

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NOS MECANISMOS  
ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA A DAUNORRUBICINA EM  
CÉLULAS DE LINHAGEM DE LEUCEMIA MIELÓIDE  
AGUDA HUMANA**

**JULIANA COSTA CURTA**

**FLORIANÓPOLIS  
2010**



**JULIANA COSTA CURTA**

**EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NOS MECANISMOS  
ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA A DAUNORRUBICINA EM  
CÉLULAS DE LINHAGEM DE LEUCEMIA MIELÓIDE  
AGUDA HUMANA**

**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.**

**FLORIANÓPOLIS  
2010**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da  
Universidade Federal de Santa Catarina

C978e Curta, Juliana Costa

Efeito do óxido nítrico nos mecanismos envolvidos na resistência a daunorrubicina em células de linhagem de leucemia mielóide aguda humana [dissertação] / Juliana Costa Curta ; orientadora, Maria Cláudia Santos da Silva. - Florianópolis, SC, 2010.

116 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Daunorrubicina. 3. Óxido Nítrico. 4. Apoptose. I. Silva, Maria Cláudia Santos da. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

**Efeito do óxido nítrico nos mecanismos envolvidos na resistência a  
daunorrubicina em células de linhagem de leucemia mielóide  
aguda humana**

**POR**

**Juliana Costa Curta**

**Dissertação julgada e aprovada em  
sua forma final pela Orientadora e  
membros da Banca Examinadora,  
composta pelos Professores  
Doutores:**

**Banca Examinadora:**

---

**Prof. Dr. Jamil Assereuy (UFSC – Membro Titular)**

---

**Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa (UFSC – Membro Titular)**

---

**Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo (UFSC – Membro Titular)**

---

**Profa. Dra. Maria Cláudia Santos Silva (UFSC – Orientadora)**

**Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel**  
**Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da**  
**UFSC**

Florianópolis, 16 de abril de 2010



***DEDICATÓRIA***

*Aos meus pais, Selvino e Zuleide, como retribuição de todo amor, carinho, compreensão e incentivo.*



## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por proporcionar-me diferentes caminhos, dando-me sempre oportunidades de escolha e guiando-me através delas.

À minha amada mãe Zuleide e minhas irmãs Roberta e Laura, pelo carinho, compreensão e atenção. E ao meu pai, que sempre priorizou a educação.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Cláudia Santos da Silva pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, e pelo grande exemplo de dedicação e amor à pesquisa científica. Meus sinceros agradecimentos pela orientação, pelo incentivo e, sobretudo pela paciência e compreensão durante esse período.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Jamil Assreuy pela colaboração na síntese do SNAP utilizado neste trabalho e por estar sempre pronto a colaborar.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Luiza Bazzo pelo suporte e pela orientação em Biologia Molecular essencial à finalização deste trabalho.

À Marley, Ana Carolina e Aline, pela amizade e ajuda técnica, sempre dispostas a ajudar, mesmo nas horas mais atribuladas. Também não posso deixar de agradecer pelas broncas e discussões, eu sei que não foi fácil me convencer de que eu não estava certa e me colocar novamente no eixo da minha pesquisa. Ainda bem que posso contar com a amizade de vocês dentro e fora do laboratório.

Às meninas do laboratório que diretamente ou indiretamente contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho: Karina, Manoela, Pâmela, Michele, Mariana e Haíra. Tenho certeza que vocês irão manter esse delicioso ambiente de trabalho, que bom pude conhecê-las.

Muito Obrigada!



## RESUMO

A Daunorrubicina (DNR) é amplamente utilizada na fase de indução do tratamento da Leucemia Mielóide Aguda (LMA). No entanto, o fenômeno de resistência a múltiplos fármacos (MDR), pode comprometer sua eficiência terapêutica como agente antineoplásico. Considerando que fármacos doadores de Óxido Nítrico (NO) têm sido investigados por terem um papel importante na sensibilização de células neoplásicas aos agentes quimioterápicos, o objetivo desse trabalho foi investigar o envolvimento do NO nos mecanismos moleculares de resistência à DNR em células de LMA de origem humana K562. Nossos resultados mostram que a incubação das células K562, com concentrações crescentes de DNR e de SNAP, um doador de NO, não causou morte celular significativa quando utilizados de forma individualizada. No entanto, a adição simultânea desses compostos, causou citotoxicidade de maneira concentração dependente. Para estudar os mecanismos pelos quais esses compostos provocaram morte celular, foi realizada a avaliação do ciclo celular, da expressão das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e survivina, proapoptótica Bax e da caspase-3. A DNR (100  $\mu$ M) e o SNAP (1mM) respectivamente causam bloqueio nas fases S e G0/G1 do ciclo celular na célula K562. Contudo, quando adicionados simultaneamente, o SNAP não altera o bloqueio causado pela DNR na fase S. Além disso, as células K562 apresentam de maneira constitutiva a expressão das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e survivina, e o tratamento com DNR e SNAP, isoladamente, não alteraram de forma significativa a expressão dessas proteínas. No entanto, a adição simultânea desses compostos causou redução de 40% e 70% na expressão de Bcl-2 e na survivina, respectivamente. A DNR e o SNAP também não alteram a expressão da proteína proapoptótica Bax, porém a associação desses compostos causou um aumento de 30% na expressão dessa proteína. A análise da distribuição intracelular de DNR nas células K562, por imunofluorescência mostra que a DNR acumula-se em regiões pontuais do citoplasma. Entretanto, quando as células K562 são tratadas com a associação de DNR e SNAP, há um acúmulo maior de DNR na célula e sua localização ocorre preferencialmente na região nuclear. Os resultados, obtidos na avaliação do acúmulo e retenção de DNR por citometria de fluxo, corroboram com esses resultados. Na análise da expressão dos genes *abcc1* e *lrp* por RT-PCR, foi observado que as células K562 apresentam expressão constitutiva de ambos os

genes. Em relação ao gene *lrp*, observamos que a DNR e o SNAP associados ou não causaram uma significativa diminuição na sua expressão. No entanto, a expressão do gene *abcc1* não foi alterada na presença de SNAP e o tratamento com DNR causou uma pequena redução na sua expressão, a qual foi intensificada com a associação DNR e SNAP. A compilação das evidências obtidas nesse estudo nos permite sugerir que o NO inibe a atividade da *abcc1*, o que leva a um aumento intracelular de DNR, o qual permite que o fármaco atinja seu alvo de ação citotóxica no núcleo. Assim, o dano ao DNA causado pela DNR ativa a apoptose via mitocondrial pelo aumento da expressão da Bax e inibição das proteínas Bcl-2 e survivina, culminando na ativação da caspase 3 e indução da apoptose nas células de leucemia mieloide aguda K562.

**Palavras-chaves:** Daunorrubicina, óxido nítrico, apoptose, ABCC1 e LRP.

## ABSTRACT

Daunorubicin (DNR) is widely used in the induction phase of the treatment for Acute Myeloid Leukemia (AML). However, multiple drug resistance (MDR) may compromise its therapeutic efficacy as an antineoplastic agent. Considering that Nitric Oxide (NO) donating drugs have been investigated for their important role in the sensitization of neoplastic cells to chemotherapy drugs, the goal of this work was to investigate the involvement of NO in the molecular mechanisms of resistance to DNR in human AML K562 cells. Our results have shown that the incubation of K562 cells, with increasing concentrations of DNR and SNAP (NO donors) did not cause significant cell death when used individually, but the simultaneous addition of these compounds produced cytotoxicity in a concentration-dependent manner. In order to study the mechanisms through which these compounds induce cell death, the cell cycle, the expression of anti-apoptotic proteins Bcl-2 and survivin, proapoptotic Bax, and caspase-3 were evaluated. DNR (100  $\mu$ M) and SNAP (1 mM) halt phases S and G0/G1 of the cell cycle in K562 cells, respectively. When added simultaneously, however, SNAP does not alter the block caused by DNR on phase S. Furthermore, K562 cells constitutively express anti-apoptotic proteins Bcl-2 and survivin, and treatment with DNR and SNAP separately does not significantly alter the expression of these proteins. Notwithstanding, the simultaneous addition of these compounds resulted in 40% and 70% reductions in the expression of Bcl-2 and survivin, respectively. DNR and SNAP also did not alter the expression of the proapoptotic protein Bax, but the association of both compounds resulted in a 30% increase in the expression of the same protein. The immunofluorescence analysis of the intracellular distribution of DNR in K562 cells shows that DNR accumulates in speckles in the cytoplasm. However, when K562 cells are treated with a mixture of DNR and SNAP, there is a greater accumulation of DNR in the cells, located primarily in the nuclear region. The results obtained in the evaluation of the accumulation and retention of DNR through flow cytometry support the previously mentioned findings. The RT-PCR analysis of the expression of *abcc1* and *Irp* genes showed that K562 cells constitutively express both genes. Regarding *Irp*, DNR and SNAP did not produce a significant decrease in its expression, either combined or separately. However, the expression of the *abcc1* gene was not affected by the presence of SNAP but when treated with

DNR its expression presented a small reduction, which was intensified by the association of DNR and SNAP. The compilation of evidence obtained in this study allows us to suggest that NO inhibits the activity of *abcc1*, leading to an intracellular increase in DNR, which allows this drug to reach its target of cytotoxic activity in the nucleus. Thus, the DNA damage caused by DNR triggers the mitochondrial apoptosis pathway with an increase in the expression of Bax and inhibition of Bcl-2 and survivin proteins, culminating in the activation of caspase-3 and the induction of apoptosis in acute myeloid leukemia K562 cells.

**Keywords:** Danorubicin, nitric oxide, apoptosis, ABCC1, LRP.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Efeito citotóxico do SNAP e da DNR isoladamente ou em associação sobre as células de linhagem leucemia mielóide aguda humana K562 .....	68
<b>Figura 2:</b> Efeito do SNAP e DNR sobre as fases do ciclo celular nas células de linhagem leucemia mielóide aguda humana K562 .....	69
<b>Figura 3:</b> Efeito do SNAP e/ou DNR na expressão das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e survivina, proteína apoptótica Bax e caspase 3 em células de linhagem de leucemia mielóide aguda humana K562 .....	71
<b>Figura 4:</b> Efeito do SNAP no acúmulo e disposição da DNR intracelular em células de linhagem de leucemia mielóide aguda humana K562.....	73
<b>Figura 5:</b> Efeito do DNR e/ou na expressão dos genes ABCC1 e LRP em células de linhagem de leucemia mielóide aguda humana K562 .....	75



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Fármacos antitumorais e seus respectivos transportadores ABC .....	43
<b>Tabela 2:</b> Sequência dos Oligonucleotídeos Iniciadores ou <i>Primers</i> .	65
<b>Tabela 3:</b> Temperatura e duração das fases das reações de RT-PCR	65
<b>Tabela 4:</b> Média em (%) das células nas fases G0/G1, S, G2/M e Sub G0/G1 do ciclo célula .....	70



## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b> Estrutura química das antraciclinas .....	32
<b>Esquema 2:</b> As Vias da Apoptose .....	35
<b>Esquema 3:</b> Subfamília de proteínas Bcl-2 .....	38
<b>Esquema 4:</b> Fases do ciclo celular normal .....	40
<b>Esquema 5:</b> Estrutura da proteína ABCB1.....	45
<b>Esquema 6:</b> Estrutura das proteínas ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC6 e ABCC10.....	46
<b>Esquema 7:</b> Formação do óxido nítrico e seu mecanismo de ação .	50
<b>Esquema 8:</b> Mecanismo proposto para efeito do óxido nítrico nos mecanismos envolvidos na resistência a daunorrubicina em células K562.....	85



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ABC – Bomba de efluxo de drogas ou proteínas transportadoras dependente de ATP

ADP – Adenosina difosfato

AIF – Fator indutor da apoptose

ANOVA – Análises de variância

APAF1 – Fator ativador de proteases 1

ATP – Adenosina Trifosfato

Bcl-2 – Proteína apoptótica

BCRP – Proteína de resistência de câncer de mama

BH – Domínio homólogo aos da Bcl-2

Caspase – Proteases baseadas em cisteína

GMPc – Guanosina Monofosfato Cíclica

DEPC – Água tratada com dietil pirocarbonato

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DNR – Daunorrubicina

DOX – Doxorrubicina

EDRF – Fator relaxante derivado do endotélio

GSH – Glutationa

GSSG – Glutationa oxidada

HRP- Enzima Horseradisch peroxidase



INCA – Instituto Nacional do Câncer

LMA – Leucemia mielóide aguda

LRP – Proteína de resistência pulmonar

LTC4 – Cisteinil leucotrieno 4

MDR – Resistência a múltiplos fármacos

MRP/ABCC – Proteína de resistência a múltiplos fármacos

MTT – Brometo de dimetiazol difeniltetrazólio

MVP – Proteína transportadora

NAPH – Nicotinamida adenine dinucleótido fosfato

NDB – Domínio de ligação de nucleotídeo

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

$O_2^-$  - Ânion Superóxido

$O_2$  – Oxigênio molecular

PARP – Poli(ADP-ribose) polimerase

PBS – Solução tampão de fosfato

P-gp/ABCB1 – Glicoproteína P

PI - Iodeto de Propídeo

RNA – Ácido Ribonucleico

RNase – Ribonuclease



RPMI – Meio de cultura Instituto Roswell Park Memorial

RT-PCR – Transcriptase Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase

SDS – Dodecil sulfato de sódio

sGC – Guanilato Ciclase

SMAC/DIABLO – Segundo ativador das caspases derivados da mitocôndria/ proteína diretamente ligada a IAP

SNAP – S-nitro-N-acetil-D,L-penicilamina

TM – Domínio transmembrana



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
1.1 Câncer .....	27
1.2 Leucemia .....	28
1.2.1 Leucemia Mielóide Aguda .....	29
1.2.2 Tratamento da Leucemia Mielóide Aguda .....	30
1.3 Antraciclinas .....	31
1.4 Mecanismos de resistência .....	34
1.4.1 Apoptose .....	34
1.4.2 Ciclo celular .....	39
1.4.3 Proteínas transportadoras ABC .....	41
1.4.3.1 Glicoproteína P – ABCB1/P-gp .....	44
1.4.3.2 Proteína de resistência a múltiplos fármacos – ABCC/MRP .....	45
1.4.4 Proteína de resistência pulmonar – LRP .....	48
1.5 Óxido Nítrico: importância biológica e envolvimento na citotoxicidade de células tumorais e na resistência a múltiplos fármacos .....	48
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>53</b>
2.1 Objetivo geral .....	55
2.2 Objetivos específicos .....	55
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>57</b>
3.1. Reagentes .....	59
3.2 Cultura de células .....	59
3.3 Preparo da amostra .....	60
3.4 Tratamento da amostra .....	60
3.5 Viabilidade celular (Ensaio do MTT) .....	60
3.6 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo .....	61
3.7 Ensaio de immunoblotting para as proteínas apoptóticas: Bcl-2, Bax, Survivina e caspase-3 .....	61
3.8 Análise do acúmulo e compartimentalização de Daunorrubicina intracelular por microscopia de fluorescência	63



3.9	Análise do acúmulo e retenção de Daunorrubicina por citometria de fluxo .....	63
3.10	Ensaio semi-quantitativo da transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-.....	64
3.11	Análise estatística .....	66
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>67</b>
4.1	Efeito citotóxico do SNAP e da DNR.....	68
4.2	Efeito do SNAP e DNR sobre as fases do ciclo celular.....	69
4.3	Efeito do SNAP e/ou DNR na expressão das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e survivina, proteína apoptóticas Bax e Caspase-3.....	70
4.4	Análise do efeito do SNAP no acúmulo e na compartimentalização intracelular de DNR.....	72
4.5	Efeito de DNR e/ou SNAP na expressão dos genes <i>abcc1</i> e <i>lrp</i> .....	74
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>77</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>87</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>91</b>



---

## *1. INTRODUÇÃO*

---



## 1.1 Câncer

Câncer é uma denominação utilizada para descrever um grupo de doenças que se caracteriza pela proliferação desordenada de células e pela perda de mecanismo de morte celular (HANAHAN e WEINBERG, 2000). O câncer é o resultado final de um longo processo de alterações genéticas acumuladas que transformam as células normais em células neoplásicas. Os mecanismos de transformação neoplásica de uma célula normal envolvem uma série de eventos genéticos e moleculares que afetam a proliferação e a diferenciação celular. Dois grupos de genes podem estar envolvidos na patogênese dos processos neoplásicos, os proto-oncogenes, que estimulam o crescimento celular e impedem a diferenciação; e os genes supressores de tumor, os quais promovem a diferenciação e limitam a proliferação das células. O desequilíbrio na regulação desses dois grupos de genes, seja pela ativação de proto-oncogenes ou perda da função de genes supressores de tumor, resulta na proliferação celular descontrolada e no acúmulo de sucessivas anormalidades genéticas, as quais são características das células neoplásicas (TSONGALIS e COLEMAN, 1998; SANTOS-SILVA, 2002).

Essas mutações gênicas características das células neoplásicas, as tornam mais resistentes do que as células normais, e é por isso que a proliferação descontrolada dessas células se sobrepõe às células normais; além disso, escapam facilmente do reconhecimento pelos sistemas de defesa imunológica. Muitos fatores podem estar envolvidos no desenvolvimento de tumores, tais como radiações eletromagnéticas, raio X, substâncias químicas como aminas heterocíclicas e infecções virais. 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 casos, como nas leucemias, o crescimento tumoral é difuso (HANAHAN e WEINBERG, 2000; SANTOS-SILVA, 2002).

O câncer é uma importante causa de óbito no Brasil. Desde 2003, as neoplasias malignas constituem-se na segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade (INCA, 2010).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as estimativas para ano de 2010, válidas também para 2011, apontam 489.270 novos casos de câncer no Brasil. Dentre os novos casos de câncer, as leucemias encontram-se entre os 10 tipos mais frequentes,

sendo superada pelos cânceres de mama, de próstata, do sistema respiratório, do cólon e reto, do estômago, do colo do útero, da cavidade oral e do esôfago. A estimativa para 2010 de novos casos de leucemias é de 9.580, sendo 5.240 homens e 4.340 mulheres (BRASIL, 2010).

## 1.2 Leucemias

As leucemias constituem um grupo heterogêneo de neoplasias malignas decorrentes da proliferação clonal de células hematopoiéticas na medula óssea e/ou nos tecidos linfóides, que, posteriormente, atingem a circulação periférica e podem infiltrar outros sistemas orgânicos (JAFFE et al., 2001; 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 e EVANS, 1998).

De modo geral, as leucemias são divididas em linfóides e mielóides e em agudas e crônicas. Nas leucemias agudas, há predominantemente células imaturas (linfoblastos ou mieloblastos), mas nas leucemias crônicas, quase todas as células são maduras. É por isso que, em geral, leucemias agudas têm pior prognóstico e, se não tratadas adequadamente, levam o paciente a óbito em dias ou semanas, enquanto nas leucemias crônicas, o curso clínico é mais brando (BAIN, 2003; PUI e EVANS, 1998; PEJOVIC e SCHWARTZ, 2002).

Os achados clínicos nas leucemias agudas são bastante variados e, embora a tríade febre, palidez, e apatia seja bastante frequente, a sintomatologia geralmente está associada aos órgãos envolvidos. Os sintomas podem variar no tempo de duração, oscilando desde dias até semanas. A dor óssea que representa o comprometimento leucêmico do periósteo e da cortical é frequente. Quando há invasão da medula óssea por blastos, e consequente diminuição da produção das células da série vermelha, a leucemia será manifestada clinicamente através de palidez, taquicardia, fadiga e dispnéia. Com o comprometimento da maturação leucocitária, há uma diminuição dos leucócitos normais e, consequentemente, infecções de repetição ou infecções que não respondem ao tratamento habitual. A

interrupção da produção da séria megacariocítica leva a manifestações de pétéquias disseminadas e sangramento, que são consequência da falta de plaquetas circulantes (FERREIRA e ROCHA, 2004).

### **1.2.1 Leucemia Mielóide Aguda**

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é uma doença maligna clonal do tecido hematopoiético, caracterizada pelo acúmulo de células blásticas anormais e pela diminuição da produção de células sanguíneas normais. O termo mielóide inclui todas as células que pertencem às linhagens celulares granulocítica (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), monócitos/macrófagos, eritrócitos, megacariócito e mastócitos. Na LMA, a proliferação anormal de células progenitoras da linhagem mielóide ocorre na medula óssea, atingindo o sangue periférico. No entanto, pode infiltrar-se em outros órgãos. O mecanismo responsável pela perda do controle da proliferação celular e expansão do clone leucêmico, todavia, não está esclarecido. Entretanto, a ativação de proto-oncogenes e mutações em genes supressores, que regulam o ciclo celular, parecem estar envolvidas na patogênese das leucemias (WILLIAMS, 2006; ZAGO et al., 2005).

Segundo a Classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), publicada em 2008, a LMA é subdividida em sete subcategorias, como segue: LMA associada a anormalidades genéticas recorrentes, LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia, Neoplasias mielóides associadas ao tratamento, LMA não categorizada nos itens anteriores, Sarcoma mielóide, Proliferação mielóide relacionada com síndrome de Down e Neoplasia de células blásticas dendríticas plasmocitóides. O diagnóstico de LMA é realizado por meio de análise de amostras de sangue periférico e/ou da medula óssea obtidos antes do início do tratamento quimioterápico. As características de morfologia, citoquímica e ou imunofenotipagem são usadas para estabelecer a linhagem celular e a para avaliação de sua maturação. A porcentagem de blastos permanece como uma ferramenta prática para categorizar a neoplasia mielóide e julgar seu prognóstico (SWERDLOW et al., 2008, VARDIMAN et al, 2009). De acordo com os critérios de citogenética pode-se classificar as LMAs em três grupos prognósticos: favorável, intermediário ou desfavorável. Entre outros fatores que influenciam o prognóstico das LMAs, inclui-

se a presença de proteínas transportadoras transmembranas, as quais expulsam certos agentes quimioterápicos da célula, conferindo resistência a múltiplos fármacos. Inclui-se ainda o fator das mutações gênicas, as quais induzem aumento da expressão de genes específicos como WTI, CEBPA, Bax, Bcl-2, BAALC, EVII, KIT e FLT3 (TALLMAN et al, 2005; AVIVI e ROWE, 2005).

A LMA acomete adultos e crianças, no entanto, na infância sua incidência é baixa, já na idade adulta aumenta rapidamente com a idade, sendo mais expressiva em indivíduos acima de 70 anos (BAIN, 2003). Apesar de ser considerada a mesma doença, adultos e crianças com LMA apresentam diferentes características clínicas, prognósticas e resposta ao tratamento. Diferente da Leucemia Linfóide Aguda (LLA), a LMA em crianças tem pior prognóstico, levando aproximadamente um terço das portadoras a recidivarem (RUBNITZ et al., 2008; SHAH e AGARWAL, 2008). Em adultos, o cenário não é muito diferente, a LMA em adultos também é de difícil tratamento. Mesmo que 50% a 85% dos pacientes adultos com LMA atinja a remissão após o tratamento, dependendo do subtipo de LMA, a maioria recidiva e vai a óbito após dois anos em remissão (SHIPLEY e BUTERA, 2009). A resistência à quimioterapia poderia ser explicada pelo aumento da ocorrência de anormalidades citogenéticas que se verifica com o avanço da idade. Pode-se acrescentar ainda que, em alguns pacientes mais idosos, a doença está associada mais frequentemente com desordens hematológicas antecedentes como as síndromes mielodisplásicas e desordens mieloproliferativas, cariótipos desfavoráveis e expressão de proteínas de resistência a múltiplos fármacos (TALLMAN et al, 2005).

### **1.2.2 Tratamento da Leucemia Mielóide Aguda**

Os avanços tecnológicos trouxeram inovações na área da farmacologia, várias formas de terapia vêm sendo utilizadas para combater as leucemias, como radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e transplante de medula óssea. Entretanto a taxa de cura em LMA permanece em torno de 20% (SHAH e AGARWAL, 2008). Apesar do transplante de medula óssea ser considerado uma modalidade terapêutica eficiente para a remissão completa das leucemias, ele apresenta restrições clínicas e sócio-econômicas para o paciente e a experiência dos grandes centros mundiais continua

reportando a cura global da doença como baixa (BITTENCOURT et al., 2003). Por isso, a quimioterapia ainda é a terapia antileucêmica de escolha, na qual, vários medicamentos anticancerígenos são utilizados de forma combinada, ou como agentes isolados (GOL B et al., 2001).

Segundo o protocolo BCSH (*British Committee for Standards in Haematology*), o tratamento da LMA é dividido em duas fases: fase de indução, a qual visa a eliminação das células leucêmicas; e a fase de consolidação, importante para evitar recaídas em semanas ou meses. De acordo com diversos grupos de estudos, vários quimioterápicos, como a citarabina, mitoxantrona e a daunorrubicina, são reconhecidos no tratamento da LMA, porém com algumas variações nas doses administradas (HANN et al., 1997; MAYER et al., 1994; GRIMWADE et al., 1998; BRUNETT, 2002).

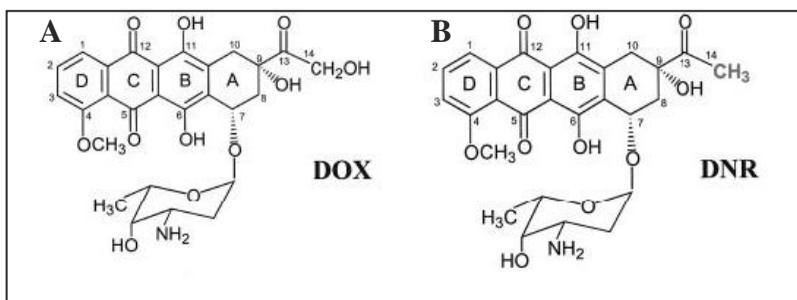
O tratamento da LMA é considerado agressivo para chegar à remissão completa, pois a remissão parcial não oferece benefícios na sobrevida. Aproximadamente 60% a 70% dos pacientes com LMA podem atingir o estado de remissão completa com os tradicionais regimes de indução, baseados em antraciclina e citarabina. Contudo, a taxa total de sobrevida com a terapia continua sendo insatisfatória em aproximadamente 30% a 40% dos pacientes (FATHI e KARP, 2009; CALCABRINI et al., 2006). O sucesso da quimioterapia está relacionado com a natureza biológica da doença e com a idade do paciente. Os melhores resultados são observados nos indivíduos mais jovens, pois resistem melhor ao tratamento antileucêmico. Sendo assim, a quimioterapia intensiva em pacientes com idade superior a 60 anos nem sempre está indicada (MILLIGAN et al., 2005).

### 1.3 Antraciclina

Os antibióticos antraciclina são produtos naturais originalmente isolados do *Streptomyces peucetius*, uma espécie de actinobactéria nos anos 1960. As primeiras antraciclina isoladas foram denominadas de Doxorubicina (DOX, também conhecida como Adriamicina) e Daunorrubicina (DNR, também conhecida como Daunomicina ou Rubidomicina) (CORTE'S FUNES e CORONADO, 2007; SIMUNEK et al., 2009).

A DOX e a DNR são formadas por uma aglicona e um açúcar, como ilustrado no esquema 1. A aglicona consiste de um anel tetracíclico com um grupo hidroquinona no anel C-B, uma substituição

do grupo metoxi na posição C-4 do anel D, e uma pequena cadeia em C-9 com um grupamento carbonila em C-13. No açúcar, denominado de daunosamina, ocorre uma ligação glicosídica em C-7 do anel A e consiste na parte 3-amino-2,3,6-trideoxi-L-fucosil. A única diferença estrutural entre DOX e DNR é a cadeia lateral na qual a DOX possui um álcool primário e a DNR um metil. Essa pequena diferença tem importante consequência no espectro de atividade da DOX e da DNR (MINOTTI et al., 2004). Enquanto a DNR tem mostrado ser altamente eficaz no tratamento das leucemias linfóide e mielóide, a DOX tem apresentado um amplo espectro antitumoral, que inclui numerosos tumores sólidos e doenças hematológicas (SIMUNEK et al., 2009).



**Esquema 1.** Estrutura química das antraciclina. A: Doxorubicina (DOX) e B: Daunorubicina (DNR) (MINOTTI et al., 2004).

Devido a suas estruturas aromáticas complexas, as antraciclina absorvem luz na região do ultravioleta e no visível, fornecendo a coloração vermelho-laranja aos compostos. Visto que esses compostos são fotossensíveis, a exposição direta à luz durante a preparação e administração deve ser evitada (CORTE'S FUNES e CORONADO, 2007).

As antraciclina entram na célula por difusão passiva, provavelmente de forma inalterada. A taxa de transporte depende da lipossolubilidade do fármaco, quanto mais lipofílica for a molécula de antraciclina maior será sua taxa de transporte. Dentro da célula, a maioria das moléculas sofre o processo de protonação, devido ao pH intracelular mais baixo. Em compartimentos ácidos como os lisossomas, as antraciclina podem ser encontradas em concentrações mais altas, se comparadas com as concentrações citoplasmáticas (DEN BOER et al, 1999).

A DNR é comumente administrada como breve infusão intravenosa em doses diárias de 30 a 45 mg/m<sup>2</sup> durante 3 dias, como terapia de indução para a LMA. A DNR é preferível, em comparação a DOX para o tratamento da LMA, porque a mielosupressão e a toxicidade limitantes da dose não trazem preocupações no tratamento da doença e, aparentemente, a DNR causa menos mucosite que a DOX (MINOTTI et al., 2004).

Apesar do uso extensivo na clínica, os mecanismos moleculares propostos para a ação antineoplásica das antraciclinas são ainda incertos. No entanto, a enzima topoisomerase II é reconhecida para ser o alvo principal das antraciclinas. Essa enzima é imprescindível durante a replicação do DNA, pois promove um giro reversível em torno da forquilha de replicação de forma a impedir que a nova fita de DNA se torne irremediavelmente emaranhada durante a segregação mitótica. A falha na formação da dupla fita bloqueia a replicação e transcrição do DNA, o que leva a célula à apoptose (LAURENT e LAFFRÉZOU, 2001; SIMUNEK et al., 2009). Além disso, as antraciclinas causam oxidação de produtos e geração de espécies reativas de oxigênio, os quais levam à alquilação de macromoléculas, à ligação cruzada e à intercalação com o DNA, à peroxidação de lipídeos e ao dano na membrana celular. Independentemente do estímulo inicial, as antraciclinas ativam a morte celular programada ou apoptose, e esse pode ser o mecanismo base para a eficácia terapêutica em determinados tipos de tumor (BOLAND et al., 1997).

Como todos os fármacos citostáticos, a administração de antraciclinas é acompanhada do aparecimento de reações adversas. O acúmulo e a toxicidade dose-dependente têm limitado o uso da DNR devido ao aparecimento de sintomas como mielosupressão, mucosites, distúrbios gastrointestinais e cardiotoxicidade. O risco das antraciclinas em induzir a cardiotoxicidade é de 10 a 26%, e depende principalmente da dose utilizada (DUAN et al., 2007; MICHELUTTI et al., 2006).

A resistência às antraciclinas pode comprometer os resultados da resposta terapêutica. A resistência pode ser causada pela redução dos níveis intracelulares do fármaco devido ao efluxo por proteínas de resistência a múltiplos fármacos (MDR), pela redução na quantidade de sítios ativos intracelulares alvos do fármaco, como as topoisomerases II e pela resistência à apoptose, devido a desregulação de suas proteínas (STYCZYNSKIL et al., 2002; FATHI e KARP, 2009).

## 1.4 Mecanismos de Resistência

A resistência aos fármacos é um fenômeno multifatorial e pode ser classificada como intrínseca ou extrínseca. A intrínseca, que se origina durante o processo evolutivo da célula neoplásica, revela o estado no qual a característica responsável pela resistência é inerente à própria célula. A extrínseca, também denominada de resistência adquirida caracteriza-se pelo desenvolvimento de resistência da célula tumoral, durante o tratamento quimioterápico (GOLDIE, 2001; HOOIJBERG et al., 2006).

Um dos grandes obstáculos para o sucesso do tratamento nos pacientes com câncer é o desenvolvimento do fenômeno conhecido como Resistência a Múltiplos Fármacos (MDR), 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 e MAYER, 2000).

Clinicamente, o fenômeno de MDR é mediado através de uma variedade de mecanismos que levam a alterações celulares como a redução na concentração intracelular de fármacos por proteínas transportadoras de membrana, mudanças a nível de proteínas alvos, mutações que diminuem e reduzem a ligação do fármaco à proteína alvo, aumento da concentração do fármaco em compartimentos celulares ácidos, alterações no metabolismo de fármacos, alterações nos sistemas de reparo do DNA, mudanças na regulação do ciclo celular, diminuição da sinalização apoptótica e aumento da resistência à morte celular (HALL et al., 2009).

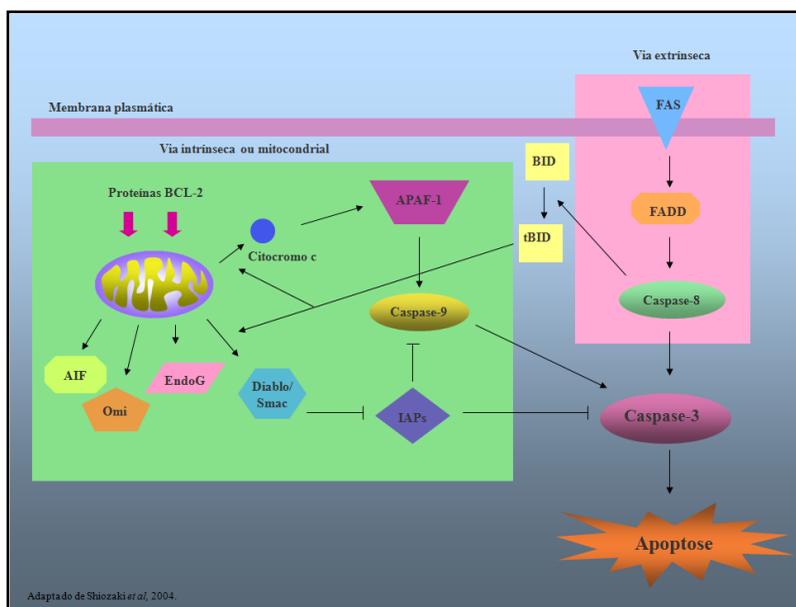
### 1.4.1 Apoptose

A apoptose um processo de morte celular programada, é um mecanismo de morte altamente regulado por uma variedade de vias sinalizadoras e fundamental para o controle da fisiologia celular e dos tecidos em resposta a estímulos internos e externos, que levam à morte celular em poucas horas (COTRAN et al.,1996; DANIAL e KORSMEYER, 2004).

A desregulação da apoptose pode interromper o delicado compasso entre a proliferação e a morte de uma célula, e, dessa forma, conduzir a doenças tais como o câncer. Em muitos casos, mutações que levam a inativação de proteínas proapoptóticas ou expressão

desregulada de proteínas antiapoptóticas, podem conduzir ao crescimento descontrolado de uma célula, à incapacidade para responder ao estresse celular, a mutações prejudiciais e/ou a danos ao DNA (FESIK, 2005).

A apoptose pode ser iniciada por vários sinais externos e internos, os quais ativam várias vias de sinalização interrelacionadas, conforme descrito no Esquema 2. A forma de ativação usual é a resposta a sinais de estresse intracelular, tais como: dano ao DNA e espécies reativas do oxigênio, assim como infecções virais e ativação de oncogenes, (via intrínseca ou mitocondrial). Por outro lado, a apoptose pode ser ativada pela ligação de um ligante extracelular a um receptor na membrana celular (via extrínseca) (PHILCHENKOV, 2004; SHIOZAKI e SHI, 2004).



**Esquema 2.** As Vias da Apoptose. A via intrínseca e a extrínseca são ativadas respectivamente em resposta a estímulos apoptóticos internos e externos. A via intrínseca leva à liberação do citocromo c e DIABLO/Smac do interior da mitocôndria. A via extrínseca leva à ativação da caspase-8, que ativa a caspase-3. Ambas as vias convergem na ativação da caspase-3. Outras proteínas como o fator indutor de apoptose (AIF), Endonuclease G (EndoG) e Omi também são liberadas para o citoplasma para facilitar a morte celular durante a apoptose.

Esse processo de morte celular é formado por uma complexa cascata de eventos ordenados e controlados pela expressão de genes e proteínas associados à apoptose. Os componentes chaves desse processo de auto-destruição das células são os membros de uma família de cisteíno-proteases intracelulares denominadas caspases (*Cytosolic Aspartate-Specific Proteases*) (PHILCHENKOV, 2004). Essas enzimas estão presentes na sua forma inativa em todas as células animais, mas podem ser induzidas a assumir sua forma ativa, através de um processo proteolítico de conservação do aminoácido aspártico. As caspases são distinguidas em caspases iniciadoras (caspase-8,-2,-9 e -10), envolvidas na inicialização da morte celular, e em caspases efetoras (caspase-3,-6 e 7) envolvidas na execução da morte celular (TESTA e RICCONI, 2007; DEL POETA et al., 2008).

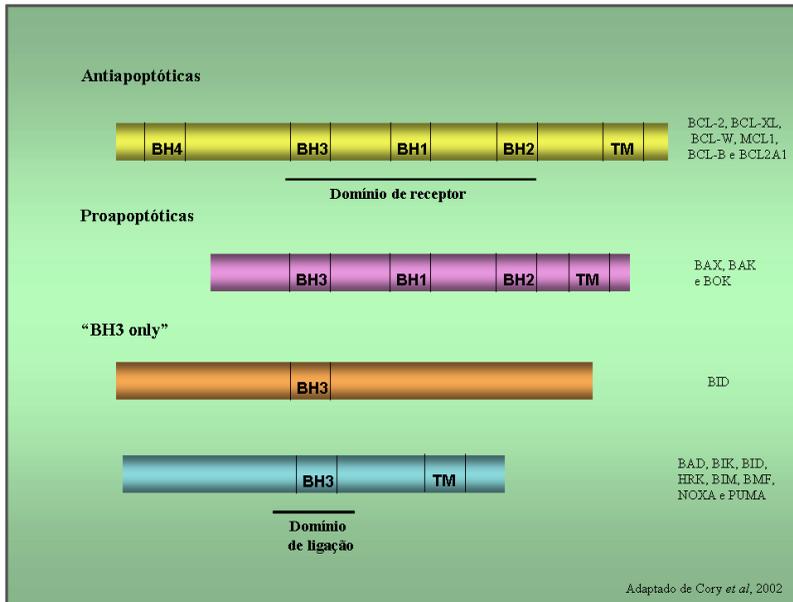
Enquanto que as caspases iniciadoras contêm um domínio para interação com seus ativadores específicos, as caspases efetoras possuem pequenos domínios e são ativadas por clivagem proteolítica pelas caspases anteriores (DEL POETA et al., 2008). Ambas as vias da apoptose, extrínseca e intrínseca, convergem na ativação da caspase-3, embora requeiram caspases iniciadoras diferentes para o início do processo, como é o caso da caspase-9 na via extrínseca e da caspase-8 na via intrínseca. Uma vez ativada, a caspase-3, induz a clivagem de ligações peptídicas em substratos importantes tais como: proteína quinase, proteínas do citoesqueleto, proteínas relacionadas com o reparo do DNA, subunidades inibitórias de endonucleases (família CIDE), o que finalmente leva à destruição das funções celulares vitais. A ativação da cascata das caspases afeta a estrutura do citoesqueleto, a regulação do ciclo celular e as vias de sinalização, o que leva finalmente ao aparecimento de modificações morfológicas características nas células em processo de apoptose, tais como: contração do citoplasma, condensação da cromatina, a fragmentação do DNA e “empacotamento” das células mortas em corpos apoptóticos (CONRADT, 2009; SHIOZAKI e SHI, 2004; COTRAN et al.,1996; PHILCHENKOV, 2004).

Embora a cascata das caspases proteolíticas represente o ponto central na resposta à apoptose, sua inicialização é regulada por uma variedade de outros fatores. Entre estes, as proteínas da família Bcl-2 (do inglês, *B-cell Lymphoma*), conhecidas como moduladores da via mitocondrial. Essas proteínas atuam através da regulação da liberação do citocromo c para o citosol, que, por sua vez, se liga ao fator ativador de proteases 1 (APAF-1), promovendo alterações conformacionais que

permitem a ativação da caspase-9 e, subsequentemente, a ativação em cascata das caspases (BURLACU, 2003).

Os membros da família Bcl-2 contêm quatro grandes domínios conservados, referidos como domínios homólogos de Bcl-2 ou domínios BH (Esquema 3). Além disso, alguns membros possuem um domínio C terminal, provavelmente envolvido como alvo de proteínas de membranas intracelulares (ANTONSSON, 2003). A família Bcl-2 é constituída de proteínas com funções opostas, isto é, enquanto algumas inibem, outras ativam a apoptose. A classe de proteínas inibidoras da apoptose (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl1, Bcl-B e Bcl2A1), denominadas de antiapoptóticas, apresentam todos os domínios conservados (BH1-4) como também o domínio hidrofílico C-terminal, e a classe das proteínas promotoras da apoptose (Bax, Bak e Bok), as proapoptóticas, apresenta múltiplos domínios conservados (BH1-3) e o domínio hidrofílico C-terminal. Além disso, existe uma classe de proteínas divergente que apresenta somente um domínio conservado (BH3), denominadas de BH3 *only*, (Bad, Bik, Bid, Hrk, Bim, Bmf, NOXA e PUMA). Os membros da família proapoptótica, a Bax e a Bak, parecem ser cruciais para indução da permeabilização da membrana mitocondrial e subsequente liberação de moléculas apoptogênicas como o citocromo c e o DIABLO, também conhecido como SMAC (do inglês, *Second Mitochondrial-derived Activador of Caspase/Direct IAP-Binding*), que levam à ativação das caspases. Por outro lado, membros da família antiapoptótica, como a Bcl-2 e a Bcl-XL, inibem a função da Bax e da Bak. O desequilíbrio entre as proteínas Bcl-2 e Bax leva à resistência à sensibilização por estímulos de morte, como por exemplo, por fármacos quimioterápicos (BURLACU, 2003; YOULE e STRASSER, 2008; CORY e ADAMS, 2002).

As proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2 são encontradas exclusivamente em membranas intracelulares, incluindo a membrana da mitocôndria, do retículo endoplasmático rugoso e do núcleo. Em relação às proteínas Bax e Bak, ambas possuem os mesmos domínios conservados, porém localizações subcelulares diferentes. Enquanto que a Bax está localizada no citosol na forma de monômeros, a Bak é encontrada na membrana da mitocôndria, e durante apoptose, sofre uma série de mudanças conformacionais para formação de oligômeros. Por outro lado, a Bax precisa ser ativada para ser translocada para membrana da mitocôndria e então, submeter-se a mudanças conformacionais e formação de oligômeros. (WANG e YOULE, 2009; ANTONSSON, 2004).



**Esquema 3:** Subfamília de Proteínas Bcl-2. As regiões helicoidais são indicadas BH1-4 e domínio hidrofílico terminal carboxi (TM) que ajuda na associação com membranas intracelulares.

Uma vez ativadas, as proteínas proapoptóticas provocam a liberação de diversas proteínas no citoplasma, incluindo o citocromo c, o fator indutor de apoptose (AIF), a adenilato quinase, a endonucleases G, a SMAC/DIABLO e a HtrA2/Omi. Existem dois mecanismos propostos para essa liberação que são: a formação de poros específicos na membrana externa da mitocôndria ou a ruptura desta. A liberação no citosol do citocromo c e de outras proteínas como o SMAC/DIABLO permite a formação do apoptosoma, um grande complexo molecular formado pelo citocromo c, o APAF-1 e a caspase-9, que é responsável pela ativação da caspase-3. (ANTONSSON, 2003; DEL POETA et al., 2008; YOULE e STRASSER, 2008).

Ao contrário dessas proteínas, membros de uma família de proteínas inibidoras de apoptose (IAP, do inglês, *Inhibitors of Apoptosis Proteins*), atuam como moléculas antiapoptóticas, a partir da inibição da ativação proteolítica da caspase-3 e 7. As IAPs, incluindo-se ML-IAP, XIAP, cIAP1, cIAP2, NIAP e a survivina, são as únicas proteínas endógenas que tem a habilidade de bloquear o passo seguinte à

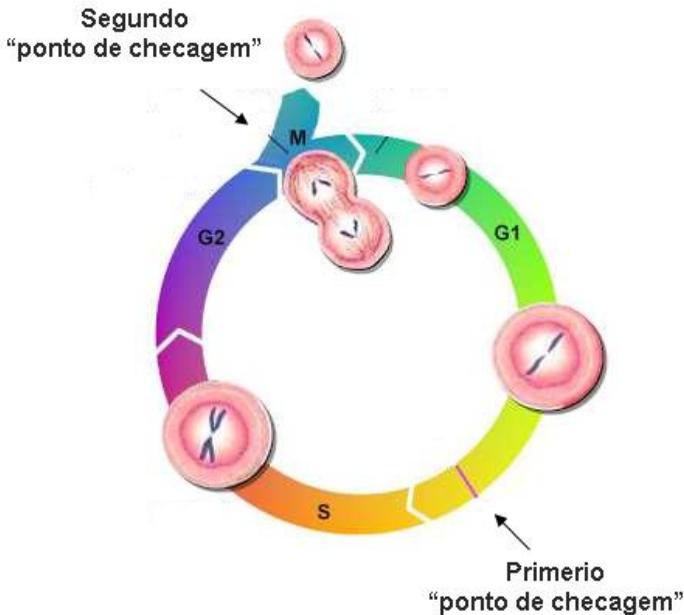
liberação do citocromo c pela mitocôndria e, conseqüentemente, regular a atividade das caspases iniciadoras e efetoras (ZAFFARONI et al., 2005; HUNTER et al., 2007; ADIDA et al., 2000). Alguns estudos apontam que a expressão de survivina é dependente do ciclo celular. Durante a proliferação celular, a survivina é expressa em altos níveis na fase G2/M e está rapidamente diminuída após a parada do ciclo celular (ITO et al., 2000; XING et al., 2001; TANAKA et al., 2000).

A survivina não é expressa em tecidos adultos normais, mas é expressa em muitos cânceres humanos e linhagem de células tumorais. Estudos de diferentes grupos têm demonstrado que em muitos tipos de câncer, a elevação na expressão da survivina está associada com pior prognóstico e aumento de tumores recorrentes. Por outro lado, a deficiência de survivina induz à morte celular e o aumento da sua expressão confere resistência à morte celular (WU et al., 2008; OKADA e MAK, 2004).

#### **1.4.2 Ciclo Celular**

Com o avanço no conhecimento dos mecanismos da oncogênese e da indução da apoptose, houve uma maior compreensão sobre o papel da regulação do ciclo celular nas vias de transformação neoplásica e do desenvolvimento da resistência à quimioterapia (SCHWARTZ e SHAH, 2005).

O ciclo celular é composto por duas fases: intérfase e mitose. A intérfase pode ser subdividida ainda em outras três etapas: Gap 1 (G1), Síntese (S) e Gap 2 (G2). Quando as células totalmente diferenciadas encontram-se em estado no quiescência, ou seja, fora do ciclo celular, diz-se que elas estão na fase G0. Entre as fases G1 e S ocorre o primeiro “ponto de checagem” (Esquema 4), o qual é responsável por certificar que a célula está preparada para entrar na fase de síntese de DNA ou fase S. Esse “ponto de checagem”, denominado como ponto de controle G1 ou de partida, é altamente regulado e afasta a possibilidade de dano no DNA antes da sua duplicação. Antes da mitose, na fase G2, ocorre o segundo “ponto de checagem” (HARTWELL e WEINERT, 1989).



**Esquema 4:** Fases do ciclo celular normal. As fases G<sub>1</sub> (células em crescimento), S (replicação do DNA) e G<sub>2</sub> (células prontas para se dividir) correspondem à interfase e a fase M (divisão celular) à mitose. Adaptado de GAGE, M. 2010.

Vários trabalhos demonstram que o produto final do gene p53, a proteína p53, é responsável pelo primeiro "ponto de checagem" entre as fases G<sub>1</sub> e S (KASTAN et al., 1991; KUERBITZ et al., 1992). Esta, quando expressa na sua forma normal ou não mutada, atua como um fator de transcrição que promove a transcrição de diversos genes efetores. Dentre estes, encontra-se o p21, que transcreve uma proteína homônima responsável por inibir a atividade das enzimas quinases, impedindo, dessa forma, a ativação das ciclinas dependentes de quinases, que são elementos-chave na iniciação e progressão do ciclo celular (GU et al., 1993). A parada do ciclo celular permite que os diversos mecanismos celulares de reparo do DNA atuem a fim de corrigir o dano genômico (LODISH et al., 2000; WEINBERG, 2000).

No entanto, se o reparo no DNA não ocorrer de forma correta, a p53 pode induzir à apoptose (KASTAN et al., 1991; KUERBITZ et al., 1992; CLARKE et al., 1993; LOWE et al., 1993). Quando há uma mutação no gene que transcreve a proteína p53, origina-se uma

proteína mutante que é incapaz de exercer a sua função de “ponto de checagem” e, nesses casos, a replicação do DNA e proliferação celular prossegue mesmo na presença de um dano genômico, o que leva a produção de clones celulares aberrantes e ao desenvolvimento e persistência do câncer (YIN et al., 1992; LIVINGSTONE et al., 1992). Embora tenha sido demonstrado que a transição G<sub>2</sub>/M é regulada independente da p53, pois a parada do ciclo celular ocorre mesmo na ausência da p53 ou na presença de sua forma mutante (KASTAN et al., 1991; KUERBITZ et al., 1992), outros trabalhos mostram que o gene p53 atua, de alguma forma, nesse “ponto de checagem” (STEWART et al., 1995).

Células em que o controle do “ponto de checagem” está comprometido são mais sensíveis ao dano causado pelos quimioterápicos. A progressão descontrolada de uma célula no ciclo celular, na presença de algum dano ao DNA, é geralmente letal, o que pode explicar a sensibilidade seletiva de algumas células neoplásicas aos tratamentos com substâncias que se intercalam com o DNA. Muitos dos compostos em estudo com ação antineoplásica têm ação em múltiplos passos do ciclo celular e seus efeitos podem ser citostático ou citotóxico, dependendo do perfil do ciclo celular da célula alvo. O entendimento das interações moleculares envolvidas pode sugerir maneiras de sensibilizar as células aos efeitos desses compostos (SHAPIRO e HARPER, 1999).

### **1.4.3 Proteínas Transportadoras ABC**

A redução da concentração intracelular de fármacos pode ocorrer através da diminuição da expressão de proteínas transportadoras passivas e do aumento da expressão de proteínas transportadoras dependentes de adenosina trifosfato (ATP), as quais fazem o efluxo de uma grande variedade de compostos contra um gradiente de concentração de maneira dependente de energia. Grande parte dessas proteínas de efluxo ATP dependentes fazem parte de uma família de genes denominada de transportadores ABC (HALL et al., 2009; LEONARD et al., 2003).

Os transportadores ABC (do inglês, *ATP binding-cassete*) compreendem uma superfamília de genes que codificam proteínas transmembranas intra e extracelulares que são relacionadas estruturalmente e apresentam diferentes funções. Essas proteínas

funcionam como bombas de efluxo capazes de translocar uma variedade de substratos incluindo açúcares, amino ácidos, íons metálicos, peptídeos, proteínas e compostos hidrofóbicos (LOCKHART et al, 2003).

A unidade funcional das proteínas da família ABC usualmente é composta de dois domínios de ligação de nucleotídeo (NBD, do inglês, *nucleotide-binding domain*), onde foram identificados dois sítios de ligação com ATP e dois domínios transmembrana (TM, do inglês, *transmembrane domain*). Os transportadores ABC são classificados em sete subfamílias (ABCA – ABCG) e podem estar expressos em ambas as células normais e neoplásicas (LOCHER, 2009; LEONARD et al., 2003; OLDHAM et al., 2008). Os transportadores ABC exibem uma atividade ATPase e translocam diferentes substratos através da membrana celular e/ou entre vários compartimentos. O transporte de substratos é assegurado por um forte acoplamento molecular dos TM com as unidades dos NBD e por uma cooperação positiva das duas unidades NBD. De acordo com a Tabela 1, além da glicoproteína-P e da proteína de resistência a múltiplos fármacos (P-gp/ABCB1 e MRP/ABCC1, respectivamente), outra proteína transportadora ABC, denominada proteína de resistência de câncer de mama (BCRP), também conhecida como MXR, ABCP e ABCG2, foi caracterizada pela habilidade de conferir o fenótipo de MDR (ROSS, 2000).

**Tabela 1: Fármacos antitumorais e seus respectivos transportadores ABC**

Classe	Fármacos	Proteínas
Antraciclinas	Doxorrubicina Daunorrubicina Epirrubicina Idarrubicina	ABCB1 (P-gp), ABCC1 (MRP1), ABCC2* (MRP2), ABCG2 (BCRP)
Epipodofilotoxina	Etoposídeo Teniposídeo	ABCB1 (P-gp), ABCC1* (MRP1), ABCC2* (MRP2), ABCG2 (BCRP)
Alcalóides da Vinca	Vincristina Vimblastina Vinorelbina	ABCB1 (P-gp), ABCC1 (MRP1), ABCC2 (MRP2)
Taxanos	Paclitaxel Docetaxel	ABCB1 (P-gp), ABCC2 (MRP2)
Inibidores de quinases	Imatinibe Flavopiridol	ABCB1 (P-gp), ABCC2 (MRP2), ABCG2 (BCRP)
Outras	Mitroxantrona Tamoxifeno Mitomicina Actinomicina D Metotrexato	ABCB1 (P-gp), ABCC1* (MRP1), ABCC2* (MRP2), ABCG2* (BCRP)

\* Esses transportadores ABC não se ligam e removem da célula todas as substâncias listadas na coluna correspondente.

Fonte: STAVROVSKAYA e STROMSKAYA, 2008.

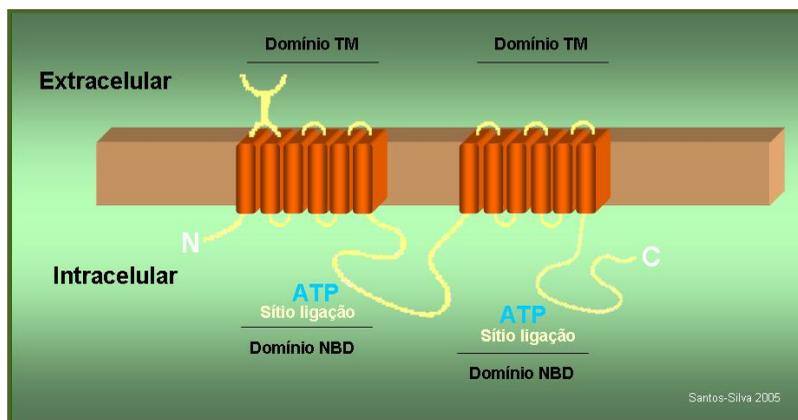
### 1.4.3.1 Glicoproteína P – ABCB1/P-gp

Em 1970, Briedler e Riehn, em um estudo com linhagens leucêmicas e células de pulmão de hamster chinês, observaram que quando estas células eram expostas a concentrações crescentes de actinomocina D, além de apresentarem resistência ao próprio quimioterápico, também apresentavam resistência a fármacos não relacionados, os quais as células não haviam sido previamente expostas. Mais tarde, Dano (1973) observou que este fenômeno era dependente de ATP, sugerindo um mecanismo ativo para o fenômeno de resistência cruzada. Esse fenótipo de MDR foi descrito por Juliano e Ling (1976), após a observação do aumento na expressão de uma proteína de membrana nas células de 170 kDa, denominada de glicoproteína P (P-gp ou ABCB1), a qual modifica a permeabilidade da membrana a diversos fármacos. O gene que codifica a proteína ABCB1 foi clonado em humanos e identificado como *mdr1* (GROS et al., 1986).

A proteína ABCB1 é expressa em vários tecidos normais, como no pulmão, na placenta, nas glândulas adrenal, no fígado, no rim, no pâncreas, no colon, no jejuno e no cérebro, com a função de secreção e de barreira (SWERTS et al., 2006), o que sugere o papel da ABCB1 na excreção e/ou transporte de xenobióticos citotóxicos. Em células neoplásicas, a ABCB1 está associada ao fenótipo de MDR, mediando à resistência a antraciclina, alcalóides da vinca, colchicina, epipodofilotoxina e taxanos. Alguns inibidores da bomba de efluxo competitivos e não competitivos têm sido identificados, e reverterem o efeito da resistência a fármacos (LEONARD et al., 2003; LEONESSA e CLARKE, 2003).

A maioria dos trabalhos com os transportadores ABC no fenômeno de MDR foram baseados em estudos com a ABCB1. A ABCB1 é uma bomba de cátions orgânicos, composta por 12 segmentos transmembrana, divididos dentro de dois domínios TM, sendo que cada um apresenta um sítio de ligação para o ATP, conforme ilustrado no Esquema 5 (LEONARD et al., 2003). O mecanismo para o efluxo de fármacos pela ABCB1 ainda não está totalmente esclarecido, a hipótese mais plausível é que quando o ATP se liga ao domínio de ligação do ATP, os dois domínios se unem, iniciando a hidrólise do ATP e a liberação adenosina difosfato (ADP) e fosfato. A hidrólise de uma molécula de ATP permite o efluxo do

substrato e restaura o transportador para, mais uma vez, sequestrar outra molécula de substrato (HALL et al., 2009).



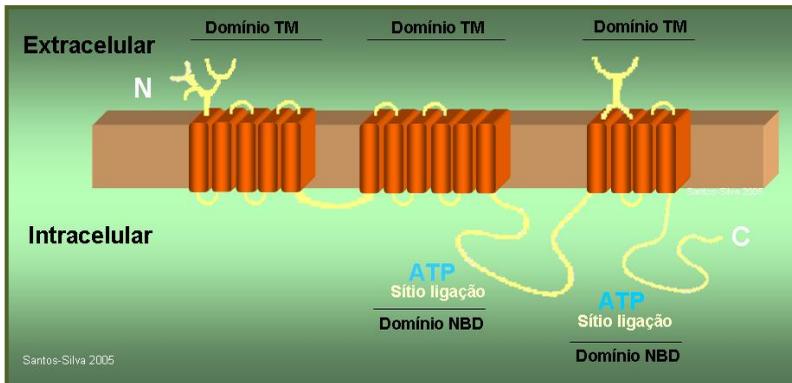
**Esquema 5.** Estrutura da proteína ABCB1. A proteína ABCB1 é composta por 12 segmentos que formam dois domínios transmembrana (domínio TM) e dois sítios de ligação para ATP (domínio NBD) no espaço intracelular, onde também está localizada a região amino terminal (N).

#### 1.4.3.2 Proteína de Resistência a Múltiplos Fármacos–ABCC/MRP

A falta de expressão de ABCB1 em algumas células multi-resistente estimulou a pesquisa de outras bombas de efluxo. A ABCC1 ou MRP1 foi clonada de uma linhagem de células H69AR de carcinoma de pulmão humano (Cole et al., 1992). O gene *abcc1*, foi o primeiro a ser mapeado no cromossomo 16 (16p13.1). Ele codifica uma proteína de 190 kDa, a qual funciona como bomba de ânions hidrofílicos N-glicosilados. A ABCC1 está localizada em ambas as membranas plasmáticas e intracitoplasmáticas, incluindo o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi (SWERTS et al., 2006). Atualmente, nove membros da família ABCC foram descritos no genoma humano, designados de MRP1, MRP2, MRP3, MRP4, MRP5, MRP6, MRP7, MRP8 e MRP9, os quais, pela nova denominação, correspondem a ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5,

ABCC6, ABCC10, ABCC11 e ABCC12, respectivamente (KUO et al., 2009).

As proteínas ABCCs compartilham uma topologia que é comum à super família ABC, onde há dois domínios TMs e dois domínios NBDs para ligação com o ATP na porção citoplasmática. Acredita-se que a ligação de substratos ocorra através da interação com os domínios TM (ZHAG et al., 2001; HAIMEUR et al., 2004). A ligação e a hidrólise do ATP fornecem a energia necessária para transportar os substratos para fora da célula. As proteínas ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC6 e ABCC10 contêm um terceiro domínio TM, o qual consiste de cinco hélices transmembrana, com uma região amino terminal (Esquema 6) (BAKOS et al., 1996; KAST e GROS, 1997; COLE e DEELEY, 2006).



**Esquema 6.** Estrutura das proteínas ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC6 e ABCC10. Estas proteínas apresentam três domínios transmembrana (domínio TM) e dois sítios de ligação para ATP (domínio NBD) no espaço intracelular. A região amino terminal (N) fica localizada no espaço extracelular.

O espectro de resistência causado pelo aumento da expressão da ABCC1 é muito similar ao da proteína ABCB1. *In vitro*, a expressão da ABCC1 confere resistência a antraciclina, alcalóides da vinca, epipodofilotoxina, campotecina e metotrexato, mas não confere aos taxanos e mitoxantrona. Vários conjugados GSH, glucoranato e sulfato, tais como, os cisteinil leucotrienos (LTC<sub>4</sub>), que são importantes mediadores da resposta inflamatória, também são transportados pela ABCC1 (SWERTS et al., 2006; LEONESSA e CLARKE, 2003). A glutatona (GSH) tem um importante papel no

processo de transporte da ABCC1. Entretanto, o exato mecanismo pelo qual a GSH participa do efluxo mediado pela ABCC1 ainda não está totalmente elucidado. A GSH parece interagir com ABCC1 por diferentes mecanismos. A GSH pode interagir de forma direta com a ABCC1, como substrato de baixa afinidade, ou de forma indireta para o transporte de certos substratos da ABCC1, como DNR, vincristina e rodamina. Esses mecanismos foram sugeridos após a observação de que quando os níveis intracelulares de GSH estão diminuídos, ocorre uma redução no transporte de DNR, DOX, etoposide e vincristina em células que apresentam um aumento na expressão de ABCC1 (SWERTS et al., 2006).

A ABCC2, localizada na membrana de canalículos biliares, está clinicamente envolvida na excreção biliar de fármacos aniônicas importantes, através da formação de conjugados com glucoronato e GSH (MIZZUNO et al., 2003). O transporte mediado pela ABCC3 de ânions orgânicos parece ser o mais importante na membrana basolateral do fígado e não requer a participação da GSH intracelular (KUO et al., 2009). A ABCC4 e ABCC5 transportam nucleotídeos e conferem resistências aos análogos de nucleotídeos antivirais. A ABCC6 parece ser uma bomba aniônica lipofílica, com um amplo espectro de resistência aos fármacos (LEONARD et al., 2003). As proteínas ABCC10, ABCC11 e ABCC12 são os membros mais recente dessa família e estão em fase inicial de investigação. A ABCC10 e ABCC11 são bombas de ânions que possuem habilidade de conferir resistência a agentes quimioterápicos. Ainda não se conhecem substratos para ABCC12 (KRUH et al., 2007; KUO et al., 2009).

A expressão de ABCCs tem sido relacionada como um fator de prognóstico desfavorável em diferentes neoplasias hematológicas não tratadas e refratárias à quimioterapia, incluindo as leucemias mielóides e linfóides agudas e crônicas (BURGER et al., 1994; SCHNEIDER et al., 1995; HART et al., 1994; PLASSCHAERT et al., 2005). A co-expressão de ABCB1 e ABCC1 em células leucêmicas tem um forte impacto negativo na resposta ao tratamento e na sobrevida dos pacientes (LEGRAND et al., 1999 e SONNEVELD, 2000).

Além dos transportadores ABC, outras proteínas transportadoras, como a proteína de resistência pulmonar (LRP), podem contribuir para desviar os fármacos citostáticos de seus alvos intracelulares e, dessa forma, contribuir com o fenótipo de MDR (IZQUIERDO, 1996).

#### 1.4.4 Proteína de Resistência Pulmonar – LRP

A LRP foi inicialmente identificada em células de câncer de pulmão resistentes à antraciclina e que não apresentavam aumento da expressão de ABCB1. O gene da *lrp* está localizado no cromossomo 16 (16p11.2), próximo ao gene da proteína ABCC1. Com base na sequência de aminoácidos da LRP, nenhum dos fragmentos transmembrana ou sítio de ligação de ATP, característico dos transportadores ABC, foi identificado. Consequentemente, a LRP não é considerada um membro dessa família, mas sim um membro da família MVP (do inglês, *Major Vault Protein*) (SWERTS et al, 2006).

A LRP é um ribonucleoproteína de múltiplas subunidades com 110 kDa, codificada pelo gene MVP. Está situada principalmente no citoplasma, entretanto, também pode ser encontrada na membrana nuclear e em complexos de poros nucleares. A LRP está envolvida no transporte intracelular de substâncias importantes para o funcionamento normal da célula, como por exemplo, hormônios, ribossomos e ácido ribonucléico (RNA) mensageiro (LU e SHERVINGTON, 2008; KUO et al., 2009).

O papel funcional da LRP no fenótipo de MDR ainda é obscuro, mas é proposto que eles agem no transporte de fármacos para longe de alvos celulares através do efluxo dos quimioterápicos do núcleo para citoplasma e/ou sequestro em vesículas citoplasmáticas (SWERTS et al., 2006).

#### 1.5 Óxido Nítrico: importância biológica e envolvimento na citotoxicidade de células tumorais e na resistência a múltiplos fármacos

Em 1980, Furchgott e Zawadzki demonstraram que células endoteliais estimuladas por diferentes agonistas liberavam um fator vasodilatador o qual ficou conhecido como fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF, do inglês, *Endothelial-Derived Relaxing Factor*). Seis anos mais tarde, sua natureza foi identificada e o EDRF passou a ser denominado de óxido nítrico (NO) (PALMER et al., 1987).

O NO é uma molécula sinalizadora altamente reativa e instável capaz de atravessar facilmente membranas celulares, modulando

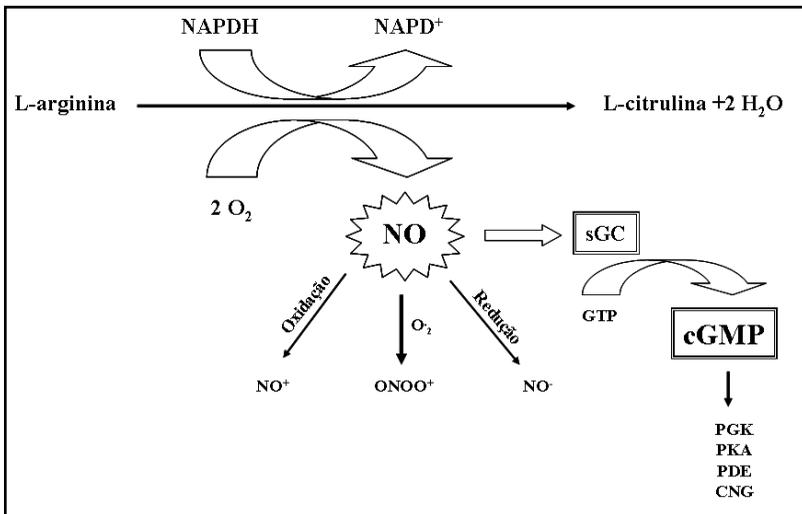
respostas fisiológicas, como a regulação de genes, a apoptose, a função plaquetária, a neurotransmissão, a memória e a resposta imune (NAPOLI e IGNARO, 2003; DUSSE et al., 2003). Todavia, o descontrole na síntese do NO está implicado na patogênese de doenças cardiovasculares, na auto-imunidade, na rejeição de transplantes, na sépsis (NATHAN, 1992), nas doenças cerebrais degenerativas (CHRISTOPHERSON e BREDT, 1997; HALLIWELL, 2001), na indução de câncer (SCHMIDT e WALTER, 1994), na genotoxicidade (WINK et al., 1998) e na inflamação (FLORA FILHO e ZILBERSTEIN, 2000).

Em sistemas biológicos, o NO é gerado pela oxidação do aminoácido L-arginina, através da atividade catalítica das enzimas óxido nítrico sintase (NOSs). Esta reação requer NADPH (do inglês, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*) e oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) como co-fatores e resulta na produção de NO e L-citrulina como produto final. O par de elétrons desemparelhado no orbital externo do NO permite que este seja um doador de elétrons, e, desse modo, participe de reações de oxidação como acceptor de elétrons de outras espécies reativas, caracterizando as suas propriedades como antioxidante (HUERTA et al., 2008).

Diferentes formas de enzimas NOSs foram identificadas e seus nomes baseados nas células onde foram isoladas pela primeira vez: NOS neuronal (nNOS, NOS tipo 1), NOS induzível, induzida em macrófagos (iNOS, NOS tipo 2); NOS endotelial (eNOS, NOS tipo 3) e em alguns tipos de tecidos, elas podem estar presentes na mitocôndria (mNOS). As NOSs diferem não somente em sua localização, mas também em suas funções. As nNOS e eNOS, constitutivamente dependentes de cálcio, geram pequenas quantidades de NO, enquanto que a iNOS, que é independente da concentração de cálcio intracelular, produz concentrações de NO capazes de danificar células e microorganismos (HONG et al., 2009; MICLESCU e GORDH, 2009).

Existem dois grandes mecanismos propostos para a ação do NO nos diversos processos fisiológicos (Esquema 7) que são: a via dependente de guanosina monofosfato cíclica (cGMP) pela qual o NO exerce a maioria das suas funções fisiológicas, e via independente de cGMP. Na primeira via, o NO se liga ao grupo heme da enzima guanilato ciclase (sGC), o que resulta na produção de um segundo mensageiro cGMP, que, por sua vez, conduz à ativação das proteínas quinases dependente de cGMP, fosfodiesterases reguladas por cGMP, e canais de íons regulados por nucleotídeos cíclicos (NAPOLI e

IGNARO, 2003). Enquanto que a via independente de cGMP ocorre através da reação do NO com o  $O_2$ , com o ânion superóxide ( $O_2^-$ ), com os tióis e com os metais de transição, como o zinco. Nessa via, o NO pode modificar proteínas diretamente, sem a participação de enzimas, por meio do processo chamado de nitração ou nitrosilação. A S-nitrosilação dos grupos tiol dos resíduos cisteínas é um processo reversível envolvido na sinalização celular. A sinalização celular regula a função de muitas proteínas intracelulares (CHOI et al., 2002; BLAISE et al., 2005; HUERTA et al., 2008), tais como, as proteínas sinalizadoras envolvidas na proliferação celular e na apoptose (ZHUANG e SIMON, 2000; ZOUKI et al., 2001).



**Esquema 7.** Formação do Óxido Nítrico e seu mecanismo de ação. A principal função do NO é através de sua interação com guanilato ciclase solúvel (sGC), a qual catalisa a guanosina trifosfato (GTP) em guanosina 3',5'-cíclica monofosfato (cGMP). O cGMP ativa proteína quinase G (PKG), proteína quinase A (PKA), fosfodiesterases (PDE) e canais regulados por íons (CNG). O NO também pode exercer sua função através da interação com  $O_2$ , através do processo nitração ou nitrosilação de proteínas intracelulares. Fonte: NAPOLI e IGNARO, 2003.

A distinção entre o efeito benéfico e o adverso num organismo em resposta à concentração fisiológica de NO pode estar relacionada com o perfil redox do tecido, com a atividade das NOS, com a presença de radicais de oxigênio, com a formação de radicais de NO,

com o sítio exógeno de produção ou eliminação de NO, com a auto-oxidação de NO e com a interação do NO com constituintes celulares (NAPOLI e IGNARO, 2003).

O óxido nítrico gerado em altas concentrações por macrófagos ativados é um dos mais importantes mecanismos de defesa contra patógenos e células tumorais. As primeiras evidências do envolvimento do NO na citotoxicidade de células tumorais foram descritas por Hibb e colaboradores (1987), quando demonstraram que a citotoxicidade de macrófagos ativados contra células tumorais era dependente da presença de L-arginina. Esses mesmos autores mostraram que macrófagos ativados sintetizavam L-citrulina e nitrito a partir da L-arginina e que a L-monometil-arginina prevenia a síntese de ambos os produtos, bem como a citotoxicidade contra o alvo, deixando claro que esta citotoxicidade causada pelos macrófagos era mediada pelo NO. Desde então, vários trabalhos vêm demonstrando que o NO pode ser citotóxico para uma variedade de células normais e/ou transformadas (para uma revisão ver, HUERTA et al., 2008; SANTOS-SILVA, 2002). A partir de estudos em diferentes tipos de células, vários mecanismos de citotoxicidade do NO foram propostos. Um desses mecanismos tem como alvo o DNA, onde o NO pode interagir diretamente, através da troca de nucleotídeos ou, ainda, através da quebra da fita de DNA, como resultado dos processos de N-nitrosilação de desoxirribonucleotídeos; ou indiretamente, quebrando a fita de DNA por meio da formação de peroxinitrito e N-nitrosaminas ou, ainda, ativando ou inibindo enzimas necessárias para a homeostase nuclear (KRONCKE et al., 1997). Além disso, o NO pode reagir com complexos Fe-S de várias proteínas importantes para a fisiologia celular, alterando suas funções, como ocorre com as enzimas da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria (HIBBS et al., 1990; CADENAS, 2004). Entretanto, a função NO e das NOSs como efetores proneoplásico versus antineoplásico é ainda controversa (HUERTA et al., 2008). Essa atividade dualista parece depender do tipo celular e da concentração de NO (KOLB, 2000).

Magrinat e colaboradores (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. Tal fato pode ocorrer através de 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 (do inglês, polimerase poli-ADP-ribose) (KUO et

al., 1996) pela formação de peroxinitrito (ZHUANG e SIMON, 2000) e pela depleção de GSH e inibição de NF-kB (SANTOS-SILVA et al., 2006).

Para avaliar os efeitos citotóxicos do NO, sem o envolvimento das NOS, são utilizados compostos doadores de NO. Esses compostos conservam o NO na sua estrutura molecular e apresentam atividade biológica depois de sua decomposição. Os doadores de NO mostram uma considerável variação em sua estrutura, estabilidade e atividade biológica. Diferenças na biodisponibilidade são decorrentes das diferentes bioativações enzimáticas e não-enzimáticas para liberação NO. Como exemplos de compostos que contenham o grupo NO funcional temos os nitratos orgânicos, o 3-morpholinosydnonimine (SIN-1), o nitroprussiato de sódio (SNP), o S-nitrosotiol (ex.: S-nitrosoglutathione) (GSNO), o S-nitro-N-acetilpenicilamina (SNAP), o S-nitrocisteína (CysNO), os compostos óxido nítrico dietilamina (DEA-NO) e a espermina-NO (CHOI et al., 2002; SINGH et al.; 1996).

---

***2. OBJETIVOS***

---



## 2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito do NO nos mecanismos envolvidos na resistência à Daunorrubicina em células de linhagem de leucemia mielóide aguda de origem humana K562.

## 2.2 Objetivos Específicos

1. Estudar o efeito citotóxico do NO e da DNR, isoladamente ou em associação, sobre células de linhagem de leucemia mielóide aguda de origem humana K562;
2. Analisar o efeito do NO e da DNR, isoladamente ou em associação, sobre o ciclo celular das células de linhagem de leucemia mielóide aguda de origem humana K562;
3. Investigar se o efeito citotóxico da associação do NO e da DNR, sobre as células de linhagem de leucemia mielóide aguda de origem humana K562, envolve os fatores reguladores de apoptose: proteína antiapoptótica Bcl-2, proteína proapoptótica Bax, proteína inibidora de apoptose survivina e caspase-3;
4. Avaliar o efeito do NO no acúmulo, na retenção e na distribuição intracelular de DNR e a relação com sua citotoxicidade em células de linhagem de leucemia mielóide aguda de origem humana K562;
5. Estudar o envolvimento do NO e da DNR, isoladamente ou em associação, na expressão dos genes *abcc1* e *lrp*, em células de linhagem de leucemia mielóide aguda de origem humana K562.



---

### ***3. MATERIAL E MÉTODOS***

---



### 3.1 Reagentes

O meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, a penicilina, a estreptomomicina e o soro bovino fetal foram adquiridos da Gibco, Invitrogen Corporation, EUA. A linhagem celular K562 foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC), EUA. O SNAP foi sintetizado de acordo com o método de Field e colaboradores (1978) e doado pelo laboratório do Prof. Jamil Assreuy, do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A DNR foi adquirida do laboratório Meizler Biopharma S/A, Índia. O Brometo de dimetiazol difeniltetrazólio (MTT) e todos os outros reagentes utilizados nos experimentos biológicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA. O kit com a solução de Iodeto de Propídeo (PI) e ribonuclease (RNase) foi adquirido da Immunostep, Espanha; o anticorpo policlonal de camundongo anti Bcl-2 da Invitrogen<sup>™</sup>, EUA; o anticorpo policlonal de cabra anti-survivina e o anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado a enzima peroxidase (HRP) da Santa Cruz Biotechnology, EUA; o anticorpo de coelho policlonal anti caspase-3 e anti Bax da Cell Signalling Technology, EUA; o anticorpo secundário anti IgG de cabra e anti IgG de coelho conjugados a HRP da Millipore, EUA. A membrana de nitrocelulose, os reagentes para eletroforese em gel poliacrilamida (SDS-PAGE) e o sistema de revelação por quimioluminescência foram adquiridos da Amershan Biosciences, EUA. Os reagentes utilizados na extração de RNA como clorofórmio, isopropanol, água dietil pirocarbonato (DEPC) foram adquiridos da Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA. O Trizol<sup>®</sup>, a enzima SuperScript III, a enzima Taq DNA polimerase e todos os demais reagentes utilizados na reação de RT-PCR foram adquiridos da Invitrogen Corporation, EUA.

### 3.2 Cultura de Células

Para a cultura de células foi utilizada a linhagem de células leucêmicas mieloblásticas de origem humana K562. As células foram mantidas em garrafas plásticas para cultura contendo meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomomicina, 10 mM de tampão HEPES, pH 7,4, em estufa úmida a 37°C, com 5% CO<sub>2</sub>. As células foram

semeadas a uma densidade  $10^6$  células/garrafa e repicadas a cada 48 horas, em fluxo laminar.

### 3.3 Preparo da Amostra

Para realização dos experimentos, a suspensão celular foi centrifugada  $200 \times g$ , por 10 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular ressuspendido em 1 mL de meio de cultura RPMI 1640. O número de células viáveis foi avaliado pelo método de Azul de Tripán e as amostras com viabilidade inferior a 90% foram excluídas. Um total de  $3,5 \times 10^5$  células/200  $\mu\text{L}$  por poço foi plaqueado em placas de 96 poços. Todos os procedimentos de preparação da amostra foram realizados em fluxo laminar e todo material utilizado foi previamente esterilizado.

### 3.4 Tratamento da Amostra

Os compostos, DNR (1-100  $\mu\text{M}$ ) e/ou SNAP (0,1-1 mM) foram adicionados às células ( $3,5 \times 10^5$  células/200  $\mu\text{l}$ ), num volume máximo de 20  $\mu\text{l}$ . Em seguida, as células retornaram à estufa, onde foram incubadas conforme as condições descritas acima, por períodos determinados, conforme a necessidade do experimento.

### 3.5 Viabilidade Celular (Ensaio do MTT)

A viabilidade celular foi realizada pelo método do MTT (VAN DE LOOSDRECHT et al., 1991). O MTT é um sal de tetrazólio, que é reduzido a um derivado formazan de cor azulada pela atividade redutora da mitocôndria, funcionando, portanto, como um indicador da função mitocondrial e, por conseguinte, da viabilidade celular. Depois do tratamento das células com DNR (1-100  $\mu\text{M}$ ) e/ou SNAP (0,1-1 mM), por um período de 24 h, conforme descrito no tratamento da amostra, foi realizado o ensaio da viabilidade celular. Após a incubação, a placa foi centrifugada, o sobrenadante removido e adicionado, então, meio de cultura fresco contendo 10% (v/v) de uma

solução de MTT (5 mg/mL em PBS). Após a incubação por 2 h a 37°C, a placa foi centrifugada novamente e o sobrenadante foi removido. Em cada poço, foram adicionados 100 µL de álcool isopropílico/HCl 0,04 N para dissolução dos cristais de formazan do MTT. Após 10 min, os restos celulares foram removidos por centrifugação. O sobrenadante límpido foi, então, transferido para outra placa, onde foi realizada a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro Microwell Systems (Organon Teknika, Belgium) no comprimento de onda 540 nm. A densidade óptica do grupo controle, ou seja, das células sem tratamento, foi considerada como equivalente a 100% de células viáveis. Deste modo, quanto maior o número de células viáveis presentes, maior a oxidação do MTT.

### 3.6 Análise do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo

Para avaliar os efeitos dos compostos DNR e/ou SNAP nas fases do ciclo celular foi utilizado o PI/RNase *solution kit*, cujo princípio consiste na coloração dos ácidos nucleicos pelo PI, após a digestão do RNA. O PI, dependendo da fase do ciclo celular, emite diferentes intensidades de fluorescência que, por sua vez, são captadas pelos detectores fotomultiplicadores do citômetro de fluxo, através de variações no seu conteúdo de DNA, e, dessa forma, permite quantificar a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular (GONG et al., 1994).

As células ( $3,5 \times 10^5$  células/200 µl) foram inicialmente tratadas durante 24 h com DNR 100 µM e/ou SNAP 1 mM e incubadas em estufa úmida a 37°C, contendo 5 % de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com solução PBS e o sobrenadante foi removido. O procedimento foi realizado conforme o kit do fabricante (Immunostep, Espanha). Brevemente, as células lavadas foram fixadas com 200 µL de etanol 70 % e incubadas durante 30 min em temperatura de - 4°C. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes em PBS, contendo 2% de albumina bovina e centrifugadas 200 x g, durante 10 min. Posteriormente, adicionou-se ao *pellet* celular 500 µL de solução de PI contendo Rnase. A suspensão permaneceu 15 min em temperatura ambiente antes da análise no citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) através do software BD CELLQuest™. O controle negativo foi preparado com células

sem serem tratadas com os compostos para caracterização dos parâmetros a serem analisados no citômetro de fluxo.

### **3.7 Ensaio de Immunoblotting para as Proteínas Apoptóticas: bcl-2, bax, survivina e caspase-3**

Para estudar a expressão das proteínas Bcl-2, Bax, survivina e caspase-3, usamos o extrato celular total obtido das células K562, após a incubação com DNR 100  $\mu$ M e/ou SNAP 1 mM, por um período de 9 h. Os extratos celulares foram desnaturados em tampão de amostra (50 mM Tris-HCl, 1% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,001% azul de bromofenol), aquecidos em banho de água fervente por 5 min. As proteínas dos extratos celulares (30  $\mu$ g) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilada/SDS a 12% (LAEMMLI, 1970). Depois, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (HYbond-C Pure, Amersham Pharmacia Biotech, EUA), em seguida, foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% em Tween-TBS (150 mM NaCl, 10 mM TRIS, 0,1% Tween 20) e imunomarcadas com os anticorpos primários específicos anti-Bcl2 de camundongo (diluição de 1:500; Invitrogen™, EUA); anti-Bax de coelho (diluição de 1:800; Cell Signalling Technology, EUA); anti-survivina de cabra (diluição de 1:1000; da Santa Cruz Biotechnology, EUA) e o anti-caspase-3 de coelho (diluição de 1:1000; Cell Signalling Technology, EUA), durante 12 h. Depois de extensivas lavagens com Tween-TBS, a identificação das proteínas foi realizada por meio de incubação por 3 h dos anticorpos secundários anti-IgG de camundongo (diluição de 1:5000; Santa Cruz Biotechnology, EUA); anti-IgG de cabra (diluição de 1:7000, Millipore, EUA); anti-IgG de coelho (diluição de 1:2000, Millipore, EUA) todos conjugados a HRP. As proteínas imunorreativas foram visualizadas utilizando-se o substrato quimioluminescente ECL (Amersham Biociences) e os filmes de raio-x foram revelados de maneira tradicional.

Os filmes obtidos na reação de quimioluminescência foram digitalizados por meio de scanner e os níveis de expressão das proteínas Bcl-2, Bax, survivina e caspase-3 foram determinados pela análise das imagens utilizando-se o programa Scion Image Software (Scion Co., EUA). O valor final da intensidade relativa foi expresso em proporção em relação a banda controle (células sem tratamento) em todos os experimentos.

### **3.8 Análise do Acúmulo e Compartimentalização Intracelular de Daunorrubicina por Microscopia de Fluorescência**

O acúmulo e a disposição do quimioterápico DNR foram avaliados de acordo com a fluorescência emitida por esse composto, conforme descrito por Frossen e colaboradores (1996). Os compostos DNR 100  $\mu\text{M}$  e/ou SNAP 1mM, foram adicionados à suspensão de células K562 ( $1 \times 10^6$  células/mL). Após a adição dos compostos, as células foram incubadas durante 12 h nas condições descritas anteriormente. Depois da incubação, as células foram centrifugadas para concentração do *pellet* e remoção do excesso de fármaco livre. Após, as células foram ressuspensas em PBS e examinadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX40, Japan) com filtro de excitação 539 nm e de emissão 617 nm. A captura das imagens foi feita com câmera fotográfica (Olympus BX40, Japan).

### **3.9 Análise do Acúmulo e Retenção de Daunorrubicina por Citometria de Fluxo**

As células K562 ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram incubadas com DNR 100  $\mu\text{M}$  e/ou SNAP 1 mM, em estufa úmida a 37°C, contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O acúmulo intracelular de DNR foi determinado em 6, 12 e 24 h. Após a incubação, as células foram lavadas três vezes e ressuspensas em PBS. As amostras foram mantidas em gelo até a determinação da intensidade de fluorescência intracelular da DNR por citometria de fluxo (FACSCalibur<sup>TM</sup>BD, BD). O composto DNR foi excitado pelo laser de argônio em 488 nm e o sinal fluorescente vermelho/alaranjado foi adquirido através de um sistema de filtros 585/42 (FL-2 *height*). Os dados foram analisados usando o programa WinMID *software*. O acúmulo de DNR foi determinado pela média da intensidade de fluorescência da amostra em relação à intensidade de fluorescência da amostra controle (célula sem tratamento).

### 3.10 Ensaio Semi-Quantitativo da Transcriptase Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)

As células K562 ( $3 \times 10^6$  células/3 mL) foram incubadas com DNR 100  $\mu\text{M}$  e/ou SNAP 1 mM durante 6 h, em estufa úmida a  $37^\circ\text{C}$ , contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Células sem tratamento foram usadas para controle da reação. As células foram lavadas três vezes com PBS para a extração do RNA segundo o protocolo do reagente Trizol<sup>®</sup>. A reação da transcriptase foi realizada usando 5  $\mu\text{g}$  do RNA total e tratada com água DEPC (0,1% v/v) até 10  $\mu\text{L}$ . As amostras foram aquecidas durante 5 min a  $70^\circ\text{C}$  e refrigeradas rapidamente em gelo durante 5 min e aquecidas novamente por mais 5 min a  $25^\circ\text{C}$ . Para cada amostra, foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de tampão *first strand*, 2  $\mu\text{L}$  de DTT (0,1 M), 2  $\mu\text{L}$  de *random hexamers* (100 ng/ $\mu\text{L}$ ), 0,4  $\mu\text{L}$  de dNTP mix (100 mM cada), 0,5 de RNaseOUT (40U/ $\mu\text{L}$ ), 0,5 de Super Script III (200U/ $\mu\text{L}$ ) e água DEPC q.s.p. Posteriormente, as amostras foram incubadas a  $25^\circ\text{C}$  por 5 min e então foram aquecidas a  $37^\circ\text{C}$  por 60 min, depois, seguiu-se a inativação da enzima a  $90^\circ\text{C}$  por 5 min. Após essa fase, completou-se a síntese de cDNA, e as amostras foram dosadas e armazenadas em freezer a  $-20^\circ\text{C}$  até realização da reação de PCR.

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores ou *primers*, utilizados para avaliar a expressão dos genes *abcc1* e *lrp* foram previamente descritos por Valera e colaboradores (2004) e a expressão do gene *gapdh* foi utilizada para a normalização das bandas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Sequência dos Oligonucleotídeos Iniciadores ou *Primers*

Gene	Sequência	Tamanho produto
<i>abcc1</i>	<i>sense</i> : 5' – TGGGACTGGAATG TCACG – 3' <i>antisense</i> : 5' – AGGAATATGCCCCGA CTTC – 3'	260pb
<i>lrp</i>	<i>sense</i> : 5' – GTCTTCGGGCCTGAGCT GGTGTGC – 3' <i>antisense</i> : 5' – CTTGGCCGTCTC TTGGGGGTCCTT – 3'	240pb
GAPDH	<i>sense</i> : 5' – CGTCTTCACCACC ATGGAGAA – 3' <i>antisense</i> : 5' – GAGGCAGGGATGAT GTCTG – 3'	330pc

A expressão do gene *abcc1* e *lrp* foram avaliadas por RT-PCR num volume final de 50 µL, contendo 1 µg de cDNA, 5 µL de tampão para PCR 10Xconcentrado, 0,4 µL de dNTPmix (100 mM), 1 µL de *primer sense* e *antisense* (10 mM cada), 0,4 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) e 1,5 de MgCl<sub>2</sub> (50 mM) para GAPDH e ABCC1 ou 0,75 µL para LRP. A temperatura e o tempo de duração das fases de desnaturação, anelamento e extensão da fita de DNA estão listados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Temperatura e duração das fases das reações de RT-PCR.

Gene	Temperatura/ Duração da fase de desnaturacao	Temperatura/ Duração da fase de anelamento	Temperatura/ Duração da fase de extensão	Núme- ro de ciclo
<i>abcc1</i>	94 °C/ 60 s	60 °C/ 60 s	72 °C/ 60 s	30
<i>lrp</i>	94 °C/ 60 s	64 °C/ 60 s	72 °C/ 60 s	30
GAPDH	94 °C/ 30 s	60 °C/ 30 s	72 °C/ 30 s	25

Todas as reações de RT-PCR foram realizadas em duplicata. Os produtos do RT-PCR foram visualizados em gel de agarose 2% corados com brometo de etídio. A intensidade das bandas foi quantificada sob luz ultravioleta e normalizada em relação à expressão do gene GAPDH. A análise das imagens foi realizada utilizando-se o programa Scion Image Software (Scion Co., EUA).

### **3.11 Análise Estatística**

Os resultados obtidos foram expressos como a média  $\pm$  erro-padrão da média ( $\pm$ EPM). Cada experimento foi repetido pelo menos três vezes, obtendo resultados semelhantes. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste “t” de Student não pareado, ou análise de variância de uma via (A NOVA), seguida pelo teste “t” de Bonferroni. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

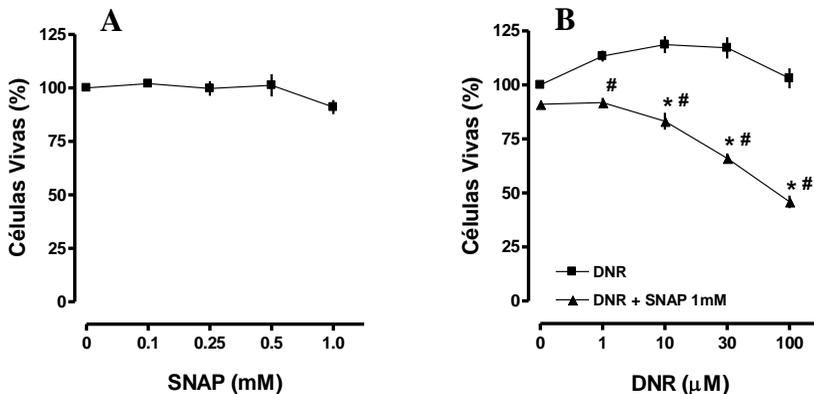
---

#### ***4. RESULTADOS***

---

#### 4.1 Efeito citotóxico do SNAP e da DNR

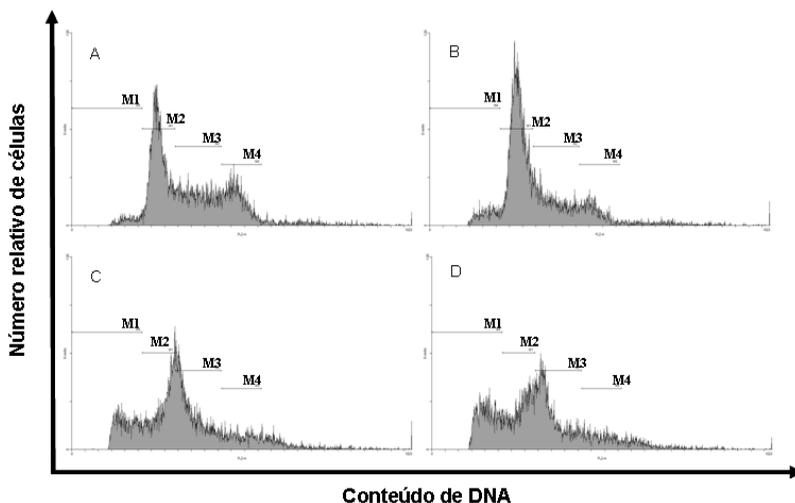
A incubação por 24 h de células de linhagem leucêmicas mieloblásticas K562, com concentrações crescentes de SNAP, um doador de NO, ou DNR não causou morte celular significativa (Figura 1, Painéis A e B). No entanto, quando as células foram tratadas, simultaneamente, por 24 h com SNAP 1 mM e concentrações crescentes de DNR, houve diminuição expressiva do número de células viáveis de maneira concentração-dependente, quando comparado DNR isoladamente (Figura 1, Painel B).



**Figura 1. Efeito citotóxico do SNAP e da DNR isoladamente ou em associação sobre as células de linhagem de leucemia mieloide aguda humana K562.** Os compostos foram adicionados isoladamente ou em associação e incubados por 24 h, conforme descrito em Material e Métodos. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade ótica 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 semelhantes. \* Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e # em relação ao grupo tratado com DNR,  $p < 0.05$  ANOVA seguido de teste t de Bonferroni.

## 4.2 Efeito do SNAP e DNR sobre as fases do ciclo celular

A análise da progressão do ciclo celular foi investigada nas células K-562 após 24 h de incubação com o SNAP 1 mM e/ou com DNR 100  $\mu$ M e comparadas ao grupo controle (sem tratamento). Como se pode observar na Figura 2, Painel B e na Tabela 4, o tratamento das células K562 com SNAP causou um bloqueio significativo de células na fase  $G_0/G_1$  (61,9%) em relação ao controle (46,6%). No entanto, o tratamento das células K562 com DNR (Figura 2, Painéis C-D e Tabela 4), provocou uma parada no ciclo celular na fase S (47%), a qual não foi alterada com adição simultânea do SNAP 1 mM.



**Figura 2: Efeito do SNAP e DNR sobre as fases do ciclo celular nas células de linhagem de leucemia mielóide aguda humana K562.** As células foram incubadas por 24 h sem tratamento (Painel A), na presença de SNAP 1 mM (Painel B), na presença de DNR 100  $\mu$ M (Painel C) e na presença SNAP 1 mM e DNR 100  $\mu$ M (Painel D) e o ciclo celular foi analisado pela intensidade de coloração dos ácidos nucléicos pelo iodeto de propídeo, conforme descrito em Material e Métodos. M1, M2, M3 e M4 representam as fases  $G_0/G_1$ , S, G2/M e sub  $G_0/G_1$ , respectivamente.

**Tabela 4:** Média em (%) das células nas fases G0/G1, S, G2/M e Sub G0/G1 do ciclo

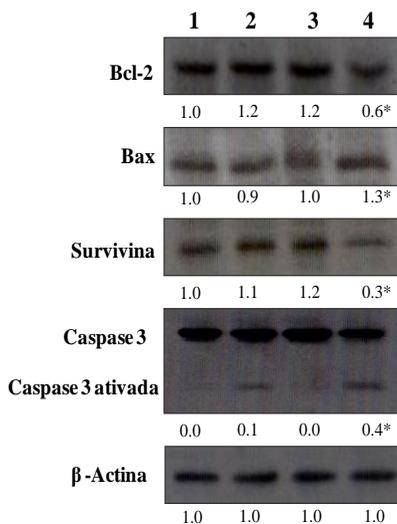
	G0/G1	S	G2/M	Apoptose (Sub G0/G1)
Controle	46.6	31.3	22.1	3.9
SNAP 1 mM	61.9*	25.9	12.2	7.7
DNR 100 $\mu$ M	38.5	47.0*	14.5	18.4*
DNR 100 $\mu$ M e SNAP 1mM	39.0	46.5*	14.5	23.9*

A Tabela 4 representa as porcentagens das células nas diferentes fases do ciclo celular. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos realizados com resultados semelhantes. \* Diferença estatisticamente significante em relação grupo controle,  $p < 0.05$  ANOVA seguido de teste t de Bonferroni.

### **4.3 Efeito do SNAP e/ou DNR na expressão das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e survivina, proteína apoptóticas Bax e Caspase-3**

A via de sinalização da apoptose foi avaliada através da expressão das proteínas Bcl-2, Bax, survivina e caspase-3 ativada. Para isso, as células foram tratadas com DNR 100  $\mu$ M e SNAP 1mM, isoladamente ou em associação, e analisadas por immunoblotting após 9 horas de incubação. Na figura 3, pode-se observar que as células K562 apresentam de maneira constitutiva a expressão das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e survivina, e o tratamento com DNR e SNAP, isoladamente, não alterou de forma significativa a expressão dessas proteínas. No entanto, a adição simultânea desses compostos causou uma redução de 40% e 70%, na expressão de Bcl-2 e survivina em relação ao controle, respectivamente ( $p < 0.05$ ), conforme a análises das áreas imunorreativas. Nessa mesma figura, pode-se constatar que a

incubação das células com DNR ou SNAP não altera a expressão da proteína antiapoptótica Bax, entretanto, há um aumento de 30% na expressão dessa proteína em relação ao controle, quando adicionado esses compostos simultaneamente. Além disso, os resultados da Figura 3, também mostram que o tratamento das células com DNR causa um leve aumento de 10 % na expressão da caspase-3 ativa (banda de 17kDa), porém quando esse composto é adicionado em associação com o SNAP há um aumento significativo de 40% na expressão dessa proteína.

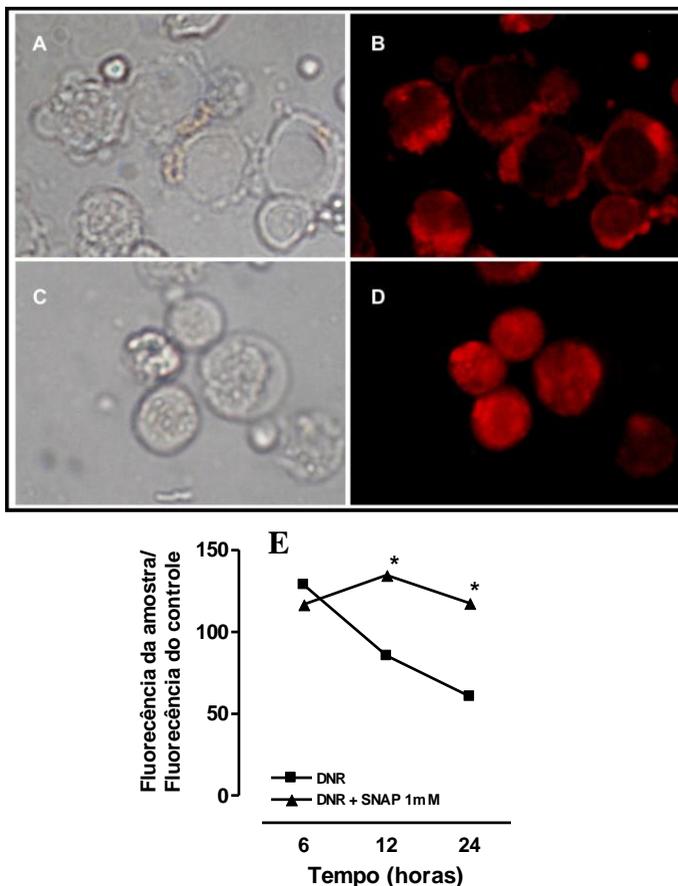


**Figura 3: Efeito do SNAP e/ou DNR na expressão das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e survivina, proteína apoptótica Bax e caspase-3 em células de linhagem de leucemia mielóide aguda humana K562.** As células foram incubadas com os compostos por 9 h, e os extratos nucleares foram obtidos por lise celular. O *immunoblotting* para o Bcl-2, survivina, Bax e caspase-3 foi realizado usando-se anticorpos primários específicos para cada proteína, como descrito em Material e Métodos. As linhas 1, 2, 3 e 4 correspondem ao controle (células sem tratamento), DNR 100  $\mu$ M, SNAP 1mM e DNR 100  $\mu$ M associado com SNAP 1 mM, respectivamente. Os valores numéricos abaixo das áreas imunorreativas correspondem à densitometria de cada linha. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de três amostras. Os mesmos resultados foram obtidos em três outros experimentos semelhantes. \* Estatisticamente diferente do controle,  $p < 0,05$  ANOVA seguido de teste t de Bonferroni.

#### **4.4 Análise do efeito do SNAP no acúmulo e na compartimentalização intracelular de DNR**

A análise do acúmulo e da disposição intracelular de DNR por microscopia de fluorescência mostra que a maioria das células apresenta forte fluorescência citoplasmática e pouca no núcleo, quando tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de DNR (Figura 4 Painéis A e B). Entretanto, pode-se observar que nas células tratadas com DNR 100  $\mu\text{M}$  e SNAP 1 mM a fluorescência está distribuída sobre toda a célula, porém com mais intensidade no núcleo (Figura 4, Painéis C e D)

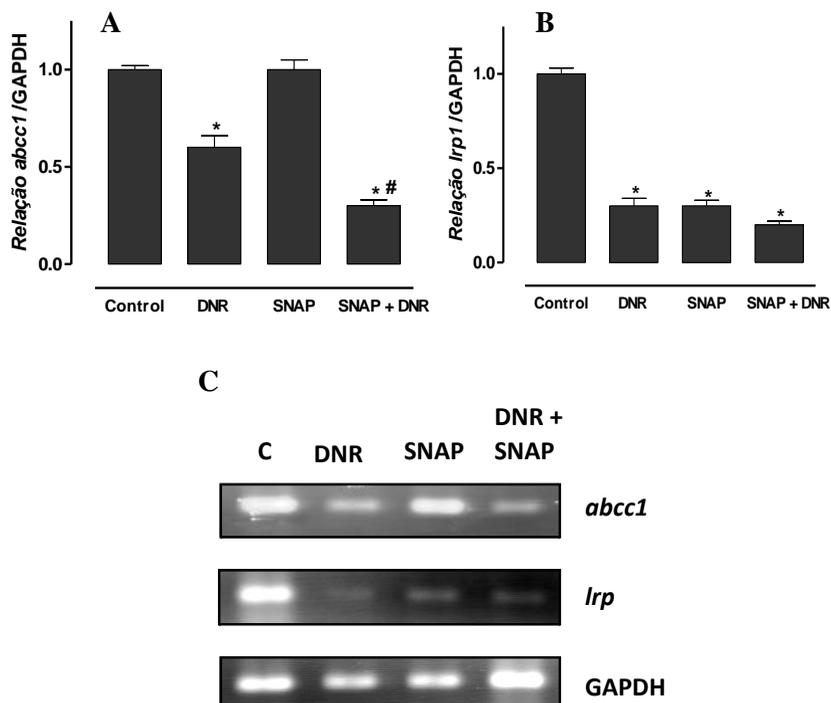
A concentração intracelular de DNR também foi avaliada por citometria de fluxo. Como pode ser observado na Figura 4, Painel E, os resultados confirmam aqueles obtidos por microscopia de fluorescência. No tratamento das células apenas com DNR 100  $\mu\text{M}$  durante 24 h, a intensidade da fluorescência reduziu gradativamente com o decorrer do tempo. No entanto, na presença da associação DNR 100  $\mu\text{M}$  e SNAP 1 mM a intensidade de fluorescência manteve-se constante durante todo o período avaliado



**Figura 4: Efeito do SNAP no acúmulo e disposição da DNR intracelular em células de linhagem de leucemia mieloide aguda humana K562. Painel A:** As células K562 foram incubadas com DNR na presença ou ausência de SNAP durante 12 horas e examinadas por microscopia de fluorescência, conforme descrito em Material e Métodos. **Painéis A e B:** células tratadas com DNR 100 $\mu$ M. **Painel C e D:** células tratadas com DNR 100 $\mu$ M e SNAP 1mM. **Painel E** – Células foram incubadas com DNR 100  $\mu$ M na presença ou ausência de SNAP 1mM. O acúmulo de DNR foi avaliado depois de 6, 12 e 24 horas de incubação por citometria de fluxo (FASCcalibur, BD). O acúmulo de DNR intracelular foi expresso em unidades arbitrárias (UA) em relação ao controle.\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com DNR,  $p < 0.05$  ANOVA seguido de teste t de Bonferroni.

#### 4.5 Efeito de DNR e/ou SNAP na expressão dos genes *abcc1* e *lrp*

Como pode ser observado no grupo controle na Figura 5, Painéis A-C, as células K562 apresentaram expressão constitutiva dos genes *abcc1* e *lrp*. No entanto, a quantificação da expressão dos genes avaliada pela relação entre os genes *abcc1* e *lrp* com a expressão do gene GAPDH, mostra que o tratamento das células K562, por um período de 6 h, com DNR 100  $\mu$ M causa significativa diminuição na expressão de ambos os genes, *abcc1* e *lrp*, enquanto que, o tratamento com SNAP 1 mM mostrou inibição apenas do gene *lrp*. Comparativamente, o tratamento com DNR 100  $\mu$ M associado ao SNAP 1 mM mostrou maior inibição dos genes *abcc1* quando comparados com a expressão constitutiva na comparação com tratamento com DNR 100  $\mu$ M (Figura 5, Painéis A).



**Figura 5: Efeito do DNR e/ou SNAP na expressão dos genes *abcc1* e *lrp* em células de linhagem leucemia mielóide aguda humana K562.** Células foram incubadas com DNR 100  $\mu$ M e/ou SNAP 1 mM, conforme descrito em Material e Métodos. Depois de 6 h, as células foram lisadas, o RNA extraído e a reação RT-PCR realizada. A expressão do gene *abcc1*, *lrp* e GAPDH foi analisada por eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio. **Painel A e B:** correspondem respectivamente à quantificação da relação entre a expressão dos genes *abcc1* e *lrp* com o gene da GAPDH obtidos na reação de RT-PCR, respectivamente. **Painel C:** representa os produtos obtidos na reação de RT-PCR. Os mesmos resultados foram obtidos de três outros experimentos semelhantes. \*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e # em relação ao grupo tratado com DNR,  $p < 0.05$  ANOVA seguido de teste t de Bonferroni.



---

***5. DISCUSSÃO***

---



A terapia na LMA visa a erradicação do clone neoplásico/leucêmico e a restauração da hematopoiese normal, o que pode ser alcançado através de uma quimioterapia de indução agressiva (HARRIS e HOCHHAUSER, 1992).

A DNR é amplamente utilizado na quimioterapia, com benefício terapêutico comprovado no tratamento de uma variedade de neoplasias, incluindo a LMA, na qual é utilizada em associação com o quimioterápico citarabina na fase de indução do tratamento (GUY e JAFFERZOU, 2001; FATHI e KARP, 2009). Como os demais fármacos citostáticos utilizados na quimioterapia convencional, a utilização da DNR está frequentemente associada ao desenvolvimento de resistência a fármacos e toxicidade, o que limita a sua eficiência terapêutica. Muitas alternativas vêm sendo realizadas para atenuar as consequências de um tratamento prolongado com quimioterápicos, tais como, a associação de fármacos ou combinações de tratamentos diferentes: a radioterapia, a imunoterapia, ou o uso de agentes indutores de diferenciação celular ou inibidores de angiogênese associados à terapia (LESZCZNIECKA et al., 2001). Atualmente, a quimioterapia ainda é a forma de terapia antileucêmica mais utilizada, apesar do reconhecimento de seus efeitos adversos, sua resistência aos fármacos e a sua morbidade associada permanecerem como problemas insolúveis desta forma de tratamento. (GOL B et al., 2001; HUERTA et al., 2008).

Assim, a busca de novos fármacos antineoplásicos, que tenham maior especificidade em induzir morte às células tumorais com poucos ou insignificantes efeitos adversos, tornou-se a meta de vários pesquisadores e oncologistas. Nesse contexto, com o objetivo de superar a resistência da célula neoplásica à terapia com agentes convencionais, fármacos doadores de NO, utilizados na terapia de doenças cardiovasculares, têm sido intensamente investigados com o propósito de se tornarem fármacos com potencial antineoplásico, funcionando como um agente citotóxico simples ou em combinação com doses subtóxicas de outros agentes citotóxicos (DE BOO et al., 2009; LEANIN et al., 2008; HUERTA et al., 2008).

A interferência do NO na diferenciação, na proliferação, na citostase e na apoptose em vários tipos de células, notadamente na leucemia, está bem descrito (KOLB, 2000). Porém, essa interferência é bastante diversificada e parece depender do tipo de célula, da concentração, da espécie reativa e do doador de NO (SANTOS-SILVA et al, 2001; OLSON et al., 2008). O NO parece ter um importante papel na sensibilização de células neoplásicas aos agentes

quimioterápicos. Vários trabalhos têm demonstrado que NO interfere no mecanismo de ação de fármacos antineoplásicos. Muir e colaboradores (2006) mostraram que o NO exerce um papel importante na sinalização que envolve a regulação da quimiossensibilização de células neoplásicas. A importância de sistemas de liberação e da quantidade de radicais de NO liberados por compostos doadores de NO no aumento da citotoxicidade causada por cisplastina foi demonstrado por Wink e colaboradores (1997). Evig e colaboradores (2004) mostraram que a produção endógena e a exposição ao NO causam um aumento da citotoxicidade da DOX em células humanas de câncer mama, mas não em mioblastos cardíacos. Também foi demonstrado que o NO inibe o mecanismo de efluxo de fármacos, o que leva a reversão da resistência a DOX em células humanas de câncer (RIGANTE et al., 2005). Além desses trabalhos, Santos-Silva e colaboradores (2006) demonstraram que o NO amplia o efeito citotóxico do taxol em células linfoblásticas leucêmicas. Esses resultados sugerem que o NO parece ser um mediador para quimiorresistência e imunoresistência, no entanto, em altas concentrações, ambos os eventos podem ser revertidos (DE BOO et al., 2009). Sendo assim, no presente estudo foi avaliado o efeito do NO nos mecanismos moleculares envolvidos na resistência a DNR em células de linhagem de leucemia mielóide aguda de origem humana K562.

Os resultados deste estudo demonstram que a incubação das células K562, com concentrações crescentes de DNR e de SNAP, um doador de NO, não causou morte celular quando os compostos foram utilizados de forma individualizada. No entanto, a adição simultânea desses compostos causou citotoxicidade de maneira concentração dependente em relação a DNR (Figura 1, Painéis A e B). Esses resultados sugerem que as células K562 apresentam resistência aos efeitos citotóxicos da DNR e do NO nas concentrações analisadas e que a associação desses compostos sensibiliza as células K562 ao efeito citotóxico do agente quimioterápico. A partir desses resultados, sugerimos duas hipóteses: ou o efeito citotóxico seria o resultado da soma de mecanismos citotóxicos distintos da DNR e do SNAP, ou esses compostos atuariam em mecanismos similares ou iguais e, dessa maneira, teriam um efeito sinérgico aditivo na citotoxicidade para as células K562. Para esclarecer qual dessas hipóteses estaria correta, outros experimentos foram necessários.

Sabendo-se que o NO pode inibir a proliferação de células, devido a mudanças na expressão e na atividade de proteínas

regulatórias do ciclo celular (TANNER et al., 2000; NAKATANI et al., 2005) e que bloqueios no ciclo celular ou comprometimentos nos “ponto de checagem” tornam as células mais sensíveis ao tratamento por agentes que causam dano ao DNA (SHAPIRO et al. 1999), foi investigado se o efeito citotóxico da associação DNR e SNAP envolvia alterações no bloqueio do ciclo celular. Como pode ser observado na Figura 2, Painéis B e C e Tabela 4, os compostos DNR e SNAP causam bloqueio nas fases G0/G1 e S do ciclo celular nas células K562, respectivamente. No entanto, quando adicionados simultaneamente, o NO não altera de forma significativa o bloqueio causado pela DNR na fase S do ciclo celular (Painel D).

Alterações no ciclo celular e nas proteínas regulatórias são frequentemente associadas à indução de apoptose (TANNER et al., 2000). O aumento no percentual de células K562 na fase sub G0/G1 do ciclo celular observados na Tabela 4 são sugestivos que a morte celular observada no ensaio de viabilidade com a associação DNR e SNAP ocorre provavelmente pelo mecanismo de apoptose.

As vias de transdução de sinais envolvidas na indução da morte celular por apoptose são múltiplas e consistem na ativação de numerosas sinalizações e componentes inibitórios, que compõem vários sistemas paralelos ou interligados, os quais culminam na autodestruição da célula (REED, 2000). A regulação da apoptose envolve o delicado equilíbrio entre as proteínas pró e antiapoptóticas. Como visto anteriormente, a família das proteínas Bcl-2 são consideradas moduladores centrais da apoptose pela via mitocondrial, as quais regulam a liberação do citocromo c para o citosol, que por sua vez, promove a ativação da caspase-3 e, subsequentemente, a ativação em cascata das caspases. A superexpressão da proteína Bcl-2 confere resistência à sensibilização por estímulos de morte, como aqueles causados por quimioterápicos e, por isso, tem mostrado ser um fator de mau prognóstico nos pacientes com leucemia aguda (KUSENDA, 1998; RUVOLO et al., 2001). Além disso, a alta expressão da proteína inibidora de apoptose survivina também tem sido associada a mau prognóstico e diminuição da sobrevida em portadores de vários tipos de câncer, incluindo a LMA (ADIDA et al., 2000; XING et al., 2001). Nossos resultados mostram claramente que as células K562 apresentam de maneira constitutiva a expressão das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e survivina e que o tratamento com 100  $\mu$ M de DNR e 1mM de SNAP, isoladamente, não altera de forma significativa a expressão dessas proteínas. No entanto, em relação ao controle, a adição simultânea desses compostos causou respectivamente uma

redução de 40% e 70% na expressão de Bcl-2 e de survivina (Figura 3). Como pode ser observado nessa mesma Figura, o SNAP e a DNR também não alteram a expressão da proteína proapoptótica Bax, porém a associação desses compostos causou um aumento de 30% na expressão dessa proteína. A mudança da proporção Bax:Bcl-2 predispõe a célula à apoptose (CORY & ADAMS, 2002). Nossos resultados corroboram com essa afirmativa, pois a associação do SNAP e DNR causou uma redução da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e o aumento da proapoptótica Bax. O desequilíbrio a favor da proteína proapoptótica Bax resultou na liberação do citocromo c e na subsequente ativação da caspase-3, que é a proteína executora da apoptose, como pode ser visto na Figura 3.

Em síntese, nossos resultados mostram que a associação de DNR e SNAP induz à apoptose em células de linhagem de leucemia mielóide aguda humana K562, pela via mitocondrial por atividade de caspases. Entretanto, esses resultados não são suficientes para sugerir se ambos causam apoptose pelo mesmo mecanismo de ação ou se são independentes.

A capacidade de acúmulo e retenção de fármacos pelas células pode contribuir para a sua eficácia na morte celular (DEN BOER et al., 1999). Conforme já sugerido por Merlin e colaboradores (2000), existe uma grande relação entre o padrão de distribuição intracelular de DNR e a sua citotoxicidade. Assim, para compreender melhor o mecanismo de indução de apoptose causada pela associação de DNR e SNAP, verificamos se NO altera o acúmulo e a retenção intracelular de DNR.

Como pode ser observada na Figura 4 Painéis A e B, a análise da distribuição intracelular de DNR nas células K562, por microscopia de fluorescência, mostra que quando essas células são tratadas com DNR, o fármaco se acumula em regiões pontuais do citoplasma, o que sugere o sequestro de DNR por organelas intracelulares. De maneira oposta, quando as células K562 são incubadas com a associação de DNR e SNAP, há um acúmulo maior de DNR na célula e sua localização ocorre preferencialmente na região nuclear (Figura 4 Painéis C e D). Os resultados obtidos na análise do acúmulo e retenção de DNR por citometria de fluxo (Figura 4 Painel D) corroboram com os achados da microscopia por fluorescência, pois o tratamento das células com associação DNR e SNAP causou maior retenção do fármaco de maneira linear durante o período de 24 horas, enquanto, o tratamento apenas com DNR mostrou que existe uma diminuição progressiva deste fármaco intracelular de maneira tempo dependente. Portanto, a análise desses resultados sugere que existe um mecanismo

de efluxo intra e extracelular para DNR nas células K562 e, mais ainda, que na presença de NO esse mecanismo é inibido. Uma observação importante deste grupo de resultados é o fato de que o principal alvo molecular das antraciclinas é a enzima topoisomerase II, localizada no núcleo, e que o aumento do acúmulo do fármaco no núcleo afeta diretamente a sensibilidade das células às antraciclinas.

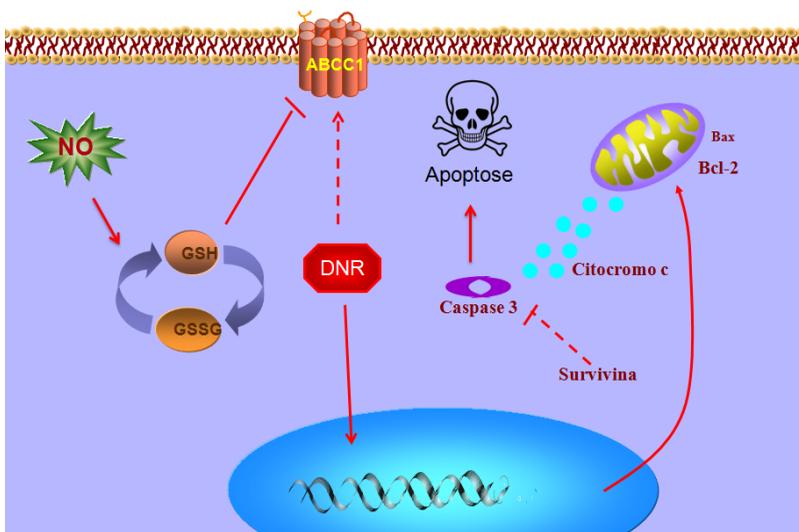
Existem poucos estudos que correlacionam o acúmulo intracelular de antraciclina, por inibição do efluxo de fármaco, com o aumento da citotoxicidade em células neoplásicas. Styczynski e colaboradores (2002) sugeriram que a diminuição da expressão da proteína de resistência ABCB1 aumenta a citotoxicidade causada pela DNR em células de LLA e LMA. Por outro lado, o acúmulo de antraciclinas também pode ocorrer devido à diminuição da expressão de outras proteínas relacionadas com a resistência a fármacos, como a ABCC1 ou LRP (MICHELUTTI et al., 2006). Conforme demonstrado por De Boer e colaboradores (1999), a concentração intracelular de DNR é inversamente proporcional a expressão da proteína LRP, mas não das proteínas ABCB1 em crianças com LLA. Em trabalhos anteriores, mostramos que o NO inibe a atividade da ABCC1, provavelmente, de forma indireta, através da depleção dos níveis de GSH (HANGAI, 2007). Portanto, para estudar melhor o efeito do NO no mecanismo de efluxo que causa aumento do acúmulo e retenção da DNR nas células K562 e consequente diminuição da resistência celular e indução a apoptose, investigamos o efeito do SNAP e da DNR na expressão dos genes que codificam as proteínas de resistências, ABCC1 e LRP.

A Figura 5 mostra que as células K562 apresentam expressão constitutiva de ambos os genes, *abcc1* e *lrp*. Em relação à LRP, observamos significativa diminuição na expressão do gene dessa proteína quando a célula foi tratada com DNR, SNAP ou DNR associado ao SNAP. No entanto, a expressão do gene *abcc1* não foi alterada na presença de SNAP, contudo, o tratamento com DNR causou pequena redução na sua expressão, a qual foi intensificada quando a célula foi tratada com a associação DNR e SNAP.

O mecanismo de ação da proteína ABCC1 ocorre por meio do transporte ativo de substratos para o meio extracelular e a sua redistribuição no meio intracelular. Isso se deve ao fato da proteína ABCC1 estar localizada nas membranas plasmática e intracelulares, incluindo o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi (SWERTS et al, 2006; LU & SHERVINGTON, 2008). O aumento da expressão de ABCC1 em células tumorais pode ser responsável, pelo menos *in*

*vitro*, pela resistência celular contra muitos agentes. A expressão da ABCC1 foi detectada em vários tumores sólidos como, por exemplo: câncer de mama, de ovário, de próstata e no melanoma (HOOIJBERG et al., 2006), assim também em tumores hematológicos, como na LLA (SAUERBREY et al., 2002; STAM et al., 2004). A análise dos resultados obtidos nesse trabalho sugere que o mecanismo de transporte envolvido na resistência a DNR nas células de linhagem de leucemia mielóide aguda de origem humana K562 envolve a proteína da ABCC1, e que, por mecanismos distintos, a DNR e o SNAP inibem a expressão e a atividade dessa proteína, respectivamente, o que rompe com o complexo sistema de resistência a DNR nessas células. Demonstramos anteriormente, que o NO não interfere na expressão da ABCC1 em células de linhagem de leucemia linfoblástica aguda, mas atua, de maneira indireta, no funcionamento da bomba de efluxo ABCC1, pela diminuição da concentração de GSH intracelular, por oxidação à GSSG (glutathiona oxidada) e por inibição da síntese de novo (HANGAI, 2007). Assim, os dados apresentados nesse trabalho, nos levam a sugerir que o NO esteja bloqueando o funcionamento da ABCC1 pelo mesmo mecanismo citado anteriormente, no entanto, mais experimentos serão necessários para confirmar essa hipótese.

A compilação das evidências obtidas nesse estudo nos permite sugerir um possível mecanismo de ação de citotoxicidade causado pela associação de DNR e NO sobre as células de linhagem de leucemia mielóide aguda K562 (Esquema 8). O NO inibe a atividade da proteína ABCC1, a qual é responsável pelo efluxo da DNR do citoplasma das células K562 para compartimentos subcelulares e para o meio extracelular. Dessa forma, há uma maior retenção intracelular de DNR, o que permite que o fármaco atinja seu alvo de ação citotóxica no núcleo. Assim, acredita-se que o dano ao DNA, causado pela DNR, ativa a cascata da apoptose via mitocondrial, aumentando a expressão da proteína proapoptótica Bax e inibindo as proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e survivina, o que rompe com o complexo sistema de resistência das células de linhagem de leucemia mielóide aguda K562, que culmina na ativação da caspase 3 e indução da apoptose.



**Esquema 8:** Mecanismo proposto para efeito do óxido nítrico nos mecanismos envolvidos na resistência a daunorrubicina em células K562. GSH, glutathiona reduzida; GSSG, glutathiona oxidase, ABCC1, proteína de resistência a múltiplos fármacos; NO, óxido nítrico; DNR, daunorrubicina.



---

**6. CONCLUSÕES**

---



Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- ✓ As células de linhagem de leucemia mielóide aguda de origem humana K562 apresentam resistência aos efeitos citotóxicos da DNR e do SNAP quando utilizados de forma individualizada;
- ✓ A associação de DNR com SNAP induziu a morte celular em células K562 de maneira concentração depende;
- ✓ A DNR e o SNAP causam respectivamente bloqueio nas fases G0/G1 e S do ciclo celular na célula K562. No entanto, quando associados, o SNAP não altera o bloqueio causado pela DNR na fase S;
- ✓ A associação DNR e SNAP causou uma redução da expressão das proteínas antiapoptóticas, Bcl-2 e survivina. O aumento da proteína proapoptótica Bax e o desequilíbrio a favor dessa proteína resultaram na liberação do citocromo C e, subsequentemente, na ativação da caspase-3;
- ✓ O SNAP aumenta a retenção de DNR em células K562, especialmente na região nuclear, o que permite que o fármaco atinja seu alvo de ação citotóxica no núcleo;
- ✓ As células de linhagem de leucemia mielóide aguda K562 apresentam expressão constitutiva de ambos os genes, *abcc1* e *lrp*.
- ✓ A DNR e o SNAP, associados ou não, causaram uma significativa diminuição na expressão do gene *lrp*;
- ✓ O SNAP não altera a expressão do gene *abcc1*, no entanto, a DNR causa uma pequena redução na sua expressão, a qual foi intensificada com a associação DNR e SNAP.
- ✓ A inibição da expressão do gene da proteína transportadora ABCC1 teve uma correlação direta com a retenção e a citotoxicidade causada pela DNR em células K562 tratadas com SNAP.



---

***7. REFERÊNCIAS***

---



ADIDA, C.; HAIOUN, C.; GAULARD, P.; LEPAGE, E.; MOREL, P.; BRIERE, J.; REYES, D. F.; DIEBOLD, J.; GISSELBRECHT, C.; SALLES, G.; ALTIERI, D. C.; MOLINA, A. T. Prognostic Significance of Survivin Expression in Diffuse Large B-cell Lymphomas. **Blood**, v. 96, p. 1921-1925, 2000.

APPELBAUM, F. P.; GILLILAND, G.; TALLMAN, M. S. The Biology and Treatment of Acute yeloid Leukemia. **American Society of Hematology**, p. 15-43, 1998.

ANTONSSON, B. Mitochondria and the Bcl-2 Family Proteins in Apoptosis Signaling Pathways. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 256/257, p. 141-155, 2004.

AVIVI, I.; ROWE, J. M. Prognostic Factors in Acute Myeloid Leukemia. **Current Opinion in Hematology**, v. 12, p. 62-67, 2005.

BAIN, B. J. **Diagnóstico em Leucemias**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda, 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. **Journal Biological Chemistry**, v. 271, n. 21, p. 12322-12326, 1996.

BINASCHI, M.; CAPRANICO, G.; DAL BO, L.; ZUNINO, F. Relationship Between Lethal Effects and Topoisomerase II Mediated Double-Strand DNA Breaks Produced by Anthracyclines with Different Sequence Specificity. **Molecular Pharmacology**, v. 51, n. 6, p. 1053-1059, 1997.

BITTENCOURT, R.; FOGLIATO, L.; DAUDT, L.; BITTENCOURT, H. N. S.; FRIEDERICH, J. R.; FERNANDES, F.; ONSTEN, T.;

FASSINA, K.; ROCHA, L. K.; MORENO, F.; SILVA, G.; CRUZ, M. S.; GARCIA, R. G.; WASNIEVSKI, J. C.; SILLA, L. M. R. Leucemia Mielóide Aguda: Perfil de Duas Décadas do Serviço de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – RS. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 25, n. 1, p. 17-24, 2003.

BLAISE, G. A.; GAUVIN, D.; GANGAL, M.; AUTHIER, S. Nitric Oxide, Cell Signaling and Cell Death. **Toxicology**, v. 208, p. 177-192, 2005.

BOLAND, M. P.; FOSTER, S. J.; O'NEILL, L. A. J. Daunorubicin Activates NFκB and Induces κB-dependent Gene Expression in HL-60 Promyelocytic and Jurkat T Lymphoma Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 20, p. 12952-12960, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional e Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2010: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2009.

BRUNETT, A. K.; Acute Myeloid Leukemia: Treatment of Adult Under 60 Years. **Reviews in Clinical and Experimental Hematology**, v. 6, n. 1, p. 26-45, 2002.

BURGER, H.; NOOTER, K.; SONNEVELD, P.; VAN WINGERDEN, K. E.; ZAMAN, G. J.; STOTER, G. High Expression of the Multidrug Resistance-Associated Protein (Mrp) in Chronic and Polymphocytic Leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 88, n. 2, p.348-356, 1994.

BURLACU, A. Regulation of Apoptosis by Bcl-2 Family Proteins. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 7, n. 3, p. 249-257, 2003.

CADENAS, E. Mitochondrial Free Radical Production and Cell Signaling. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 25, p. 17-26, 2004.

CALCABRINI, A.; GARCIA-MARTINEZ, J. M.; GONZALEZ, L.; TENDERO, M. J.; ORTUNO, M. T. A.; CRATERI, P.; LOPEZ-RIVAS, A.; ARANCIA, G.; GONZALEZ-PORQUE, P.; MARTIN-PEREZ, J. Inhibition of Proliferation and Induction of Apoptosis in Human Breast Cancer Cells by Lauryl Gallate. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 8, p. 1699-1712, 2006.

CHOI, B.; PAE, H, JANG, S. I.; KIM, Y.; CHUNG, H.; Nitric Oxide as a Pro-apoptotic as well as Anti-apoptotic Modulator. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. 116-126, 2002.

CHRISTOPHERSON, K. S.; BREDT, D. Nitric Oxide in Excitable Tissues: Physiological Roles and Disease. **Journal Clinical Investigation**, v. 100, n. 10, p. 2424-2429, 1997.

CLARKE, A. R.; PURDIE, C. A.; HARRISON, D. J.; MORRIS, R. G.; BIRD, C. C.; HOOPER, M. L.; WYLLIE, A. H. Thymocyte Apoptosis Induced by p53-Dependent and Independent Pathways. **Nature**, v. 362, p. 849-852, 1993.

COLE, S. P.; BHARDWAJ, J. G.; GERLACH, J. E.; MACKIE, C. E.; GRANT, C. E.; ALMQUIST, K. C.; STEWART, A. J. KURZ, E. U.; DUNCAN, A. M.; DEELEY, K. C. Overexpression of a Transporter Gene in a Multidrug-Resistant Human Lung Cancer Cell Line. **Science**, v. 258, p. 1650–1654, 1992.

COLE, S.P.; DEELEY, R.G. Transport of Glutathione and Glutathione Conjugates by MRP1. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 8, p. 438-446, 2006.

CONRADT, B. Genetic Control of Programmed Cell Death During Animal Development. **Annual Review of Genetics**, v. 43, p. 493-523, 2009.

CORTES-FUNES, H.; CORONADO, C. Role of Anthracyclines in the Era of Targeted Therapy. **Cardiovascular Toxicology**, v. 7, p. 56-60, 2007.

CORY, S.; ADAMS, J. M. The Bcl-2 Family: Regulators of the Cellular Life-or-Death Switch. **Nature Reviews**, v. 2, p. 647-656, 2002.

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**, v. 116, p. 205-219, 2004.

DANO, K. Active Outward Transport of Daunomycin in Resistant Ehrlich Ascites Tumor Cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 323, p. 466-483, 1973.

DE BOO, S.; KOPECKA, J.; BRUSA, D.; GAZZANO, E.; MATERA, L.; GHIGO, D.; BOSIA, A.; RIGANTI, C. iNOS Activity is Necessary for the Cytotoxic and Immunogenic Effects of Doxorubicin in Human Common Cancer Cells. **Molecular Cancer**, v. 8, n. 108, 2009.

DEL POETA, G.; BRUNO, A.; DEL PRINCIPE, M. I.; VENDITTI, A. MAURILLO, L.; BUCCISANO, F.; STASI, R.; NERI, B.; LUCIANO, F.; SINISCALCHI, A.; FABRITTI, P.; AMADORI, S. Deregulation of the Mitochondrial Apoptotic Machinery and Development of Molecular Targeted Drug in Acute Myeloid Leukemia. **Current Cancer Drug Targets**, v. 8, p. 207-222, 2008.

DEN BOER, M. L.; PIETERS, R.; KAZEMIER, K. M.; JANKA-SCHAUB, G. E. HENZE, G.; VEERMAN, A. J. P. Relationship Between the Intracellular Daunorubicin Concentration, Expression of Major Vault Protein/Lung Resistance Protein and Resistance to Anthracyclines in Childhood Acute Lymphoblastic **Leukemia**. *Leukemia*, v. 13, p. 2023-2030, 1999.

DEVERAUX, Q. L.; REED, J. C. IAP Family Proteins-Suppressors of Apoptosis. **Genes & Development**, v. 13, n. 3, p. 239-252, 1999.

DOROSHOW, J.H.; SYNOLD, T.W.; SOMLO, G.; AKMAN, S. A.; GAJEWSKI, E. Oxidative DNA Base Modifications in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients Treated with High-Dose Infusional Doxorubicin. **Blood**, v. 97, n. 9, p. 2839-2845, 2001.

DUAN, S.; BLEIBEL, W. K.; HUANG, R. S.; SHUKLA, S. J.; WU, X.; BADNER, J. A.; DOLAN, M. E. Mapping Genes that Contribute to Daunorubicin - Induced Cytotoxicity. **Cancer Research**, v. 67, n. 11, p. 5425-5433, 2007.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão Sobre Óxido Nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

EASTMAN, A.; RIGAS, J. R. Modulation of Apoptosis Signaling Pathways and Cell Cycle **Regulation**. **Seminars in Oncology**, v. 26, n. 5, p. 7-16, 1999.

EVIG, C. B.; KELLEY, E. E.; WEYDERT, C. J.; CHU, Y.; BUETTNER, G. R.; BURN, C. P. Endogenous Production and Exogenous Exposure to Nitric Oxide Augment Doxorubicin Cytotoxicity for Breast Cancer Cells but not Cardiac Myoblasts. **Nitric Oxide**, v. 10, n. 3, p. 119-129, 2004.

FATHI, A. T.; KARP, J. E. New Agents in Acute Myeloid Leukemia: Beyond Cytarabine and Anthracyclines. **Current Oncology Reports**, v. 11, p. 346-352, 2009.

FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004.

FESIK, S. W. Promoting Apoptosis as a Strategy for Cancer Drug Discovery. **Nature Reviews**, v. 5, p. 876-885, 2005.

FIELD, L.; DILTS, R. V.; RAVICHANDRAN, R.; LENHERT, P. G.; CARNAHAN, G. E. 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. **Journal Chemical Society, Chemical Communications**, p. 249-250, 1978.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido Nítrico: O Simples Mensageiro Percorrendo a Complexidade. Metabolismo, Síntese e Funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FORSSEN, E. A.; MALE-BRUNE, R.; ADLER-MOORE, J. P.; LEE, M. J. A.; SCHMIDT, P. G.; KRASIEVA, T. B.; SHIMIZU, S.; TROMBERG, B. J. Fluorescence Imaging Studies for the Disposition of Daunorubicin Liposomes (DaunoXome) within Tumor Tissue. **Cancer Research**, v. 56, p. 2066-2075, 1996.

GAGE, M. Kirschner Lab Research – **Overall Research**. Disponível em: <<http://kirschner.med.harvard.edu>>. Acesso em: 30 de janeiro de 2010.

GEWIRTZ, D.A. A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, n. 7, p. 727- 741, 1999.

GOL B, 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**, v.15, p. 613-620, 2001.

GOLDIE, J.H. Drug Resistance in Cancer: A perspective. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 20, p. 63-68, 2001.

GONG, J.; TRAGANOS, F.; DARZYNKIEWICZ, Z. A Selective Procedure for DNA Extraction from Apoptotic Cells Applicable for Gel Electrophoresis and Flow Cytometry. **Analytical Biochemistry**, v. 218, n. 2, p. 314-319, 1994.

GRIMWADE, D.; WALKER, H.; OLIVER, F.; WHEATHEY, K.; HARRISON, C.; HARRISON, G. REES, J.; HANN, I.; STEVENS, R.; BURNETT, A.; GOLDSTONE, A. The Importance of Diagnostic Cytogenetics on Outcome in AML: Analysis of 1,612 Patients Entered Into the MRC AML 10 Trial. **Blood**, v. 92, n. 7, p. 2322-2333, 1998.

GROS, P.; CROOP, J.; HOUSMAN, D. Mammalian Multidrug Resistance Gene: Complete cDNA Sequence Indicates Strong Homology to Bacterial Transport Proteins. **Cell**, v. 47, p. 371-380, 1986.

GU, Y.; TURCK, C. W.; MORGAN, D. O. Inhibition of CDK2 Activity *in vivo* by an Associated 20K Regulatory Subunit. **Nature**, v. 366, p. 707-710, 1993.

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). **Molecular Pharmacology**, v. 65, n. 6, p. 1375– 1385, 2004.

HALL, M. D.; HANDLEY, M. D.; GOTTESMAN, M. M. Is Resistance Useless? Multidrug Resistance and Collateral Sensitivity. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 10, p. 546-556, 2009.

HALLIWELL, B. Role of Free Radicals in Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Implications for Antioxidant Treatment. **Drugs & Aging**, v. 18, n. 9, p. 685-716, 2001.

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

HANN, I. M.; STEVENS, R. F.; GOLDSTONE, A. H.; REES, J. K.; WEATLEY, K.; GRAY, R. G.; BURNETT, A. K. Randomized Comparison of DAT Versus ADE as Induction Chemotherapy in Children and Younger Adults with Acute Myeloid Leukemia. Results of the Medical Research Council's 10th AML Trial (MRC AML10). **Blood**, v. 89, n. 7, p. 2311-2318, 1997.

HANGAI, M. M. Envolvimento do Óxido Nítrico nos Mecanismos de Resistência Tumoral em Células Linfoblásticas Leucemicas. **Tese de mestrado desenvolvida pelo programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina**, defendida em 2007.

HARRIS, A. L.; HOCHHAUSER, D. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Treatment. **Acta Oncologica**, v. 31, p. 205-213, 1992.

HART, S. M.; GANESHAGURU, K.; HOFFBRAND, A. V.; PRENTICE, H. G.; MEHTA, A. B. Expression of the Multidrug Resistance-Associated Protein (Mrp) in Acute Leukaemia. **Leukemia**, v. 8, n. 12, p. 2163-2168, 1994.

HARTWELL, L. H.; WEINERT, T. A. Checkpoints: Controls that Ensure the Order of Cell Cycle Events. **Science**, v. 246, p. 629-634, 1989.

HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R. Activated Macrophages-Mediated Cytotoxicity: Use of the *in vitro* Cytotoxicity Assay for Study of Bioenergetic and Biochemical Changes that Develop in Tumor Target Cells. **Methods. Enzymol**, v. 20, p. 508-520, 1987.

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: MONCADA, S.; HIGGS, A. **Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system: Proceedings of the Symposium on Biological Importance of Nitric Oxide**. Amsterdam: Elsevier, 1990, p. 189-223.

HONG, H.; SUN, JIANGTAO, J.; CAI, W. Multimodality Imaging of Nitric Oxide Synthases. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 684-698, 2009.

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 Chemotherapy Pharmacology**, v. 58, p. 1-12, 2006.

HUERTA, S.; CHILKA, S.; BONAVIDA, B. Nitric Oxide Donors: Novel Cancer Therapeutics (Review). **International Journal of Oncology**, v. 33, p. 909-927, 2008.

HUNTER, A. M.; LACASSE, E. C.; KORNELUK, R. G. The Inhibitors of Apoptosis (IAPs) as Câncer Targets. **Apoptosis**, v. 12, p. 1543-1568, 2007.

IKEGUCHI, M.; LIU, J.; KAIBARA, N. Expression of Survivin mRNA and Protein in Gastric Cancer Cell Line (MKN-45) During Cisplatin Treatment. **Apoptosis**, v. 7, p. 23-29, 2002.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **O que é o câncer?** Disponível em: <[www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)>. Acesso em: 20 de janeiro de 2010.

ITO, T.; SHIRAKI, K.; SUGIMOTO, K.; YAMANAKA, T.; FUJIKAMA, K.; ITO, M. Survivin Promotes Cell Proliferation in Human Hepatocellular Carcinoma. **Hepatology**, v. 31, n. 5, p. 1080-1085, 2000.

IZQUIERDO, M. A.; NEEFJES, J. J.; MATHARI, A. E.; FLENS, M. J.; SCHEFFER, G. L.; SCHEPER, R. J.; Overexpression of the ABC Transporter ATP in Multidrug-Resistant Human Cancer Cell Lines. **British Journal of Cancer**, v. 74, p. 1961–1967, 1996.

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

JEANNIN, J. F.; LEON, L.; CORTIER, M.; SASSI, N.; PAUL, C.; BETTAIEB, A. Nitric Oxide Induced-Resistance or Sensitization to Death in Tumor Cells. **Nitric Oxide**, v. 19, n. 2, p. 158-163, 2008.

JULIANO, R. L.; LING, V. A Surface Glycoprotein Modulating Drug Permeability in Chinese Hamster Ovary Cell Mutants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 455, p. 152–162, 1976.

KAST, C.; GROS, P. Topology Mapping of the Amino-Terminal Half of Multidrug Resistance-Associated Protein by Epitope Insertion and Immunofluorescence. **Journal Biological Chemistry**, v. 272, p. 26479-26487, 1997.

KASTAN, M. B.; ONYEKWERE, O.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, B.; CRAIG, R. Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage. **Cancer Research**, v. 51, p. 6304-6311, 1991.

KOLB, J. P. Mechanisms Involved in the Pro- and Anti-Apoptotic Role of NO in Human Leukemia. **Leukemia**, v. 14, p. 1685-1694, 2000.

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. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, p. 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**, v. 2, p. 107-120, 1997.

KRUH, G. D.; GUO, Y.; HOPPER-BORGE, E.; BELINSKY, M. G.; CHEN, Z. ABCC10, ABCC11 and ABCC12. **European Journal of Physiology**, v. 453, p. 675-684, 2007.

KUERBITZ, S. J.; PLUNKETT, B. S.; WALSH, W. V.; KASTAN, M. B. Wild-type p53 is a Cell Cycle Checkpoint Determinant Following Irradiation. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United State of American**, v. 89, p. 7491-7495, 1992.

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. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 219, n. 2, p. 502-508, 1996.

KUO, M. T.; BEDNARSKI, P.; KOHNO, K.; SALERNO, M.; TARASIUK, J.; ZUNINO, F. Redox Regulation of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy: **Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities**. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 11, n. 1, p. 99-134, 2009.

KUSENDA, J. Bcl-2 Family and Leukemia. Minireview. **Neoplasma**, v. 45, n. 3, p. 117-122, 1998.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAURENT, G.; JAFFREZOU, J. P. Signaling Pathways Activated by Daunorubicin. **Blood**, v. 98, p. 913-924, 2001.

LEGRAND, O.; ZITTOUN, R.; MARIE, J. P. Role of Mrp1 in Multidrug Resistance in Acute Myeloid Leukemia. **Leukemia**, v. 13, n. 4, p. 578-584, 1999.

LEONARD, G. D.; FOJO, T.; BATES, B. E. The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. **The Oncologist**, v. 8, p. 411-424, 2003.

LEONESSA, F.; CLARKE, R. ATP Binding Cassette Transporters and Drug Resistance in Breast Cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 10, p. 43-73, 2003.

LESZCZYŃIECKA, M.; ROBERTS T.; DENT P.; GRANTE, S.; FISCHER, P. B. Differentiation Therapy of Human Cancer: Basic Science and Clinical Applications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, p. 105-156, 2001.

LIVINGSTONE, L.; WHITE, A.; SPROUSE, J.; LIVANOS, E.; JACKS, T.; TLSTY, T. Altered Cell Cycle Arrest and Gene Amplification Potencial Accompany Loss of Wild-Type p53. **Cell**, v. 70, p. 923-935, 1992.

LOCHER, K. P. Structure and Mechanism of ATP-binding Cassette Transporters. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 364, p. 239-245, 2009.

LOCKHART, A. C.; TIRONA, R. G.; KIM, R. B. Pharmacogenetics of ATP-Binding Cassette Transporters in Cancer And Chemotherapy. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 2, p. 685-698, 2003.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. E. **Molecular Cell Biology**. 4 ed. New York, 2000.

LOWE, S. W.; SCHMITT, E. M.; SMITH, S. W.; OSBORNE, B. A.; JACKS, T. p53 is Required for Radiation-Induced Apoptosis in Mouse Thymocytes. **Nature**, v. 362, p. 847-849, 1993.

LU, C.; SHERVINGTON, A. Chemoresistance in Gliomas. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 312, p. 71-80, 2008.

MAGRINAT, G.; MASON, S. N; SHAMI, P. J.; WEINBERG, J. B.  
Nitric Oxide Modulation of Human Leukemia Cell Differentiation and Gene Expression. **Blood**, v. 80, n. 8, p. 1880-1884, 1992.

MAYER, R. J.; DAVIS, R. B.; SCHIFFER, C. A.; BERG, D. T.;  
POWELL, B. L.; SCHULMAN, P.; OMURA, G. A.; MOORE, J. O.;  
MCINTYRE, R. Intensive Postremission Chemotherapy in Adults with Acute Myeloid Leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 14, p. 896-903, 1994.

MERLIN, J. L.; BOUR-DILL, D.; MARCHAL, S.; RAMACCI, C.;  
POULLAIN, M. G.; GIROUX, B. Modulation of Daunorubicin Cellular Resistance by combination of P-Glycoprotein Blockers Acting on Drug Efflux and Intracellular Drug sequestration in Golgi Vesicles. **Cytometry**, v. 41, p. 62-72, 2000.

MICHELUTTI, A.; STOCCHI, R.; CANDONI, A.; TIRIBELLI, M.;  
CALISTRI, E.; RUSSO, D.; FANI, R.; DAMIANI, D. Effect of Amifostine on the Cytotoxicity of Daunorubicin and Daunoxome in Tumor and Normal Cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 57, p. 517-524, 2006.

MICLESCU, A.; GORDH, T. Nitric Oxide and Pain: 'Something Old, Something New'. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 53, p. 1107-1120, 2009.

MILLIGAN, D.; GRIMWADE, D.; CULLI, J.; SWIRSKY D.;  
CRADDOCK, C.; KELL, J. **Guideline on the Management of Acute Myeloid Leukaemia in Adults**. London: British Society for Haematology, 2005.

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.;  
GIANNI, L. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. **Pharmacological Reviews**, v. 56, n. 2, p. 185-229, 2004.

MIZUNO, N.; NIWA, T.; YOTSUMOTO, Y.; SUGIYAMA, Y. Impact of Drug Transporter Studies on Drug Discovery and Development. **Pharmacological Reviews**, v. 55, p. 425-461, 2003.

MUINDI, J.R.; SINHA, B.K.; GIANNI, L.; MYERS, C. E. Hydroxyl radical production and DNA damage induced by anthracycline-iron complex. **FEBS Lett**, v. 172, p. 226-230, 1984.

MUIR, C. P.; ADAMS, M. A.; GRAHAM, C. H.; Nitric Oxide Attenuates Resistance to Doxorubicin in Three-Dimensional Aggregates of Human Breast Carcinoma cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 96, p. 169-176, 2006.

NAKATANI, N.; ICHIMARU, M.; MORIYASU, M.; KATO, A. Induction of Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemia Cell Line HL-60 by C-Benzylated Dihydrochalcones, Uvaretin, Isouvaretin and Diuvaretin. **Biological & Pharmaceutical**, v. 28, n. 1, p. 83-86, 2005.

NAPOLI, C.; IGNARRO, L. J. Nitric Oxide – Releasing Drugs. **Annul Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 43, p. 97-123, 2003.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB Journal**, v. 94, n. 6, p. 3051-3064, 1992.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of Apoptotic and Non-Apoptotic Death in Tumor Cells. **Nature Reviews**, v. 4, p. 592-603, 2004.

OLDHAM, M. L.; DAVIDSON, A. L.; CHEN, J. Structural Insights Into ABC Transporter Mechanism. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 18, n. 6, p. 726-733, 2008.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric Oxide Release Accounts for the Biological Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor. **Nature**, v. 327, p. 524-526, 1987.

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

PHILCHENKOV, A. Caspases: Potential Targets for Regulating Cell Death. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 8, n. 4, p. 432-444, 2004.

PLASSCHAERT, S. L.; DE BONT, E. S.; BOEZEN, M.; VANDER KOLK, D. M.; DAENEN, S. M.; FABER, K. N.; KAMPS, W. A.; DE VRIES, E. G.; VELLENGA, E. Expression of Multidrug Resistance Associated Proteins Predicts Prognosis in Childhood and Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 24, p. 8661-8668, 2005.

PUI, C. H.; EVANS, W. E. Acute Lymphoblastic Leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 605-615, 1998.

REED, J. C. Bcl-2 and the Regulation of Programmed Cell Death. **Journal of Cell Biology**, v. 124, n. 1, p. 1-6, 2000.

RIGANTI, C.; MIRAGLIA, E.; VIARISIO, D.; COSTAMAGNA, C.; PESCARMONA, G.; GHIGO, D.; BOSIA, A. Nitric Oxide Reverts the Resistance to Doxorubicin in Human Comum Cancer Cells by Inhibiting the Drug Efflux. **Cancer Research**, v. 65, n. 2, p. 516-525, 2005.

ROSS, D. D. Novel Mechanisms of Drug Resistance in Leukemia. **Leukemia**, v. 14, p. 457-467, 2000.

RUBNITZ, J. E.; GIBSON, B.; SMITH, F. O. Acute Myeloid Leukemia. **Pediatric Clinics of North America**, v. 55, n. 1, p. 21-51, 2008.

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

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**, v. 173, p. 53-61, 2001.

SANTOS-SILVA, M. C.; FREITAS, M. S.; ASSREUY, J. Involvement of NF- $\kappa$ B and Glutathione in Cytotoxic Effects of Nitric Oxide and Taxol on Human Leukemia Cells. **Leukemia Research**, v. 30, p. 145–152, 2006.

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 Glutathiona. **Tese de doutorado desenvolvida pelo programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina**, defendida em 2002.

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. **Leukemia and Lymphoma**, v. 43, p. 875–879, 2002.

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

SCHNEIDER, E.; COWAN, K. H.; BADER, H.; TOOMEY, S.; SCHWARTZ, G. N.; KARP, J. E.; BURKE, P. J.; KAUFMANN, S. H.

Increased Expression of the Multidrug Resistance-Associated Protein Gene in Relapsed Acute Leukemia. **Blood**, v. 85, n. 1, p. 186-193, 1995.

SCHWARTZ, G. K.; SHAH, M. Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology*, v. 23, n. 36, p. 9408-9421, 2005.

SHAH, M.; AGARWAL, B. Recent Advances in Management of Acute Myeloid Leukemia (AML). **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 75, n. 8, p. 831-837, 2008.

SHAPIRO, G. I.; HARPER, W.; Anticancer Drug Targets: Cell Cycle and Checkpoint Control. **Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 12, p. 1645-1653, 1999.

SHIOZAKI, E. N.; SHI, Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: Mechanisms from Structural Biology. **Biochemical Sciences**, v. 39, n. 9, p. 486-494, 2004.

SHIPLEY, J. L.; BUTERA, J. N. Acute Myelogenous Leukemia. *Experimental Hematology*, v. 37, n. 6, p. 649-658.

SIMUNEK, T.; STIRBA, M.; POPELOVA, O.; ADAMCOVA, M.; HRDINA, R.; GERSL, V. Anthracyclina-Induced Cardiotoxicity: Overview of Studies Examining the Roles of Oxidative Stress and Free cellular Iron. **Pharmacological Reports**, v. 61, p. 154-171, 2009.

SINGH, R. J.; HOGG, N.; JOSEPH, J.; KALYANARAMAN, B. Mechanism of Nitric Oxide Release from S-Nitrosothiols. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 31, p. 18596-18603, 1996.

SINHA, B. K.; TRUSH, M. A.; KENNEDY, K. A.; MIMNAUGH, E. G. Enzymatic Activation and Binding of Adriamycin to Nuclear DNA. **Cancer Research**, v. 44, p. 2892-2896. 1984.

SONNEVELD, P. Multidrug Resistance in Haematological Malignancies. **Journal of Internal Medicine**, v. 247, n. 5, p. 521-534, 2000.

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**, v. 18, p. 78-83, 2004.

STAVROVSKAYA, A. A.; STROMSKAYA, T. P. Transport Protein of the ABC Family and Multidrug Resistance of Tumor Cells. **Biochemistry**, v. 73, n. 5, p. 592-604, 2008.

STEWART, N.; HICKS, G. G.; PARASKEVAS, F.; MOWAT, M. Evidence for a Second Cell Cycle Block at G2/M by p53. **Oncogene**, v. 10, n. 1, p. 109-115, 1995.

STYCZYNSKI, J.; WYSOCKIL, M.; DEBSKIL, R.; KURYLAK, A.; BALWIERZ, W.; MILEWSKA, R. R.; MATYSIAK, M.; BALCERSKA, A.; KOWALCZYK, J.; WACHOWIAK, J.; JAKIMCZYK, D. S.; CHYBICKA, A.; The Influence of Intracellular Idarubicin and Daunorubicin Levels on Drug Cytotoxicity in Childhood Acute Leukemia. **Acta Biochimica Polonica**, v. 49, n. 1, p. 99-107, 2002.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, H. L.; JAFFE, E.S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J. W. WHO Classification of Tumor of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. **IARC**: Lyon, 2008.

SWERTS, K.; DE MOERLOOSE, B.; DHOOGHE, C.; LAUREYS, G.; BENOIT, Y.; PHILIPPE, Y. B. Prognostic Significance of Multidrug Resistance-related Protein un Childhood Acute Lymphoblastic. **Europea Journal of Cancer**, v. 42, p. 295-309, 2006.

TALLMAN, M. S.; GILLILAND, D. G.; ROWE, J. M. Drug Therapy for Acute Myeloid Leukemia. **Blood**, v. 106, p. 1154-116, 2005.

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**, v. 1, n. 6, p. 127-134, 2000.

TANNER, F. C.; MEIER, P.; GREUTER, H.; CHAMPION, C.; NABEL, E. G.; LUSCHER, T. F. Nitric oxide Modulates Expression of Cell Cycle Regulatory Proteins: Cytostatic Strategy for Inhibition of Human Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. **Circulation**, v. 101, n. 16, p. 1982-1989, 2000.

TESTA, U.; RICCIONI, R. Deregulation of Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia. **Haematologica**, v. 92, p. 81-94, 2007.

TSONGALIS, G. J.; COLEMAN, W. B. Molecular Oncology: Diagnostic and Prognostic Assessments of Human Cancers in the Clinical Laboratory. **Cancer Investigation**, v. 16, n. 1, p. 485-502, 1998.

VALERA, E. T.; SCRIDELI, C. A.; QUEIROZ, R. G. P.; MORI, B. M. O.; TONE, L. G. Multiple Drug Resistance Protein (MDR-1), Multidrug Resistance-Related Protein (MRP) and Lung Resistance Protein (LRP) Gene Expression in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **São Paulo Medical Journal**, v. 122, n. 4, p. 166-167, 2004.

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 Molorimetric MTT Assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 141, p. 15-22, 1991.

VARDIMAN, J. W.; THIELE, J.; ARBER, D. A.; BRUNNING, R. D.; BOROWITZ, M. J.; PORWIT, A.; HARRIS, N. L.; LE BEAU, M. M.; LINDBERG, E. H.; TEFFERI, A.; BLOOMFIELD, C. D. The 2008 Revision of the World Health Organization (WHO) Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia: Rationale and Important Changes. **Blood**, v. 114, p. 937-951, 2009.

WANG, C.; YOULE. R. J. The Role of Mitochondria in Apoptosis. **Annual Review of Genetics**, v. 43, p. 43-95, 2009.

WEINBERG, R. A. **Uma Célula Renegada: Como o Câncer Começa**. Rio de Janeiro: Rocco, 2000.

WILLIAMS, W. **Hematologic diseases**. 7 ed. Marshall A. Lichtman, 2006.

WINK, D. A.; COOL, J. A.; CHRISTODOULOU, D.; KRISHNA, M. C.; PACELLI, R.; LIM, S.; DEGRAFF, W.; GAMSON, J.; VODOVOTZ, Y.; RUSSO, A.; MITCHELL, J. B. Nitric Oxide and Some Nitric Oxide Donor Compounds Enhance the Cytotoxicity of Cisplatin. **Nitric Oxide**, v. 1, p. 88-94, 1997.

WINK, D. A.; VODOVOTZ, Y.; LAVAL, J.; LAVAL, F.; DEWHIRST, M. W.; MITCHELL, J. B. The multifaceted Roles of Nitric Oxide in Cancer. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 5, p. 711-721, 1998.

WU, Y.; YOU, Y.; CHEAN, A.; ZOU, P. Reversal of Drug Resistance by Silencing Survivin Gene Expression in Acute Myeloid Leukemia Cells. **Acta Biochimica Polonica**, v. 55, n. 4, p. 1-8, 2008.

XING, N.; QUIAN, J.; BOSTWICK, D.; BERGSTRALH, E.; YOUNG, C. Y. Neuroendocrine Cells in Human Prostate Over-Express the Anti-Apoptosis Protein Surviving. **Prostate**, v. 1, n. 48, p. 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 Research**, v. 32, n. 6, p. 507–514, 2000.

YIN, Y.; TAINSKY, M.; BISCHOFF, F. Z.; STRONG, L. C.; WAHL, G. M. Wild-type p53 Restores Cell Cycle Control and Inhibits Gene Amplification in Cells with Mutant p53 Alleles. **Cell**, v. 70, p. 937-948, 1992.

YOULE, R. J.; STRASSER, A. The Bcl-2 Protein Family: Opposing Activities that Mediate Cell Death. **Nature Reviews**, v. 9, p. 47-59, 2008.

ZAFFARONI, N.; PENNATI, M.; DAIDONE, M. G. Survivin as a Target for New Anticancer Interventions. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 9, n. 2, p. 360-372, 2005.

ZAGO, M.; FALCÃO, R.; PASQUINI, R. **Hematologia Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2005.

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. **Journal Biological Chemistry**, v. 276, p. 34966– 34974, 2001.

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**, v. 12, n. 4, p. 445-449, 2004.

ZHUANG, S.; SIMON, G. Peroxynitrite-Induced Apoptosis Involves Activation of Multiple Caspases in HL-60 Cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 279, n. 2, p. 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. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, n. 5, p. 815-824, 2001.

