



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia

**ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO NOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA  
TUMORAL EM CÉLULAS LINFOBLÁSTICAS LEUCÊMICAS**

**Mirela Machado Hangai**

Florianópolis - SC, Março 2007.

**MIRELA MACHADO HANGAI**

**ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO NOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA  
TUMORAL EM CÉLULAS LINFOBLÁSTICAS LEUCÊMICAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmácia. Área de concentração: Análises Clínicas

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Cláudia Santos da Silva

Co-Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tânia Beatriz Creczynski Pasa

Florianópolis - SC, Março 2007.

**Mirela Machado Hangai**

**ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO NOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA  
TUMORAL EM CÉLULAS LINFOBLÁSTICAS LEUCÊMICAS**

Esta Dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de  
**Mestre em Farmácia no Programa de Pós-Graduação em Farmácia** da  
Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 29 de março de 2007.

---

Prof. Dr. Marcos Antônio Segatto Silva  
Coordenador do Programa

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tânia B. Creczynski Pasa  
Co-Orientadora

---

Prof. Dr. Jamil Assreuy  
(FARMACOLOGIA - UFSC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Luiza Bazzo  
(ACL - UFSC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thereza Christina Barja  
Fidalgo  
(FARMACOLOGIA - UERJ)

## AGRADECIMENTOS

Ao Adrián por razões que não se podem expressar com palavras, mas são sabidas profundamente por nós dois.

À minha família pelo apoio emocional e paciência.

À professora Maria Cláudia Santos da Silva pela oportunidade, pelos conhecimentos transmitidos, pela dedicação e orientação ao trabalho.

À professora Tânia Beatriz Creczynski Pasa pela co-orientação e confiança durante estes anos.

À professora Maria Luiza Bazzo e às colegas Nicéia, Samira e Daniela por toda ajuda técnico-científica e atenção prestada.

Ao professor Jamil Assreuy pela grande contribuição ao trabalho.

Ao professor Neivo Navarini pelas correções gramaticais.

Às minhas companheiras de laboratório, pessoas com as quais compartilhei assuntos técnicos e filosóficos. Em especial à Marley e às Alines, pela amizade e ajuda nos momentos de dificuldades.

Aos colegas do Laboratório de Bioenergética e Bioquímica de Macromoléculas pelo companheirismo. Em especial à Claudriana, por todo o auxílio, atenção e boa vontade.

A CAPES que confiou em meu trabalho e outorgou a bolsa para este mestrado.

Por fim, a todos os que contribuíram de alguma forma com este trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>X</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XIII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XIV</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1 CÂNCER E LEUCEMIA: PRINCÍPIOS GERAIS .....	4
2.2 NECROSE E APOPTOSE .....	8
2.3 ÓXIDO NÍTRICO: IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA E ENVOLVIMENTO NO CÂNCER E NA LEUCEMIA.....	14
2.4 GLUTATIONA: DEFINIÇÃO, SÍNTESE, DEGRADAÇÃO E IMPORTÂNCIA FISIOLÓGICA E PATOLÓGICA.....	19
2.5 DESREGULAÇÃO DA APOPTOSE E RESISTÊNCIA .....	22
2.6 A FAMÍLIA DE PROTEÍNAS DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLOS FÁRMACOS MRP/ABCC	27
2.7 MRP1 – PROTEÍNA DE RESISTÊNCIA ASSOCIADA A MÚLTIPLOS FÁRMACOS 1 E SUA RELAÇÃO COM O CÂNCER.....	29
2.8 ENVOLVIMENTO DA GLUTATIONA NO TRANSPORTE MEDIADO PELA MRP1 .....	30
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
3.1 GERAL .....	36
3.2 ESPECÍFICOS .....	36
<b>4. MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
4.1 ARTIGO SUBMETIDO: INVOLVEMENT OF NITRIC OXIDE ON MRP1 ACTIVITY IN L-1210 LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA CELLS.....	38
4.1.1 ABSTRACT .....	40
4.1.2 INTRODUCTION.....	41
4.1.3 MATERIALS AND METHODS .....	43
4.1.3.1 Reagents .....	43
4.1.3.2 Cell culture.....	43
4.1.3.3 Treatments and viability assay (MTT assay).....	43
4.1.3.4 DNA fragmentation analysis by gel electrophoresis .....	44

4.1.3.5	Glutathione measurement .....	44
4.1.3.6	MRP- related transport activity .....	44
4.1.3.7	MRP1 expression .....	45
4.1.3.8	Statistical analysis .....	45
<b>4.1.4</b>	<b>RESULTS .....</b>	<b>46</b>
4.1.4.1	Effect of SNAP and NTG on cytotoxicity of L-1210 cells.....	46
4.1.4.2	Effect of SNAP and BSO on GSH levels in L-1210 cells.....	47
4.1.4.3	MRP1-related transport activity .....	48
4.1.3.4	Effect of SNAP and/or BSO on CFDA intracellular accumulation .....	50
4.1.4.5	Effect of SNAP and/or BSO on MRP1 expression in L-1210 cells .....	53
<b>4.1.5</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1.6</b>	<b>ACKNOWLEDGEMENTS .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1.7</b>	<b>REFERENCES .....</b>	<b>58</b>
<b>4.2</b>	<b>MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS ADICIONAIS .....</b>	<b>64</b>
<b>4.2.1</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS ADICIONAIS .....</b>	<b>64</b>
4.2.1.1	Reagentes .....	64
4.2.1.2	Linhagem Celular.....	64
4.2.1.3	Tratamentos.....	65
4.2.1.4	Determinação da Concentração de ATP (Luciferin – luciferase) .....	65
4.2.1.5	Análise Estatística .....	65
<b>4.2.2</b>	<b>RESULTADOS ADICIONAIS .....</b>	<b>67</b>
4.2.2.1	Fragmentação do DNA causada pelo SNAP e pela GTN, em células de linhagem linfoblástica leucêmica murina L-1210.....	67
4.2.2.2	Efeito do BSO e do SNAP sobre a citotoxicidade e sobre a concentração de glutathione, em células de linhagem linfoblástica leucêmica murina L-1210 .....	68
4.2.2.3	Efeito do inibidor da MRP probenecide, sobre a viabilidade de células de linhagem linfoblástica leucêmica murina L-1210.....	70
4.2.2.4	Depleção energética causada pelo SNAP, em células de linhagem linfoblástica leucêmica murina L-121071 .....	71
4.2.2.5	Depleção energética em células de linhagem linfoblástica leucêmica murina L-1210, após 6 horas de tratamento com SNAP .....	72
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>73</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>83</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Esquema 1:</b> Alterações morfológicas observadas na apoptose e na necrose.	10
<b>Esquema 2:</b> Duas principais vias da apoptose: intrínseca (mitocondrial) e extrínseca (receptores de morte).....	11
<b>Esquema 3:</b> Etapas bioquímicas envolvidas na biossíntese de óxido nítrico pela óxido nítrico sintase.....	15
<b>Esquema 4:</b> Síntese e degradação da glutathiona.....	20
<b>Esquema 5:</b> Ciclo redox da glutathiona.....	21
<b>Esquema 6:</b> Topologia estrutural proposta para as proteínas MRP.....	28
<b>Esquema 7:</b> A GSH é um substrato e um co-substrato para MRP1, porém, os mecanismos exatos de transporte não estão bem definidos.....	31
<b>Esquema 8:</b> Mecanismo de resistência proposto: envolvimento do NO e da glutathiona sobre a MRP1 em células de linhagem linfoblástica leucêmica L-1210.....	79
<b>Figure 1:</b> Cytotoxicity of SNAP and NTG on murine lymphoblastic leukemia L-1210 cell line.....	46
<b>Figure 2:</b> Effect of SNAP and BSO on GSH levels in L-1210 cells.....	47
<b>Figure 3:</b> Dose-dependent inhibition of MRP1 activity by probenecid.....	49
<b>Figure 4:</b> Effect of SNAP or BSO on CFDA accumulation.....	51
<b>Figure 5:</b> Effect of SNAP and BSO co-treatment on CFDA intracellular accumulation.....	52
<b>Figure 6:</b> Expression of MRP1 in L1210 cells.....	53
<b>Figura 7:</b> Fragmentação do DNA causada pelo SNAP e GTN em células de linhagem linfoblástica leucêmica murina (L-1210).....	67
<b>Figura 8:</b> Efeito do SNAP, associados ou não a L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO), sobre a citotoxicidade e a concentração de glutathiona total em células de linhagem linfoblástica leucêmica murina (L-1210).....	69
<b>Figura 9:</b> Efeito do probenecide (PB) sobre a viabilidade de células de linhagem linfoblástica leucêmica murina (L-1210).....	70

<b>Figura 10:</b> Efeito do SNAP sobre a concentração de ATP em células de linhagem linfoblástica leucêmica murina (L-1210).....	71
<b>Figura 11:</b> Efeito do SNAP sobre a concentração de ATP em células de linhagem linfoblástica leucêmica murina (L-1210).....	72



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Propriedades bioquímicas, regulação e função das três isoformas de óxido nítrico sintases.....	16
<b>Tabela 2:</b> Mecanismos de resistência à apoptose.....	23
<b>Tabela 3:</b> GSH e compostos (substratos) que podem afetar o transporte sobre a MRP1.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	<i>ATP-binding cassette</i> (bombas de efluxo de fármacos dependentes de ATP)
AIF	<i>Apoptosis-inducing factor</i> (fator indutor da apoptose)
AMP	Adenosina monofosfato
APAF-1	<i>Apoptotic protease activating factor - 1</i> (fator ativador de proteases 1)
ATP	Adenosina trifosfato
AUTO	<i>Autofluorescence</i>
Bcl-2	Proteína anti-apoptótica
BSO	L-butionina (S,R)-sulfoximina
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (grupo de diferenciação)
CF	Carboxi-5',6' diclorofluoresceína
CFDA	Carboxi-5',6' diclorofluoresceína diacetato
CIS	Cisteína
cMOAT	Transportador de ânion orgânico multi-específico canalicular
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
DISC	<i>Death-inducing signalling complex</i> (complexo sinalizador iniciador da apoptose)
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DR	<i>Death receptor</i> (receptores de morte)
DTNB	5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico
EDRF	<i>Endothelial-derived relaxing factor</i> (fator de relaxamento derivado do endotélio)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGIL	Grupo Europeu para a Classificação Imunológica das Leucemias
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FAB	Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i> (proteína adaptadora associada à proteína Fas com um domínio de morte)

Fas	Receptor de superfície celular
FLIPs	<i>FADD-like interleukin-1<math>\beta</math> converting enzyme-like protease inhibitory protein</i>
FMN	Mononucleotídeo de flavina
FSC	<i>Forward scatter</i> - parâmetro que avalia o tamanho celular
$\gamma$ -GCS	Gama-glutamilcisteína sintetase
GLI	Glicina
GLU	Glutamato
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
gpP / ABCB1	Glicoproteína P
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
$\gamma$ -GT	Gama-glutamiltranspeptidase
GTN / NTG	Nitroglicerina/ <i>Nitroglycerin</i>
HLA-DR	Antígeno de histocompatibilidade de classe 2
I $\kappa$ B	Proteína inibitória kappa B
IAPs	Proteínas inibidoras da apoptose
ICAD	<i>Inhibitor of caspase-activated DNase</i> (inibidor da DNase ativada por caspase)
INCA	Instituto Nacional do cancer
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
kDa	Kilo Dalton
L-1210	Células de linhagem de leucemia linfoblástica aguda murina
LLA	Leucemia linfóide aguda
LMA	Leucemia mielóide aguda
MDR	<i>Multidrug resistance</i> (resistência a múltiplos fármacos)
MRP1 / ABCC1	<i>Multidrug-resistance-associated protein</i> (proteína associada à resistência a múltiplos fármacos 1)
MSDs	Domínios <i>spanning</i> de membrana
MTT	Método do brometo de dimetilazol difeniltetrazólio
NAC	N-acetilcisteína

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NBDs	Sítios de ligação de nucleotídeos
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NH <sub>2</sub>	Amino
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintases
OMS	Organização Mundial de Saúde
p53	Proteína supressora de tumor p53
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase
PB	Probenecide
PBS	Salina tamponada com fosfatos
RNOS	Espécies reativas de oxigênio derivadas do óxido nítrico
Smac	Ativador secundário de caspases derivado da mitocôndria (Smac; <i>second mitochondrial-derived activator of caspases</i> )
SNAP	S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina
SSC	<i>Side scatter</i> - parâmetro que determina a complexidade e a granulidade celular
TE	Tampão Tris-HCl EDTA
THB <sub>4</sub>	Tetra-hidrobiopterina
TNB	2-nitrobenzóico
TNFR1	Fator de necrose tumoral (receptor de sinalização celular)
WHO	World Health Organization

## RESUMO

A ausência de resposta ao tratamento do câncer está relacionada com diversas causas, resultando na incapacidade do quimioterápico em induzir a morte da célula tumoral. O principal obstáculo é o fenômeno conhecido como resistência a múltiplos fármacos (MDR), que resulta do aumento da extrusão de uma variedade de compostos quimioterápicos, com conseqüente redução do seu acúmulo no interior da célula. Dentre os fatores que podem originar o fenótipo MDR, encontra-se a ativação ou superexpressão de proteínas exportadoras de fármacos, que pertencem à família de transportadores ABC (*ATP Binding-Cassette*), como, por exemplo, a proteína de resistência associada a múltiplos fármacos 1 (MRP1). Vários trabalhos demonstraram que a expressão de MRP tem sido relacionada como um fator de prognóstico desfavorável, em diferentes neoplasias hematológicas não tratadas e refratárias a quimioterapia, incluindo as leucemias linfoblásticas agudas. Além disso, as MRPs, como a MRP1 e a MRP2, transportam compostos quimioterápicos para fora das células conjugadas à GSH. No entanto, a interação entre GSH e MRP1 é complexa e não está completamente esclarecida. Por outro lado, está demonstrado que a redução da concentração de GSH diminui a resistência mediada pela MRP1, contra alcalóides da vinca e antraciclinas. Demonstramos, anteriormente, que o NO promoveu a diminuição da concentração de GSH e a morte celular, em células linfoblásticas leucêmicas CEM, e esses efeitos foram potencializados pelo BSO (L-butionina-[S,R]-sulfoximina), um inibidor da  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetase, enzima chave na síntese de GSH *de novo*. Como a GSH é importante para o transporte mediado pela MRP1, no presente trabalho investigamos o envolvimento da depleção da GSH, induzida pelo NO, na atividade e expressão da MRP1, em células de linhagem linfoblástica leucêmica L-1210. Nossos resultados demonstraram que a MRP1 está ativa nas células L-1210, e esta atividade foi inibida pelo NO na presença ou ausência de BSO. A associação do NO e BSO resultou em um efeito sinérgico sobre a inibição da atividade e redução da expressão da MRP1. Estes resultados nos permitem sugerir que um dos prováveis mecanismos de inibição da atividade da MRP1 pelo NO, em células linfoblásticas leucêmicas L-1210, seja de forma indireta, através da depleção de GSH e inibição da síntese *de novo* de GSH. Dessa forma, concluímos que doadores de NO poderiam ser usados, associados aos quimioterápicos que fazem parte do protocolo de tratamento terapêutico da leucemia linfoblástica, como uma nova estratégia de inibição da MRP1.

## ABSTRACT

The lack of response to cancer treatments is related to several causes, resulting in chemotherapy inability to induce tumoral cell death. The major obstacle is the multidrug resistance (MDR) phenomenon that is the extrusion of chemotherapy drugs variety from the cells. The principal factor which can promote MDR phenotype is the activation or superexpression of drugs exporter proteins, including ABC transporters (*ATP Binding-Cassette*) family, for example, multidrug resistance associated protein 1 (MRP1). Several works confirm that MRP expression have been related as an unfavorable diagnosis factor in different hematological neoplasias non treated and refractories to chemotherapy, including murine lymphoblastic leukemia. In fact, MRPs, like MRP1 and MRP2 transport chemotherapy agents out of cells when conjugated to glutathione (GSH). However the interaction between GSH and MRP1 is complex and not yet completely understood. On other side, it was demonstrated that decreasing intracellular GSH levels reduces the resistance related to MRP1 against vinca alkaloids and anthracyclines. It was showed that NO induced GSH decrease and cellular death in lymphoblastic leukemia cells (CEM) and these effects was enhanced by BSO (L-butionina-[S,R]-sulfoximina). BSO is an  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetase inhibitor, a key enzyme in GSH synthesis. Since GSH is important for the drugs transport related to MRP1, in this work we studied the involvement of NO-induced GSH depletion on MRP1 activity and expression in murine lymphoblastic leukemia L-1210 cell line. These results demonstrated that MRP1 is active in this cell line and its activity was inhibited by NO in the presence or absence of BSO. The association of NO and BSO resulted in a synergistic effect on inhibition and expression reduction of MRP1. The results suggest that the probably inhibition mechanism of MRP1 activity by NO is indirectly through the GSH depletion and inhibition of *de novo* synthesis in murine lymphoblastic leukemia L-1210 cell line. Thus we suggest that NO can be used in association with treatments protocols chemotherapy of lymphoblastic leukemia, like a new MRP1 inhibition strategy.

## 1. INTRODUÇÃO

Câncer é uma denominação utilizada para descrever um grupo de doenças, que se caracteriza pela proliferação desordenada de células e pela incapacidade de diferenciação celular (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

O câncer é diagnosticado em mais de 11 milhões de pessoas por ano e causa a morte de cerca de sete milhões de pessoas, neste mesmo período, em todo o mundo (WHO, 2007). No Brasil, o câncer é a segunda causa de morte, representando 12% do total de óbitos registrados (KLIGERMAN, 2001). Segundo dados do Ministério da Saúde, a estimativa de novos casos de câncer, para o ano de 2006, foi de 472.050 (INCA 2006). Em Santa Catarina, a estimativa de novos casos de leucemias, para o ano de 2006, foi de 7,35 para 100.000 homens e 5,27 para 100.000 mulheres (INCA 2006). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o número de novos casos de câncer aumentará 50% nos próximos 20 anos, sendo que 60% ocorrerão nos países menos desenvolvidos. A quantidade de novos casos de câncer em um ano, no Brasil, é maior do que a de casos acumulados de AIDS, em 24 anos (INCA 2006). Esta incidência justifica novos investimentos em pesquisa na área de biologia tumoral, no que se refere ao tratamento e à definição dos fatores de risco para estabelecer prioridades na prevenção, planejamento e gerenciamento dos serviços de saúde (INCA 2006).

As leucemias constituem um grupo de neoplasias malignas, caracterizado pela proliferação descontrolada de células hematopoiéticas na medula óssea e nos tecidos linfóides, que, posteriormente, atingem a circulação periférica e podem infiltrar-se em outros sistemas orgânicos (DIPIRO *et al.*, 2002, BAIN, 2003). A proliferação descontrolada de células leucêmicas inibe a produção das células sanguíneas normais, como os leucócitos, os eritrócitos e as plaquetas. Em decorrência da não-funcionalidade das células leucêmicas, os indivíduos afetados, além de sofrerem de anemia e de desordens hemorrágicas, estão mais sujeitos a infecções (BAIN, 2003, BASSAN *et al.*, 2004, GUIMARÃES, 2004). Diversas formas de terapia vêm sendo utilizadas no tratamento de leucemias, como: radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e transplante de medula óssea. No entanto, embora o transplante de medula óssea seja eficaz na remissão completa das leucemias, apresenta restrições clínicas e sócio-econômicas para o paciente. Por isso, a

quimioterapia ainda é a forma de tratamento mais utilizada (GOLAB *et al.*, 2001). A utilização de compostos anticâncer visa a inibir a proliferação celular (HERR & DEBATIN, 2001), induzir à apoptose, ou diferenciação celular, o que, invariavelmente, induzirá à apoptose (LESZCZYNIECKA *et al.*, 2001).

Pelo menos dois fatores podem ser responsáveis pelo insucesso no tratamento de leucemias agudas (LA): a morte precoce do paciente ou a resistência ao tratamento (ESTEY, 2001). Diversos trabalhos mostram mecanismos celulares relacionados com a resistência das células leucêmicas à apoptose, induzida por quimioterápicos e/ou outros compostos (ZAMAN *et al.*, 1995; BALLATORI *et al.*, 2005; OZBEN, 2006). O estudo desses mecanismos permite-nos desenvolver compostos antineoplásicos, com citotoxicidade mais específica para as células tumorais e com menos efeitos adversos para o paciente.

A resistência adquirida ou intrínseca a múltiplos quimioterápicos é o maior obstáculo clínico no tratamento de neoplasias hematológicas (GOLDIE, 2001; OZBEN, 2006). Diferentes mecanismos estão envolvidos no fenômeno conhecido como resistência a múltiplos fármacos (MDR). Entretanto, a MDR está freqüentemente associada à superexpressão de uma classe de proteínas transportadoras de membrana, conhecidas como ABC-transportadoras (bombas de efluxo de drogas dependentes de ATP), como a glicoproteína P (Pgp/ABCB1) e a proteína associada à resistência a múltiplos fármacos 1 (MRP1/ABCC1), as quais levam à diminuição da concentração intracelular de vários compostos (KRISHNA & MAYER, 2000; LEITE, *et al.*, 2006).

A família das proteínas associadas à resistência a múltiplos fármacos (MRP) é composta por nove membros: MRP1, MRP2, MRP3, MRP4, MRP5, MRP6, MRP7, MRP8 e MRP9 (HOOIJBERG, *et al.*, 2006). A mesma está amplamente distribuída nos tecidos normais (KRISHNA & MAYER, 2000; LESLIE *et al.*, 2005; HOOIJBERG, *et al.*, 2006). Porém, em células tumorais, há um aumento da expressão de MRP, que pode ser responsável pela resistência celular contra muitos agentes. Contudo, a relação entre a expressão da MRP e a resposta das células tumorais à quimioterapia tem sido objeto de muitos estudos (HOOIJBERG *et al.*, 2006). Sabe-se que a expressão da MRP1 foi detectada em vários tumores sólidos, como, por exemplo, câncer de mama, ovário, próstata, melanomas etc. (HOOIJBERG, *et al.*, 2006) e, também em tumores hematológicos, como na leucemia linfoblástica aguda (SAUERBREY *et al.*, 2002; STAM *et al.*, 2004).



Vários trabalhos têm demonstrado que as proteínas associadas à MDR, como a MRP1 e a MRP2 transportam compostos quimioterápicos para fora das células conjugadas à GSH (glutathiona reduzida), (O'BRIEN & TEW, 1996; BORST *et al.*, 2000). No entanto, a interação entre GSH e MRP1 é complexa e não está completamente esclarecida. Além disso, está demonstrado que a diminuição da concentração de GSH diminui a resistência mediada pela MRP1, contra alcalóides da vinca e antraciclina (ISHIKAWA *et al.*, 1996; KUO *et al.*, 1998; BORST *et al.*, 2000, SOUZA, 2006). A GSH é fundamental na defesa contra vários agentes tóxicos e, além disso, é um dos alvos intracelulares mais importantes do óxido nítrico (NO). A diminuição da concentração de GSH, pelo NO, aumenta a sensibilidade da célula à ação terapêutica de alguns compostos quimioterápicos (WINK & MITCHELL, 1998).

O NO é um mediador endógeno, envolvido em uma ampla variedade de funções celulares, incluindo regulação da pressão arterial, neurotransmissão e neuromodulação, respostas imunológicas e atividade citotóxica (MONCADA *et al.*, 1991; NAPOLI & IGNARO, 2003). Esta última função está relacionada com o papel do NO na indução à apoptose. Porém, seu papel continua contraditório, pois ele pode exercer efeito pró ou anti-apoptótico (WINK & MITCHELL, 1998; KOLB, 2000; BLAISE *et al.*, 2005). Como efeito pró-apoptótico, estudos indicam que o NO é citotóxico para células de linhagem humana de pacientes com leucemia e linfoma (FILEP *et al.*, 1996). Portanto, a resposta da célula ao NO depende de um complexo sistema de interações moleculares, que é dependente do tempo e da dose, e pode também ser específico do tipo celular (BLAISE *et al.*, 2005).

Santos-Silva *et al.* (2006) demonstraram anteriormente que o NO promoveu a diminuição da concentração de GSH e a apoptose, em células linfoblásticas leucêmicas CEM, e esses efeitos foram potencializados pelo BSO (L-butionina-[S,R]-sulfoximina), um inibidor da  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetase, enzima chave na síntese de GSH *de novo*. Como a GSH é importante para o transporte mediado pela MRP1, no presente trabalho investigamos o envolvimento do NO e da GSH sobre a atividade e expressão da MRP1, em células de linhagem linfoblástica leucêmica L-1210.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CÂNCER E LEUCEMIA: PRINCÍPIOS GERAIS

O câncer, ou neoplasia, refere-se a um conjunto de mais de 100 doenças em que as células apresentam alterações genéticas, que culminam numa desordem no processo de morte celular, o que resulta em crescimento celular anormal, capacidade de invadir tecidos e órgãos e perda de suas funções originais (ROBBINS, 2000; FENECH, 2002).

As causas primárias do câncer são variadas e ainda não estão muito bem explicadas, mas as neoplasias originam-se a partir de mutações genéticas espontâneas ou induzidas por agentes patogênicos, as quais promovem desordem no ciclo celular e, como consequência, elevação na taxa de proliferação e deficiência de morte celular. Este processo leva à formação de clones de células neoplásicas. Em geral, a formação do câncer dá-se lentamente e é o ponto final de um processo que passa por várias etapas antes de formar a massa tumoral, como: (a) fase de iniciação, quando as células sofrem o efeito do agente carcinogênico, que provoca alterações em alguns genes, sem detecção clínica do tumor; (b) fase de promoção, em que a célula transformada é modificada em célula maligna, lenta e gradualmente; (c) fase de progressão, caracterizada pela multiplicação descontrolada e irreversibilidade do processo. Nesta fase, o câncer já está instalado e evolui até o aparecimento das primeiras manifestações clínicas da doença (ROBBINS, 2000, ALMEIDA, *et al.*, 2005).

Os mecanismos de transformação de uma célula normal em neoplásica envolvem vários eventos genéticos e moleculares. Existem, basicamente, dois grupos de genes que desencadeiam a formação do câncer: os proto-oncogenes ativados, que promovem o crescimento celular e impedem sua diferenciação, e os genes supressores de tumor desativados, responsáveis pela diferenciação e limitação da proliferação celular. O desequilíbrio na regulação desse complexo sistema, por meio da ativação dos proto-oncogenes ou por perda da função dos genes supressores de tumor, leva à proliferação celular descontrolada, e também ao acúmulo de sucessivas anormalidades genéticas, características das células neoplásicas (ROBBINS, 2000, DIPIRO *et al.*, 2002, BAIN, 2003).

Em algumas formas de câncer, a origem celular, o local do organismo e a variabilidade genética de cada indivíduo podem influenciar nas características tumorais. Contudo, em alguns tipos, como nas leucemias, o crescimento tumoral é difuso (FRANKS & TEICH, 1998; HANAHAN & WEINBERG, 2000; SANTOS-SILVA, 2002).

Leucemias constituem um grupo de neoplasias malignas, caracterizado pela proliferação descontrolada de células hematopoiéticas na medula óssea e/ou nos tecidos linfóides, que se originam a partir de uma mutação somática em uma única célula-tronco ou célula primordial (*stem cell*), a qual forma o clone leucêmico. As células clonais atingem a circulação periférica e podem se infiltrar em outros sistemas orgânicos (DIPIRO *et al.*, 2002, BAIN, 2003).

A transformação leucêmica pode ocorrer em diferentes fases da diferenciação de precursores linfóides ou mielóides, o que a caracteriza como uma doença heterogênea, sob o aspecto biológico e morfológico. Por constituírem um grupo heterogêneo de doenças, as leucemias diferem-se quanto à etiologia, patogênese, prognóstico e resposta ao tratamento (BAIN, 2003; PUI & EVANS, 1998).

As leucemias são divididas em linfóides e mielóides, e em agudas e crônicas (BAIN, 2003). Nas leucemias agudas há predomínio de progenitores da linhagem linfóide ou mielóide, que recebem a denominação de blastos leucêmicos. Esses blastos são incapazes de se diferenciar em células maduras, devido a um bloqueio de maturação, o que consiste no marco fisiopatológico das leucemias agudas (WANG, 2000, BENE *et al.*, 2001). Entretanto, nas leucemias crônicas quase todas as células são maduras. Em geral, os pacientes com leucemias agudas têm pior prognóstico e, se não forem tratados adequadamente, podem ir a óbito em dias ou semanas (PEJOVIC, 2002, BAIN, 2003).

Durante muitos anos, a classificação para leucemias proposta pelo grupo FAB (*French-American-British Cooperative Group*), em 1976 (Bennett, 1976), modificada em 1988 e 1991 (Bennett, 1988, Bennett, 1991), foi utilizada. Nessa classificação, baseada no aspecto morfológico e nas características citoquímicas dos blastos leucêmicos, as leucemias mielóides agudas (LMA) foram divididas em oito subtipos (M0 a M7) e as leucemias linfóides agudas (LLA), em três subtipos (L1 a L3). No entanto, com a finalidade de superar as limitações da classificação FAB, considerando as características morfológicas, imunofenotípicas e genético-moleculares dos blastos, em 2001, a Organização Mundial de Saúde (OMS), em

conjunto com a Sociedade de Hematologia Americana e a Associação Européia de Hematologia, publicou uma nova classificação para neoplasias do sistema hematopoiético e linfóide. Nessa classificação, foram criadas quatro subcategorias para a LMA, como segue: LMA associadas a anormalidades genéticas recorrentes; LMA com displasia de múltiplas linhagens; LMA/SMD associada a tratamento e LMA não categorizada nos ítems anteriores. Nesta categoria, segundo os critérios citogenéticos, a LMA pode ser classificada, de acordo com o cariótipo, em favorável, intermediário e desfavorável. A LLA foi subdividida, conforme a marcação imunofenotípica, em linhagem B (Pró-B, Comum, Pré-B e LLA-B) e em linhagem T (Pré-T e LLA-T), (JAFFE *et al.*, 2001).

A LLA é uma doença heterogênea, que varia de acordo com a linhagem celular dos linfoblastos leucêmicos, com os diferentes graus de diferenciação e com as alterações genéticas moleculares, representando mais de 90% das anormalidades cromossômicas encontradas (LOPES, 2000). Segundo o Grupo Europeu para a Classificação Imunológica das Leucemias (EGIL), os blastos da linhagem B expressam antígenos específicos para anticorpos monoclonais (CD19, CD79a e CD22), e os blastos de linhagem T, para o anticorpo CD3. Deve-se observar que o antígeno de histocompatibilidade de classe 2 (HLA-DR) é expresso na grande maioria dos casos de LLA de linhagem B, independente do grau de maturação da célula, ao passo que na LLA-T a expressão do HLA-DR está relacionada com um imunofenótipo mais maduro (SZCZEPANSKI *et al.*, 2003).

A LLA é a leucemia mais comum na infância, e corresponde a aproximadamente 30% das formas de câncer que acometem crianças (LOPES, 2000, BASSAN *et al.*, 2004). Atualmente, cerca de 80% dos casos de LLA diagnosticados em crianças atingem remissão completa, após o tratamento quimioterápico. Entretanto, 20% a 25% destes pacientes podem apresentar recidiva da doença durante esse período. Nos pacientes que apresentam recidiva da doença, a sobrevida global diminui para apenas 25% a 30%, nos melhores centros de tratamento. Em adultos, a cura é em torno de 40% menor (BAIN, 2003). A LLA representa cerca de 80% de todos os casos de leucemia em pacientes com até 15 anos de idade. O pico de incidência da doença está entre dois e cinco anos de idade (LOPES, 2000, BASSAN *et al.*, 2004). No Brasil, de cada dez a quinze casos de câncer em pacientes com até 15 anos, quatro são de LLA (GUIMARÃES, 2004). Nos adultos, a LLA representa aproximadamente 15% das leucemias, sendo que metade

dos casos ocorre entre 15 e 50 anos, e é rara sua ocorrência em pessoas com idade superior a 70 anos (BASSAN *et al.*, 2004). Sua freqüência em pessoas com idade superior a 15 anos é um terço da infantil, com um pico de incidência aos 50 anos (HARRISON, 2001). Acomete mais homens do que mulheres e há uma maior incidência em pessoas brancas do que em pessoas negras (BAIN, 2003, BASSAN *et al.*, 2004, GUIMARÃES, 2004).

A proliferação descontrolada de células leucêmicas inibe a produção das células sanguíneas normais, tais como: os leucócitos, os eritrócitos e as plaquetas. Em decorrência da não-funcionalidade das células leucêmicas, os indivíduos com diagnóstico de LLA freqüentemente apresentam sintomas, como: fadiga, astenia e palidez, em virtude da anemia; sangramento gengival e outras manifestações hemorrágicas, resultantes da plaquetopenia e febre, devido a complicações infecciosas associadas à neutropenia ou à liberação de citocinas secretadas pelas células leucêmicas (BAIN, 2003, BASSAN *et al.*, 2004, GUIMARÃES, 2004). Nesses pacientes, pode-se observar linfadenopatia generalizada, esplenomegalia e hepatomegalia, devido à infiltração das células leucêmicas nos diferentes tecidos do organismo (PEJOVIC, 2002).

Existem várias formas de terapia sendo utilizadas para combater as leucemias, tais como: radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e transplante de medula óssea. A quimioterapia ainda é a forma mais utilizada, apesar dos efeitos tóxicos (GOLAB *et al.*, 2001).

O objetivo do tratamento terapêutico, baseado na utilização de compostos anticâncer (quimioterápicos), é promover a morte celular por apoptose ou modificar processos intracelulares que convergem a ela. A apoptose, induzida por quimioterápicos, tem a finalidade de danificar o DNA, os componentes lipídicos de membranas celulares e as proteínas celulares, bem como causar desequilíbrio na homeostase celular, comumente designado de estresse celular (HERR & DEBATIN, 2001). Assim, o entendimento da sinalização intracelular, que conduz à apoptose, é de fundamental importância para o esclarecimento dos possíveis alvos para intervenção terapêutica e para a elucidação dos mecanismos de resistência aos fármacos.

## 2.2 NECROSE E APOPTOSE

O fenômeno de morte celular foi negligenciado por muitos anos, em benefício de outros processos biológicos, tais como: ativação, proliferação e diferenciação celular. Somente em 1972, Kerr, Wyllie e Currie propuseram uma classificação bioquímica e morfológica fundamental para definir o papel fisiológico deste processo (REED, 2003).

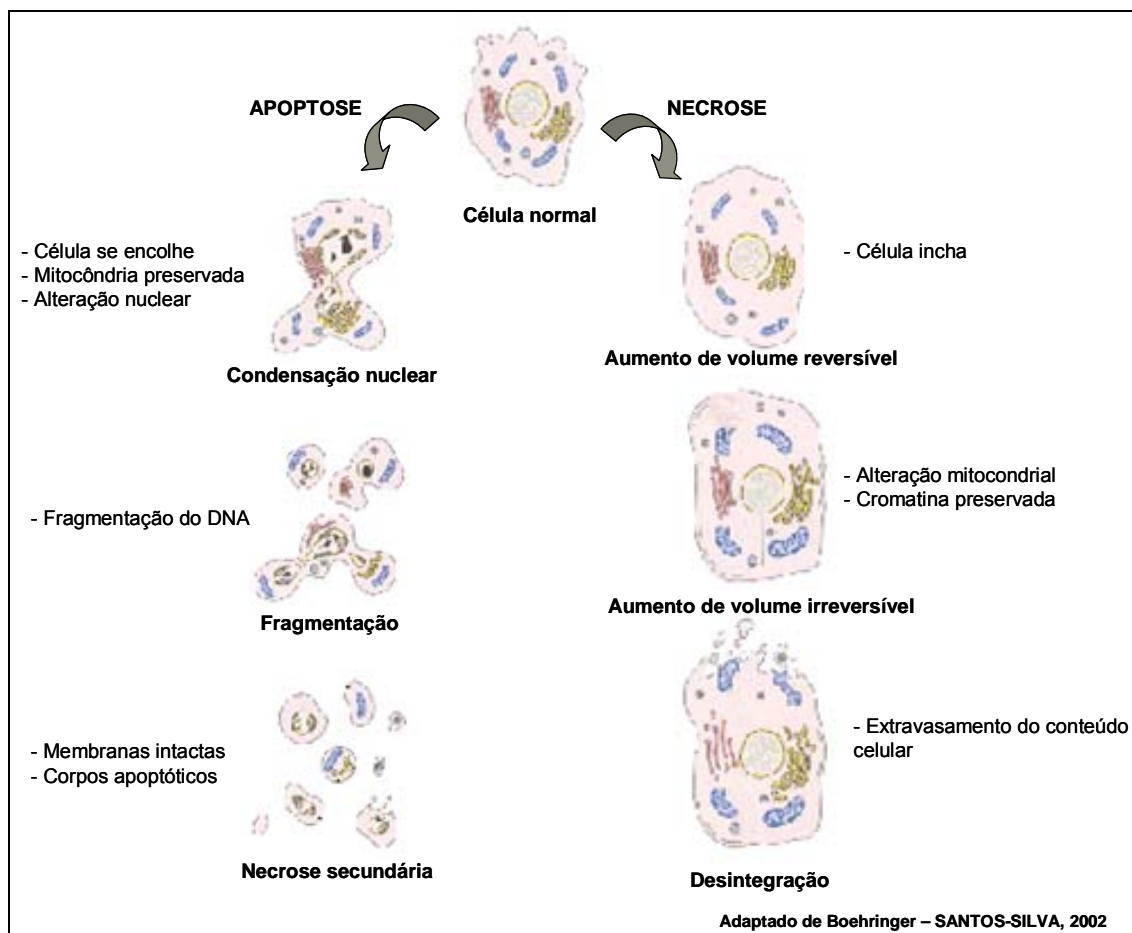
A morte celular afeta todos os tipos de células e pode ser dividida em duas classes, necrose e apoptose (Esquema 1). A necrose, tradicionalmente chamada de morte celular passiva, representa o resultado final de um amplo distúrbio energético, provocado pela depleção de ATP (adenosina trifosfato) a níveis incompatíveis com a sobrevivência celular, como resultado de estímulos exógenos que ocorrem após situação de estresse (EDINGER & THOMPSON, 2004). A necrose é caracterizada morfológicamente por vacuolização citoplasmática, perda da integridade da membrana plasmática e uma inflamação em redor da célula morta, atribuída à liberação de conteúdos celulares e moléculas pró-inflamatórias (COTRAN *et al.*, 1996; EDINGER & THOMPSON, 2004).

A apoptose, conhecida também como morte celular programada ou ativa, é um mecanismo altamente regulado por uma variedade de vias sinalizadoras celulares (EDINGER & THOMPSON, 2004). Este processo é importante para um correto desenvolvimento embrionário e manutenção da homeostase dos tecidos, através do controle do número de células, pois é responsável pela eliminação normal de populações indesejadas de células, durante a embriogênese, em vários processos fisiológicos (COTRAN *et al.*, 1996; ARANTES-GONÇALVES *et al.*, 2004; DANIAL & KORSMEYER, 2004). Entretanto, a apoptose também ocorre sob condições patológicas, nas quais, às vezes, é acompanhada de necrose (COTRAN *et al.*, 1996). Para a morte celular ser classificada como apoptose, deve-se observar a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA (ácido desoxirribonucléico) e o “empacotamento” das células mortas em corpos apoptóticos, sem a quebra da membrana plasmática, evitando, assim, o extravasamento do conteúdo citoplasmático. Os corpos apoptóticos são reconhecidos e removidos pelas células fagocíticas, sem que ocorra resposta inflamatória em redor da célula morta

(COTRAN *et al.*, 1996; EDINGER & THOMPSON, 2004). A morte celular por apoptose requer energia na forma de ATP (NAKAMURA & WADA, 2000).

Há quatro eventos bioquímicos comuns que parecem ser importantes na mediação da lesão celular e na morte celular: oxigênio e espécies reativas de oxigênio; cálcio intracelular e a perda da homeostase de cálcio; depleção de ATP e defeitos na permeabilidade das membranas. (COTRAN *et al.*, 1996).

A concentração intracelular de ATP parece ser crítica na seleção do processo de morte celular (LOS *et al.*, 2002; BRAS *et al.*, 2005). A alta concentração de ATP favorece a apoptose, enquanto a baixa concentração estimula a morte celular por necrose (LOS *et al.*, 2002). Isto pode ser observado no estudo realizado por Liest *et al.* (1997), no qual foi demonstrado que a diminuição da concentração celular de ATP, por um inibidor da geração de ATP mitocondrial (oligomicina), mediou a mudança do processo de morte de apoptose para necrose, em células leucêmicas. Contraditoriamente, Garland (1997) mostrou que a depleção intracelular de ATP, pelo desacoplamento da ATPase mitocondrial, induziu à morte celular por apoptose, exibindo fragmentação do DNA em células de linhagem pré-B, dependentes de interleucina-3. Portanto, pode-se verificar que a deficiência energética, ou depleção de ATP, induz à morte celular por apoptose ou necrose (BRAS *et al.*, 2005; SKULACHEV, 2006). O entendimento do mecanismo de apoptose pode contribuir para o esclarecimento do processo de morte, uma vez que há o envolvimento de várias moléculas sinalizadoras deste processo. Por exemplo, as características morfológicas da apoptose resultam da ativação das caspases, pela ligação a receptores de morte ou pela liberação de mediadores apoptóticos da mitocôndria (EDINGER & THOMPSON, 2004).

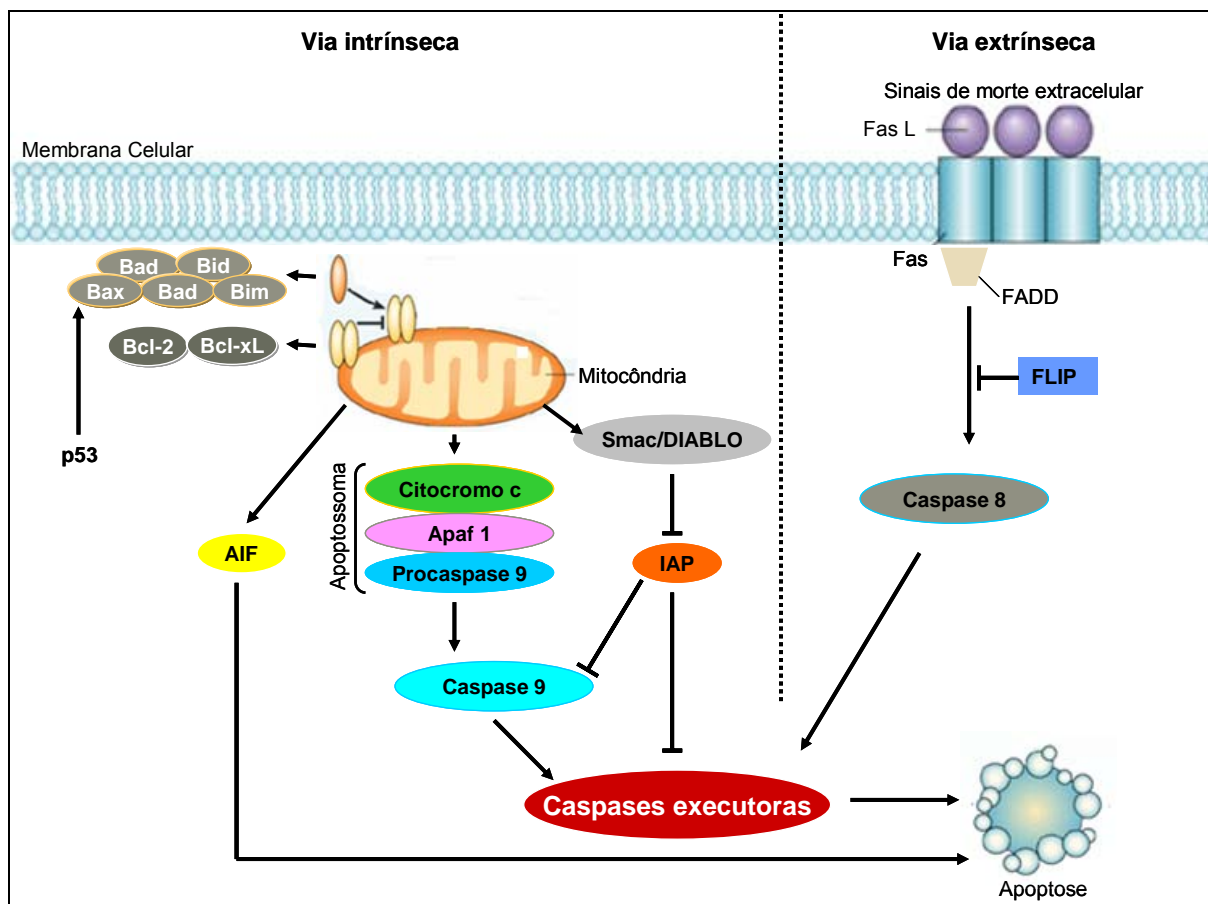


**Esquema 1:** Alterações morfológicas observadas na apoptose e na necrose.

A apoptose é um processo fisiológico de morte celular programada, que desempenha um importante papel na manutenção da homeostase e na remoção de células obsoletas ou indesejadas, como, por exemplo, daquelas com mutações potencialmente prejudiciais ou com alterações no ciclo celular (FESIK, 2005). A apoptose pode ser desencadeada por duas vias principais: intrínseca e extrínseca (Esquema 2). Ambas as vias resultam na ativação de membros de uma família de cisteíno-aspartato proteases, denominadas caspases, os quais são responsáveis pelo processo apoptótico. As caspases são divididas, basicamente, em dois importantes grupos: grupo das iniciadoras, formado pelas caspases 8, 9 e 10 e, possivelmente, a 2, cujo papel principal é ativar as caspases executoras; grupo das executoras, formado pelas caspases 3, 6 e 7, responsáveis pela execução do processo propriamente dito. A caspase 3 é o principal membro deste grupo que, entre outras funções, cliva ligações peptídicas de substratos importantes, como a laminina, proteínas do citoesqueleto e o inibidor de DNase ativada por caspase



(ICAD; *inhibitor of caspase-activated DNase*), o que contribui para o aparecimento das modificações morfológicas das células em apoptose (IGNEY & KRAMMER, 2002; GHOBRIAL *et al.*, 2005; BLAISE *et al.*; 2005).



**Esquema 2:** Duas principais vias da apoptose: intrínseca (mitocondrial) e extrínseca (receptores de morte).

Bax, Bad, Bid, Bik, Bim, proteínas da família Bcl-2 apoptóticas; Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, proteínas da família Bcl-2 antiapoptóticas; p53, proteína p53; AIF, fator indutor da apoptose; Smac/DIABLO, ativador secundário da caspase derivado da mitocôndria; IAP, proteína inibidora da apoptose; Apaf-1, fator ativador de caspase; FLIP, proteína inibitória associada a Fas; Fas, receptor de superfície celular; FasL, ligante de Fas; FADD, proteína associada ao Fas com um domínio de morte.

A via extrínseca é ativada pela ligação de receptores localizados na superfície celular, chamados receptores de morte (DR; *death receptor*), cuja família é composta pelas moléculas Fas/CD95, TNFR1, DR3, DR4, DR5 e DR6. Tais receptores, quando ativados, recrutam proteínas adaptadoras, como, por exemplo, a proteína adaptadora associada à proteína Fas, com um domínio de morte (FADD; *Fas-associated death domain protein*), que se unem à caspase 8 ou 10, constituindo o complexo conhecido como complexo sinalizador iniciador da apoptose (DISC; *death-inducing signalling complex*). Nesse ambiente molecular, as caspases iniciadoras

são estimuladas e, conseqüentemente, podem ativar, de forma direta, as caspases executoras ou gerar sinais que convergem à via intrínseca, resultando em alterações mitocondriais (IGNEY & KRAMMER, 2002; SHIOZAKI & SHI, 2004; GHOBRIAL *et al.*, 2005; BLAISE *et al.*; 2005).

A via intrínseca é ativada pela ação de diferentes sinais intracelulares, tais como: radiação ultravioleta, agentes quimioterápicos, baixa quantidade de nutrientes, ausência de fatores de crescimento celular, níveis elevados de espécies reativas de oxigênio, os quais podem gerar sinais de estresse, que são detectados pelas mitocôndrias e induzem a translocação de citocromo c, e de outros fatores apoptogênicos, como o ativador secundário de caspases, derivado da mitocôndria (Smac; *second mitochondrial-derived activator of caspases*) e o fator indutor da apoptose (AIF; *apoptosis-inducing factor*), para o citosol. O citocromo c citoplasmático liga-se ao fator ativador de protease – 1 (Apaf-1; *apoptotic protease activating factor - 1*) e resulta num complexo que, na presença de ATP, ativa a caspase 9 e é chamado apoptossoma executor (IGNEY & KRAMMER, 2002; GHOBRIAL *et al.*, 2005; BLAISE *et al.*; 2005).

O processo de autodestruição da célula por apoptose é altamente regulado e vários componentes-proteínas, fatores de transcrição, etc., regulam este processo apoptótico em diferentes níveis.

As FLIPs (*FADD-like interleukin-1 $\beta$  converting enzyme-like protease inhibitory protein*) são proteínas que interferem com o início da apoptose, diretamente em nível de DR (KRUEGER *et al.*, 2001). Foram identificadas em células humanas e, estruturalmente, são semelhantes à procaspase-8. Permitem a ligação ao DISC e, assim, inibem o processo e ativação da caspase-8 iniciadora (IGNEY & KRAMMER, 2002).

Os membros da família Bcl-2 constituem um grupo de proteínas que exercem funções opostas, pois algumas protegem a célula da morte, por atuar como proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1 etc), e outras conduzem a célula à apoptose, por atuar como proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bid etc) (BORNER, 2003). Dessa forma, são capazes de integrar sinais de sobrevivência ou morte celular, em função da supressão ou promoção de mudanças na permeabilidade da membrana mitocondrial, através do controle da liberação do

citocromo c para o citosol, gerados nos meios intra e extracelulares (BORNER, 2003).

A via mitocondrial também é susceptível à regulação negativa pelas proteínas inibidoras da apoptose (IAPs; *inhibitor of apoptosis proteins*), as quais constituem uma família (c-IAP-1 e c-IAP -2, X-IAP e Survivina) e podem inibir diretamente as caspases, como, por exemplo, as caspase 3 e 9, mas cuja atividade, por sua vez, pode ser bloqueada por proteínas mitocondriais, tal como Smac (HUANG, 2002; SHI, 2002).

Um importante elemento regulador da apoptose, pela via intrínseca, é a ativação do fator de transcrição p53, em resposta ao extenso dano no DNA, que codifica a proteína supressora de tumor p53. O mecanismo capaz de desencadear a apoptose é a fosforilação e ativação desta molécula (p53) subsequente à lesão do DNA. A proteína p53 ativada tem a capacidade de estimular genes pró-apoptóticos, como, por exemplo, o Bax, que ocasionarão alterações no potencial da membrana mitocondrial, e libera para o citoplasma o citocromo c, capaz de ativar a caspase 9 e induzir ao processo apoptótico. Um dos moduladores deste mecanismo é o gene Bcl-2, que pode alterar a liberação do citocromo c, pela membrana mitocondrial (SCHMITT & LOWE, 1999; BLAISE *et al.*, 2005).

Um fator fundamental que influencia não somente a apoptose, mas também outros processos celulares (inflamação, proliferação celular e regulação da resposta imune), é o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (BOURS *et al.*, 2000; HERR & DEBATIN, 2001; SHISHODIA & AGGARWAL, 2004; VIATOUR *et al.*, 2005, GHOSH *et al.*, 1998). Normalmente, o NF- $\kappa$ B encontra-se no citoplasma, ligado a uma proteína inibitória, o I $\kappa$ B. Entretanto, uma variedade de estímulos externos, incluindo citocinas, patógenos, estresse e agentes quimioterápicos, pode estimular a fosforilação do NF- $\kappa$ B, ubiquitinação e subsequente degradação do I $\kappa$ B, que, então, permite a translocação do NF- $\kappa$ B livre para o núcleo e ativa a expressão de genes. Dependendo do estímulo e do contexto celular, o NF- $\kappa$ B pode ativar genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos (MAYO & BALDWIN, 2000, IGNEY & KRAMMER, 2002; LIN & KARIN, 2003; SHISHODIA & AGGARWAL, 2004).

Além desses componentes intracelulares, a apoptose pode ser regulada por outras moléculas sinalizadoras. Um exemplo desta molécula é o óxido nítrico (NO). O NO possui duplo papel em tecidos e células especializadas. É uma molécula

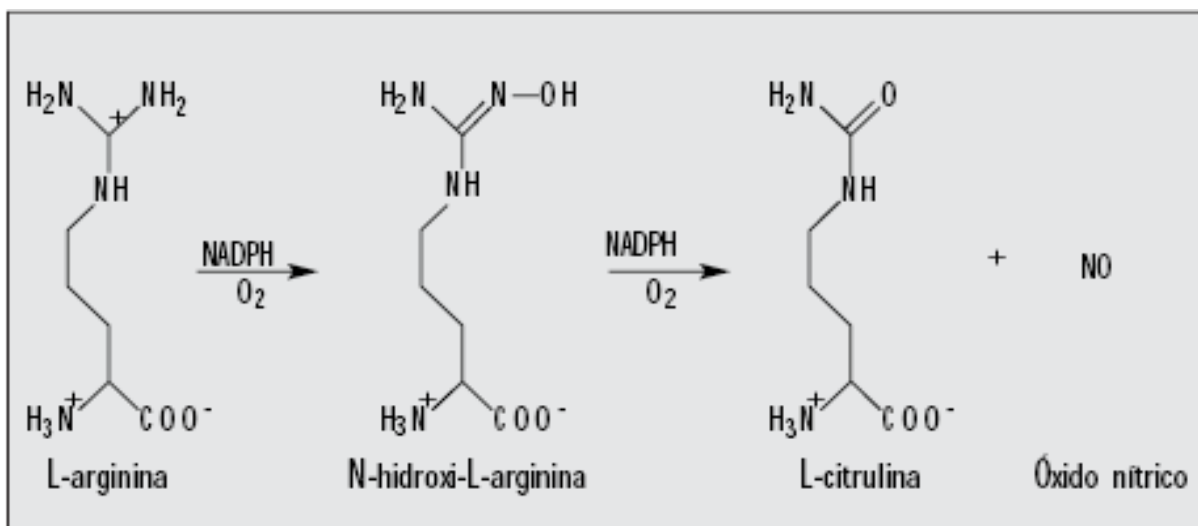
sinalizadora fisiológica essencial, não somente por mediar várias funções celulares, mas também por induzir efeitos citotóxicos e mutagênicos, quando presente em excesso (BAKAN *et al.*, 2003).

### **2.3 ÓXIDO NÍTRICO: IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA E ENVOLVIMENTO NO CÂNCER E NA LEUCEMIA**

Furchgott e Zawadzki (1980) descobriram que células endoteliais, estimuladas com diferentes agonistas, liberavam um vasodilatador que foi denominado de fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF, *endothelial-derived relaxing factor*). Poucos anos depois, foi identificada a sua natureza e passou a ser denominado como óxido nítrico (NO) (PALMER *et al.*, 1987).

O radical livre gasoso NO é uma molécula sinalizadora capaz de passar facilmente pelas membranas celulares, modulando respostas fisiológicas, incluindo manutenção do tônus vascular, regulação gênica, apoptose, função plaquetária, neurotransmissão, memória, estimulação imune e regulação da pressão sanguínea (NAPOLI & IGNARO, 2003; DUSSE *et al.*, 2003). Todavia, o descontrole na síntese do NO está implicado na patogênese de doenças cardiovasculares, auto-imunidade, rejeição de transplantes, sépsis (NATHAN, 1992), doenças cerebrais degenerativas (CHRISTOPHERSON & BREDT, 1997; HALLIWELL, 2001), indução de câncer (SCHMIDT & WALTER, 1994), genotoxicidade (WINK *et al.*, 1998) e na inflamação (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

O NO é produzido por uma família de isoenzimas, denominadas óxido nítrico sintases (NOS), através da oxidação enzimática do grupamento guanidina do aminoácido L-arginina, que gera um composto intermediário, N-hidroxi-L-arginina, e subseqüentemente NO e citrulina (MURAD, 1999, BOGDAN, 2001), (ver Esquema 3). Todas as isoformas de NOS são enzimas homodiméricas, que requerem alguns co-substratos, tais como: oxigênio molecular e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), e vários co-fatores, tais como: mononucleotídeo de flavina (FMN), dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), tetrahidrobiopterina (THB<sub>4</sub>), heme e cálcio/calmodulina (MAYER & ANDREW, 1998, MURAD, 1999, BOGDAN, 2001).



**Esquema 3:** Etapas bioquímicas envolvidas na biossíntese de óxido nítrico pela óxido nítrico sintase (DUSSE *et al.*, 2003).

Três variedades de isoformas de NOS têm sido purificadas em diferentes tecidos de mamíferos e muitos já tiveram seus genes clonados (BOGDAN, 2001). A clonagem e o seqüenciamento dessas enzimas revelaram a existência de três isoformas de NOS: tipo I (NOS1, NOS neuronal, nNOS), tipo II (NOS2, NOS induzida, iNOS) e tipo III (NOS3, NOS endotelial, eNOS). As isoenzimas tipo I e tipo III formam a classe de NOS que são referidas como forma constitutiva (cNOS). A cNOS está continuamente presente na célula e sua ativação depende de íons cálcio (Ca<sup>2+</sup>), de calmodulina e de outros co-fatores. A segunda classe é a forma induzida (iNOS ou tipo II), que pode ser induzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (WINK & MITCHELL, 1998, KOLB, 2000; BOGDAN, 2001) (ver Tabela 1).

**Tabela 1:** Propriedades bioquímicas, regulação e função das três isoformas de óxido nítrico sintases (BOGDAN, 2001).

	Isoformas		
	NOS1	NOS2	NOS3
Sinônimos	NOS tipo I, NOS neuronal (nNOS), NOS cerebral (bNOS)	NOS tipo II, NOS macrófágico (macNOS), NOS induzida (iNOS)	NOS tipo III, NOS endotelial (eNOS, ecNOS)
Peso molecular (kDa)	155	125	135
Localização intracelular	Citosol: ligada ao citoesqueleto ou receptores de membrana	Citosol: vesículas	Membrana plasmática ("caveolae")
Dependentes $Ca^{2+}$ e calmodulina	Sim	Não	Sim
Regulação por citocinas	Fraca	Forte	Fraca
Produção de NO	Baixa	Alta	Baixa
Exemplos de células encontradas	Neurônios, células do músculo esquelético.	Macrófagos, micróglia, hepatócitos, etc.	Células endoteliais e algumas células epiteliais
Principais funções	Neurotransmissão, Neuroproteção, neurodegeneração.	Atividade antimicrobiana e citostática, imunoregulação, imunossupressão, dano tecidual.	Vasodilatação, regulação da pressão sanguínea, inibição da agregação plaquetária, hipotensão.

As células contendo cNOS produzem pequenas quantidades de NO, por curtos períodos de tempo e, desta forma, podem ocorrer os efeitos diretos do NO (WINK & MITCHELL, 1998). Baixas concentrações do NO são requeridas para preservar funções celulares normais, como, por exemplo, vasodilatação fisiológica e neurotransmissão (KIM *et al.*, 1999). Entretanto, para a iNOS, a produção de NO é muito maior e por períodos prolongados, o que contribui para os efeitos indiretos do NO, tais como: nitrosilação, nitração e oxidação (WINK & MITCHELL, 1998). Em outras palavras, altas concentrações de NO, produzidas pelas iNOS, usualmente são citotóxicas e podem interagir com grupamentos tióis ou proteínas contendo metais e, assim, alterar funções protéicas ou iniciar um processo de expressão gênica (BRÜNE *et al.*, 1998). Além disso, o NO pode causar dano celular ou promover a morte celular (MONCADA *et al.*, 1991; BRÜNE *et al.*, 1998, WINK & MITCHELL, 1998; KONOVALOVA *et al.*, 2003).

O clássico papel do NO geralmente reflete a ativação direta da guanilato ciclase, o que resulta na formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc), seguida da transdução de sinais, mediada por proteínas quinases (NAPOLI &

IGNARO, 2003). Entretanto, várias outras atividades relacionadas ao NO são independentes de GMPc (CHUNG *et al.*, 2001). Espécies reativas de oxigênio derivadas do NO (RNOS) podem alterar a bioatividade de certas moléculas, tais como: proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (WINK & MITCHELL, 1998; EISERICH *et al.*, 1998). De fato, radicais de oxigênio podem intensificar a bioreatividade do NO, através da formação de RNOS, como, por exemplo, a reação do NO com radical superóxido ( $O_2^-$ ), que resulta na produção do ânion peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), um agente altamente oxidante, capaz de induzir à peroxidação lipídica e de danificar proteínas e DNA (MURPHY, 1999; HOGG & KALYNARAMAN, 1999; SZABÓ, 2003), e, conseqüentemente, alterar funções de várias moléculas sinalizadoras importantes envolvidas na proliferação celular e na apoptose (ZHUANG & SIMON, 2000; ZOUKI, *et al.*, 2001).

Outro alvo do NO é o DNA, onde pode interagir direta e indiretamente. Cita-se, como exemplos de interação direta, a troca de nucleotídeos ou a quebra da fita de DNA, em conseqüência da N-nitrosilação de desoxirribose nucleotídeos, e de interação indireta, a quebra da fita de DNA, em função da formação de peroxinitrito e N-nitrosaminas ou estímulo, ou inibição de enzimas fundamentais para a homeostase nuclear (KRÖNCKE *et al.*, 1997). Diversas conseqüências biológicas ocorrem em resposta ao dano causado ao DNA, como indução de mutações e a parada na replicação e na transcrição de genes. O reconhecimento do DNA danificado é realizado por sistemas de reparo celular, os quais envolvem enzimas de reparo do DNA e outros fatores nucleares, como a proteína supressora de tumor p53 (KRÖNCKE *et al.*, 1997; MURPHY, 1999). Em resposta ao dano no DNA, provocado pelo NO, há uma elevação da expressão de p53 e ativação da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), (MURPHY, 1999), a qual pode levar a célula à morte por depleção energética (KIECHLE & ZHANG, 2002; EDINGER & THOMPSON, 2004). Além disso, o NO pode reagir com complexos Fe-S de várias proteínas importantes para a fisiologia celular, e alteram suas funções, como as enzimas da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria (HIBBS *et al.*, 1990, CADENAS, 2004). A inibição dessas enzimas leva à diminuição dos níveis de ATP e, subseqüente, à morte celular, devido ao déficit energético (BROWN, 2001).

Numerosas pesquisas têm sido realizadas para analisar a ação do NO na morte celular. Porém, os resultados ainda são contraditórios, pois, em determinados casos, o NO é capaz de estimular vias de transdução de sinais que induzem à

apoptose (efeito pró-apoptótico), ao passo que em outros casos o NO parece proteger células, da apoptose (efeito anti-apoptótico) (KRÖNCKE *et al.*, 1997; KIM, *et al.*, 1999; KOLB, 2000; BLAISE *et al.*, 2005). O NO pode prevenir a apoptose em várias linhagens celulares, tais como: células endoteliais, linfomas, folículos ovarianos, miócitos cardíacos e hepatócitos (BLAISE *et al.*, 2005). Todavia, as células de leucemias, mastocitomas, sarcomas e melanomas sofrem apoptose quando expostas ao NO (SANTOS-SILVA *et al.*, 2001; WINK *et al.*, 1998).

Vários trabalhos descrevem o efeito do NO na proliferação e diferenciação de células leucêmicas. Magrinat *et al.* (1992) demonstraram que o envolvimento do NO é capaz de induzir diferenciação em células leucêmicas monocíticas humanas HL60 e alterar a expressão gênica dessas células. O NO também tem sido relacionado com a indução à apoptose, em vários tipos de células leucêmicas, que pode ocorrer por diversas formas: por ativação das caspases (YABUKI, *et al.*, 2000), por redução dos níveis de Bcl-2 (ZHONG *et al.*, 2004), por ativação da PARP (KUO *et al.*, 1996), pela formação de peroxinitrito (ZHUANG & SIMON, 2000), pela depleção de GSH e inibição de NF- $\kappa$ B (SANTOS-SILVA *et al.*, 2006).

Por outro lado, o NO pode desempenhar uma atividade anti-apoptótica. A primeira observação desse efeito foi sugerida no trabalho realizado por Genaro *et al.* (1995), na qual o NO protegia os linfócitos B da apoptose, através de um mecanismo dependente de GMPc (ativação da guanilato ciclase). Atualmente, sabe-se que o NO pode proteger diversos tipos de células normais ou neoplásicas da apoptose e que, além do mecanismo descrito acima, outros prováveis mecanismos podem estar envolvidos, como, por exemplo, a inibição da ativação de caspases (LI *et al.*, 1999; LIU & STAMLER, 1999), através da S-nitrosilação da cisteína, do sítio ativo da enzima e/ou oxidação (LI *et al.*, 1997; LI *et al.*, 1999). Além desses mecanismos, o NO pode apresentar outro mecanismo protetor, pela inibição da liberação do citocromo c da mitocôndria, o qual é um fator fundamental na sinalização apoptótica, pela ativação da caspase 9 (KIM *et al.*, 1999).

A ação ou inibição antitumoral do NO é dependente da quantidade de NO gerado e da interação das células do hospedeiro com as células neoplásicas (O'SULLIVAN & LEWIS, 1994; MURTA *et al.*, 1999). Portanto, essa ampla variedade de efeitos do NO parece estar relacionada às concentrações de NO geradas, à suscetibilidade individual das células e à permanência do fenômeno (BLAISE *et al.*, 2005).



Observamos que a importância do NO, no ambiente tumoral, é complexa, pelo fato das células normais e tumorais poderem produzir NO com o potencial de regular e proteger, bem como de promover a morte de células (KONOVALOVA *et al.*, 2003; BLAISE *et al.*, 2005). A sensibilidade das células tumorais ao NO é particularmente aumentada, quando as células tumorais são expostas a determinados compostos, que diminuem as concentrações intracelulares de GSH. Esses compostos potencializam o efeito citotóxico mediado pelo NO (KALYANARAMAN *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2002, FRIESEN *et al.*, 2004, SANTOS-SILVA, 2006).

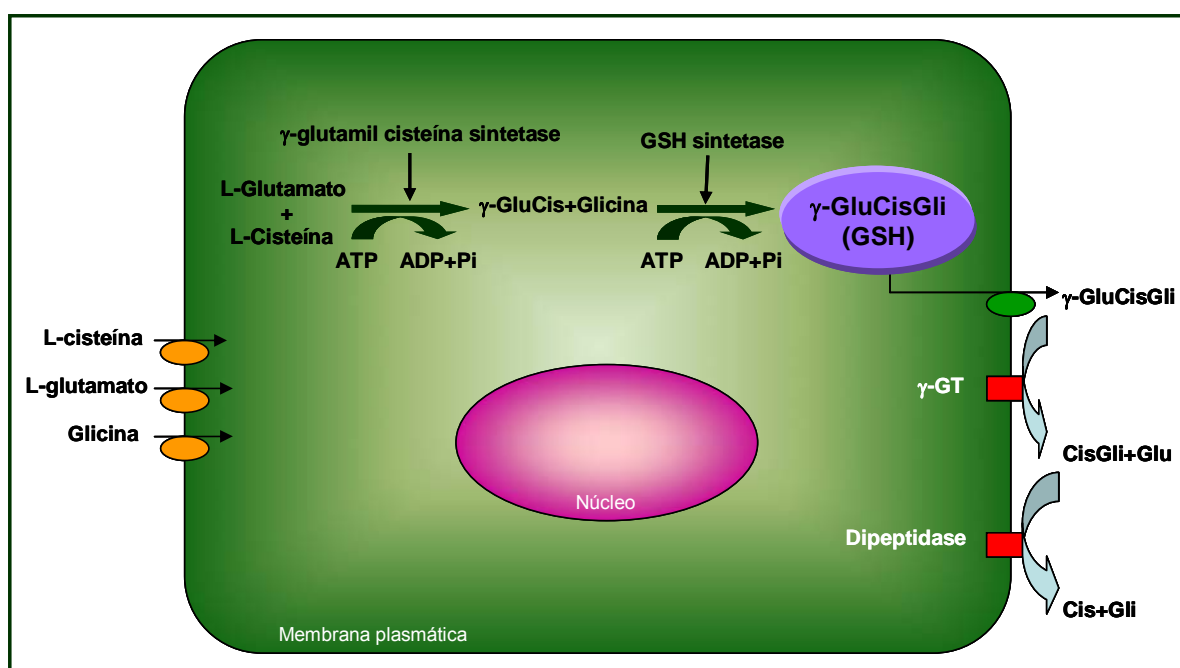
A glutathiona reduzida (GSH) é um dos alvos intracelulares mais importantes do NO. Demonstrou-se que o NO reage com a GSH intracelular para formar S-nitrosoglutathiona (CLANCY *et al.*, 1994). Além disso, a depleção de GSH pelo NO aumenta a sensibilidade de células à ação terapêutica de determinados compostos (WALKER *et al.*, 1995), como demonstrado por Santos-Silva *et al.* (2006), em que o NO causou diminuição da concentração intracelular de GSH e potencializou o efeito citotóxico do taxol em células linfoblásticas leucêmicas.

## **2.4 GLUTATHIONA: DEFINIÇÃO, SÍNTESE, DEGRADAÇÃO E IMPORTÂNCIA FISIOLÓGICA E PATOLÓGICA**

A glutathiona reduzida é um tripeptídeo (GSH, L-glutamil-L-cisteinil-glicina), sintetizado em todas as células de mamíferos (MEISTER & TATE, 1976), e é o tiol (sulfidril, -SH) mais abundante no meio intracelular (O'BRIEN & TEW, 1996, DRINGEN, 2000, WANG & BALLATORI, 1998). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína. Ou seja, o grupamento -SH é importante para o desempenho das funções da GSH. A GSH é considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante não-enzimático da célula.

A GSH é sintetizada intracelularmente pela ação de duas enzimas citosólicas. A gama-glutamilcisteína sintetase ( $\gamma$ -GCS), que utiliza glutamato (Glu) e cisteína (Cis) como substratos, que forma o dipeptídeo  $\gamma$ GluCis, o qual passa a ser combinado à glicina (Gli), numa reação catalisada pela glutathiona sintetase (GSH

sintetase), para gerar GSH. O ATP é um co-substrato para ambas as enzimas. Após sua síntese, a GSH é liberada para outros compartimentos intracelulares, incluindo mitocôndria e retículo endoplasmático, e para o espaço extracelular para a utilização por outras células e tecidos (BALLATORI *et al.*, 2005). Todavia, a síntese de GSH ocorre intracelularmente, porém, a sua degradação ocorre exclusivamente no espaço extracelular e somente sobre a superfície de células que expressam as enzimas gama-glutamil transpeptidase ( $\gamma$ -GT) e dipeptidase (WANG & BALLATORI, 1998, BALLATORI *et al.*, 2005), (Esquema 4).

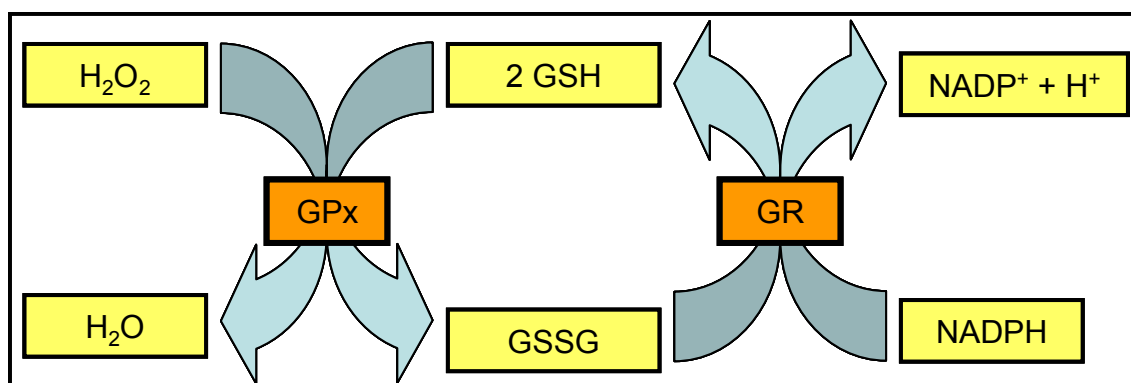


**Esquema 4:** Síntese e degradação da glutatona (adaptado de WANG & BALLATORI, 1998). Glu, Glutamato; Cis, Cisteína; Gli, Glicina;  $\gamma$ -GT, gama-glutamiltranspeptidase.

Durante o metabolismo aeróbico, são formados alguns compostos intermediários de oxigênio, incluindo superóxido e peróxido de hidrogênio. Essas espécies químicas podem levar à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de oxigênio derivadas do nitrogênio, que causam peroxidação lipídica, modificações em proteínas e DNA, com conseqüentes alterações no metabolismo celular (WANG & BALLATORI, 1998).

A GSH é predominantemente a primeira defesa antioxidante intracelular contra os produtos tóxicos de oxigênio, particularmente na mitocôndria, local onde ocorre a maior síntese desses radicais (DELEVE & KAPLOWITZ, 1991). Após a exposição da GSH (forma reduzida) ao agente oxidante, como, por exemplo, aos

compostos intermediários de oxigênio e de nitrogênio, ocorre sua oxidação à GSSG (forma oxidada), cuja reação é catalisada pela glutatona peroxidase (GPx). A recuperação da GSH é feita pela enzima glutatona redutase (GR), na presença de NADPH, constituindo um ciclo redox essencial para manutenção da integridade do sistema protetor celular. Sob condições fisiológicas, a GR mantém mais de 98% da GSH intracelular na forma reduzida (WANG & BALLATORI, 1998), (Esquema 5).



**Esquema 5:** Ciclo redox da glutatona (adaptado de DRINGEN, 2000).

GSH, Glutatona reduzida; GSSG, glutatona oxidada; GPx, glutatona peroxidase; GR, glutatona redutase; NADPH, nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida;  $H_2O_2$ , peróxido de hidrogênio;  $H_2O$ , água.

Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, haverá recuperação da GSH. Entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo (SHAN *et al.*, 1990, GILBERT & McLEAN, 1990, HALLIWEL, 1993). Assim, a intensidade do estresse oxidativo pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH. A GSSG em excesso pode resultar em um ambiente mais oxidante, que beneficia a formação de pontes dissulfeto (-SS-) nas proteínas portadoras de grupamento tiol (-SH), o que prejudica suas funções (GILBERT, 1990). Portanto, quando há uma sobrecarga de moléculas reativas em comparação com a capacidade das defesas antioxidantes, elas se estabilizam e danificam biomoléculas importantes, como: o DNA, as proteínas e os lipídeos.

A glutatona reduzida (GSH) exerce um importante papel em vários processos bioquímicos. Porém, distúrbios no seu estado redox estão implicados na origem e progressão de inúmeras doenças. A GSH é importante na síntese de DNA e de proteínas estruturais, na ativação transcricional de genes específicos, na regulação e

manutenção do estado *redox* da célula, na regulação do ciclo celular, na proteção contra danos oxidativos e nitrosativos, para a metabolização de compostos tóxicos eletrofílicos (quimioterápicos), pois participa de reações de detoxificação e na manutenção da função imune (WANG & BALLATORI, 1998; RAHNMAN & MACNEE, 2000; BALLATORI *et al.*, 2005). Além disso, a GSH é essencial na regulação da proliferação celular e da apoptose. Os níveis de GSH são importantes para suprimir a apoptose, mediada por diferentes compostos oxidantes, inclusive o NO (GHIBELLI *et al.*, 1998). Sabe-se que a GSH exerce uma importante ação na resistência aos fármacos, pois a redução da concentração de GSH diminui a resistência mediada pela MRP1, contra vários compostos derivados de produtos naturais (ZAMAN *et al.*, 1995).

Muitos agentes terapêuticos usados na clínica atual foram desenvolvidos empiricamente, a fim de identificar agentes que fossem tóxicos para as células tumorais ou inibissem sua proliferação. Atualmente, está bem estabelecido que a maioria dos agentes tem seu papel, eventualmente, pela ativação da apoptose em células tumorais, por diferentes mecanismos, os quais envolvem dano ao DNA, ativação de resposta ao estresse celular e, finalmente, ativação de vias de transdução de sinais de apoptose. Desde que agentes com distintos alvos intracelulares podem iniciar a apoptose, com mecanismos similares, defeitos no programa de apoptose podem produzir resistência a múltiplos fármacos. A desregulação do processo de apoptose, em favor da sobrevivência das células, pode desequilibrar o delicado balanço entre a proliferação e a morte celular, contribuindo para o desenvolvimento e persistência de doenças, como o câncer (REED, 2003; FESIK, 2005).

## **2.5 DESREGULAÇÃO DA APOPTOSE E RESISTÊNCIA**

As células tumorais podem adquirir resistência à apoptose por vários mecanismos, como podem ser vistos na tabela 2, os quais interferem em diferentes níveis da sinalização apoptótica e acarretam defeitos nas vias indutoras desse processo, que podem, eventualmente, levar à expansão de populações de células neoplásicas. Além disso, a quimioterapia e radioterapia agem primariamente nas células, com a finalidade de induzir à apoptose e, se ocorrem defeitos na via

apoptótica, as células neoplásicas podem tornar-se resistentes à terapia (IGNEY & KRAMMER, 2002).

**Tabela 2:** Mecanismos de resistência à apoptose (adaptado de IGNEY & KRAMMER, 2002).

<b>Expressão de moléculas anti-apoptóticas</b>	
Membros da família BCL2	BCL2 BCL-X <sub>L</sub>
FLIP	
Receptor solúvel para ligante de morte	CD95 solúvel
IAPs	Survivina cIAP2
<b>Alterações na via p53</b>	
p53	
<b>Downregulation e mutação de moléculas pró-apoptóticas</b>	
BAX	
APAF1	
Caspase-8	
Receptores de morte	CD95 TRAIL-R1 TRAIL-R2
XAF1	
<b>Outros mecanismos</b>	
Alterações na via NF-κB	
Expressão de transportadores	MDR1/glicoproteína P MRP

Vários trabalhos demonstram diferentes mecanismos de resistência à apoptose, como seguem:

Células de linfoma B, cuja translocação do cromossomo 14:18 resulta no aumento da expressão da Bcl-2 e resistência da célula à apoptose (TSUJIMOTO *et al.*, 1985; REED *et al.*, 1988); Também tem sido mostrada a relação entre os altos níveis de expressão da Bcl-2, com um prognóstico desfavorável nos pacientes com leucemia aguda (RUVUOLO *et al.*, 2001).

A expressão de altas concentrações de FLIP foi observada em linfoma de células-B murina e em células de melanoma humano, interferindo na apoptose em receptores de morte (MUELLER & SCOT, 2000; KRUEGER *et al.*, 2001).

Outro mecanismo, pelo qual a célula tumoral interfere na apoptose, envolve a expressão de receptores solúveis, como, por exemplo, expressão do receptor solúvel CD95. Altas concentrações desse receptor foram encontradas no soro de pacientes com melanoma e podem estar associadas com um pior prognóstico nesses pacientes (UGUREL *et al.*, 2001).

A expressão da survivina, uma proteína da família das IAPs, está aumentada em determinados tumores (AMBROSINI *et al.*, 1997). Vários trabalhos demonstraram que a survivina suprime a apoptose induzida por Fas, Bax, caspases e drogas anticâncer (TAMM *et al.*, 1998). Além disso, altos níveis de expressão estão relacionados a mau prognóstico e diminuição da sobrevivência em vários tipos de câncer humano (ITO *et al.*, 2000; XING *et al.*, 2001; TANAKA *et al.*, 2000; ADIDA *et al.*, 2000).

Além da expressão de genes anti-apoptóticos, certos tipos de células tumorais podem adquirir resistência pela *downregulation* ou mutações em moléculas pró-apoptóticas, como Bax, e resultar em perda da função (IGNEY & KRAMMER, 2001). O APAF1, o qual forma uma parte integral do apoptossoma, freqüentemente não está expresso em melanomas metastáticos, “escapando” da apoptose mediada pela mitocôndria (SOENGAS *et al.*, 2001). A deleção da leucina 62 na caspase 8 foi observada em células de carcinoma humano e alterou a função pró-apoptótica da caspase 8 (LIU *et al.*, 2002). Portanto, mutações na caspase 8 evitam a ocorrência de morte celular mediada por tal caspase (ZHIVOTOVSKY & ORRENIUS, 2003).

Uma dessas vias de resistência envolve a participação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Vários trabalhos demonstram que a regulação aberrante da ativação do NF- $\kappa$ B está associada a várias doenças, inclusive o câncer (MERCURIO *et al.*, 1999). A atividade constitutiva do NF- $\kappa$ B tem sido observada em câncer de mama, de próstata, de col retal e de ovário, bem como em alguns tipos de leucemias e linfomas (BALDWIN, 2001; KARIN *et al.*, 2002), a qual parece suprimir a morte celular causada por quimioterápicos e levar à resistência (BALDWIN, 2001). Sugere-se que esta atividade é essencial para o crescimento e/ou sobrevivência dessas células cancerosas (FURMAN *et al.*, 2000, SANTOS-SILVA *et al.*, 2001).

O exato mecanismo de ação do NF- $\kappa$ B na modulação do processo de apoptose não está totalmente elucidado, pois há controvérsias se sua ativação é benéfica ou não, em casos de neoplasias malignas, já que alguns fatores de transcrição podem, dependendo das circunstâncias, participarem tanto da proliferação quanto da apoptose. Por exemplo, o NF- $\kappa$ B pode regular a expressão tanto das proteínas pró-apoptóticas quanto das anti-apoptóticas, como ocorre com a transcrição de proteínas da família Bcl-2 (SHISHODIA & AGGARWAL, 2004). Santos-Silva *et al.* (2001) demonstraram que a inibição do NF- $\kappa$ B, pelo NO e pelo

taxol, induz à apoptose células linfoblásticas leucêmicas. A inibição do NF- $\kappa$ B pode resultar também em aumento da sensibilidade das células tumorais à apoptose, induzida por quimioterápicos ou radiação- $\gamma$  (WANG *et al.*, 1999).

Numerosos estudos clínicos têm examinado o efeito de mutações na proteína p53 sobre a resposta à quimioterapia e à radioterapia, conseqüentemente, sobre a resistência à apoptose. Mutações em p53 conferem resposta desfavorável à quimioterapia, pelo menos em alguns tipos de câncer e em resposta a algumas drogas (GASCO & CROOK, 2003). Esta evidência é provavelmente mais observada no câncer de mama, onde vários estudos relatam que a resposta à antraciclina é menos favorável naqueles pacientes contendo mutações em p53 (GEISLER *et al.*, 2001; RAHKO *et al.*, 2003). A mutação do gene p53 também pode estar relacionada ao aumento da expressão de proteína associada à resistência a múltiplos fármacos 1 (MRP1), e, dessa forma, contribuir com o fenômeno de resistência a drogas (TSANG *et al.*, 2003).

A resistência aos fármacos é um fenômeno multifatorial, que pode ser classificada como intrínseca ou extrínseca. A primeira revela o estado no qual a característica responsável pela resistência é inerente à própria célula, que se originou durante um processo evolutivo. A última, também denominada de resistência adquirida, caracteriza-se pelo desenvolvimento de resistência da célula tumoral, durante o tratamento quimioterápico (GOLDIE, 2001; HOOIJBERG, *et al.*, 2006). A identificação dos mecanismos que levam à resistência intrínseca ou adquirida é importante no desenvolvimento de terapias mais efetivas.

Um dos grandes obstáculos para o sucesso do tratamento nos pacientes com câncer é o desenvolvimento do fenômeno conhecido como MDR (resistência a múltiplos fármacos), o qual se caracteriza pela habilidade das células tumorais de desenvolverem resistência simultânea a diferentes agentes quimioterápicos, estruturalmente e funcionalmente não relacionados (HOOIJBERG, *et al.*, 2006; KRISHNA & MAYER, 2000).

O termo MDR tem sido amplamente usado para descrever diferentes mecanismos de resistência. Destes, os mecanismos celulares de resistência podem ser classificados em dois grandes grupos: (1) os que apresentam o fenótipo de MDR não-clássico; (2) os que apresentam o fenótipo de MDR clássico ou típico, relacionado com transporte (KRISHNA & MAYER, 2000).

(1) Fenótipo de MDR não-clássico: não está relacionado com os mecanismos de transporte. Este tipo de resistência pode ser causado por alterações na atividade de sistemas enzimáticos específicos, como, por exemplo, o sistema das topoisomerases, que podem diminuir a atividade citotóxica de fármacos, independente da sua concentração intracelular, a qual permanece inalterada. Além disso, como citado anteriormente, alterações das proteínas que controlam a apoptose, por exemplo, aquelas envolvendo as proteínas da família Bcl-2 e p53, podem também reduzir a quimiosensibilidade, desde que a maioria dos compostos antineoplásicos exerça seus efeitos citotóxicos, via processo apoptótico (KRISHNA & MAYER, 2000).

(2) Fenótipo de MDR clássico: resulta da superexpressão de determinadas proteínas nas células malignas, tais como, as proteínas transportadoras na membrana celular. Estas proteínas funcionam como bombas de efluxo, capazes de exportar os agentes citotóxicos para fora da célula, e diminuem sua concentração intracelular (OZBEN, 2006).

Um dos primeiros experimentos responsáveis pela identificação dessas proteínas e, conseqüentemente, do fenótipo de resistência a múltiplos fármacos, foi realizado por Dano (1973), em experimento em que células ascíticas de camundongo com tumor de Ehrlich foram capazes de diminuir a concentração intracelular de dounorubicina, pela extrusão ativa deste fármaco. Em 1976, Juliano e Ling descobriram a glicoproteína P (gpP), nas células de ovário de hamster chinês resistentes, com peso molecular de 170 kDa. Entretanto, somente em 1992, Cole e colaboradores descobriram um segundo mecanismo de resistência, denominado MRP. Neste mecanismo, a expressão do gene, que codifica a proteína MRP (peso molecular de 190 kDa), também está relacionada com a redução da concentração de quimioterápico intracelular, semelhante àquele mediado pela gpP (KRUH & BELINSKY, 2003).

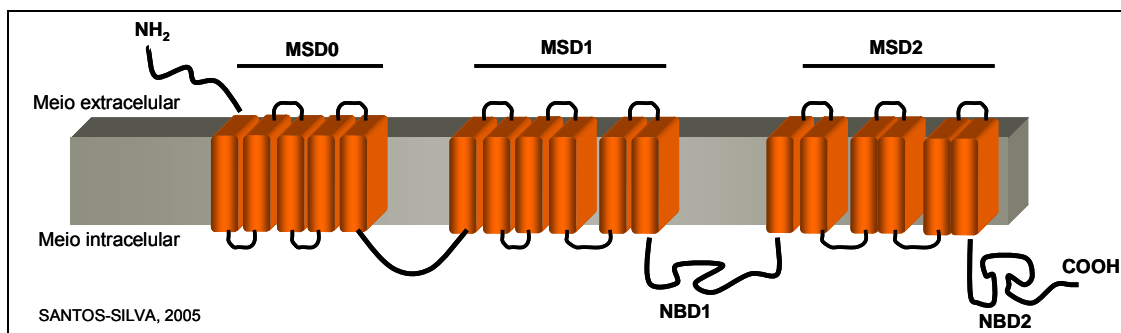
Tanto a gpP quanto a MRP, pertencem à superfamília de proteínas de membrana ATP Binding Cassete (ABC), que atuam como transportadores ativos, também chamados de ATPases de transporte. Podem estar superexpressas em células malignas e resultar na diminuição das concentrações intracelulares de fármacos necessários para uma terapia efetiva (KRISHNA & MAYER, 2000; LESLIE *et al.*, 2005; OZBEN, 2006).



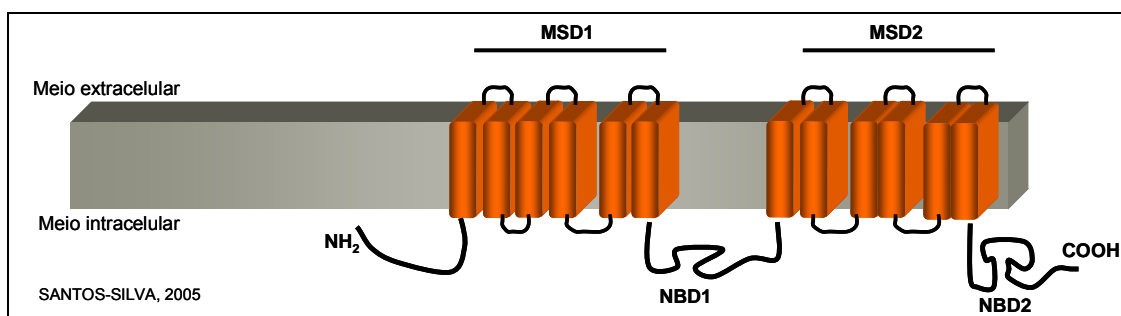
## 2.6 A FAMÍLIA DE PROTEÍNAS DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLOS FÁRMACOS MRP/ABCC

A família das proteínas MRP é composta por nove membros: MRP1, MRP2, MRP3, MRP4, MRP5, MRP6, MRP7, MRP8 e MRP 9 (HUANG & SADÉE, 2006; BORST *et al.*, 2006; DEELEY & COLE, 2006; HOOIJBERG *et al.*, 2006), e está amplamente distribuída nos tecidos normais (KRISHNA & MAYER, 2000; LESLIE *et al.*, 2005; HOOIJBERG, *et al.*, 2006). Acredita-se que o papel fisiológico dessas proteínas esteja relacionado com a proteção do organismo contra o acúmulo de substâncias tóxicas (LESLIE *et al.*, 2005).

As proteínas MRP's compartilham uma topologia que é comum à superfamília ABC, onde há dois domínios *spanning* de membrana (MSD1 e MSD2) e cada uma contém seis hélices transmembranas (BAKOS *et al.*, 1996; KAST & GROS, 1997). Acredita-se que a ligação de substratos ocorra pela interação entre estas hélices transmembranas (ZHANG *et al.*, 2001; HAIMEUR *et al.*, 2004), (Esquema 6). Na porção citoplasmática da proteína, há dois sítios de ligação de nucleotídeos (NBDs), (FLENS *et al.*, 1994; COLE & DEELEY, 2006). Na MRP1, estes sítios são funcionalmente não equivalentes. O NBD1 possui maior afinidade de ligação para ATP que o NBD2; o NBD2 possui maior capacidade de hidrolisar o ATP que o NBD1 (COLE & DEELEY, 2006). A ligação e a hidrólise do ATP fornecem a força necessária para bombear substratos para fora da célula. As proteínas transportadoras MRP1, MRP2, MRP3, MRP6 e MRP7 contêm um terceiro domínio *spanning* de membrana (MSD0), com aproximadamente 200 aminoácidos, que consiste de cinco hélices transmembranas, com uma região amino (NH<sub>2</sub>) terminal (Esquema 6), (BAKOS *et al.*, 1996; KAST & GROS, 1997; COLE & DEELEY, 2006).



#### A. MRP1, MRP2, MRP3, MRP6 e MRP7



#### B. MRP4, MRP5, MRP8 e MRP9

**Esquema 6:** Topologia estrutural proposta para as proteínas MRP (adaptado de BALLATORI *et al.*, 2005). **(A)** MRP1, MRP2, MRP3, MRP6 e MRP7 contêm MSD0 extra de cinco hélices transmembranas na região NH<sub>2</sub> terminal e MSD1 e MSD2 de seis hélices transmembranas cada, além de NBD1 e NBD2. **(B)** MRP4, MRP5, MRP8 e MRP9 contêm MSD1 e MSD2, bem como NBD1 e NBD2. MSD0, MSD1 e MSD2, domínios *spanning* de membrana; NBD1 e NBD2, sítios de ligação de nucleotídeos; NH<sub>2</sub>, região amino terminal; COOH; região carboxila terminal.

O segundo membro da família MRP é chamado de transportador de ânion orgânico multi-específico canalicular (cMOAT, MRP2), que está envolvido no transporte de vários compostos aniônicos, como conjugados à GSH, aos glucoronídeos e aos sais biliares, bem como no transporte de metais pesados, como a cisplatina. A MRP3 encontra-se expressa em altas concentrações no fígado e pode estar envolvida no efluxo de ânions orgânicos do fígado para a circulação sanguínea, na presença de obstrução biliar (ZENG *et al.*, 1999). A MRP4 e MRP5 transportam nucleosídeos e conferem resistência aos análogos de nucleosídeos antiretrovirais (LEONARD *et al.*, 2003). A MRP6 parece ser uma bomba aniônica lipofílica, com um amplo espectro de resistência aos fármacos (BELINSKY, *et al.*, 2002). A MRP7 parece estar pouco relacionada com a resistência à vincristina, à vimblastina e ao docetaxel e, de forma mais interessante, com a resistência ao docetaxol e outros taxanos (HOPPER-BORGE *et al.*, 2004). A MRP8 media o efluxo

de uma ampla variedade de análogos de nucleosídeos, bem como de substratos fisiológicos (CHEN *et al.*, 2005). Ainda não se conhecem substratos para a MRP9 (BORST *et al.*, 2006; HOOIJBERG, *et al.*, 2006).

## **2.7 MRP1 – PROTEÍNA DE RESISTÊNCIA ASSOCIADA A MÚLTIPLOS FÁRMACOS 1 E SUA RELAÇÃO COM O CÂNCER**

A MRP1 está expressa em concentrações moderadas na maioria dos tecidos normais, exceto no fígado, onde se encontra em concentrações relativamente baixas. Na maioria dos tecidos, a MRP1 está localizada na superfície celular basolateral, resultando no efluxo de substratos para a circulação sanguínea (LESLIE *et al.*, 2005; COLE & DEELEY, 2006). No cérebro, a MRP1 encontra-se na região apical da célula (GRAFF & POLLACK, 2004) e serve como uma barreira de permeabilidade de compostos entre o sangue e o fluido cerebrospinal (COLE & DEELEY, 2006). Nos tecidos em que está expressa, esta proteína serve como proteção pela redução do acúmulo celular de xenobióticos e de seus metabólitos (TRIBULL *et al.*, 2003; LESLIE *et al.*, 2005).

Entretanto, o aumento da expressão de MRP em células tumorais pode ser responsável, pelo menos *in vitro*, pela resistência celular contra muitos agentes. A expressão da MRP1 foi detectada em vários tumores sólidos, como por exemplo: câncer de mama, ovário, próstata e melanoma (HOOIJBERG *et al.*, 2006), e também em tumores hematológicos, como na leucemia linfoblástica aguda (SAUERBREY *et al.*, 2002; STAM *et al.*, 2004). Em células tumorais, as MRPs parecem estar localizadas predominantemente na membrana plasmática, o que contribui para a resistência celular (HOOIJBERG *et al.*, 2006).

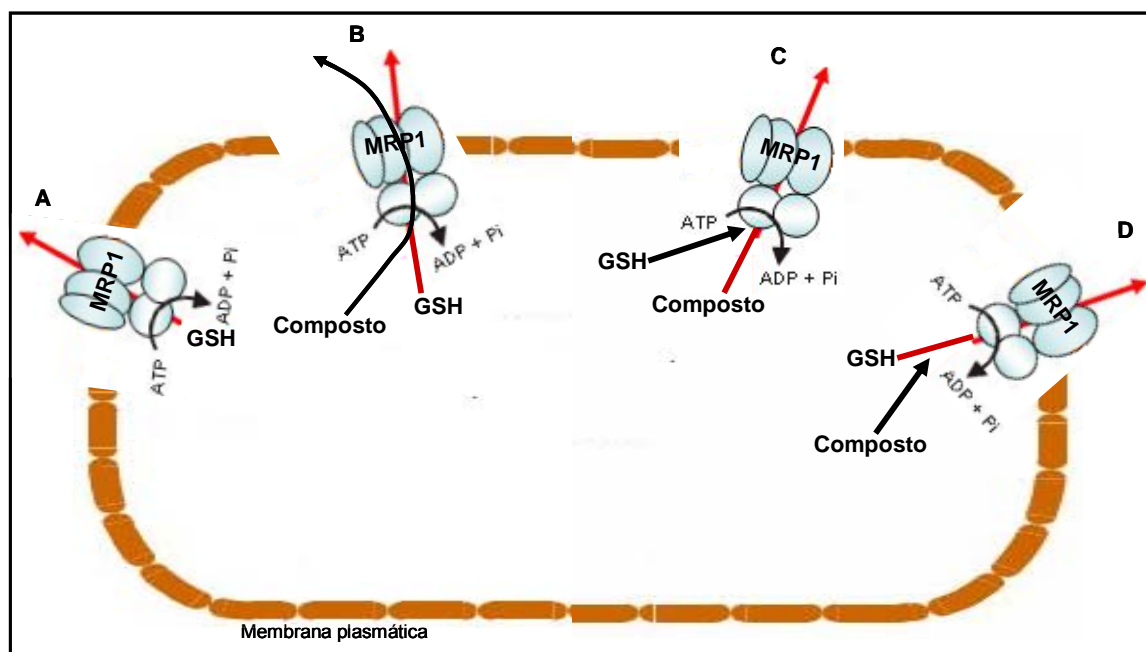
Vários trabalhos têm demonstrado que a MRP1 transporta compostos quimioterápicos para fora das células conjugadas à GSH (ZAMAN *et al.*, 1995; BORST *et al.*, 2000; BORST *et al.*, 2006; COLE & DEELEY, 2006) e que há correlação direta entre o aumento da expressão de MRP1 e de  $\gamma$ -GCS em células tumorais (ISHIKAWA *et al.*, 1996; KUO *et al.*, 1998). Além disso, está demonstrado que a redução da concentração de GSH diminui a resistência mediada pela MRP1, contra alcalóides da vinca e antraciclinas (ISHIKAWA *et al.*, 1996; KUO *et al.*, 1998; BORST *et al.*, 2000).

## 2.8 ENVOLVIMENTO DA GLUTATIONA NO TRANSPORTE MEDIADO PELA MRP1

Evidências iniciais para o transporte da GSH sobre a MRP1 foram sustentadas por estudos que utilizaram células que superexpressavam MRP1. Zaman *et al.* (1995) observaram um aumento do efluxo de GSH em células de carcinoma de pulmão, transfectadas com MRP1. Além disso, Lautier *et al.* (1996) associaram a elevada expressão da MRP1 em células HeLa transfectadas, com significativa diminuição das concentrações intracelulares de GSH, consistente com o efluxo de GSH sobre a MRP1 .

No entanto, a interação entre GSH e MRP1 é complexa e não está completamente esclarecida. A GSH parece interagir com a MRP1, através de pelo menos quatro diferentes mecanismos (BALLATORI *et al.*, 2005):

- A GSH por si só é substrato de baixa afinidade para MRP1 (Esquema 7, A);
- A GSH é requerida para o co-transporte de alguns substratos para MRP1 (Esquema 7, B);
- A GSH estimula o transporte de alguns compostos através da MRP1, mas ela não é co-transportada (Esquema 7, C);
- O transporte da GSH pode ser intensificado por certos compostos, que eles próprios não são substratos para MRP1 (Esquema 7, D).



**Esquema 7:** A GSH é um substrato e um co-substrato para MRP1, porém, os mecanismos exatos de transporte não estão bem definidos (adaptado de BALLATORI *et al.*, 2005). **(A)** GSH como substrato para MRP1. **(B)** A GSH é requerida para o co-transporte de alguns substratos para MRP1. **(C)** A GSH estimula o transporte de certos compostos pela MRP1, porém, a GSH não é co-transportada. **(D)** O transporte da GSH é acelerado por certos compostos, mas estes não são transportados pela MRP1.

Essas observações sugerem que a MRP1 pode mediar o efluxo de ambos, GSH e compostos, e que esses processos podem estar acoplados. Em estudos que utilizam vesículas enriquecidas com MRP1, o transporte de substratos, tais como, daunorubicina, doxorubicina, etoposídeos e vincristina, está aumentado na presença de GSH. Porém, não se sabe se esses compostos são conjugados à GSH, o que sugere o aumento de GSH para um possível mecanismo de co-transporte ou se a GSH é utilizada como um co-fator para o transporte do substrato (LOE *et al.*, 1996). Consistente com o mecanismo de co-transporte, a vincristina, os etoposídeos e, em menor extensão, a vimblastina estimulam o transporte de GSH para dentro de vesículas enriquecidas com MRP1 (RAPPA *et al.*, 1997, LOE *et al.*, 1998, MAO *et al.*, 2000). Assim, alguns fármacos derivados de produtos naturais, que não são conjugados com a GSH, podem ser transportados por um mecanismo de co-transporte (Esquema 7, B).

Entretanto, o mecanismo de co-transporte não é aplicado para todos os substratos que requerem a GSH para o efluxo sobre a MRP1. Tal análise pode ser verificada no estudo realizado por Zaman *et al.* (1995), que mostrou que a daunorubicina requer GSH para o transporte. Entretanto, este fármaco não estimula o transporte da GSH, contrariando o mecanismo de co-transporte (Esquema 7, C).

Adicionalmente, determinados bioflavonóides, como a naringenina e apigenina, que não são bons substratos para MRP1, estimulam a entrada da GSH em vesículas (Esquema 7, D) (LESLIE *et al.*, 2003). A tabela 3 mostra alguns compostos mencionados anteriormente e seus prováveis mecanismos de transporte sobre a MRP1.

**Tabela 3:** GSH e compostos (substratos) que podem afetar o transporte sobre a MRP1 (adaptado de BALLATORI *et al.*, 2005).

Compostos	Requer GSH para transporte	Transportado sobre a MRP1	Estimula o transporte da GSH	Mecanismo de co-transporte	Referências
Daunorubicina	Sim	Sim	Não	Não	ZAMAN <i>et al.</i> , 1995
Vincristina	Sim	Sim	Sim	Sim	LOE <i>et al.</i> , 1996
Vimblastina	Sim	Sim	Sim	Sim	LOE <i>et al.</i> , 1998
Bioflavonóides	Não	Não	Sim	Não	LESLIE <i>et al.</i> , 2003

Os resultados apresentados indicam que a GSH pode estimular o transporte sobre a MRP1, sem que ela própria seja transportada (Esquema 7, C), e que o transporte da GSH pode ser estimulado por compostos que parecem não participar ativamente do transporte, eles próprios não são transportados (Esquema 7, D), sugerindo que existe mais de um sítio de ligação do substrato sobre a MRP1 (BALLATORI *et al.*, 2005).

Embora esses sítios de ligação do substrato sobre a MRP1 não tenham sido identificados, tem-se sugerido que existam sítios que reconhecem substratos aniônicos e hidrofóbicos (HEIJN *et al.*, 1997). O tamanho e a orientação de um substrato, no seu sítio de ligação, podem determinar se a GSH poderia também ligar-se ou ser transportada. A GSH pode ser requerida para preencher completamente o sítio de ligação e conduzir o transporte mais eficiente de ambos, substrato e GSH (QIAN *et al.*, 2001).

Vários estudos de mutagêneses das hélices transmembranas (troca de aminoácidos) foram realizados para determinar quais resíduos na MRP1 são importantes para a ligação e transporte da GSH, e parece que a lisina<sup>332</sup> é essencial para a ligação e transporte da GSH sobre a MRP1 (HAIMEUR *et al.*, 2004). Outro fator importante que também parece afetar a eficiência do transporte é a

hidrofobicidade do substrato. Derivados do verapamil que são mais hidrofóbicos são capazes de intensificar o transporte da GSH sobre a MRP1, mais eficientemente do que os derivados hidrofílicos de verapamil (LOE *et al.*, 2000).

A GSH também pode influenciar a funcionalidade da MRP1, sem interagir diretamente com o sítio de ligação do fármaco, por estimular a ligação do ATP e a atividade da ATPase sobre a MRP1 (CHANG *et al.*, 1997). Além disso, a ligação da GSH pode levar a alterações conformacionais na MRP1, de tal forma que o transporte de certos substratos só ocorra na presença da GSH (MANCIU *et al.*, 2003).

Baseado nas informações acima, a GSH pode ser transportada pela MRP1 e, independente do mecanismo envolvido, sabe-se que a diminuição da concentração de GSH tem sido relacionada com a reversão da resistência a certos fármacos e, por sua vez, com o mecanismo de resistência mediado pela MRP1 (AKAN *et al.*, 2004, 2005). A vincristina, por exemplo, é transportada para fora da célula pela MRP1 em concentrações fisiológicas de GSH, e essa resistência pode ser revertida pela depleção de GSH (RENES *et al.*, 1999). Igualmente, a diminuição das concentrações intracelulares de GSH com BSO (L-butionina (S,R)-sulfoximina), um inibidor da síntese de GSH, reduz o transporte de vários compostos, como a daunorubicina, em células que superexpressam MRP1 (ZAMAN *et al.*, 1995).

Akan *et al.* (2004, 2005) investigaram o efeito de um composto precursor de glutathione, NAC (N-acetilcisteína) e do BSO, sobre a resistência da vincristina e doxorrubicina, mediada pela MRP1, em células de rim embrionário humano (HEK293) e células 293MRP, transfectadas com MRP1. Estas duas células foram incubadas com vincristina e doxorrubicina, na presença e ausência de NAC e/ou BSO, e observou-se que NAC aumentou a resistência destas células. Em contraste, BSO diminuiu a resistência mediada pela MRP1 na presença de NAC, indicando que a indução da resistência, mediada pela MRP1, depende da GSH e que o BSO parece ser um agente quimioterápico promissor em células tumorais que superexpressam MRP1.

Além da possibilidade de reversão da resistência mediada pela MRP1 com, utilização de um inibidor da síntese de GSH (BSO), realizaram-se vários estudos à cerca do fenótipo MDR, como um todo, com o objetivo de inibir os transportadores MDR, e conseqüentemente impedir o mecanismo de resistência. A reversão do fenômeno MDR pode ser realizada com o uso de inibidores da atividade funcional da

gpP e de outras bombas relacionadas. Dentre eles, podemos citar o Verapamil, a Trifluoperazina e a Ciclosporina A. Um fator limitante do uso de reversores MDR é a alta toxicidade, devido à necessidade de usar altas doses para potencializar o efeito dos quimioterápicos. Embora outros agentes reversores menos tóxicos e mais potentes tenham sido desenvolvidos, os estudos envolvendo a modulação clínica da MDR ainda não apresentam resultados satisfatórios (WAGNER-SOUZA *et al.*, 2003). Dessa forma, a investigação de novos compostos reversores da MDR pode abrir novos horizontes no tratamento da leucemia.

A triagem clínica ajuda a revelar problemas associados à combinação de fármacos anticâncer na quimioterapia, junto com um inibidor da MDR. O primeiro fator a ser determinado antes de iniciar uma triagem clínica é identificar a proteína transportadora ABC, envolvida na resistência ao fármaco, e utilizar um fármaco anticâncer que beneficiará a inibição da proteína transportadora. O segundo fator é monitorar as concentrações plasmáticas e a efetividade *in vivo* do inibidor da MDR, testado para verificar que uma concentração inibitória efetiva foi realmente realizada *in vivo* (OZBEN, 2006). Podemos citar como alguns exemplos de inibidores da MRP1: probenecide, MK571, VX-710 (biricodar), (AOUALI *et al.*, 2005) e MS-209 (OZBEN, 2006).

Poucos trabalhos têm demonstrado o papel do NO na MDR e, além disso, com resultados conflitantes. Riganti *et al.* (2005) demonstram que o NO reverte a resistência de células epiteliais de cólon humano, que são resistentes à doxorubicina (HT29-dx), através da nitração de resíduos de tirosina na proteína MRP3. Por outro lado, Watts *et al.* (2006) mostraram que o transporte de Ferro ( $^{59}\text{Fe}$ ), em células que superexpressam MRP1, é mediado pelo NO, através da formação do complexo GS-Fe-NO, o qual requer GSH. A utilização de compostos, que reduzem a concentração de GSH (BSO) ou de um inibidor da MRP1 (probenecide), impede o efluxo de  $^{59}\text{Fe}$  mediado pelo NO.

Em trabalhos anteriores demonstramos que linhagens de células leucêmicas linfoblásticas humanas e murinas apresentam atividade constitutiva do NF- $\kappa$ B, e que o NO e o taxol inibem a atividade constitutiva do NF- $\kappa$ B. No entanto, não há correlação direta entre o efeito inibitório sobre o NF- $\kappa$ B e a intensidade de morte celular causada por esses compostos (SANTOS-SILVA *et al.*, 2001). Posteriormente, mostramos a importância das concentrações de GSH na proteção celular contra os



efeitos citotóxicos do NO e do taxol, em linhagens de células linfoblásticas leucêmicas CEM (SANTOS-SILVA *et al.*, 2006). Além disso, foi observado que o taxol inibe a atividade da MRP nessas células, provavelmente indiretamente, através da redução da concentração de GSH (SOUZA, 2006). Como visto anteriormente, os sistemas de resistência das células são múltiplos e, apesar do grande número de trabalhos realizados nesta área, as interrelações entre os fatores responsáveis pela apoptose, e seus efeitos na resistência às drogas, ainda não estão completamente esclarecidos. Indubitavelmente, o entendimento dos mecanismos moleculares de resistência das células leucêmicas à apoptose, induzida por quimioterápico e/ou outros compostos, faz-se necessário para o avanço em direção ao desenvolvimento de compostos antineoplásicos, com citotoxicidade mais específica para as células tumorais e com menores efeitos colaterais para o paciente. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi investigar o envolvimento do NO e da GSH sobre a atividade e expressão da MRP1, em linhagem de células de leucemia linfoblástica murina (L-1210).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL**

Estudar o envolvimento do óxido nítrico (NO) nos mecanismos de resistência tumoral em células linfoblásticas leucêmicas.

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

- Estudar o mecanismo citotóxico de doadores de NO, em células de linhagem linfoblástica leucêmica L-1210;
- Analisar se o processo de morte celular, causado pelos doadores de NO, é por apoptose ou necrose;
- Avaliar a relação dos níveis de ATP com a citotoxicidade causada pelo NO, em células de linhagem linfoblástica leucêmica L-1210;
- Investigar a atividade da bomba de efluxo MRP1, em células de linhagem linfoblástica leucêmica L-1210;
- Associar o efeito do NO sobre a concentração intracelular de glutathione e a atividade da MRP-1 nas células de linhagem linfoblástica leucêmica L-1210;
- Estudar o envolvimento do NO na expressão da MRP-1, nas células de linhagem linfoblástica leucêmica L-1210.

#### 4. MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS

Os materiais e métodos utilizados, assim como os resultados obtidos, encontram-se, majoritariamente, descritos no artigo original submetido à revista *Nitric Oxide*, o qual está precedido por um breve resumo em português, com a finalidade de facilitar uma revisão rápida das informações mais relevantes contidas no mesmo.

Entretanto, alguns resultados importantes, para estabelecer as condições experimentais, não foram submetidos à publicação. Sendo assim, após a apresentação do artigo original submetido, são apresentados os materiais e métodos e resultados desses experimentos.

#### **4.1 ARTIGO SUBMETIDO: INVOLVEMENT OF NITRIC OXIDE ON MRP1 ACTIVITY IN L-1210 LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA CELLS**

Mirela Machado Hangai, Daniela Ferraz Pereira Leite, Samira Cardoso Ferreira, Jamil Assreuy, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa and Maria Cláudia Santos-Silva

##### **RESUMO**

**INTRODUÇÃO:** A proteína de resistência, associada a múltiplos fármacos 1 (MRP1), pertence à família de transportadores ABC (*ATP Binding-Cassette*). A MRP1 está relacionada à extrusão de compostos quimioterápicos, conjugados à glutationa (GSH), reduzindo seu acúmulo no interior da célula. A ativação ou superexpressão da MRP1 é capaz de conferir um fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (MDR), o que representa um obstáculo para o tratamento do câncer. A GSH é fundamental na defesa contra vários agentes tóxicos e, além disso, é um dos alvos intracelulares mais importantes do óxido nítrico (NO). Está demonstrado que altas concentrações de GSH são importantes para a resistência à apoptose, induzida por diferentes compostos, inclusive o NO, e que a diminuição da concentração de GSH pelo NO aumenta a sensibilidade da célula à ação terapêutica de alguns compostos quimioterápicos. No entanto, a interação entre GSH e MRP1 é complexa e não está completamente esclarecida.

**OBJETIVO:** Como a GSH é importante para o transporte mediado pela MRP1, no presente trabalho estudou-se o envolvimento da depleção da GSH induzida pelo NO, na atividade e expressão da MRP1, em células de linhagem linfoblástica leucêmica L-1210.

**MATERIAIS E MÉTODOS:** Compostos, doadores de NO (SNAP: 0.1 - 1 mM e GTN: 0.1 - 1 mM), BSO (0,01; 0,1 mM) e probenecide (PB: 1 – 10 mM) foram adicionados às células L-1210. Para os experimentos de viabilidade celular, determinação da concentração de GSH e verificação da apoptose, as células L-1210 foram incubadas por até 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada, monitorando-se a oxidação do MTT por enzimas mitocondriais (VAN DE LOOSDRECHT *et al.*, 1991), a

concentração de glutathiona reduzida (GSH) foi quantificada pelo método proposto por Tietze (1969) e a apoptose foi detectada pela fragmentação do DNA (HAN, 1997). Para os experimentos de citometria de fluxo (análise da atividade e expressão da MRP1), as células L1210 foram pré-incubadas na presença e na ausência de BSO (10  $\mu$ M and 100  $\mu$ M), por 12 horas, e incubadas por mais 6 horas com SNAP 1 mM. Para medir a atividade da MRP1 nas células L-1210, utilizou-se o teste de efluxo do substrato fluorescente CFDA (carboxi-5',6' diclorofluoresceína diacetato). Para isto, as células L-1210 foram incubadas com DMEM, na presença e na ausência de CFDA (4  $\mu$ M) e de um inibidor da MRP, probenecide (PB; 1 - 10 mM). A fluorescência foi medida por citometria de fluxo. A expressão da MRP1 foi verificada por citometria de fluxo, utilizando-se o anticorpo monoclonal primário de rato anti MRP1 e o anticorpo secundário anti-rato, obtido em cabra, conjugado à fluoresceína.

**RESULTADOS:** Nossos resultados mostraram que a incubação das células L-1210, com concentrações crescentes de doadores de NO, SNAP e GTN, induzem a morte celular de maneira concentração-dependente; a morte celular ocorreu por apoptose, pois ambos os compostos causaram fragmentação nuclear. Aproximadamente 80% das células L-1210 apresentaram atividade para MRP1, e o inibidor da MRP1 clássico, probenecide (1 - 10 mM), foi capaz de aumentar o acúmulo intracelular do substrato fluorescente, CFDA, sugerindo inibição da MRP1. O doador de NO, SNAP, induziu um efeito citotóxico concentração-dependente sobre as células L-1210. Este efeito citotóxico foi relacionado à diminuição da concentração de GSH e foi potencializado pela L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO), um inibidor da síntese de GSH. A redução da concentração de GSH, pelo SNAP ou BSO, foi associada ao aumento do acúmulo de CFDA. A co-incubação de SNAP e BSO aumentou o acúmulo de CFDA, exibindo um importante sinergismo de ação. A expressão da MRP1 não foi alterada pelo SNAP ou BSO, isoladamente. Entretanto, o co-tratamento de SNAP e BSO diminuiu a expressão de MRP1, em cerca de 16%.

**CONCLUSÃO:** Nossos resultados sugerem que o NO e o BSO diminuem a atividade da MRP1, indiretamente, através da diminuição da concentração intracelular de GSH. Além disso, há uma redução da expressão da MRP1 nas células de linhagem linfoblástica leucêmica murina L-1210.

#### 4.1.1 ABSTRACT

Multidrug resistance related protein 1 (MRP1/ ABCC1) is an ABC transporter protein related to the extrusion of chemotherapy drugs conjugated to glutathione (GSH) out of cells. MRP1 over-expression is able to confer a multidrug resistance phenotype, being an obstacle to the treatment of cancer. It is well known that high GSH levels are important to apoptosis resistance induced by different agents such as nitric oxide (NO) being one of the main of its intracellular targets. In the present work we studied the involvement of GSH on NO-induced cytotoxicity and its relationship with MRP1 activity and expression on a murine lymphoblastic leukemia L-1210 cell line. Approximately 80% of L-1210 leukemia cell were positive to MRP1 and the classical MRP1 inhibitor, probenecid (1-10 mM), was able to enhance intracellular accumulation of a fluorescent substrate, CFDA, suggesting ABCC1 inhibition. The NO donor SNAP induced a dose-dependent cytotoxic effect on L-1210 cells. This cytotoxic effect was related to GSH depletion and was potentialized by L-buthionine-S,R-sulfoximine (BSO), an inhibitor of GSH synthesis. The GSH depleting effects induced by SNAP or BSO were associated to increased CFDA accumulation. The co-incubation of SNAP and BSO highly increased CFDA accumulation exhibiting remarkable synergism. MRP1 expression was not altered by SNAP or BSO treatment *per se*, however the co-treatment of BSO and SNAP decreased MRP1 expression by about 15%. Our results suggest that NO and BSO diminish MRP1 activity directly through the MRP1 expression reduction and also indirectly through the depletion of GSH in murine lymphoblastic leukemia L-1210 cell line.

Keywords: Multidrug resistance protein 1; Nitric oxide; L-1210 leukemia cells

#### 4.1.2 INTRODUCTION

A major obstacle to the success of chemotherapeutic treatments is the occurrence of multidrug resistance (MDR) phenomenon in cancer patients [1, 2]. It is characterized by a cross-resistance of tumor cells to a whole variety of structural and functional unrelated anticancer drugs [3, 4]. Different mechanisms were shown to be involved in this phenomenon; however it is often correlated with the overexpression of transporter proteins, such as P-glycoprotein (Pgp/ABCB1) and/or multidrug resistance related protein (MRP1/ABCC1) [3, 5, 6]. These proteins belong to the ATP-binding cassette transporter superfamily and act as an energy-dependent efflux pump, extruding chemotherapeutic agents from the cell thereby reducing their cytotoxicity [7].

The broad distribution of MRPs in normal tissues suggests that they are potentially present in the majority of cancer kinds. Expression of MRP1 was detected in many solid tumors, such as lung and gastrointestinal carcinomas, melanomas, breast, ovary, and prostate cancers [8]. Increased expression of MRPs in tumor cells can be responsible for cellular drug resistance against many agents. Therefore, the relationship between expression of MRPs and the response of tumor cells to chemotherapy has been subject of many studies [8].

A significant amount of evidence has been compiled in recent years demonstrating the involvement of GSH in drug resistance [9, 10]. MRP1 was first described as a glutathione S-conjugate transporter, exhibiting a high affinity for the endogenous glutathione S-conjugate [7, 9, 10]. However the interaction between GSH and MRP1 is complex and is not yet completely understood [11, 12]. Decreasing intracellular GSH levels with L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO), an specific inhibitor of GSH synthesis, reduces transport of chemotherapeutic drugs such as doxorubicin and vincristine, which are substrates of MRP1 [11]. In fact, other studies have demonstrated that depletion of GSH, in cell lines overexpressing MRP1, reverses the resistance phenotypes [13, 14].

Nitric oxide (NO) is an endogenous mediator involved in a wide range of biological functions including blood pressure regulation, neurotransmission and neuromodulation, immune response and cytotoxic activity [15, 16]. The cell response to NO depends on a complex set of molecular interactions that are time and dose-

dependent and may also be cell type specific [15]. One of the NO mechanisms of action is to deplete the intracellular levels of GSH, increasing the therapeutic action of some chemotherapeutic compounds [17].

Numerous works have analyzed the role of NO in apoptosis which is still conflicting, since NO can be either pro- or anti-apoptotic [15, 17, 18]. Several reports indicate that NO shows cytotoxic effect for human cell lines from patients presenting leukemia and lymphoma [19]. This finding increases the possibility of NO donors being used as chemotherapeutic agents for hematological disorders [20]. Besides, it was suggested that the reduced synthesis of NO might be implicated in the beginning of MDR phenotype and that the restoration of NO production reverses this phenotype [21].

Our previous studies have demonstrated that NO induced a depletion of GSH levels and cell death in CEM cells, and that these effects were potentialized by BSO [22]. As GSH is an important molecule to the transport mediated by MRP1, in the present work we investigated the involvement of NO and GSH on MRP1 activity and expression in a murine lymphoblastic leukemia cell line, L-1210.



### 4.1.3 MATERIALS AND METHODS

#### 4.1.3.1 Reagents

Tissue culture media, serum and antibiotics were purchased from GIBCO (São Paulo, Brazil). Carboxy-5'-6'-dichlorofluorescein diacetate (CFDA) was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). MTT (3-[4,5-dithylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), bromide ethidium, probenecid (PB), DTNB (5,5'- dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), glutathione reductase, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) and BSO (L-buthionine-[S,R]-sulphoximine) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Primary rat monoclonal antibody anti-MRP1 (ABCC1) was purchased from Alexis Biochemicals and the goat anti-rat secondary (fluorescein conjugated) antibody was purchased from Sigma. S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP) was synthesized according to method of Field (1978) [23]. Nitroglycerin (NTG) was obtained from Cristália (Itapira, SP, Brazil).

#### 4.1.3.2 Cell culture

Murine L-1210 lymphoblastic leukemia cells (ATCC, Manassas, VA) were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 10 mM HEPES, pH 7.4 at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. Every 2–3 days, cells were passaged by removing 90% of supernatant and replacing it with fresh medium.

#### 4.1.3.3 Treatments and viability assay (MTT assay)

SNAP (0.1-1 mM), nitroglycerin (NTG, 0.1-1 mM) and BSO (0.01 and 0.1 mM) were added to cells ( $5 \times 10^5$ ) in a maximum volume of 20 µL. Cells were then incubated up to 24h. Cell viability was monitored by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay [24]. All reagents were freshly dissolved in cell culture medium.

#### 4.1.3.4 DNA fragmentation analysis by gel electrophoresis

Isolation of apoptotic DNA fragments was performed following the method of Han (1997) with a minor modification. To isolate DNA fragments cells were harvested and washed twice with cold phosphate buffer saline (PBS). Cell pellets were then incubated in a lyses buffer containing 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.25% NP-40, 0.5 g/L proteinase K at 50°C for 2 h. DNA was then precipitated with 2.5 vol of ethanol at -25°C overnight and dried in air. After washing with ice-cold 70% ethanol, the pellets were then dissolved in TE buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA and 0.6 mg/ml RNase A and incubated at 37°C for 1 h. Horizontal electrophoresis was performed at 200 V for 10 min in 1,0% agarose gel (Sigma) complemented with 1 µL ethidium bromide (1g/100ml). Separated DNA fragments were visualised using UV transilluminator (Macrovue UV-20 230V, Amersham Pharmacia Biotech AB, USA).

#### 4.1.3.5 Glutathione measurement

Total glutathione (GSH + GSSG, reduced and disulphide forms, respectively) were measured through the glutathione reductase method [25]. Briefly,  $5 \times 10^5$  cells were washed in PBS, resuspended in 100 µL chilled Milli-Q water containing 1mM EDTA and sonicated for 10 s. Then, 20 µL of each homogenate were transferred to a 96-well plate followed by addition of 180 µL of the reaction medium containing DTNB 75 µM; NADPH 120 µM, glutathione reductase 1 U/mL and EDTA 10 mM in phosphate buffer 100 mM, pH 7.4. A standard curve was made with GSH (0.001–1 µM). The absorbance was measured immediately and then every min during 5 min at 412 nm using a Microwell Systems (Organon Teknika). Values were expressed as percentage of control GSH values.

#### 4.1.3.6 MRP- related transport activity

MRP-related transport activity was investigated through the fluorescent probe CFDA efflux assay as described by Leite *et al.* (2006) [26]. Briefly, cells ( $5 \times 10^5$  cells / 0.3 mL) were loaded with 4 µM CFDA in the presence or absence of probenecid (1-

10 mM), a MRP inhibitor, for 30 min at 37°C. CFDA, a non-polar-non-fluorescent compound, freely diffuses into cells where it is cleaved by esterases, resulting in fluorescent CF (dichlorofluorescein), a substrate for MRP1 and MRP2 [27, 28]. Afterward, the cells were washed and incubated for a further 30 min at 37°C to determine dye extrusion. Analysis of the amount of dye accumulated by the cells was carried out on a FACScalibur (Becton and Dickinson, USA) equipped with a 15 mW argon-ion laser, emissions 488 nm and 585 nm. Controls performed without CFDA revealed the presence of autofluorescence (AUTO), which established the fluorescence threshold below which CFDA incorporation was not significant. For those experiments data were acquired in a mode of 10000 events, and a gate based on forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) parameters was made to analyze only viable cells. All flow cytometry analysis was accomplished by using WINMDI, version 2.8.

#### **4.1.3.7 MRP1 expression**

MRP1 expression was done as described by Echevarria-Lima *et al.* (2005) [29]. Briefly, the method consists in wash  $5 \times 10^5$  cells with PBS and permeabilized with FACS lysing solution (Becton & Dickinson, USA) for 30 min at room temperature. Cells were washed with PBS and incubated with the primary mouse monoclonal antibody (1:50), followed by incubation with goat anti-rat secondary antibody (1:100) conjugated with fluorescein for 20 min at room temperature. Cells were then washed in PBS and analyzed by flow cytometry. Analyses were performed by flow cytometry using a FACScalibur (Becton and Dickinson, USA). The data were analyzed by WinMID software, version 2.8.

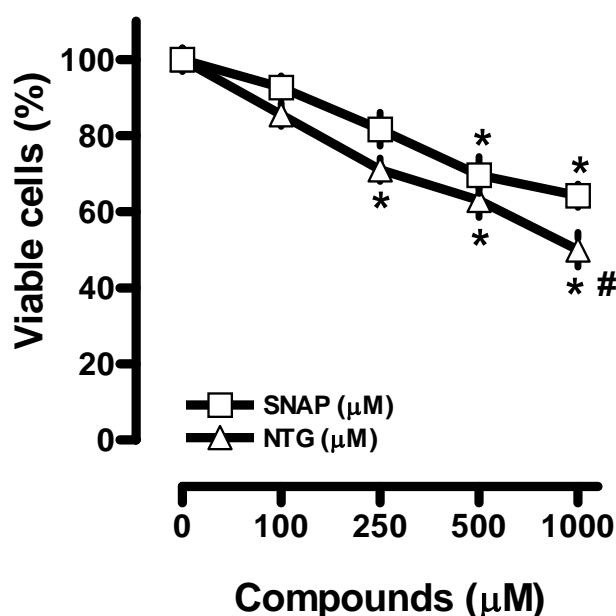
#### **4.1.3.8 Statistical analysis**

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of triplicate wells. Each experiment was repeated at least three times with similar results. Statistical significance was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post-hoc t test. A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

#### 4.1.4 RESULTS

##### 4.1.4.1 Effect of SNAP and NTG on cytotoxicity of L-1210 cells

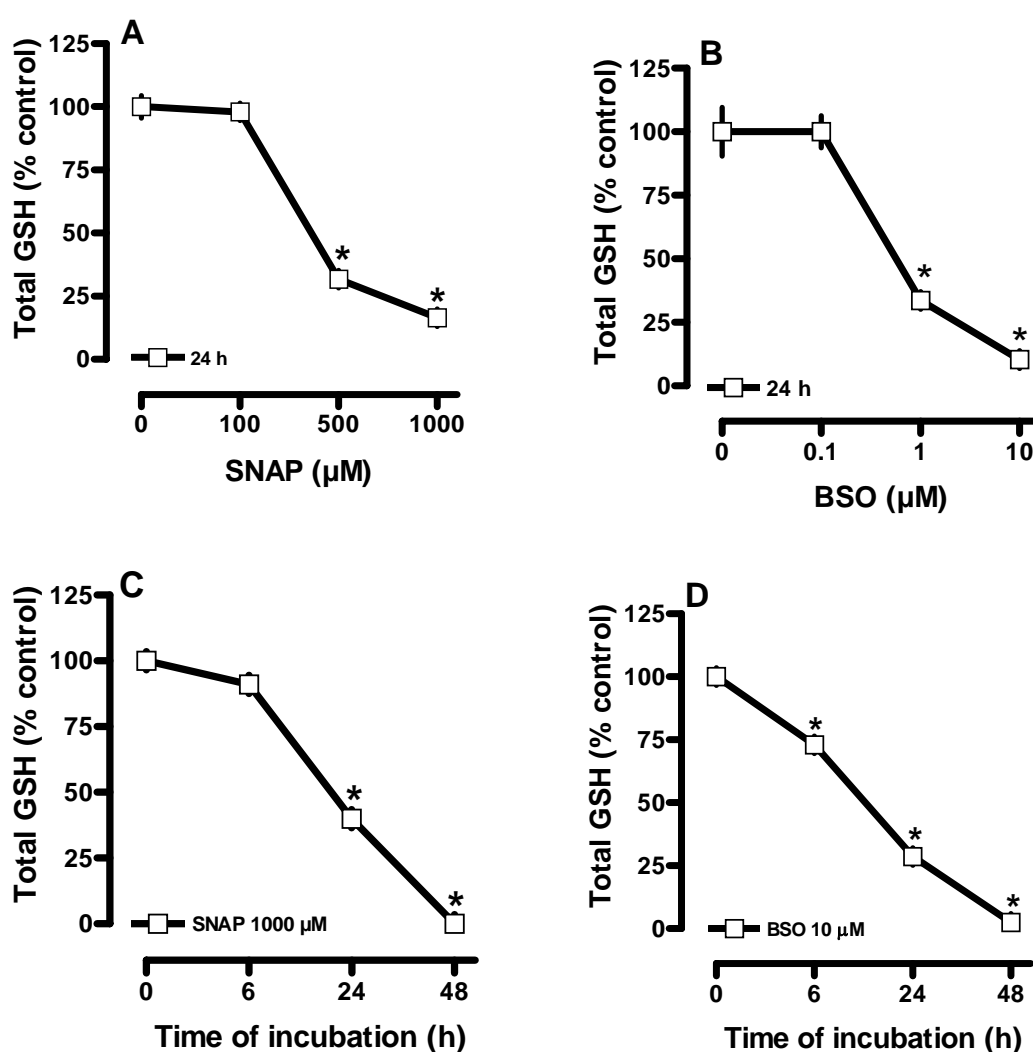
Incubation of L-1210 cells with increasing concentrations of SNAP for 24 h caused significant cell death in a concentration-dependent manner (Fig. 1). Other NO donor, NTG (nitroglycerin), which has been used for the treatment of coronary artery disease [30], was also tested and it caused a significant cell death at concentration of 250  $\mu\text{M}$  (Fig. 1). To clarify if the cell death-inducing effect of SNAP and NTG was due to apoptosis DNA fragmentation, a hallmark of apoptosis, was assessed. DNA damage was observed 24 h after exposure of increasing concentrations of SNAP and NTG (data not shown).



**Figure 1.** Cytotoxicity of SNAP and NTG on murine lymphoblastic leukemia L-1210 cell line. Cells were incubated with SNAP or GTN in increasing concentrations for 24 h. Cells were washed and processed for MTT assay. Optical density of control groups was taken as 100% cell viability confirmed by Trypan Blue exclusion. Cell viability was also checked at the beginning and at the end of experiment by Trypan Blue exclusion. Data are means  $\pm$  SEM of triplicates from three independent experiments. \* $p < 0.05$  compared to control group and. #  $p < 0.05$  compared to SNAP 1000  $\mu\text{M}$ .

#### 4.1.4.2 Effect of SNAP and BSO on GSH levels in L-1210 cells

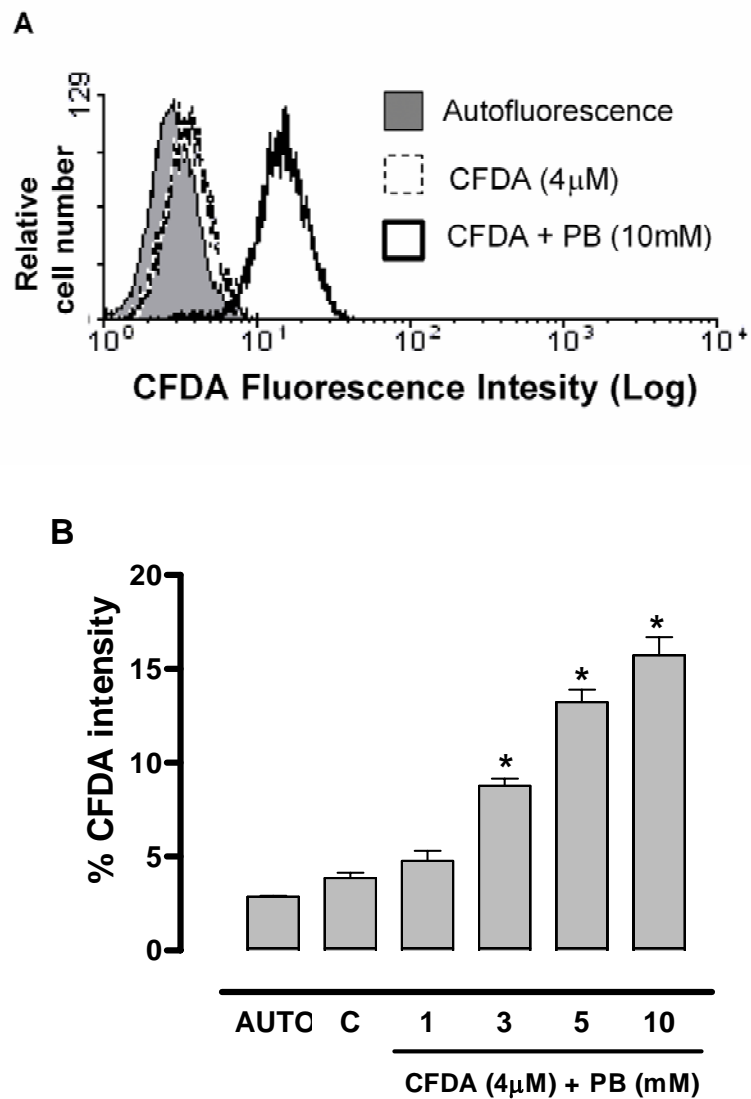
SNAP induced a significant decrease in intracellular GSH levels in a concentration-dependent manner, presenting a reduction of 83.5% at 1 mM (Fig. 2, Panel A). As expected, treatment with BSO also resulted in GSH depletion (Fig. 2, Panel B). In Fig. 2, panels C and D show that SNAP and BSO induced GSH depletion in a time-dependent manner. More over, cells treated with both agents, BSO and SNAP for 6h had its glutathione content reduced by 95% (data not shown).



**Figure 2.** Effect of SNAP and BSO on GSH levels in L-1210 cells. Concentration-response curves of SNAP (**Panel A**) and BSO (**Panel B**). Time course curves were obtained with 1000  $\mu\text{M}$  SNAP (**Panel C**) and 10  $\mu\text{M}$  BSO (**Panel D**). Cells were plated ( $5 \times 10^5$  per well) in 96-well plates in DMEM and incubated for 24 h (**Panel A and B**) or 6, 24 and 48 h (**Panel C and D**). Total glutathione (GSH + GSSG) was measured in cell lysates using the glutathione reductase method, as described in Materials and Methods section. The values of GSH levels of control group at 6, 12 and 48 h were taken as 100%. Data are mean  $\pm$  SEM of triplicates from three independent experiments. \* $p < 0.05$  compared to control group.

#### 4.1.4.3 MRP1-related transport activity

To evaluate the relative contributions of MDR proteins to prognosis in clinical trials, functional tests measuring the fluorescent dye uptake/efflux in tumor cells by flow cytometry have been widely used [27, 28, 31, 32]. The MRP1 activity was analyzed as previously described [26]. The efflux of the MRP1 fluorescent substrate CFDA was studied with L1210 cells. Briefly, cell suspensions at  $10^6$  cells/mL were incubated with 4  $\mu$ M of CFDA, in the presence or absence of the MRP inhibitor probenecid (PB, 1 – 10 mM). The experiment was performed as detailed in the material and methods section. Controls performed without CFDA revealed the presence of autofluorescence (AUTO), which established the fluorescence threshold below which CFDA incorporation was not significant. The increase in CFDA accumulation after incubation with the MRP inhibitor, probenecid, was represented as the mean of intracellular CFDA fluorescence intensity. As shown in Fig. 3 (Panel A and B) L-1210 cells almost did not retain CFDA intracellularly and PB increased CFDA accumulation in a concentration dependent manner. Probenecid (10 mM) increased CFDA fluorescence accumulation by about 5 fold, suggesting that MRP is active in L1210 cells and that PB inhibited MRP-related transport activity.

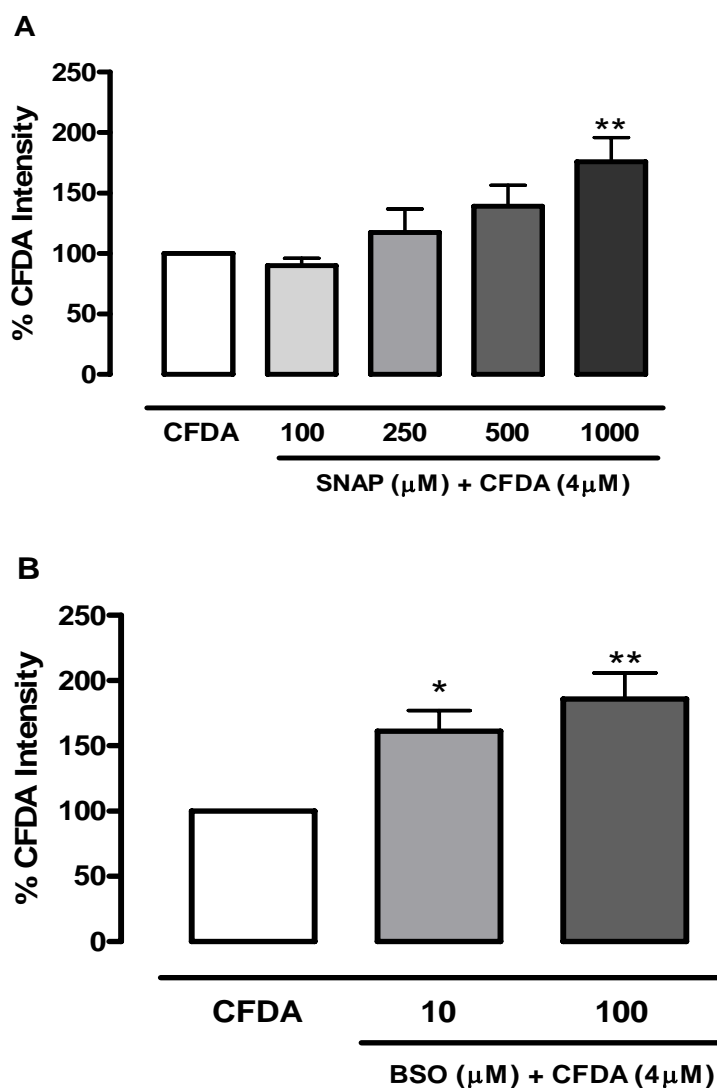


**Figure 3.** Dose-dependent inhibition of MRP1 activity by probenecid. CFDA mean fluorescence intensity of cells treated with different concentrations of the MRP reversor probenecid (PB). Cells treated or not with PB were incubated in absence (autofluorescence) or presence of CFDA (4  $\mu$ M) for 30 min at 37°C as described in Material and Methods section. Panel A. A representative histogram showing CFDA accumulation in the presence of PB (10 mM). Panel B. A representative graph showing CFDA mean intensity quantification in the presence of different concentration of PB (1-10 mM).

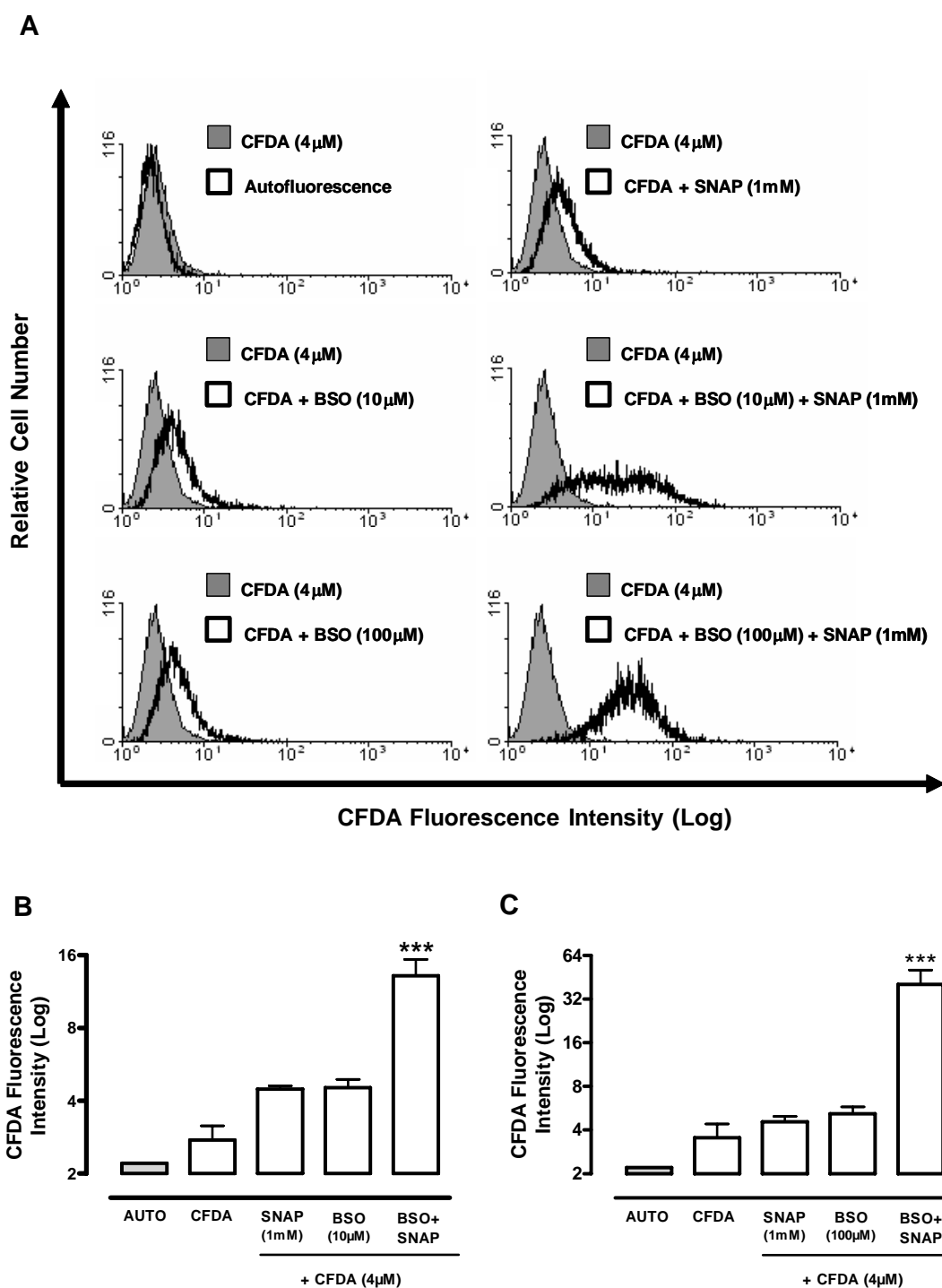
#### 4.1.3.4 Effect of SNAP and/or BSO on CFDA intracellular accumulation

As both, SNAP and BSO were able to reduced GSH levels (Fig. 2), and as this thiol is important to MRP activity [7] we investigated if SNAP and/or BSO we able to inhibit MRP activity after a 6h-treatment. As shown in Fig. 4 (Panel A) SNAP slightly enhanced intracellular CFDA accumulation in a concentration dependent manner, SNAP (1 mM) induced a 65% increase in CFDA fluorescence intensity, suggesting MRP activity reduction. On the same way, 10  $\mu$ M and 100  $\mu$ M BSO were able to increase CFDA fluorescence intensity by about 60 and 85% respectively, as shown in Fig. 4 (Panel B). Therefore we analyzed MRP1 activity in cells treated with both agents. As shown in Fig. 5 (Panel A), co-incubation of SNAP and 100  $\mu$ M BSO highly increased the accumulation of CFDA. BSO (10 or 100  $\mu$ M) exhibit remarkable synergism with SNAP (1 mM) increasing CFDA accumulation by about  $4.8 \pm 0.8$  (Fig 5B) and  $11.4 \pm 2.8$  fold (Fig 5C) respectively, displaying a higher effect comparing to probenecid on CFDA accumulation.





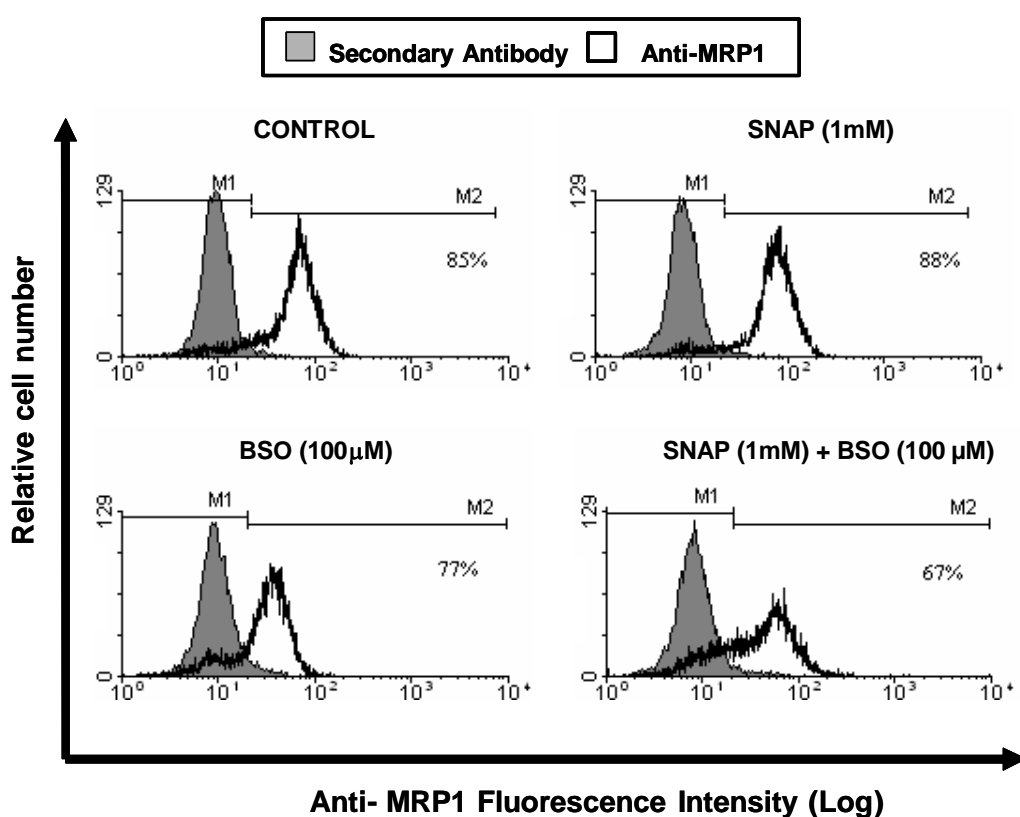
**Figure 4.** Effect of SNAP or BSO on CFDA accumulation. L1210 cells were treated with SNAP (100 – 1000  $\mu\text{M}$ ) for 6 hours or with BSO (10 or 100  $\mu\text{M}$ ) for 12h at 37°C. After treatment, cells were loaded with the fluorescent CFDA (4  $\mu\text{M}$ ) for 30 min at 37°C, then cells were washed and incubated for a further 30 min at 37°C to determine dye accumulation. **Panel A.** Effect of different concentrations of SNAP on CFDA accumulation. **Panel B.** Effect of BSO at different concentrations on CFDA accumulation. The fluorescence was measured by flow cytometry, as described in Materials and Methods. The results are expressed as the percentage of CFDA fluorescence. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .



**Figure 5.** Effect of SNAP and BSO co-treatment on CFDA intracellular accumulation. L1210 cells were pre-incubated with BSO (10  $\mu$ M or 100  $\mu$ M) for 12 hours at 37°C and incubated for more 6 hours with SNAP (1 mM). Cells treated or not with BSO/SNAP were incubated in absence (autofluorescence, AUTO) or presence of CFDA (4  $\mu$ M) for 30 min at 37°C. Thereafter, the cells were washed and incubated for a further 30 min at 37°C to determine dye accumulation. The fluorescence was measured by flow cytometry, as described in Materials and Methods. **Panel A.** A representative histogram showing the effect of BSO (10 or 100  $\mu$ M) and/or SNAP (1 mM) on CFDA accumulation. **Panel B.** Quantification of CFDA mean fluorescence intensity inside cells treated with BSO (10  $\mu$ M), SNAP (1 mM) or BSO (10  $\mu$ M) plus SNAP. **Panel C.** Quantification of CFDA mean fluorescence intensity inside cells treated with BSO (100  $\mu$ M), SNAP (1 mM) or BSO (100  $\mu$ M) plus SNAP. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of at least three different experiments. \*\*\* $P < 0.001$ .

#### 4.1.4.5 Effect of SNAP and/or BSO on MRP1 expression in L-1210 cells

To analyze the expression of MRP1, L-1210 cells were stained with anti-MRP1 antibody and analyzed by flow cytometry (Fig. 6). Almost the whole cell control population was positive for MRP1 ( $81.7 \pm 2.2\%$ ). However, no differences in MRP1 expression were observed when L-1210 cells were treated with 1 mM SNAP or 100  $\mu$ M BSO ( $86.9 \pm 2.8\%$  and  $77.9 \pm 2.5\%$ , respectively). In addition, the co-incubation of SNAP with BSO slightly decreased the MRP1 expression ( $68.8 \pm 4.8\%$ ),  $P < 0.05$ .



**Figure 6.** Expression of MRP1 in L1210 cells. Cells were loaded with anti-MRP1 monoclonal antibody and secondary antibody, as described in Materials and Methods. Representative histogram showing the expression of MRP1 on L1210 cell line (A) and effect of SNAP (1 mM) (B), BSO (100  $\mu$ M) (C) and of the co-treatment of SNAP and BSO (D) on MRP1 expression.

#### 4.1.5 DISCUSSION

The goal of the acute leukemia therapy is the eradication of neoplastic/leukemia clone and the restoration of normal hematopoiesis. This has been achieved using aggressive suppressive chemotherapy, which rapidly reduces the number of leukemic cells. However, conventional chemotherapy is frequently associated with the development of multidrug resistance systemic toxicity, thereby limiting therapeutic effectiveness [33-35]. Considering these points, new therapeutical targets are being investigated.

NO has been described to induce apoptosis in various kinds of tumor cells, including leukemia cells [15, 16, 18, 36, 37]. NO cause apoptosis by various mechanisms including inhibition of mitochondrial respiration [38], ion channels nitrosylation, proteins ADP-rybosylation [39, 40], induction of DNA damages, stimulation of enzymes expression and transcription factors involved in DNA repair and modulation of apoptosis, such as the tumor suppressor p53 [18], caspases activation [41], PARP induction [42] and down-regulation of the anti-apoptotic protein bcl-2 [43]. One of the main intracellular targets for NO action is glutathione (GSH). GSH is the major intracellular non-protein thiol, and its redox status is critical for various biological events, including transcriptional activation of specific genes and modulation of redox-regulated signal transduction [44]

We have previously described that NO exhibits a cytotoxic effect on lymphoblastic leukemia cell lines, and that taxol synergizes with NO [45]. In the present work, incubation of L-1210 cells with increasing concentrations of NO donors, SNAP and NTG (that has long been used as a vasodilator for treatment of angina pectoris) [30, 46], induced cell killing in a concentration-dependent manner and caused DNA fragmentation (data not shown). Moreover, we have demonstrated the involvement of GSH in NO-induced cytotoxic effects on CEM leukemia cells [22]. NO induced a GSH depletion in CEM cells, which was potentiated by L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO) [22]. Same results were observed in L-1210 leukemia cells (data not shown). Our results show that SNAP and BSO decreased GSH levels in L-1210 cells in concentration- and time-dependent manner. In addition, concentration-response curves for GSH depletion were accompanied by decreases in cell viability. For example, GSH depletion was observed in SNAP concentrations above 500  $\mu$ M,

the same concentration in which cell death started to take place. These results demonstrated that NO and BSO reduced the levels of intracellular GSH, what could promote cell oxidative and nitrosative damages.

GSH metabolism has also been associated with some multidrug resistancerelated proteins (MRP), that extrude chemotherapy drugs conjugated to or cotransported with GSH [7, 9, 47]. In addition, the drug transport seems to be dependent on the continued synthesis of GSH and it can be blocked by BSO, an inhibitor of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS), which is the rate-limiting enzyme for GSH synthesis [42, 48]. Therefore we analyzed the effect of NO and BSO on MRP-related activity through flow cytometry.

Our data demonstrated that MRP1 is expressed and active in L-1210 cells, and in agreement with others [26, 48], BSO treatment was able to increase CFDA (a fluorescent MRP substrate) accumulation, in a dose dependent manner suggesting MRP activity reduction. Our results also demonstrated that SNAP slightly increase CFDA accumulation, *per se*, probably by reducing GSH levels. It was already demonstrated that NO donors could reverse doxorubicin resistance in a human colon cancer cell line that over express MRP3 by nitrating this protein [21]. This possibility is not excluded in our system.

Moreover, CFDA accumulation was higher after SNAP and BSO co-treatment comparing to the treatment of SNAP and BSO alone, suggesting that there is an important synergism of action leading to an intense inhibition of MRP activity. This phenomenon could be explained by the combined effect of these two agents on the reduction of GSH levels, (95% in a 6h-treatment). Another possible explanation for the synergism observed between SNAP and BSO over MRP activity would be that these two agents could reduce MRP1 protein expression. In fact, our results demonstrated that the co-treatment of SNAP and BSO slightly decreased MRP1 expression (16%). On the other side, our results showed that SNAP or BSO did not alter MRP1 expression in this cell line *per se*.

Recently other works linking these systems have been published. It have been demonstrated that MRP1 inhibition could diminish NO production, by inhibiting INOS expression [26]. More over, it is known that NO produced by macrophages plays an important role in the cytotoxic mechanisms against tumor cells by inducing iron (Fe) release. Watts and collaborators [49] have shown that NO-mediated Fe efflux from

cells required GSH and occurred as a GS–Fe–NO complex, which is exported from cells by MRP1.

Our results demonstrated that NO and BSO induced GSH depletion, inhibiting MRP1 activity and expression, in L-1210 cells. Those observations suggested that the efflux of anti-tumoral drugs and also physiological complexes by MRP could be in some way controlled by use of NO donors and that NO donors could be helpful for anti-tumoral strategies.

#### **4.1.6 ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank Dr Maria Luiza Bazzo for the use of her laboratory facilities. This work was supported by: Fundo de Apoio a Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina (FUNPESQUISA/UFSC), Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX, Brazil), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq, Brazil) and Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC, Brazil). Mirela M. Hangai is a recipient of MD fellowship from CAPES and Daniela F. P. Leite is a recipient of a PhD fellowship from CNPq.

#### 4.1.7 REFERENCES

- [1] T. Ozben, Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer, *FEBS Lett* 580 (2006) 2903-2909.
- [2] E.M. Leslie, R.G. Deeley, S.P. Cole, Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense, *Toxicol Appl Pharmacol* 204 (2005) 216-237.
- [3] R. Krishna, L.D. Mayer, Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs, *Eur J Pharm Sci* 11 (2000) 265-283.
- [4] D.R. Hipfner, R.G. Deeley, S.P. Cole, Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1, *Biochim Biophys Acta* 1461 (1999) 359-376.
- [5] D.F.P Leite, J. Echevarria-Lima, L.T. Salgado, M.A. Capella, J.B. Calixto, V.M. Rumjanek, In vivo and in vitro modulation of MDR molecules in murine thymocytes, *Int Immunopharmacol* 6 (2006) 204-215.
- [6] A. Bielak-Mijewska, K. Piwocka, A. Magalska, E. Sikora, P-glycoprotein expression does not change the apoptotic pathway induced by curcumin in HL-60 cells, *Cancer Chemother Pharmacol* 53 (2004) 179-185.
- [7] P. Borst, R. Evers, M. Kool, J. Wijnholds, A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins, *J Natl Cancer Inst* 92 (2000) 1295-1302.
- [8] J.H. Hooijberg, N.A. de Vries, G.J. Kaspers, R. Pieters, G. Jansen, G.J. Peters, Multidrug resistance proteins and folate supplementation: therapeutic implications for antifolates and other classes of drugs in cancer treatment, *Cancer Chemother Pharmacol* 58 (2006) 1-12.



- [9] M.L. O'Brien, K.D. Tew, Glutathione and related enzymes in multidrug resistance, *Eur J Cancer* 32A (1996) 967-978.
- [10] I. Akan, S. Akan, H. Akca, B. Savas, T. Ozben, Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) mediated vincristine resistance: effects of N-acetylcysteine and Buthionine sulfoximine, *Cancer Cell Int* 5 (2005) 22.
- [11] N. Ballatori, C.L. Hammond, J.B. Cunningham, S.M. Krance, R. Marchan, Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins, *Toxicol Appl Pharmacol* 204 (2005) 238-255.
- [12] T. Bagrij, A. Klokouzas, S.B. Hladky, M.A. Barrand, Influences of glutathione on anionic substrate efflux in tumour cells expressing the multidrug resistance-associated protein, MRP1, *Biochem Pharmacol* 62 (2001) 199-206.
- [13] J. Renes, E.G. de Vries, E.F. Nienhuis, P.L. Jansen, M. Muller, ATP- and glutathione-dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRP1, *Br J Pharmacol* 126 (1999) 681-688.
- [14] C.H. Versantvoort, H.J. Broxterman, T. Bagrij, R.J. Scheper, P.R. Twentyman, Regulation by glutathione of drug transport in multidrug-resistant human lung tumour cell lines overexpressing multidrug resistance-associated protein, *Br J Cancer* 72 (1995) 82-89.
- [15] G.A. Blaise, D. Gauvin, M. Gangal, S. Authier, Nitric oxide, cell signaling and cell death, *Toxicology* 208 (2005) 177-192.
- [16] S. Moncada, R.M. Palmer, E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacol Rev* 43 (1991) 109-142.
- [17] D.A. Wink, J.B. Mitchell, Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide, *Free Radic Biol Med* 25 (1998) 434-456.

- [18] J.P. Kolb, Mechanisms involved in the pro- and anti-apoptotic role of NO in human leukemia, *Leukemia* 14 (2000) 1685-1694.
- [19] J.G. Filep, C. Baron, S. Lachance, C. Perreault, J.S. Chan, Involvement of nitric oxide in target-cell lysis and DNA fragmentation induced by murine natural killer cells, *Blood* 87 (1996) 5136-5143.
- [20] M. Tsumori, J. Tanaka, K. Koshimura, M. Kawaguchi, Y. Murakami, Y. Kato, Cytotoxic effect of nitric oxide on human hematological malignant cells, *Acta Biochim Pol* 49 (2002) 139-144.
- [21] C. Riganti, E. Miraglia, D. Viarisio, C. Costamagna, G. Pescarmona, D. Ghigo, Nitric oxide reverts the resistance to doxorubicin in human colon cancer cells by inhibiting the drug efflux, *Cancer Res* 65 (2005) 516-525.
- [22] M.C. Santos-Silva, M.S. Freitas, J. Assreuy, Involvement of NF-kappaB and glutathione in cytotoxic effects of nitric oxide and taxol on human leukemia cells, *Leuk Res* 30 (2006) 145-152.
- [23] L. Field, R.V. Dilts, R. Ravichandran, P.G. Lenhert, G.E. Carnahan, An unusually stable thionitrite from N-acetyl-D,L-penicillamine; X-ray crystal and molecular structure of 2-(acetylamino)-2-carboxy-1,1-dimethylethyl thionitrite, *J Chem Soc, Chem Commun*, (1978) 249-250.
- [24] A.A. van de Loosdrecht, E. Nennie, G.J. Ossenkoppele, R.H. Beelen, M.M. Langenhuijsen, Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study, *J Immunol Methods* 141 (1991) 15-22.
- [25] F. Tietze, Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues, *Anal Biochem* 27 (1969) 502-522.

- [26] D.F.P Leite, J. Echevarria-Lima, J.B. Calixto, V.M. Rumjanek, Multidrug resistance related protein (ABCC1) and its role on nitrite production by the murine macrophage cell line RAW 264.7, *Biochem Pharmacol* (2006)
- [27] A. Maftah, O. Huet, P.F. Gallet, M.H. Ratinaud, Flow cytometry's contribution to the measurement of cell functions, *Biol Cell* 78 (1993) 85-93.
- [28] D.M. van der Kolk, E.G. de Vries, J.A. Koning, E. van den Berg, M. Muller, E. Vellenga, Activity and expression of the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 in acute myeloid leukemia cells, tumor cell lines, and normal hematopoietic CD34+ peripheral blood cells, *Clin Cancer Res* 4 (1998) 1727-1736.
- [29] J. Echevarria-Lima, F. Kyle-Cezar, D.F.P. Leite, L. Capella, M.A. Capella, V.M. Rumjanek, Expression and activity of multidrug resistance protein 1 in a murine thymoma cell line, *Immunology* 114 (2005) 468-475.
- [30] N. Marsh, A. Marsh, A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology, *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27 (2000) 313-319.
- [31] A.L. Dogan, O. Legrand, A.M. Faussat, J.Y. Perrot, J.P. Marie, Evaluation and comparison of MRP1 activity with three fluorescent dyes and three modulators in leukemic cell lines, *Leuk Res* 28 (2004) 619-622.
- [32] A.A. Neyfakh, Use of fluorescent dyes as molecular probes for the study of multidrug resistance, *Exp Cell Res* 174 (1988) 168-176.
- [33] A.L. Harris, DNA repair: relationship to drug and radiation resistance, metastasis and growth factors, *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 48 (1985) 675-690.
- [34] A.L. Harris, DNA repair and resistance to chemotherapy, *Cancer Surv* 4 (1985) 601-624.
- [35] A.L. Harris, D. Hochhauser, Mechanisms of multidrug resistance in cancer treatment, *Acta Oncol* 31 (1992) 205-213.

- [36] B. Brune, A. von Knethen, K.B. Sandau, Nitric oxide and its role in apoptosis, *Eur J Pharmacol* 351 (1998) 261-272.
- [37] P.K. Kim, R. Zamora, P. Petrosko, T.R. Billiar, The regulatory role of nitric oxide in apoptosis, *Int Immunopharmacol* 1 (2001) 1421-1441.
- [38] G.C. Brown, Nitric oxide and mitochondrial respiration, *Biochim Biophys Acta* 1411 (1999) 351-369.
- [39] K.D. Kroncke, K. Fehsel, V. Kolb-Bachofen, Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where?, *Nitric Oxide* 1 (1997) 107-120.
- [40] M.P. Murphy, Nitric oxide and cell death, *Biochim Biophys Acta* 1411 (1999) 401-414.
- [41] F. Brockhaus, B. Brune, U937 apoptotic cell death by nitric oxide: Bcl-2 downregulation and caspase activation, *Exp Cell Res* 238 (1998) 33-41.
- [42] M.L. Kuo, Y.P. Chau, J.H. Wang, S.G. Shiah, Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase block nitric oxide-induced apoptosis but not differentiation in human leukemia HL-60 cells, *Biochem Biophys Res Commun* 219 (1996) 502-508.
- [43] M. Yabuki, S. Kariya, Y. Inai, K. Hamazaki, T. Yoshioka, T. Yasuda, Molecular mechanisms of apoptosis in HL-60 cells induced by a nitric oxide-releasing compound, *Free Radic Res* 27 (1997) 325-335.
- [44] I. Rahman, W. MacNee, Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches, *Free Radic Biol Med* 28 (2000) 1405-1420.
- [45] M.C. Santos-Silva, M. Sampaio de Freitas, J. Assreuy, Killing of lymphoblastic leukemia cells by nitric oxide and taxol: involvement of NF-kappaB activity, *Cancer Lett* 173 (2001) 53-61.

[46] H. Al-Sa'doni, A. Ferro, S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs, *Clin Sci (Lond)* 98 (2000) 507-520.

[47] G.J. Zaman, J. Lankelma, O. van Tellingen, J. Beijnen, H. Dekker, C. Paulusma, Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 7690-7694.

[48] T. Ishikawa, J.J. Bao, Y. Yamane, K. Akimaru, K. Frindrich, C.D. Wright, Coordinated induction of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells, *J Biol Chem* 271 (1996) 14981-14988.

[49] R.N. Watts, C. Hawkins, P. Ponka, D.R. Richardson, Nitrogen monoxide (NO)-mediated iron release from cells is linked to NO-induced glutathione efflux via multidrug resistance-associated protein 1, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 7670-7675.

## 4.2 MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS ADICIONAIS

### 4.2.1 MATERIAIS E MÉTODOS ADICIONAIS

#### 4.2.1.1 Reagentes

Os meios de cultura, os antibióticos e o soro fetal bovino (FCS) foram adquiridos da GIBCO (São Paulo, Brasil). O S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina (SNAP) foi preparado segundo o método de FIELD *et al.* (1978). O L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO, inibidor da enzima gama-glutamilcisteína sintetase), a albumina sérica bovina (BSA) e o probenecide (PB) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). O PB foi dissolvido em NaCl 0.9% (v/v), mantido como solução estoque de 50 mM, estocado a -20°C e diluído em meio DMEM, imediatamente antes do uso. O TRIS foi obtido da Invitrogen (São Paulo, SP, Brasil) e o EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) foi obtido da Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O Kit para detecção enzimática de ATP e a solução padrão de ATP foram obtidos da Pharmacia (ATP-monitoring Reagent/Pharmacia). Todas as soluções foram preparadas em meio de cultura.

#### 4.2.1.2 Linhagem Celular

Foram utilizadas células de linhagem linfoblástica leucêmica L-1210 (de origem murina). As células leucêmicas foram mantidas em garrafas plásticas de cultura, contendo meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), complementado com 10% de soro fetal, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 10 mM HEPES, pH 7,4, em estufa úmida a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Para a realização dos experimentos, o número de células viáveis foi avaliado pelo método de Azul de Trypan (0,5%) (FRESHNEY, 1987). Um total de 5 x 10<sup>5</sup> ou 1 x 10<sup>6</sup> células por poço foi adicionado em placas de 96 ou 24 poços, respectivamente, dependendo do protocolo experimental.

#### 4.2.1.3 Tratamentos

Os compostos SNAP (100, 250, 500 e 1000  $\mu\text{M}$ ), BSO (10 e 100  $\mu\text{M}$ ) e PB (1.0, 2.0, 3.0 e 5.0 mM) foram adicionados às células, num volume máximo de 20  $\mu\text{L}$ . Tais compostos foram adicionados, separados ou simultaneamente, às células. O BSO foi adicionado às células, 12 horas antes do SNAP (1 mM). Após a adição dos compostos, as células retornaram à estufa, onde foram incubadas durante 24 horas, nas condições descritas anteriormente.

#### 4.2.1.4 Determinação da Concentração de ATP (Luciferin – luciferase)

Este método consiste na ativação da enzima luciferase, pela ligação ao ATP, na presença de  $\text{MgCl}_2$ . O ATP é hidrolisado a AMP, que permanece ligado a luciferin e pirofosfato (Ppi). Este complexo reage subsequentemente com  $\text{O}_2$ , resultando na emissão de um feixe de luz ( $h\nu$ ), na liberação de AMP,  $\text{CO}_2$  e oxiluciferin (DE LUCA, 1976). A quantidade de luz emitida é naturalmente proporcional à quantidade inicial de ATP existente no meio de reação. Brevemente, em uma cubeta de plástico, foi adicionado tampão Tris-HCl 0,1M, a pH 8,0, e EDTA 0,2 mM, e, posteriormente, a solução luciferin/luciferase (Kit). O sinal desta solução foi medido no luminômetro (LKB-luminometer 1250) e impresso com um registrador (LKB-BROMA 2210-Rekoder) previamente calibrado. À mesma solução, foi adicionada a amostra e, então, realizado um novo registro. Posteriormente, a solução padrão de ATP foi adicionada e um terceiro registro foi realizado. Os registros são medidos com régua e o resultado é obtido em centímetros. Posteriormente, todos os dados de volumes, concentrações e dos respectivos registros são fornecidos ao computador para a realização dos cálculos da concentração de ATP, com a utilização de um programa chamado LUMI, elaborado especialmente para esta técnica (FROMME *et al.*, 1987). A concentração de ATP é obtida em Molar.

#### 4.2.1.5 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM). Cada experimento foi repetido pelo menos três vezes, com resultados semelhantes.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste “t” de Student não pareado, ou a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste “t” de Bonferroni. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

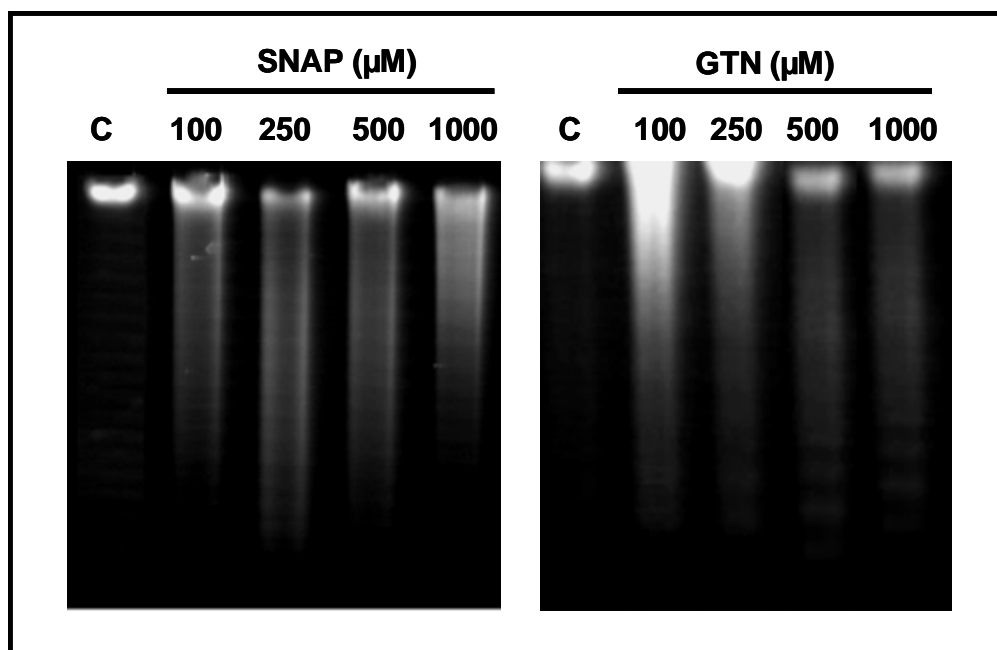


## 4.2.2 RESULTADOS ADICIONAIS

Com a finalidade de facilitar a demonstração dos resultados, as figuras apresentadas seguiram a numeração do artigo.

### 4.2.2.1 Fragmentação do DNA causada pelo SNAP e pela GTN, em células de linhagem linfoblástica leucêmica murina L-1210

Como pode ser observado na Figura 7, após o tratamento das células L-1210 com SNAP e GTN, nas concentrações de 100 a 1000  $\mu\text{M}$ , por 24 horas, houve fragmentação do DNA, a qual é característica da etapa final do processo de apoptose. Pode-se observar ainda que, no grupo controle (células sem tratamento), não houve fragmentação nuclear.

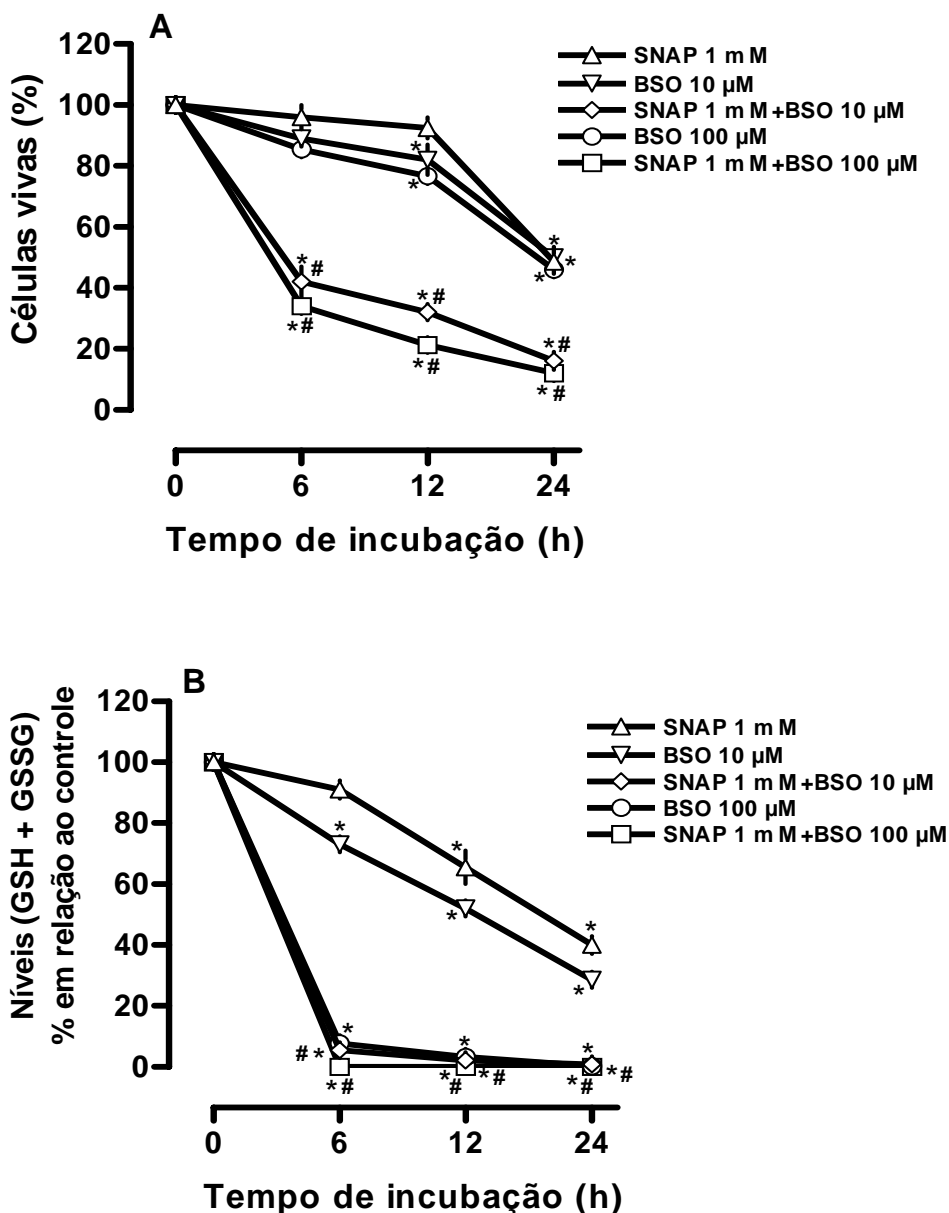


**FIGURA 7:** Fragmentação do DNA causada pelo SNAP e GTN, em células de linhagem linfoblástica leucêmica murina (L-1210). Após 24 horas de incubação, com os compostos indicados, as células foram lisadas e o DNA extraído. A fragmentação do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e a imagem obtida através do Transiluminador MacroVue UV-20 Hoefer.

#### **4.2.2.2 Efeito do BSO e do SNAP sobre a citotoxicidade e sobre a concentração de glutathiona, em células de linhagem linfoblástica leucêmica murina L-1210**

Como pode ser observado na Figura 8 (Painel A), a incubação das células L-1210 com SNAP 1 mM, em intervalos de tempos diferentes (0, 6, 12 e 24 horas), mostrou que o efeito citotóxico do NO só foi obtido em 24 horas (cerca de  $40 \pm 4\%$  de morte celular). O BSO (10 e 100  $\mu\text{M}$ ) apresentou efeito citotóxico para as células L-1210, somente após 12 horas de incubação, no qual revelaram uma redução significativa da viabilidade celular de  $18 \pm 5\%$  e  $50 \pm 3,5\%$ , respectivamente. Entretanto, a incubação simultânea de BSO (10 e 100  $\mu\text{M}$ ) com SNAP 1 mM potencializou o efeito citotóxico do NO, já após 6 horas de incubação, ou seja, a co-incubação de SNAP 1 mM, com BSO 10  $\mu\text{M}$ , causou cerca de  $58 \pm 5\%$  de morte celular e, com BSO 100  $\mu\text{M}$ , causou cerca de  $66 \pm 2\%$  de morte celular.

A Figura 8, Painel B mostra que o BSO causou diminuição da concentração de GSH, de maneira tempo-dependente. Na menor concentração de BSO (10  $\mu\text{M}$ ), a redução já foi significativa após 6 horas de incubação. O SNAP 1 mM causou diminuição da concentração de GSH, após 12 horas de incubação, com células L-1210. Entretanto, uma importante potencialização na redução da concentração de GSH, em 6 horas, foi observada com a associação de SNAP e BSO (10 e 100  $\mu\text{M}$ ). O SNAP 1 mM, que não causou redução significativa da concentração de GSH em 6 horas ( $91 \pm 3\%$ ), teve seu valor reduzido significativamente para  $5.5 \pm 0.3\%$ , quando associado com BSO 10  $\mu\text{M}$ , e para valores próximo a zero, quando associado com BSO 100  $\mu\text{M}$ . A diminuição da concentração de GSH pelo SNAP 1 mM somente foi observado após 12 horas de incubação (redução de cerca de  $20 \pm 5\%$  da concentração de GSH).

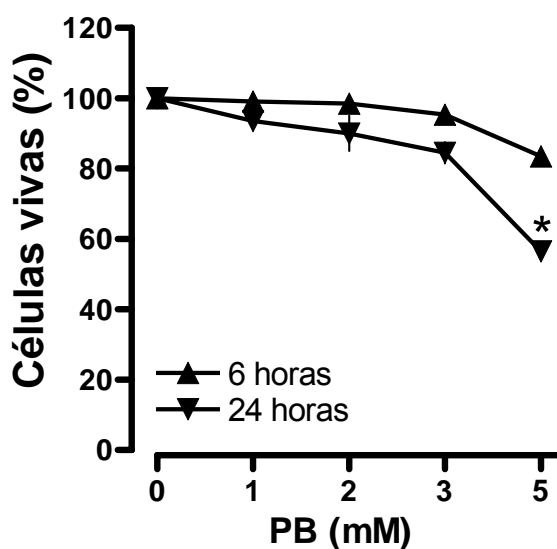


**FIGURA 8:** Efeito do SNAP, associados ou não a L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO), sobre a citotoxicidade e a concentração de glutathiona total em células de linhagem linfoblástica leucêmica murina (L-1210).

**Painel A:** Efeito citotóxico dependente do tempo do SNAP (1 mM), na presença e na ausência de BSO (10 e 100 μM,) sobre células leucêmicas murinas (L-1210). **Painel B:** Curva tempo-resposta do SNAP (1 mM), na presença e na ausência de BSO (10 e 100 μM), sobre os níveis de glutathiona total, em células leucêmicas murinas (L-1210). O BSO foi adicionado às células 12 horas antes do SNAP. Após 6, 12 e 24 horas de incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT, onde a densidade óptica do grupo controle corresponde a 100% da viabilidade celular; e as concentrações de GSH total foram quantificadas no lisado celular, pelo método da glutathiona redutase, conforme descrito em Materiais e Métodos. Cada ponto representa a média ± EPM de três amostras. \* Estatisticamente diferente do controle e # estatisticamente diferente de SNAP na ausência de BSO,  $p < 0,05$  ANOVA, seguida de teste t de Bonferroni.

#### 4.2.2.3 Efeito do inibidor da MRP probenecide, sobre a viabilidade de células de linhagem linfoblástica leucêmica murina L-1210

Para avaliar a influência da atividade da MRP sobre a viabilidade celular, as células L-1210 foram incubadas com concentrações crescentes de probenecide (PB; um inibidor da MRP). Como pode ser observado na Figura 9, somente houve morte celular com PB após 24 horas de incubação, na concentração de 5 mM ( $43,5 \pm 1,2\%$  de morte celular).

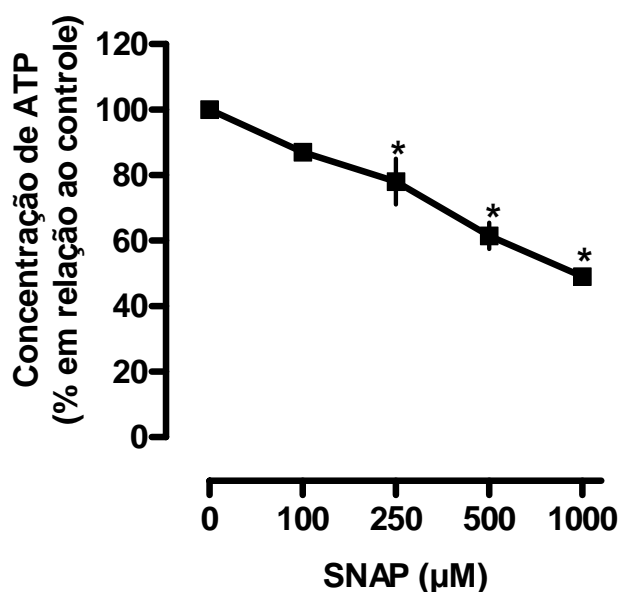


**FIGURA 9.** Efeito do probenecide (PB) sobre a viabilidade de células de linhagem linfoblástica leucêmica murina (L-1210).

O PB, nas concentrações de 1,0, 2,0, 3,0 e 5,0 mM, foi adicionado às células L-1210 e incubado por 6h ou 24h, conforme descrito em Material e Métodos. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo-controle corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de três amostras. Os mesmos resultados foram obtidos em pelo menos três outros experimentos idênticos. \* Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $p < 0,05$  ANOVA, seguida de teste  $t$  de Bonferroni.

#### 4.2.2.4 Depleção energética causada pelo SNAP, em células de linhagem linfoblástica leucêmica murina L-1210

A Figura 10 mostra que o SNAP causou diminuição da concentração intracelular de ATP, de maneira concentração-dependente, em relação ao controle. Baixas concentrações de SNAP já foram suficientes para diminuir a concentração intracelular de ATP. Por exemplo, na concentração de 250  $\mu\text{M}$  houve uma diminuição de  $22 \pm 7\%$  de ATP intracelular, em relação ao controle. No entanto, o maior efeito do SNAP ocorreu na concentração de 1000  $\mu\text{M}$ , com diminuição de  $50 \pm 0,6\%$  da concentração de ATP.

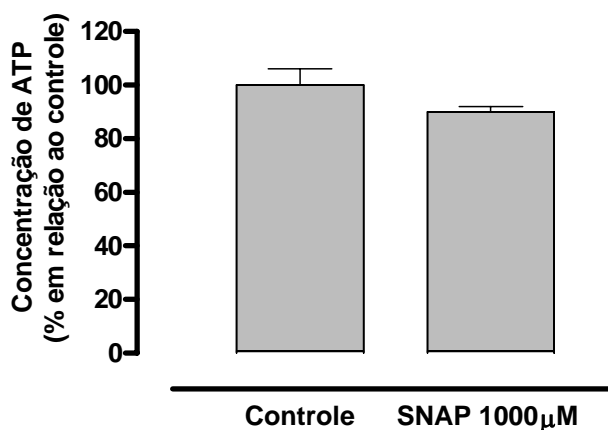


**FIGURA 10:** Efeito do SNAP sobre a concentração de ATP, em células de linhagem linfoblástica leucêmica murina (L-1210).

As células foram plaqueadas ( $1 \times 10^6$  células/poço) em placas de 24 poços e incubadas com SNAP (100 – 1000  $\mu\text{M}$ ), por 24 horas. O conteúdo celular de ATP foi quantificado pelo ensaio de bioluminescência da luciferin-luciferase, conforme descrito em Materiais e Métodos. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de três amostras. \* Estatisticamente diferente do controle,  $p < 0,05$  ANOVA, seguida de teste t de Bonferroni.

#### 4.2.2.5 Depleção energética em células de linhagem linfoblástica leucêmica murina L-1210, após 6 horas de tratamento com SNAP

Pode-se observar, na Figura 11, que após 6 horas de incubação das células L-1210 com SNAP 1 mM, a mesma concentração que foi capaz de inibir atividade da MRP1 decorrente do aumento do acúmulo de CFDA intracelularmente, houve uma redução não significativa da concentração de ATP ( $10 \pm 2\%$ ), em relação às células não tratadas.



**FIGURA 11:** Efeito do SNAP sobre a concentração de ATP, em células de linhagem linfoblástica leucêmica murina (L-1210).

As células foram plaqueadas ( $1 \times 10^6$  células/poço) em placas de 24 poços e incubadas com SNAP 1 mM por 6 horas. O conteúdo celular de ATP foi quantificado pelo ensaio de bioluminescência da luciferin-luciferase, conforme descrito em Materiais e Métodos. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de três amostras. Não houve diferença estatística em relação ao controle,  $p > 0,05$  teste "t" de Student.

## 5. DISCUSSÃO GERAL

As leucemias agudas caracterizam-se pela proliferação clonal de células leucêmicas, imaturas na medula óssea, e pelo bloqueio maturativo (anaplasia) variável, em diferentes linhagens celulares hematopoiéticas, o que possibilita a existência de diferentes subtipos de leucemias. Se não tratadas adequadamente, as células leucêmicas proliferam-se descontroladamente e resultam em um excesso de células malignas que extravasam para a circulação periférica, onde podem ser encontradas em grande número. Dessa forma, podem causar anemia, plaquetopenia e infiltração de outros tecidos, e levam a óbito em dias ou semanas, conforme o prognóstico (BAIN, 2003; PLASSCHAERT *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006). Por isso, a terapia antileucêmica visa à eliminação do clone leucêmico/neoplásico e a restauração da hematopoiese normal. Para isto tem-se usado quimioterapia supressora agressiva, a qual reduz rapidamente o número de células leucêmicas (HARRIS, 1985a; HARRIS, 1985b; HARRIS & HOCHHAUSER, 1992). A quimioterapia é uma das abordagens terapêuticas mais eficientes para o tratamento de cânceres sólidos e hematológicos e tem proporcionado melhora na remissão e sobrevivência dos pacientes (RIGANTI *et al.*, 2005). Entretanto, a terapia convencional é freqüentemente associada com o desenvolvimento de resistência a múltiplos fármacos, que limita a efetividade terapêutica (HARRIS, 1985a; HARRIS, 1985b; HARRIS & HOCHHAUSER, 1992). Considerando esses pontos, novos alvos terapêuticos devem ser investigados.

Inúmeros trabalhos têm analisado o papel do óxido nítrico (NO) na apoptose. Os resultados ainda são conflitantes, pois se em algumas situações o NO protege as células de estímulos apoptóticos, em outras ele induz a apoptose em vários tipos de células tumorais, incluindo células leucêmicas (KRÖNCKE *et al.*, 1997; KOLB, 2000; KIM *et al.*, 2001; BLAISE *et al.*, 2005). O NO causa apoptose por vários mecanismos: inibição da respiração mitocondrial (BROWN, 1999); nitrosilação de canais de íons; ribosilação-ADP de proteínas (KRONCKE *et al.*, 1997; MURPHY, 1999); indução de danos ao DNA, como conseqüência da formação de peroxinitrito (ZHUANG & SIMON, 2000); estimulação da expressão de enzimas e fatores de transcrição envolvidos no reparo do DNA e modulação da apoptose, tais como, a proteína supressora de tumor p53 (KOLB, 2000), a ativação das caspases (YABUKI,

*et al.*, 2000), a indução da PARP (KUO *et al.*, 1996) e a redução dos níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (ZHONG *et al.*, 2004). Um dos principais alvos intracelulares do NO é a GSH. A GSH é o principal tiol não protéico intracelular e seu estado redox é crítico para vários eventos biológicos, incluindo a ativação da transcrição de genes específicos e a modulação do sinal de transdução (RAHMAN & MACNEE, 2000).

Em trabalhos anteriores foi demonstrado que o NO é citotóxico para células linfoblásticas leucêmicas e que, juntamente com o taxol, exibe um efeito citotóxico sinérgico (SANTOS-SILVA *et al.*, 2001). Ambos compostos inibem a atividade constitutiva do NF- $\kappa$ B e, dessa maneira, impedem o restabelecimento da concentração de GSH, após estresse oxidativo (SANTOS-SILVA *et al.*, 2006). Além disso, foi observado que a depleção da concentração de GSH parece inibir indiretamente a atividade da MRP1, em células linfoblásticas leucêmicas CEM (SOUZA, 2006). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o envolvimento do NO e da GSH sobre a atividade e expressão da MRP1, em células de linhagem linfoblástica leucêmica L-1210.

Nossos resultados mostram que o tratamento das células L-1210, com concentrações crescentes de doadores de NO, SNAP e GTN, um fármaco usado como vasodilatador para o tratamento de angina pectoris (MARSH & MARSH, 2000; AL-SA'DONI & FERRO, 2000), induzem à morte celular, de maneira concentração-dependente (Figura 1).

O tratamento anticâncer é baseado na utilização de compostos que provocam a morte celular por apoptose ou na modificação de processos intracelulares, que convergem a ela, pois se esse processo ocorresse por necrose teria o inconveniente da indução de um processo inflamatório, como resultado do extravasamento do conteúdo intracelular (HERR & DEBATIN, 2001). Por isso, posteriormente, avaliamos se a morte celular causada pelos dois compostos doadores de NO ocorriam por apoptose. Observamos que ambos compostos causaram fragmentação nuclear, a qual é uma característica do processo final de apoptose (Figura 7). Outro fator que corrobora com o modelo de morte celular por apoptose nas células L-1210, causado pelo NO, foi em relação ao consumo da concentração intracelular de ATP, causada pelo NO (Figura 10). O SNAP causou redução da concentração intracelular de ATP em aproximadamente 50%, após 24 horas de incubação, com as células L-1210. Vários autores têm demonstrado que a concentração de ATP representa um



papel importante para a execução da apoptose, que é um mecanismo dependente de energia, diferente do que ocorre com a necrose (LEIST *et al.*, 1997; GRUSCH *et al.*, 2002; TATSUMI *et al.*, 2003; SCHAPER & KOSTIN, 2005).

Como visto anteriormente, concentrações adequadas de GSH intracelular são cruciais para o funcionamento de sistemas de defesa importantes contra agentes pró-oxidantes, na síntese de DNA e de proteínas estruturais, na ativação transcricional de genes específicos, na regulação e manutenção do estado *redox* da célula, na regulação do ciclo celular, na proteção contra danos oxidativos e nitrosativos, para a metabolização de drogas tóxicas eletrofílicas (quimioterápicas) e na modulação das respostas imune e inflamatória (WANG & BALLATORI, 1998; RAHMAN & MACNEE, 2000). Além disso, o metabolismo da GSH tem sido relacionado com algumas proteínas de resistência, associadas a múltiplos fármacos (MRP), que extruem compostos quimioterápicos conjugados à GSH ou co-transportados com a GSH (BORST, 2000; O'BRIEN, & TEW, 1996; ZAMAN *et al.*, 1995). Fundamentados nessas informações, e em resultados anteriores, que demonstram que o NO diminui a concentração de GSH intracelular em células leucêmicas CEM, e é potencializado pelo BSO, um inibidor específico de  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase (SANTOS-SILVA *et al.*, 2006), formulamos a hipótese de que o NO poderia intervir nas proteínas de resistência das células linfoblásticas leucêmicas, indiretamente, através da diminuição de GSH intracelular. Para isso, inicialmente, avaliamos o efeito do NO e do BSO sobre a concentração de GSH, nas células linfoblásticas leucêmicas L-1210. Semelhante ao observado para as células CEM, o SNAP e o BSO diminuíram as concentrações de GSH nas células L-1210, de maneira concentração-dependente (Figura 2; Painéis A e B) e tempo-dependente (Figura 2; Painéis C e D). Quando comparados à curva concentração-resposta da viabilidade celular do SNAP (Figura 1), foi observada uma estreita associação. Por exemplo, o SNAP causa depleção de GSH nas concentrações acima de 500  $\mu$ M, e é exatamente a partir dessa concentração que se observa a diminuição na viabilidade das células leucêmicas linfoblásticas. Além disso, pode-se observar que a associação de SNAP e BSO resulta num sinergismo de ação citotóxica e diminuição da concentração intracelular de GSH (Figura 8; Painéis A e B). Esses resultados mostram a importância da glutatona na proteção celular contra o efeito deletério do NO. Altas concentrações de glutatona intracelular estão associadas à resistência de várias linhagens celulares tumorais a drogas quimioterápicas, como leucemia

linfoblástica L-1210 (KRAMER *et al.*, 1987). Provavelmente, por isso, o tempo parece ser um fator importante para que ocorra a ação do NO sobre a GSH, pois, diferente do BSO, o SNAP diminuiu a concentração de GSH somente após 12 horas de incubação (Figura 8; Painel B). Esse conjunto de resultados confirma nossa hipótese de que a depleção de GSH fragiliza as células leucêmicas L-1210, aos efeitos oxidativos e nitrosativos do NO com consumo de ATP.

Considerando a importância da integridade da membrana citoplasmática e da viabilidade celular para a análise da atividade da proteína transportadora transmembrana dependente de ATP, MRP1, nas células linfoblásticas L-1210, houve a necessidade de alguns experimentos para a padronização da metodologia. Nossos resultados mostram que o PB não é citotóxico após 6 horas de incubação (Figura 9), nem mesmo o SNAP e o BSO (Figura 8; Painel A). Além disso, o SNAP 1 mM não foi capaz de consumir concentrações significantes de ATP, em 6 horas (Figura 11), o qual é necessário para o funcionamento adequado da MRP1. Sendo assim, foram padronizados os estudos de atividade da MRP1, no período de 6 horas de tempo de incubação.

A análise da atividade da MRP1, por citometria de fluxo, baseia-se na capacidade dessas bombas de efluxo extruírem da célula um substrato fluorescente (CF; carboxi-5',6'-diclorofluoresceína), o qual é o resultado da hidrólise do CFDA pelas esterases não específicas (MAFTAH *et al.*, 1993). Como mostra a Figura 3, as células L-1210 apresentam uma intensidade de fluorescência baixa, quando incubadas com CFDA. Entretanto, na presença de PB, um inibidor específico de MRP1, há uma retenção considerável de CFDA intracelular, o que indica a expressão e a atividade da MRP1 nessas células.

O transporte de compostos para fora da célula, pela GSH, parece ser dependente da síntese continuada de GSH e pode ser bloqueado pelo BSO, um inibidor da  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase ( $\gamma$ -GCS), que é uma enzima limitante para a síntese de GSH (KUO *et al.*, 1996; ISHIKAWA *et al.*, 1996). Com base nessas informações e nas evidências da atividade da MRP1, nas células linfoblásticas leucêmicas L-1210, o próximo foco de investigação foi analisar o possível envolvimento da depleção da GSH, induzido pelo NO e pelo BSO, na inibição da atividade dessa bomba de efluxo. Nossos resultados mostram claramente que o BSO foi capaz de aumentar o acúmulo do CFDA, sugerindo redução de atividade da MRP (Figura 4; Painel B). Da mesma forma como ocorreu com o BSO, porém com

intensidade menor, o SNAP também aumentou o acúmulo do CFDA intracelular (Figura 4; Painel A). Além disso, o acúmulo de CFDA foi consideravelmente maior após o co-tratamento das células com SNAP e BSO (10 ou 100  $\mu\text{M}$ ), quando comparado ao tratamento de SNAP e BSO sozinhos, mostrando um importante sinergismo de ação, o qual leva a uma intensa inibição da atividade de MRP (Figura 5; Painéis A - C). Este fenômeno pode ser explicado pelo efeito combinado desses dois agentes sobre a redução dos níveis de GSH, o qual pode ocorrer por oxidação ou por inibição da síntese *de novo* de GSH. Estes resultados corroboram com os dados da literatura, os quais afirmam que a concentração de GSH é fundamental para a atividade da MRP1, e que a síntese *de novo* de GSH é importante para a manutenção deste processo. Como visto anteriormente, o BSO impede a síntese *de novo* de GSH, pela inibição da  $\gamma$ -GCS (KUO *et al.*, 1996; ISHIKAWA *et al.*, 1996), e o NO parece atuar da mesma forma, porém indiretamente, através da inibição do fator transcrição NF- $\kappa$ B, responsável pela transcrição de genes antioxidantes (SANTOS-SILVA, 2006). O NO pode, ainda, diminuir as concentrações de GSH, por meio da S-nitrosilação de enzimas envolvidas no metabolismo da GSH, como a glutathiona peroxidase (ASAHI *et al.*, 1995), a glutathiona S-transferase (CLARK & DEBNAM, 1988), a  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetase (HAN *et al.*, 1995) e a glutathiona redutase (BECKER *et al.*, 1995) e, desta forma, alterar as defesas antioxidantes intracelulares, resultando em dano oxidativo e/ou nitrosativo.

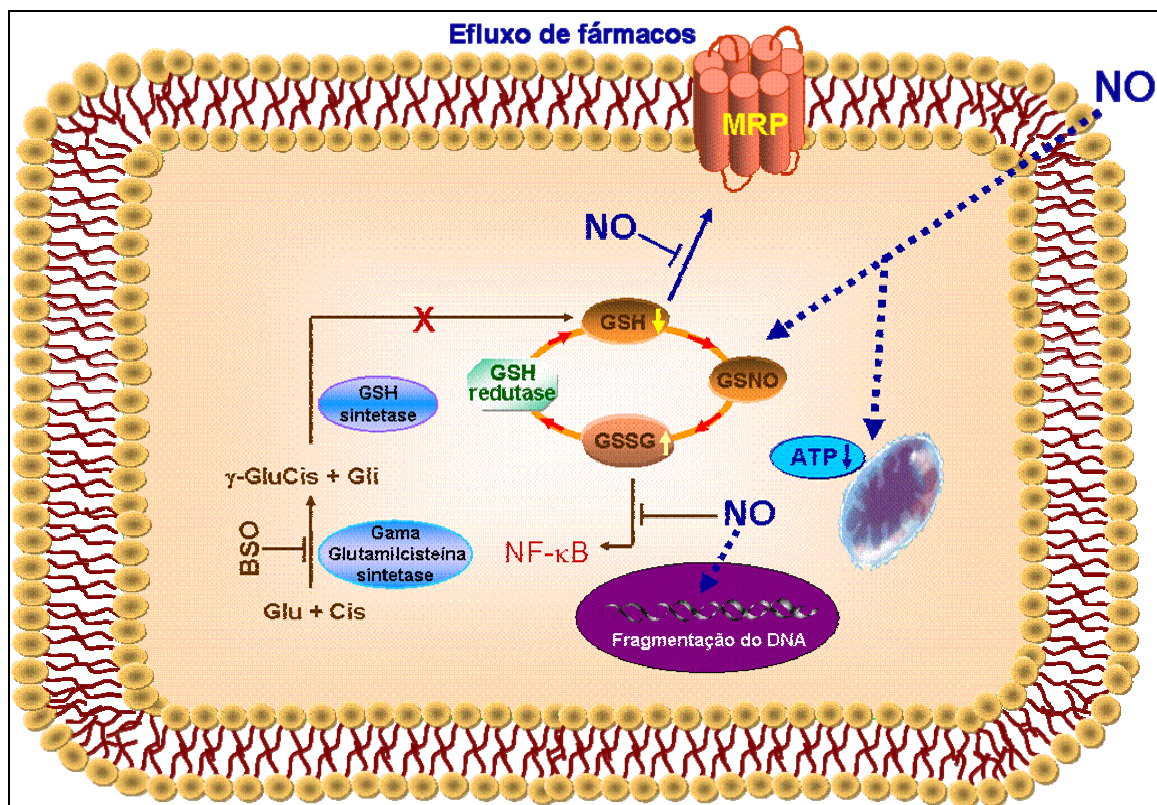
Como visto anteriormente, a proteína MRP se liga e hidrolisa o ATP como fonte de energia, para bombear substratos para fora da célula (COLE & DEELEY, 2006). Considerando que o NO diminuiu a concentração de ATP intracelular (Figura 10), avaliamos se o efeito inibitório do NO sobre a atividade da MRP poderia ocorrer por diminuição de ATP. Como a avaliação da atividade da MRP foi realizada após 6 horas de incubação com SNAP, analisamos a concentração de ATP neste mesmo período. Observamos que o NO não causou redução significativa da concentração de ATP (Figura 11).

Outra possível explicação, para o sinergismo observado entre SNAP e o BSO sobre a atividade da MRP, poderia ser o fato de que estes dois agentes pudessem reduzir a expressão da proteína MRP1. Nossos resultados demonstraram que, diferente do SNAP e do BSO *per se*, a associação de SNAP e BSO 100  $\mu\text{M}$

promoveu uma discreta diminuição na expressão da MRP1, nas células L-1210 (aproximadamente 16%; Figura 6).

Ao contrário do relatado por RIGANTI *et al.* (2005), que doadores de NO podem reverter a resistência à doxorubicina em linhagem de células de câncer de colon humano, que superexpressam MRP3 pela nitração desta proteína, nossos resultados indicam que o NO interfere na resistência, inibindo o funcionamento da bomba de efluxo MRP1.

Embora distante da complexidade fisiológica *in vivo*, a compilação de evidências obtidas neste estudo permite-nos sugerir que um dos prováveis mecanismos de inibição da atividade da MRP1 pelo NO, em células linfoblásticas leucêmicas L-1210, seja de forma indireta através da depleção e inibição da síntese *de novo* de GSH (Esquema 8). Apesar dos dados apresentados neste trabalho mostrarem que o SNAP não reduz concentrações significativas de ATP, no período em que foi avaliada a atividade da MRP1, acredita-se que o consumo desta fonte de energia, durante as ações deletérias do NO, resulte num somatório de ações que convergem à inibição dessas proteínas de resistência. Desta forma, concluímos que doadores de NO poderiam ser usados associados aos quimioterápicos que fazem parte do protocolo de tratamento terapêutico da leucemia linfoblástica, como uma nova estratégia de inibição da MRP1.



**Esquema 8:** Mecanismo de resistência proposto: envolvimento do NO e da glutatona sobre a MRP1 em células de linhagem linfoblástica leucêmica L-1210.

GSH, glutatona reduzida; GSSG, glutatona oxidada; Glu, Glutamato; Cis, Cisteína; Gli, Glicina; MRP, proteína associada à resistência a múltiplos fármacos; BSO, L-butionina (S,R)-sulfoximina; ATP, adenina trifosfato; NF-κB, fator nuclear kappa B; NO, óxido nítrico.

## 6. CONCLUSÃO

Recentemente, os avanços na biologia molecular têm proporcionado um melhor entendimento sobre os mecanismos de morte celular, bem como o desenvolvimento de estratégias de quimioterapias mais efetivas. Entretanto, a refratariedade ao tratamento quimioterápico relacionada à resistência à apoptose, devido ao desenvolvimento do fenótipo MDR em muitas células neoplásicas, ainda representa um sério problema clínico. Dentre os fatores que podem originar o fenótipo MDR, estão incluídos: alterações no reparo do DNA, defeitos em genes controladores da apoptose, aumento na detoxificação intracelular de drogas e a ativação ou superexpressão de proteínas transportadoras de drogas dependentes de ATP (como a MRP) (KRISHNA & MAYER, 2000).

O metabolismo da GSH tem sido relacionado com algumas MRPs, que extruem compostos quimioterápicos conjugados ou co-transportados com a GSH (BORST, 2000; O'BRIEN, & TEW, 1996; ZAMAN *et al.*, 1995). Portanto, o conhecimento sobre proteínas transportadoras de drogas e sua relação com o fenótipo MDR, permitem-nos investigar *in vitro* os possíveis mecanismos que induzem a esse fenótipo, em células leucêmicas, e como inibi-los.

Nossos resultados mostram que:

- Os doadores de NO, SNAP e GTN apresentam efeito citotóxico para as células linfoblásticas leucêmicas L-1210, de maneira concentração-dependente Porém, o GTN demonstrou maior citotoxicidade.
- O SNAP e o GTN causam morte celular por apoptose nas células linfoblásticas leucêmicas L-1210;
- O SNAP causou redução da concentração de ATP de maneira concentração-dependente, após 24 horas de incubação, com células linfoblásticas leucêmicas L-1210. Provavelmente, um dos possíveis mecanismos de apoptose causado pelo NO, ocorre pelo consumo intracelular de ATP, o qual é importante para a execução da apoptose, pois é um mecanismo dependente de energia.

- SNAP 1 mM e BSO 10 e 100  $\mu$ M diminuíram as concentrações de GSH nas células L-1210, de maneira concentração e tempo-dependentes, e o co-tratamento de SNAP 1 mM e BSO (10 ou 100  $\mu$ M) resultou num efeito sinérgico sobre a diminuição da concentração intracelular de GSH. Diferente do BSO (10 ou 100  $\mu$ M), o SNAP 1 mM diminuiu a concentração de GSH, somente após 12 horas de incubação. Esse conjunto de resultados sugere que a depleção de GSH fragiliza as células leucêmicas L-1210, aos efeitos oxidativos e nitrosativos do NO, com consumo de ATP.
- As células L-1210 apresentam atividade para a MRP1, pois na presença de um inibidor específico da MRP1, PB (3 mM), há uma retenção intracelular considerável de CFDA (substrato fluorescente da MRP1).
- O SNAP 1 mM e o BSO (10 ou 100  $\mu$ M) causam inibição da atividade da MRP1. O co-tratamento das células, com SNAP 1 mM e BSO (10 ou 100  $\mu$ M), mostra um importante sinergismo de ação no bloqueio da atividade dessa proteína de resistência..
- A expressão da MRP1 não foi alterada pelo SNAP 1 mM ou BSO 100  $\mu$ M isoladamente. Entretanto, a associação de SNAP 1 mM e BSO 100  $\mu$ M diminuiu a expressão de MRP1.

Finalmente, os dados obtidos neste estudo nos permitem sugerir que o NO interfere de maneira indireta no funcionamento da bomba de efluxo MRP1, pela diminuição da concentração de GSH intracelular, por oxidação à GSSG e por inibição da síntese *de novo*. Além disso, a associação de NO e BSO diminuem a expressão de MRP1. Desta forma, concluímos que o NO tem um papel importante na reversão do fenômeno MDR, mediado pela MRP1, em células linfoblásticas leucêmicas. Diante da complexidade que são as proliferações leucêmicas e suas “artimanhas” para o desenvolvimento de MDR, e do fator limitante do uso de reversores MDR, devido à alta toxicidade, pela necessidade de altas doses para potencializar o efeito dos quimioterápicos, apontamos os doadores de NO como uma

nova estratégia para o desenvolvimento de fármacos inibidores/reversores da atividade funcional da MRP1. No entanto, estudos adicionais são necessários.



## 7. REFERÊNCIAS

ADIDA, C.; HAIOUN, C.; GAULARD, P.; LEPAGE, E.; MOREL, P.; BRIERE, J.; DOMBRET, H.; REYES, F.; DIEBOLD, J.; GISSELBRECHT, C.; SALLES, G.; ALTIERI, D.C.; MOLINA, T.J. Prognostic significance of survivin expression in diffuse B-cell lymphomas. **Blood** 96, 5, 1921-1925, 2000.

AKAN, I., AKAN, S., AKCA, H., SAVAS, B. AND OZBEN, T. Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) mediated vincristine resistance: effects of N-acetylcysteine and Buthionine sulfoximine. **Cancer Cell Int.** 5, 22, 1-9, 2005.

AKAN, I., AKAN, S., AKCA, H., SAVAS, B. AND OZBEN, T. N-acetylcysteine enhances multidrug resistance-associated protein 1 mediated doxorubicin resistance. **Eur. J. Clin. Invest.** 34, 10, 683-689, 2004.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova** 28, 1, 118-129, 2005.

AL-SA'DONI, H.; FERRO, A. S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs, **Clin Sci (Lond)** 98, 507-520, 2000.

AMBROSINI, G.; ADIDA, C.; ALTIERI, D.C. A novel antiapoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. **Nat. Med.** 3, 917-921. 1997.

AOUALI, N.; EDDABRA, L.; MACADRÉ, J.; MORJANI, H. Immunosuppressors and reversion of multidrug-resistance. **Critical Reviews in Oncology/Hematology** 56, 61-70, 2005.

ARANTES-GONÇALVES, F.; TAVARES, M.; SOARES-FORTUNATO, J. A apoptose. **Revista da Faculdade de Medicina de Lisboa** 9, 1, 13-18, 2004.

ASAHI, M.; FUJII, J.; SUZUKI, K.; SEO, H.G.; KUZUYA, T.; HORI, M.; FUJII, S.; TANIGUCHI, N. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity. **J. Biol. Chem.** 270, 36, 21035-21039, 1995.

BAIN, B.J. **Diagnóstico em Leucemias**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda, 2003.

BAKAN, H.; TAYSI, S.; YILMAZ, Ö.; BAKAN, E.; KUSKAY, S.; UZUN, N.; GÜNDOĞDU, M. Glutathione peroxidase, glutathione reductase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde concentrations in serum of patients with chronic lymphocytic leukemia. **Clinica Chimica Acta** 338, 143-149, 2003.

BAKOS, E.; HEGEDUS, T.; HOLLO, Z.; WELKER, E.; TUSNADY, G.E.; ZAMAN,

G.J.R.; FLENS, M.J.; VARADI, A.; SARKADI, B. Membrane topology and glycosylation of the human multidrug resistance-associated protein. **J. Biol. Chem.** 271, 21, 12322– 12326, 1996.

BALDWIN, A.S. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- $\kappa$ B. **J Clin Invest** 107, 33, 241–246, 2001.

BALLATORI, N.; HAMMOND, C.L.; CUNNINGHAM, J.B.; KRANCE, S.M.; MARCHAN, R. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. **Toxicology and Applied Pharmacology** 204, 238– 255, 2005.

BASSAN, R.; GATTA, G.; TONDINI, C.; WILLEMZE, R. Adult acute lymphoblastic leukaemia. **Oncol Hematology** 50, 3, 223-261, 2004.

BECKER, K.; GUI, M.; SCHIRMER, R.H. Inhibition of human glutathione reductase by S-nitrosoglutathione. **Eur. J. Biochem.** 234, 472-478, 1995.

BELINSKY, M.G.; CHEN, Z.S.; SHCHAVELEVA, I. Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance 6 (MRP6, ABCC6). **Cancer Res.** 62, 6172-6177, 2002.

BENE, M.C.; BERNIER, M.; CASASNOVAS, R.O.; CASTOLDI, G.; DOEKHARAN, D.; VAN DER HOLT, B.; KNAPP, W.; LEMEZ, P.; LUDWIG, W.D.; MATUTES, E.; ORFAO, A.; SCHOCH, C.; SPERLING, C.; VAN'T VEER, M.B. Acute myeloid leukaemia M0: haematological, immunophenotypic and cytogenetic characteristics and their prognostic significance: an analysis in 241 patients. **Br J Haematol** 113, 3, 737-745, 2001.

BENNETT, J.M.; BERGER, R.; CATOVSKY, D. Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukemias. Second MIC Cooperative Study Group. **Br J Haematol** 68, 487–494, 1988.

BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0) **Br J Haematol** 78, 325-329, 1991.

BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D.A.; GRALNICK, H.R.; SULTAN, C. Proposals for the classification of the acute leukemias. **Br J Haematol** 33, 4, 451-458, 1976.

BLAISE, G.A.; GAUVIN, D.; GANGAL, M.; AUTHIER, S. Nitric oxide, cell signaling and cell death, **Toxicology** 208, 177-192, 2005.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. **TRENDS in Cell Biology** 11, 2, 66-75, 2001.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Mol Immunol** 39, 11, 615-47, 2003.

BORST, P.; EVERS, R.; KOOL, M.; WIJNHOLDS, J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins, **J Natl Cancer Inst** 92, 1295-1302, 2000.

BORST, P.; ZELCER, N; VAN DE WETERING, K.; POOLMAN, B. On the putative co-transport of drugs by multidrug resistance proteins. **FEBS Letters** 580, 1085-1093, 2006.

BOURS, V.; BENTIREN-ALJ, M.; HELLIN, A.C.; VIATOUR, P.; ROBE, P.; DELHALLE, S.; BENOIT, V.; MERVILLE, M.P. Nuclear factor- $\kappa$ B, cancer, and apoptosis. **Biochem. Pharmacol.** 60, 8, 1085–1089, 2000.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S.A. Programmed Cell Death via Mitochondria: Different Modes of Dying. **Biochemistry (Moscow)** 70, 2, 231-239, 2005. Translated from *Biokhimiya* 70, 2, 284-293, 2005.

BROWN, G.C. Nitric oxide and mitochondrial respiration, **Biochim Biophys Acta** 1411, 351-369, 1999.

BROWN, G.C. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. **Biochimica et Biophysica Acta** 1504, 46-57, 2001.

BRÜNE, B.; VON KNEHTEN, A.; SANDAU, K.B. Nitric oxide and its role in apoptosis. **Eur. J. Pharmacol.** 351, 261-272, 1998.

CADENAS, E. Mitochondrial free radical production and cell signaling. **Molecular Aspects of Medicine** 25, 17-26, 2004.

CHANG, X.B.; HOU, Y.X.; RIORDAN, J.R. ATPase activity of purified multidrug resistance-associated protein. **J. Biol. Chem.** 272, 30962– 30968, 1997.

CHEN, Z.S.; GUO, Y.; BELINSKY, M.G.; KOTOVA, E.; KRUIH, G.D. Transport of bile acids, sulfated steroids, estradiol 17-beta-Dglucuronide, and leukotriene C4 by human multidrug resistance protein 8 (ABCC11). **Mol Pharmacol** 67, 545–557, 2005.

CHRISTOPHERSON, K.S.; BREDET, D. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease, **Journal Clinical Investigation** 100, 10, 2424-2429, 1997.

CHUNG, H.T.; PAE, H.O.; CHOI, B.M.; BILLIAR, T.R.; KIM, Y.M. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 282, 5, 1075-1079, 2001.

CLANCY, R.M.; LEVARTOVSKY, D.; LESZCZYNSKA-PIZIAK, J.; YEGUDIN, J.; ABRAMSON, S.B. Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitroglutathione as a bioactive intermediary. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 91, 3680-3684, 1994.

CLARK, A.G.; DEBNAM, P. Inhibition of glutathione S-transferases from rat liver by S-nitroso-L-glutathione. **Biochem. Pharmacol.** 37, 3199-3201, 1988.

COLE, S.P.; BHARDWAJ, G.; GERLACH, J.; MACKIE, J.E.; GRANT, C.; ALMQUIST, K.C.; STEWART, A.J.; KURZ, E.; DUNCAN, A.M.; DEELEY, R.G. Overexpression of a transporter gene in a multidrug resistant human lung cancer cell line. **Science** 258, 1650-1654, 1992.

COLE, S.P.; DEELEY, R.G. Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. **TRENDS in Pharmacological Sciences** 27, 8, 438-446, 2006.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Robbins. Patologia Estrutural e Funcional**, 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1996.

DANIAL, N.N.; KORSMEYER, S.J. Cell death: Critical control points. **Cell** 116, 205-219, 2004.

DANO, K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites. **Biochim Biophys Acta** 323, 466-483, 1973.

DE LUCA, M. Firefly luciferase. **Adv. Enzymol.**, 44, 37-68, 1976.

DEELEY R.G.; COLE, S.P.C. Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1) **FEBS Letters** 580, 1103-1111, 2006.

DELEVE, L.D.; KAPLOWITZ, N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Pharmacol Ther** 52, 287-305, 1991.

DIPIRO, J.T.; TALBERT, R.L.; YEE, G.C.; MATZKE, G.R.; WELLS, B.G.; POSEY, L.M. **Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 2002.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in Neurobiology** 62, 649-671, 2000.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** 39, 4, 343-350, 2003.

EDINGER, A.L.; THOMPSON, C.B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology** 16, 663-669, 2004.

EISERICH, J.P.; PATEL, R.P.; O'DONNELL, V.B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modifications of biomolecules. **Mol. Aspects Med.** 19, 221-357, 1998.

ESTEY, E.H. Therapeutic options for acute myelogenous leukemia. **Cancer**. 92, 1059-1073, 2001

Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. **In Instituto Nacional do Câncer - Ministério da Saúde-Brasil**; 2006.

FENECH, M. Chromosomal biomarkers and genomic instability relevant to cancer. **DDIT** 7, 1128-1137, 2002.

FESIK, S.F. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discover. **Nature** 5, 876-885, 2005.

FIELD, L.; DILTS, R.V.; RAVICHANDRAN, R.; LENHERT, P.G.; CARNAHAN, G.E. An unusually stable thionitrite from N-acetil-D,L-penicillamine; X-ray crystal and molecular structure of 2-(acetylamino)-2-carboxy-1,1-dimethylethyl thionitrite. **J. Chem. Soc. Comm.** 249-250, 1978.

FLENS, M.J.; IZQUIERDO, M.A.; SCHEFFER, G.L.; FRITZ, J.M.; MEIJER, C.J.; SCHEPER, R.J.; ZAMAN, G.J. Immunochemical detection of the multidrug resistance-associated protein MRP in human multidrugresistant tumor cells by monoclonal antibodies. **Cancer Res.** 54, 4557– 4563, 1994.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira** 46, 3, 265-271, 2000.

FRANKS, L.M.; TEICH, N.M. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer . **In** What is cancer? ed FRANKS, L.M., 1-20 and Epidemiology of cancer, ed KEY, 34-59, Oxford University Press Inc., New York, 1998.

FRESHNEY, R. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**, p 117, Alan R. Liss, Inc., New York, 1987.

FRIESEN, C.; KIESS, Y.; DEBATIN, K-M. A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukemia cells. **Cell Death and Differentiation** 11, S73-S85, 2004.

FROMME, P.; BOEREMA, E.J.; GRÄBER, P. Isolation and characterization of a supramolecular complex of subunit-III of the ATP-synthase from chloroplasto. **Z. Naturforsch.**, 42c, 11-12, 1239-1245, 1987.

FURCHGOTT, R.T.; ZAWADZKI, J.V. The abligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcoline. **Nature** 288, 373-376, 1980.

FURMAN, R.R.; ASGARY, Z.; MASCARENHAS, J.O.; LIOU, H.C.; SCHATTNER, E.J. Modulation of NF- $\kappa$ B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. **J Immunol** 164, 2200–2206, 2000.

GARLAND, J.M. Energy metabolism during apoptosis. **J. Biol. Chem.** 272, 4680-4688, 1997.

GASCO, M.; CROOK, T. p53 family members and chemoresistance in cancer: what we know and what we need to know. **Drug Resistance Updates** 6, 323–328, 2003.

GEISLER, S.; LONNING, P.E.; AAS, T.; JOHNSEN, H.; FLUGE, O.; HAUGEN, D.F.; LILLEHAUG, J.; AKSLEN, L.A.; BORRESEN-DALE, A.-L. Influence of TP53 gene alterations and c-erb-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. **Câncer Res.** 61, 2505–2512, 2001.

GENARO, A.M.; HORTELANO, S.; ALVAREZ, A.; MARTINEZ, C.; BOSCA, L. Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. **J Clin Invest** 95, 1884–1890, 1995.

GHIBELLI, L.; FANELLI, C.; ROTILIO, G.; LAFAVIA, E.; COPPOLA, S.; COLUSSI, C.; CIVITAREALE, P.; CIRIOLO, M.R. Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. **FASEB J.** 12, 479-486, 1998.

GHOBRIAL, I.M.; WITZIG, T.E.; ADJEI, A.A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA Cancer J Clin.** 55, 178-194, 2005.

GILBERT, H.F. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol** 63, 69-172, 1990.

GOLAB J.; ZAGOZDZON, R.; KAMINSKI, R.; KOZAR, K.; GRYSKA, K.; IZYCKI, D.; MACKIEWICZ, A.; STOKLOSA, T.; GIERMASZ, A.; LASEK, W.; JAKÓBISIAK, M. Potentiation antitumor effectiveness of combined chemo-immunotherapy with interleukin-12 e 5-fluorouracil of L1210 leukemia *in vivo*. **Leukemia** 15, 613-620, 2001.

GOLDIE, J.H. Drug resistance in cancer: A perspective. **Cancer and Metastasis Reviews** 20, 63–68, 2001.

GRAFF, C.L.; POLLACK, G.M., Drug transport at the blood–brain barrier and the choroid plexus. **Curr. Drug Metab.** 5, 95– 108, 2004.

GROSH, S.; MAY, M.J.; HOPP, E.B. NF-kappaB and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. **Ann. Rev. Immunol.** 16, 225-260, 1998.

GRUSCH, M.; POLGAR, D.; GFATTER, S.; LEUHUBER, K.; HUETTENBRENNER, S.; LEISSER, C.; FUHRMANN, G.; KASSIE, F.; STEINKELLNER, H.; SMID, K.; PETERS, G.J.; JAYARAM, H.N.; KLEPAL, W.; SZEKERES, T.; KNASMU S.; KRUPITZA, G. Maintenance of ATP favours apoptosis over necrosis triggered by benzamide riboside. **Cell Death and Differentiation** 9, 2, 169 -178, 2002.

GUIMARÃES, J.R.Q. **Manual de Oncologia**. 1. ed. São Paulo: BBS Editora, 2004.

HAIMEUR, A.; CONSEIL, G.; DEELEY, R.G.; COLE, S.P. Mutations of charged amino acids in or near the transmembrane helices of the second membrane spanning domain differentially affect the substrate specificity and transport activity of the multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1). **Mol. Pharmacol.** 65, 1375– 1385, 2004.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in neurodegenerative diseases: Therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs & Aging** 18, 9, 685-716, 2001.

HALLIWELL, B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. **Haemostasis** 23(suppl 1): 118-126, 1993.

HAN, J.; STAMLER, J.S.; LI, H.; GIFFITHI, O.W. Inhibition of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase by S-nitrosylation. **In: The Biology of Nitric Oxide**, Stamler, J.S.; Gross, S.; Moncada, S.; Higgs, A. (eds), pp 114, Portland Press: London, 1995.

HAN, R. Research and Development of Anticancer Drugs and Experimental Techniques, Pekin Medical University Pekin Union Medical college joint Publishing House, Beijing, 395-399, 1997.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell** 100, 57-70, 2000.

HARRIS, A.L.; HOCHHAUSER, D. Mechanisms of multidrug resistance in cancer treatment, **Acta Oncol** 31, 205-213, 1992.

HARRIS, A.L. DNA repair and resistance to chemotherapy, **Cancer Surv** 4, 601-624, 1995a.

HARRIS, A.L. DNA repair: relationship to drug and radiation resistance, metastasis and growth factors, **Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med** 48, 675-690, 1995b.

HARRISON, C.J. Acute lymphoblastic leukaemia. **Best Practice & Research Clinical Hematology**, 14, 3, 593-607, 2001.

HEIJN, M.; HOOIJBERG, J.H.; SCHEFFER, G.L.; SZABO, G.; WESTERHOFF, H.V.; LANKELMA, J. Anthracyclines modulate multidrug resistance protein (MRP) mediated organic anion transport. **Biochim. Biophys. Acta** 1326, 12– 22, 1997.

HERR, I.; DEBATIN, K.M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. **Blood** 98, 2603–2614, 2001.

HIBBS, J.B.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z.; GRANGER, D.L.; DRAPIER, J.C.; AMBER, I.J.; LANCASTER, J.R. Synthesis of nitric oxide from a terminal guanidine nitrogen atom of L-arginine: a molecular mechanism regulating cellular proliferation that targets intracellular iron. **In: Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system: Proceedings of the Symposium on Biological Importance of Nitric Oxide**, Moncada S, Higgs A (eds), 189-223, Elsevier: Amsterdam, 1990.

HOGG, N.; KALYNARAMAN, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta** 1411, 378-384, 1999.

HOOIJBERG, J.H.; DE VRIES, N.A.; KASPERS, G.J.L.; PIETERS, R.; JANSEN, G.; PETERS, G.J. Multidrug resistance proteins and folate supplementation: therapeutic implications for antifolates and other classes of drugs in cancer treatment. **Cancer Chemother Pharmacol** 58, 1–12, 2006.

HOPPER-BORGE, E.; CHEN, Z.S.; SHCHAVELEVA, I.; BELINSKY, M.G.; KRUIH, G.D. Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel. **Cancer Res** 64, 4927–4930, 2004.

HUANG, Y.; SADÉE, W. Membrane transporters and channels in chemoresistance

and –sensitivity of tumor cells. **Cancer Lett** 239, 2, 168-182, 2006.

HUANG, Z. The chemical biology of apoptosis. Exploring protein-protein interactions and the life and death of cells with small molecules. **Chem Biol** 9, 10, 1059-1072, 2002.

IGNEY, F.H.; KRAMMER, P.H. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. **Nature** 2, 277-288, 2002.

ISHIKAWA, T.; BAO, J.J.; YAMANE, Y.; AKIMARU, K.; FRINDRICH, K.; WRIGHT, C.D., KUO, M.T. Coordinated induction of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells, **J Biol Chem** 271, 25, 14981-14988, 1996.

ITO, T.; SHIRAK, K.; SUGIMOTO, K.; YAMANAKA, K.; FUJIKAWA, K.; ITO, M.; TAKASE, K.; MORIYAMA, M.; KAWANO, H.; HAYASHIDA, M.; NAKANO, T.; SUZUKI, A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. **Hepatology** 31, 5, 1080-1085, 2000.

JAFFE, E.S.; HARRIS, N.L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J.W. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon, 2001.

JULIANO, R.L.; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochim Biophys Acta** 455, 152-162, 1976.

KALYANARAMAN, B.; JOSEPH, J.; KALIVENDI, S.; KONOREV, E.; KOTAMRAJU, S. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity, **Mol. Cell. Biochem.** 234/235, 119–124, 2002.

KARIN, M.; CAO, Y.; GRETEN, F.R.; LI, Z.W. NF- $\kappa$ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. **Nat Rev Cancer** 2, 301–310, 2002.

KAST, C.; GROS, P. Topology mapping of the amino-terminal half of multidrug resistance-associated protein by epitope insertion and immunofluorescence. **J. Biol. Chem.** 272, 26479– 26487, 1997.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer** 26, 239-257, 1972.

KIECHLE, F.L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clin. Chim. Acta** 326, 1/2, 27–45, 2002.

KIM, Y-M.; BOMBECK, C.A.; BILLIAR, T.R. Nitric oxide as bifunctional regulator of apoptosis. **Circ. Res.** 84, 253-256, 1999.

KOLB, J.P. Mechanisms involved in the pro- and anti-apoptotic role of NO in human leukemia, **Leukemia** 14, 1685-1694, 2000.

KONOVALOVA, N.P.; GONCHAROVA, A.S.; VOLKOVA, L.M.; RAJEWSKAYA, T.A.;



EREMENKO, L.T.; KOROLEV, A.M. Nitric oxide donor increases the efficiency of cytostatic therapy and retards the development of drug resistance. **Nitric Oxide** 8, 59-64, 2003.

KRAMER, R.A.; GREENE, K.; AHMAD, S.; VISTICA, D.T. Chemosensitization of L-phenylalanine mustard by the thiol-modulating agent buthionine sulfoximine. *Cancer Res.* 47, 1593-1597, 1987.

KRISHNA, R.; MAYER, L.D. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. **Eur J Pharm Sci** 11, 265-283, 2000.

KRONCKE, K-D; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection - How, Why, When, and Where? **Nitric Oxide: Biology and Chemistry** 2, 107-120, 1997.

KRUEGER, A.; BAUMANN, S.; KRAMMER, P. H.; KIRCHHOFF, S. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor mediated apoptosis. **Mol. Cell. Biol.** 21, 8247-8254, 2001.

KRUH, G.D.; BELINSKY, M.G. The MRP family of drug efflux pumps. **Oncogene** 22, 7537-7552, 2003.

KUO, M.L.; CHAU, Y.P.; WANG, J.H.; SHIAH, S.G. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase block nitric oxide-induced apoptosis but not differentiation in human leukemia HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219, 502-508, 1996.

KUO, M.T.; BAO, J.; FURUICHI, M.; YAMANE, Y.; GOMI, A.; SAVARAJ, N.; MASUZAWA, T.; ISHIKAWA, T. Frequent coexpression of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase mRNA in drug-resistant cells, untreated tumor cells, and normal mouse tissues. **Biochem. Pharmacol.** 55, 5, 605-615, 1998.

LAUTIER, D.; CANITROT, Y.; DEELEY, R.G.; COLE, S.P. Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene. **Biochem. Pharmacol.** 52, 967-977, 1996.

LEIST, M.; SINGLE, B.; CASTOLDI, A.F.; KUHNLE, S.; NICOTERA, P. Intracellular Adenosine Triphosphate (ATP) Concentration: A Switch in the Decision Between Apoptosis and Necrosis. **J. Exp. Med.** 185, 8, 1481-1486, 1997.

LEONARD, D.; FOJO, T.; BATES, S.E. The role of ABC transporters in clinical practice. **The Oncologist** 8, 411-424, 2003.

LESLIE, E.M.; DEELEY, R.G.; COLE, S.P. Bioflavonoid stimulation of glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1). **Drug Metab. Dispos.** 31, 11 - 15, 2003.

LESLIE, E.M.; DEELEY, R.G.; COLE, S.P. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. **Toxicol Appl**

**Pharmacol** 204, 216-237, 2005.

LESZCZYNIĘCKA, M.; ROBERTS, T.; DENT, P.; GRANTE, S.; FISHER, P.B. Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. **Pharmacology & Therapeutics**, 90, 105–156, 2001.

LI, J.; BILLIAR, T.R.; TALANIAN, R.V.; KIM, Y.M. Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. **Biochem Biophys Res Commun** 240, 419–424, 1997.

LI, J.; BOMBECK, C.A.; YANG, S.; KIM, Y.M.; BILLIAR, T.R. Nitric oxide suppresses apoptosis via interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultures hepatocytes. **J Biol Chem** 274, 17325–17333, 1999.

LIN, A., KARIN, M. NF- $\kappa$ B in cancer: a marked target. **Seminars in Cancer Biology** 13, 107–114, 2003.

LIU, B.; PENG, D.; LU, Y.; JIN, W.; FAN, Z. A novel single amino acid deletion caspase-8 mutant in cancer cells that lost pro-apoptotic activity. **J Biol Chem** 277, 30159–30164, 2002.

LIU, L.; STAMLER, J.S. NO: an inhibitor of cell death. **Cell Death Differ** 6, 937–942, 1999.

LOE, D.W.; ALMQUIST, K.C.; DEELEY, R.G.; COLE, S.P. Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. **J. Biol. Chem.** 271, 9675–9682, 1996.

LOE, D.W.; DEELEY, R.G.; COLE, S.P. Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. **Cancer Res.** 58, 5130–5136, 1998.

LOE, D.W.; OLESCHUK, C.J.; DEELEY, R.G.; COLE, S.P. Structure–activity studies of verapamil analogs that modulate transport of leukotriene C(4) and reduced glutathione by multidrug resistance protein MRP1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 275, 795–803, 2000.

LOPES, L.F. Marcadores moleculares nas leucemias linfocíticas agudas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 22, 2, 166-8, 2000.

LOS, M.; MOZOLUK, M.; FERRARI, D.; STEPCZYNSKA, A.; STROH, C.; RENZ, A.; HERCEG, Z.; WANG, Z.Q.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. **Mol. Biol. Cell** 13, 3, 978–988, 2002.

MAFTAH, A.; HUET, O.; GALLET, P.F.; RATINAUD, M.H. Flow cytometry's contribution to the measurement of cell functions, **Biol Cell** 78, 1/2, 85-93, 1993.

MAGRINAT, G.; MASON, S.N.; SHAMI, P.J.; WEINBERG, J.B. Nitric oxide modulation

of human leukemia cell differentiation and gene expression. **Blood** 80, 8, 1880-1884, 1992.

MANCIU, L.; CHANG, X.B.; BUYSE, F.; HOU, Y.X.; GUSTOT, A.; RIORDAN, J.R.; RUYSSCHAERT, J.M. Intermediate structural states involved in MRP1-mediated drug transport. Role of glutathione. **J. Biol. Chem.** 278, 3347– 3356, 2003.

MAO, Q.; DEELEY, R.G.; COLE, S.P. Functional reconstitution of substrate transport by purified multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1) in phospholipid vesicles. **J. Biol. Chem.** 275, 34166– 34172, 2000.

MARSH, N.; MARSH, A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology, **Clin Exp Pharmacol Physiol** 27, 313-319, 2000.

MAYER, B.; ANDREW, P. Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. Naunyn Schmiedebergs **Arch. Pharmacol.** 358, 127-133, 1998.

MAYO, M.W.; BALDWIN, A.S. The transcription factor NF $\kappa$ B: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. **Biochem. Biophys. Acta** 1470, M55-M62, 2000.

MEISTER, A.; TATE, S.S. Glutathione and related  $\gamma$ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. **Annu. Rev. Biochem.** 45, 559-604, 1976.

MERCURIO, F.; MANNING, A.M. NF- $\kappa$ B as a primary regulator of the stress response. **Oncogene** 18, 6163-6171, 1999.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.** 43, 109-142, 1991.

MUELLER, C. M.; SCOTT, D. W. Distinct molecular mechanisms of Fas resistance in murine B lymphoma cells. **J. Immunol.** 165, 1854–1862, 2000.

MURAD, F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. **Bioscience Reports** 24, 4/5, 453-474, 1999.

MURPHY, M.P. Nitric oxide and cell death. **Biochimica et Biophysica Acta** 1411, 401-414, 1999.

MURTA, B.M.T; MACHADO, J.S.; ZAPAROLI, M.; LARA, V.C.; MURTA, E.F. The relationship of host immune cells, cytokine and nitric oxide production to tumor cells in ovarian carcinoma. **Sao Paulo Med J.** 117, 2, 87-92, 1999.

NAKAMURA, N.; WADA, Y. Properties of DNA fragmentation activity generated by ATP depletion. **Cell Death and Differentiation** 7, 477-484, 2000.

NAPOLI, C.; IGNARRO, L.J. Nitric oxide – releasing drugs. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 43, 97-123, 2003.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB Journal**

6, 3051-3064, 1992.

O'BRIEN, M.L.; TEW, K.D. Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. **European Journal of Cancer** 32, 6, 967-978, 1996.

O'SULLIVAN, C.; LEWIS, C.E. Tumor-associated leucocytes: Friend or foes in breast cancer carcinoma. **Journal Pathology** 172, 229-235, 1994.

OZBEN, T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer, **FEBS Lett** 580, 2903-2909, 2006.

PALMER, R.M. J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**. 327, 524-526, 1987.

PEJOVIC, T.; SCHWARTZ, P.E. Leukemias. **Clinical Obstetrics and Gynecology** 45, 866-878, 2002.

PLASSCHAERT, S.L.A.; KAMPS, W.A.; VELLENGA, E.; VRIES, E.G.E. DE; BONT, E.S.J.M. DE. Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia: a question of maturation? **Cancer Treatment Reviews** 30, 37-51, 2004.

PUI, C-H.; EVANS, W.E. Acute Lymphoblastic leukemia. **N. Engl. J. Med.** 339, 605-615, 1998.

QIAN, Y.M., SONG, W.C., CUI, H., COLE, S.P., DEELEY, R.G. Glutathione stimulates sulfated estrogen transport by multidrug resistance protein 1. **J. Biol. Chem.** 276, 6404-6411, 2001.

RAHKO, E., BLANCO, G., SOINI, Y., BLOIGU, R., JUKKOLA, A. A mutant TP53 gene status is associated with a poor prognosis and anthracycline resistance in breast cancer patients. **Eur. J. Cancer** 39, 447-453, 2003.

RAHNMAN, I.; MACNEE, W. Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. **Free Radical Biology & Medicine** 28, 1405-1420, 2000.

RAPPA, G., LORICO, A., FLAVELL, R.A., SARTORELLI, A.C. Evidence that the multidrug resistance protein (MRP) functions as a co-transporter of glutathione and natural product toxins. **Ancer Res.** 57, 5232-5237, 1997.

REED, J. C., CUDDY, M., SLABIAK, T., CROCE, C. M. & NOWELL, P. C. Oncogenic potential of BCL-2 demonstrated by gene transfer. **Nature** 336, 259-261, 1988.

REED, J.C. Apoptosis-targeted therapies for cancer. **Cancer Cell** 3, 1, 17-22, 2003.

RENES, J.; VRIES, E.G.E.; NIENHUIS, E.F.; JANSEN, P.L.M.; MÜLLER, M. ATP- and glutathione-dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug protein MRP1. **British Journal of Pharmacology** 126, 691-688, 1999.

RIGANTI, C.; MIRAGLIA, E.; VIARISIO, D.; COSTAMAGNA, C.; PESCARMONA, G.; GHIGO, D.; BOSIA, A. Nitric oxide reverts the resistance to doxorubicin in human colon cancer cells by inhibiting the drug efflux, **Cancer Res** 65, 516-525, 2005.

ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA, 2000.

RUVUOLO P.P.; DENG, X. MAY, W.S. Phosphorylation of Bcl-2 and regulation of apoptosis. **Leukemia** 15, 515-522, 2001.

SANTOS-SILVA, M. C. **Efeito citotóxico do óxido nítrico e do taxol sobre células linfoblásticas leucêmicas: envolvimento do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e papel da glutathione**. Tese de doutorado desenvolvida pelo Programa de Pós – Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, defendida em 2002.

SANTOS-SILVA, M.C.; FREITAS, M.S.; ASSEREUY, J. Killing of lymphoblastic leukemia cells by nitric oxide and taxol: involvement of NF- $\kappa$ B activity. **Cancer Letters** 173, 53-61, 2001.

SANTOS-SILVA, M.C.; FREITAS, M.S.; ASSEREUY, J. Involvement of NF- $\kappa$ B and glutathione in cytotoxic effects of nitric oxide and taxol on human leukemia cells **Leukemia Research** 30, 145–152, 2006.

SAUERBREY, A.; VOIGT, A.; WITTIG, S.; HAFER, R.; ZINTL, F. Messenger RNA analysis of the multidrug resistance related protein (MRP1) and the lung resistance protein (LRP) in de novo and relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Lymphoma** 43, 875–879, 2002.

SCHAPER, J.; KOSTIN, S. Cell Death and Adenosine Triphosphate: The Paradox. **Circulation** 112, 6-8, 2005.

SCHMIDT, H.H.H.W.; WALTER, U. NO at work. **Cell** 78, 919-925, 1994.

SCHMITT CA, LOWE SW. Apoptosis and therapy. **J Pathology** 187, 127-137, 1999.

SHAN, X.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther** 47, 61-71, 1990.

SHI, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. **Mol Cell** 9, 3, 459-470, 2002.

SHIOZAKI, E.N.; SHI, Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. **TRENDS in Biochemical Sciences** 39, 9, 486-494, 2004.

SHISHODIA, S.; AGGARWAL, B.B. Nuclear factor- $\kappa$ B: a friend or a foe in cancer? **Biochemical Pharmacology** 68, 1071-1080, 2004.

SILVA, G.C. DA; PILGER, D.A.; CASTRO, S.M. DE; WAGNER, S.C. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas **J Bras Patol Med Lab** 42, 2, 77-84, 2006.

SKULACHEV, V.P. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. **Apoptosis** 11, 473–485, 2006.

SOENGAS, M.S.; CAPODIECI, P.; POLSKY, D.; MORA, J.; ESTELLER, M.; OPITZ-ARAYA, X.; MCCOMBIE, R.; HERMAN, J.G.; GERALD, W.L.; LAZEBNIK, Y.A.; CORDON-CARDO, C.; LOWE, S.W. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. **Nature** 409, 6817, 207–211, 2001.

SOUZA, N.M.A. **Envolvimento do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e da glutathiona na resistência à apoptose induzida por compostos antimicrotúbulos em células linfoblásticas leucêmicas.** Dissertação de mestrado desenvolvida pelo Programa de Pós – Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina, defendida em 2006.

STAM, R.W.; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M.M.; DEN BOER, M.L.; EBUS, M.E.; JANKA-SCHAUB, G.E.; ALLEN, J.D.; PIETERS, R. Multidrug resistance genes in infant acute lymphoblastic leukemia: Ara-C is not a substrate for the breast cancer resistance protein. **Leukemia** 18, 78–83, 2004.

SZABÓ, C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. **Toxicology Letters** 140/141, 105-112, 2003.

SZCZEPANSKI, T.; VELDEN, V.H.J.; DONGEN, J.M. Classification systems for acute and chronic leukemias. **Best Practice & Research Clinical Hematology** 16, 4, 561-582, 2003.

TAMM, I.; WANG, I.; SAUSVILLE, E.; SCUDIERO, D.A.; VIGNA, N.; OLTERS DORF, T.; REED, J.C. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas(CD95), Bax, Caspases, and anticancer drugs. **Cancer Res.** 58, 23, 5315-5320, 1998.

TANAKA, K.; IWAMOTO, S.; GON, G.; NOHARA, T.; IWAMOTO, M.; TANIGAWA, N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. **Clinical Cancer Research** 6, 1, 127-134, 2000.

TATSUMI, T.; SHIRAISHI, J.; KEIRA, N.; AKASHI, K.; MANO, A.; YAMANAKA, S.; MATOBA, S.; FUSHIKI, S.; FLISS, H.; NAKAGAWA, M. Intracellular ATP is required for mitochondrial apoptotic pathways in isolated hypoxic rat cardiac myocytes. **Cardiovasc Res** 59, 2, 428-440, 2003.

TIETZE, F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal. Biochem.**, 27, 502-22, 1969.

TRIBULL, T.E.; BRUNER, R.H.; BAIN, L.J. The multidrug resistance-associated protein 1 transports methoxychlor and protects the seminiferous epithelium from injury. **Toxicol. Lett.** 142, 1/2, 61–70, 2003.

TSANG, W.P., CHAU, S.P., FUNG, K.P., KONG, S.K., KWOK, T.T. Modulation of

multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) by p53 mutant in Saos-2 cells. **Cancer Chemother. Pharmacol.** 51, 161–166, 2003.

TSUJIMOTO, Y., COSSMAN, J., JAFFE, E. & CROCE, C. M. Involvement of the BCL-2 gene in human follicular lymphoma. **Science** 228, 1440–1443, 1985.

UGUREL, S., RAPPL, G., TILGEN, W.; REINHOLD, U. Increased soluble CD95 (sFas/CD95) serum level correlates with poor prognosis in melanoma patients. **Clin. Cancer Res.** 7, 1282–1286, 2001.

Van de LOOSDRECHT, A.A.; NENE, E.; OSSENKOPPELE, G.J.; BEELEN, R.H.J.; LANGENHUIJSE, M.M.A.C. Cell mediated cytotoxicity against U937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. **J. Immunol. Methods**, 141, 15-22, 1991.

VIATOUR, P.; MERVILLE, M.P.; BOURS, V.; CHARIOT, A. Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. **Trends Biochem Sci.** 30, 1, 43-5, 2005.

WAGNER-SOUZA, K.; MELETTI-DE-OLIVEIRA, M.C.; MAIA, R.C.; RUMJANEK, V. Ciclosporina A e seus análogos como reversores da resistência a múltiplas drogas em células tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia** 49, 2, 103-112, 2003.

WALKER, M.W.; KINTER, M.T.; ROBERTS, R.J.; SPITZ, D.R. Nitric oxide-induced cytotoxicity: involvement of cellular resistance to oxidative stress and role glutathione in protection. **Pediatr. Res.** 37, 41-49, 1995.

WANG, C.Y.; CUSACK, J.C. Jr.; LIU R, BALDWIN, A.S. Jr. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-κB. **Nat Med** 5, 412–417, 1999.

WANG, W.; BALLATORI, N. Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Functions. **Pharmacol. Rev.** 50, 3, 335-356, 1998.

WANG, Z.Y.; CHEN, Z. Differentiation and apoptosis induction therapy in acute promyelocytic leukaemia. **Lancet Oncol.** 1, 101-106, 2000.

WATTS, R.N.; HAWKINS, C.; PONKA, P.; RICHARDSON, D.R. Nitrogen monoxide (NO)-mediated iron release from cells is linked to NO-induced glutathione efflux via multidrug resistance-associated protein 1, **Proc Natl Acad Sci USA** 103, 7670-7675, 2006.

WHO. World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer>>. Acesso em fev. 2007.

WINK, D.A.; MITCHELL, J.B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide, **Free Radic Biol Med** 25, 434-456, 1998.

WINK, D.A.; VODOVOTZ, Y.; LAVAL, J.; LAVAL, F.; DEWHIRST, M.W.; MITCHELL,

J.B. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. **Carcinogenesis** 19, 5, 711-721, 1998.

XING, N.; QIAN, J.; BOSTWICK, D.; BERGSTRALH, E.; YOUNG, C. Neuroendocrine cells in human prostate over-express the anti-apoptosis protein survivin. **Prostate** 48, 1, 7-15, 2001.

YABUKI, M.; TSUTSUI, K.; HORTON, A.A.; YOSHIOKA, T.; UTSUMI, K. Caspase activation and cytochrome c release during HL-60 cell apoptosis induced by a nitric oxide donor, **Free Radical Res.** 32, 6, 507–514, 2000.

YANG, D.; YIN, J.; MISHRA, S.; MISHRA, R.; HSU, C. NO-Mediated Chemoresistance in C6 Glioma Cells, **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 962, 8–17, 2002.

ZAMAN, G.J.; LANKELMA, J.; VAN TELLINGEN, O.; BEIJNEN, J.; DEKKER, H.; PAULUSMA, C.; OUDE ELFERINK, R.P.; BAAS, F.; BORST, P. Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug resistance-associated protein. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 92, 7690–7694, 1995.

ZENG, H.; BAIN, L.J.; BELINSKY, M.G.; KRUIH, G.D. Expression of multidrug resistance protein-3 (multispecific organic anion transporter-D) in human embryonic kidney 293 cells confers resistance to anticancer agents. **Cancer Res.** 59, 5964-5967, 1999.

ZHANG, D.W., COLE, S.P., DEELEY, R.G. Identification of a nonconserved amino acid residue in multidrug resistance protein 1 important for determining substrate specificity: evidence for functional interaction between transmembrane helices 14 and 17. **J. Biol. Chem.** 276, 34966–34974, 2001.

ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. Apoptosis and cancer: where we are and where to go . . . **Seminars in Cancer Biology** 13, 93–95, 2003.

ZHONG, Y.L.; QIU, L.N.; LIN, H.J.; WANG, W.S.; WU, J.G.; LIU, J.D. Change of Bcl-2, Bax proteins and mitochondrial membrane protein on nitric oxide induced apoptosis in HL-60 cells. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.** 12, 4, 445-449, 2004.

ZHUANG, S.; SIMON, G. Peroxynitrite-induced apoptosis involves activation of multiple caspases in HL-60 cells. **Am J Physiol Cell Physiol** 279, 2, 341-351, 2000.

ZOUKI, C.; JOZSEF, L.; OUELLET, S.; PAQUETTE, Y.; FILEP, J.G. Peroxynitrite mediates cytokine-induced IL-8 gene expression and production by human leukocytes. **J Leukoc Biol** 69, 5, 815-824, 2001.