com/Global/Products/Pivanex/Suppliers-0-0.html>>. [Consultado em 9/9/2013].

Pracinostat. [Em linha]. Disponível em <http://www.selleckchem.com/products/SB939.html>. [Consultado em 9/9/2013].

Procainamida. [Em linha]. Disponível em [http://www.ctsaci.com.br/reagente.php?Produto=Procainamida%20%20%20%20%20%20%20%20&id\\_reagentes=7535&m\\_reagentes=1](http://www.ctsaci.com.br/reagente.php?Produto=Procainamida%20%20%20%20%20%20%20%20&id_reagentes=7535&m_reagentes=1). [Consultado em 9/9/2013].

RG108. [Em linha]. Disponível em <http://www.stemgent.com/products/show/2#>. [Consultado em 9/9/2013].

Romidepsin. [Em linha]. Disponível em <http://www.medchemexpress.com/product/Romidepsin.html>. [Consultado em 9/9/2013].

Shankar, S. e Srivastava, R.K. (2008). Histone deacetylase inhibitors: mechanisms and clinical significance in cancer: HDAC inhibitor-induced apoptosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 615, pp. 261-298.

Sodium phenylbutyrate. [Em linha]. Disponível em <http://www.medchemexpress.com/product/Sodium-phenylbutyrate.html>. [Consultado em 9/9/2013].

Szyf, M. (2009). Epigenetics, DNA Methylation and Chromatin Modifying Drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 49, pp. 243-263.

Tranilcipromina. [Em linha]. Disponível em [http://www.ctsaci.com.br/reagente.php?Produto=Tranilcipromina%20%20%20%20%20%20%20%20&id\\_reagentes=8936&m\\_reagentes=1](http://www.ctsaci.com.br/reagente.php?Produto=Tranilcipromina%20%20%20%20%20%20%20%20&id_reagentes=8936&m_reagentes=1). [Consultado em 9/9/2013].

Turner, B.M. (2011). Environmental sensing by chromatin: An epigenetic contribution to evolutionary change. *FEBS Letters*, 585, pp. 2032-2040.

Vaissière, T., Sawan, C. e Herceg, Z. (2008). Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutation Research*, 659, pp. 40-48.

Vaquero, A. (2009). The conserved role of sirtuins in chromatin regulation. *The International Journal of Developmental Biology*, 53, pp. 303-322.

Verbrugge, I., Johnstone, R.W. e Bots, M. (2011). Promises and challenges of anticancer drugs that target the epigenome. *Epigenomics*, 3(5), pp. 547-565.

Xu, W.S., Parmigiani, R.B. e Marks, P.A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, 26, pp. 5541-5552.