

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Efeito Citotóxico do Óxido Nítrico e do Taxol Sobre Células Linfoblásticas Leucêmicas: Envolvimento do Fator de Transcrição NF- κ B e Papel da Glutathiona

Maria Cláudia Santos da Silva

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.
Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

Florianópolis - SC

Fevereiro/2002

SILVA-SANTOS, MC. Efeito citotóxico do óxido nítrico e do taxol sobre células linfoblásticas leucêmicas: envolvimento do fator de transcrição NF- κ B e papel da glutathione. Florianópolis, 2002, 127p Dissertação (Doutorado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Jamil Assreuy
Defesa: 19/02/02

O presente trabalho avaliou, através de técnicas moleculares, bioquímicas e farmacológicas, o efeito citotóxico do óxido nítrico (NO) e do taxol sobre células linfoblásticas leucêmicas. Foi investigado o envolvimento do NF- κ B e a importância da glutathione na citotoxicidade causada pelo NO e pelo taxol. Os resultados obtidos, demonstraram que o efeito citotóxico do NO e do taxol sobre células leucêmicas linfoblásticas parecem atuar em vias muito semelhantes, ou seja, ambos apresentaram ações independentes de alterações no citoesqueleto, inibiram a atividade do NF- κ B e depletaram os níveis de glutathione (GSH). Além disso, quando associados, apresentaram efeito citotóxico sinérgico. Sendo assim, concluímos que o NO e o taxol, além de diminuir os níveis de glutathione intracelular, o que sensibiliza as células aos danos oxidativos e nitrosativos, também impedem o restabelecimento dos níveis normais de GSH intracelular, através da inibição da atividade do NF- κ B.

Óxido nítrico, taxol, fator nuclear- κ B, glutathione, leucemia linfoblástica, células L-1210, células CEM, citoesqueleto.

**“EFEITO CITOTÓXICO DO ÓXIDO NÍTRICO E DO TAXOL EM CÉLULAS
LINFOBLÁSTICAS LEUCÊMICAS: ENVOLVIMENTO DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO NF-KB E PAPEL DA GLUTATIONA”**

POR

MARIA CLÁUDIA SANTOS SILVA

**Tese julgada e aprovada em sua forma
final, pelo Orientador e membros da
Banca Examinadora, composta pelos
Professores Doutores:**


Banca Examinadora:



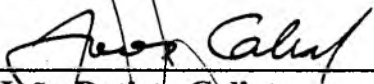
Jamil Assrey Filho **FMC/UFSC-(Orientador)**



Ronaldo Albuquerque Ribeiro **UFC**



Giles Alexander Rae **FMC/UFSC**



João Batista Calixto **FMC/UFSC**



Carlos Rogério Tonussi **FMC/UFSC**

Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC

Florianópolis, 19 de fevereiro de 2002.

DEDICATÓRIAS ESPECIAIS

Ao meu marido, Nivaldo, em quem sempre encontrei apoio, incentivo, compreensão, carinho e companheirismo de maneira incondicional.

Aos meus filhos queridos, Eduardo e Maria Fernanda, responsáveis pelas horas mais suaves e doces desta trajetória, quando um beijo e um abraço apertado me faziam lembrar que “tudo vale a pena”.

Aos meus pais (*in memoriam*), Adolfo e Cláudia, que partiram antes de ver esta obra concluída, mas que foram os responsáveis pelo fundamento dela, pelo exemplo de força, pelo incentivo, pela formação e pelo amor.

AGRADECIMENTOS

- Especialmente ao meu orientador, Prof. Jamil Assreuy, pelo exemplo de profissionalismo, dedicação e integridade, e por me ensinar a procurar os caminhos científicos a serem percorridos, que transformam uma idéia num fato concreto.
- Ao Prof. João B. Calixto, pela disponibilização de sua infra-estrutura, fundamental para a realização deste trabalho.
- À Profa. Thereza Christina Barja Fidalgo e seus alunos, pela acolhida carinhosa e atenção dispensada.
- À Profa. Marta Sampaio de Freitas, pela amizade, atenção, ensinamentos e intermináveis trocas de informações.
- Ao Prof. Mario Steindel, pela utilização do microscópio de fluorescência e por estar sempre pronto a colaborar.
- À Profa. Maria Luiza Bazzo, por sempre estender a mão nos momentos certos e por indicar a direção do norte durante os períodos de turbulência da minha vida profissional e pessoal.
- À Bristol-Myers Squibb (São Paulo, Brasil), pelo fornecimento do Taxol^R
- utilizado na maioria dos experimentos deste trabalho.
- Aos professores do Departamento de Análises Clínicas, pelo suporte dado durante o período de afastamento para a concretização deste trabalho.
- Aos Professores da Coordenadoria Especial de Farmacologia, pela amizade e ensinamentos dispensados.
- À Adriane S. Madeira, pela amizade e ajuda técnica, sempre disposta a ajudar, mesmo nas horas mais atribuladas.
- Ao José Eduardo Silva Santos, pelo auxílio nos experimentos de dosagem de glutathione e pelos trabalhos em colaboração.
- Aos amigos que estiveram ou estão presentes no Laboratório de Farmacologia do Óxido Nítrico, Danielle, Daniel, Márcia, Renata, Rodrigo, Fabiane, Thaíse, Januária, Emiliania, Fernanda, Vanessa, Rafael e Alexandre, pelo convívio e, principalmente, pelo carinho nos momentos mais tristes de minha vida.
- Aos funcionários da Coordenadoria Especial de Farmacologia, pela ajuda prestada.

- Aos colegas da Pós-Graduação, pela troca de informações e amizade.
- Aos meus irmãos Angela, Cléia (*in memoriam*) e Luiz Henrique, por serem os primeiros a me ensinarem a fazer parte “do todo”, a viver em grupo, a dividir, a perder e a ganhar, pelo carinho, apoio e por acreditarem na minha capacidade de ir em frente.
- Finalmente, a todas as pessoas que de maneira direta ou indireta contribuíram para a conclusão desta etapa da minha vida.

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao tamanho original.”*

Albert Einstein

*“Talvez não tenhamos conseguido
fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito....*

*Não somos o que deveríamos ser,
não somos o que iremos ser....*

Mas graças a Deus

Não somos o que éramos.”

Martin Luther King

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.2 LEUCEMIAS	3
1.3 ENVOLVIMENTO DA APOPTOSE NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER E SUAS IMPLICAÇÕES EM SEU TRATAMENTO	5
1.4 IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DO ÓXIDO NÍTRICO COMO MOLÉCULA CITOTÓXICA NO CÂNCER E NA LEUCEMIA.....	9
CAPÍTULO 2 EFEITO CITOTÓXICO DE DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO E DE PEROXINITRITO EM CÉLULAS LINFOBLÁSTICAS LEUCÊMICAS	15
2.1 INTRODUÇÃO	15
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	16
2.2.1 Reagentes	16
2.2.2 Linhagens Celulares	16
2.2.3 Tratamentos.....	17
2.2.3.1 Doadores de NO e SIN-1	17
2.2.3.2 Co-incubação de macrófagos murinos J774 ativados e células leucêmicas murinas	17
2.2.4 Determinação de Nitrito	17
2.2.5 Viabilidade Celular (Ensaio do MTT)	18
2.2.6 Análise Estatística	18
2.3 RESULTADOS	18
2.4 DISCUSSÃO.....	22
CAPÍTULO 3 PAPEL DO CITOESQUELETO NA CITOTOXICIDADE CAUSADA PELO ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS LINFOBLÁSTICAS LEUCÊMICAS	24
3.1 INTRODUÇÃO	24
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.2.1 Reagentes	28
3.2.2 Linhagens Celulares	28
3.2.3 Tratamentos.....	29
3.2.3.1 Compostos que alteram a dinâmica do citoesqueleto e inibidor de síntese protéica	29
3.2.3.2 Associação da colchicina, taxol, citocalasina B e cicloheximida com SNAP ou taxol.....	29
3.2.4 Associação do SNAP e do taxol.....	29
3.2.5 Viabilidade Celular (Ensaio do MTT)	30
3.2.6 Análise Estatística	30
3.3 RESULTADOS	30
3.3.1 Efeito citotóxico de compostos despolimerizantes de microtúbulos sobre linhagens leucêmicas linfoblásticas.....	30
3.3.2 Efeito citotóxico da citocalasina B sobre linhagens leucêmicas linfoblásticas.....	32
3.3.3 Efeito citotóxico da cicloheximida sobre linhagens leucêmicas linfoblásticas.....	32
3.3.4 Efeito de compostos que alteram a dinâmica do citoesqueleto e de inibidor de síntese protéica na citotoxicidade causada pelo SNAP ou taxol em linhagens linfoblásticas leucêmicas.....	32

3.3.5 Efeito da associação do SNAP e do taxol na morte de células linfoblásticas leucêmicas	33
3.4 DISCUSSÃO.....	35
CAPÍTULO 4 INDUÇÃO DE APOPTOSE PELO ÓXIDO NÍTRICO E PELO TAXOL EM CÉLULAS LINFOBLÁSTICAS LEUCÊMICAS	39
4.1 INTRODUÇÃO	39
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.2.1 Reagentes	42
4.2.2 Linhagem Celular.....	42
4.2.3 Tratamentos.....	42
4.2.4 Viabilidade Celular (Microscopia de Fluorescência).....	43
4.2.5 Determinação da Atividade da Caspase 3	43
4.2.6 Análise Estatística	44
4.3 Resultados	44
4.3.1 Indução de Apoptose em Linhagens de Células Leucêmicas Linfoblásticas L-1210	44
4.3.2 Efeito do SNAP e o do Taxol sobre a Atividade da Caspase 3.....	45
4.4 DISCUSSÃO.....	47
CAPÍTULO 5 ENVOLVIMENTO DA ATIVIDADE DO NF-κB NA CITOTOXICIDADE CAUSADA PELO ÓXIDO NÍTRICO E PELO TAXOL EM CÉLULAS LINFOBLÁSTICAS LEUCÊMICAS.....	51
5.1 INTRODUÇÃO	51
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	58
5.2.1 Reagentes	58
5.2.2 Linhagens Celulares	58
5.2.3 Tratamentos.....	59
5.2.3.1 Inibidores de NF- κ B.....	59
5.2.3.2 Associação de PDTC, de TLCK e de TPCK com SNAP ou taxol.....	59
5.2.3.3 Associação de LPS com SNAP, taxol ou PDTC.....	59
5.2.4 Viabilidade Celular (Ensaio do MTT)	59
5.2.5 Preparação de Extrato Nuclear.....	60
5.2.6 Ensaio da mobilidade por deslocamento em gel pela ligação de extratos nucleares com o oligonucleotídeo consenso para NF- κ B	60
5.2.7 Ensaio de <i>immunoblotting</i> para NF- κ B (c-Rel)	61
5.2.8 Análise Estatística	62
5.3 RESULTADOS.....	62
5.3.1 Efeito citotóxico dos inibidores de NF- κ B sobre células leucêmicas.....	62
5.3.2 Efeito do PDTC, TLCK e TPCK sobre a citotoxicidade causada pelo NO ou pelo taxol.....	63
5.3.3 Bloqueio da ativação do NF- κ B pelo SNAP e pelo taxol em células leucêmicas ..	63
5.3.4 Efeito do NO e do taxol sobre a atividade do NF- κ B e a relação com a morte de células leucêmicas linfoblásticas.....	65
5.3.5 Efeito do LPS sobre a citotoxicidade causada pelo NO, pelo taxol e pelo PDTC ..	68
5.3.6 Efeito da associação do SNAP e taxol na atividade do NF- κ B	68
5.4 DISCUSSÃO.....	69
CAPÍTULO 6 PAPEL DA GLUTATIONA NA CITOTOXICIDADE CAUSADA PELO ÓXIDO NÍTRICO E PELO TAXOL EM CÉLULAS LINFOBLÁSTICAS LEUCÊMICAS.....	74
6.1 INTRODUÇÃO	74
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	78

6.2.1 Reagentes	78
6.2.2 Linhagens Celulares	78
6.2.3 Tratamentos	79
6.2.3.1 Associação de BSO, de BCNU com SNAP ou taxol	79
6.2.4 Viabilidade Celular (Ensaio do MTT)	79
6.2.5 Determinação dos níveis de glutathiona	79
6.2.6 Preparação de Extrato Nuclear	80
6.2.7 Ensaio de <i>immunoblotting</i> para NF- κ B (c-Rel)	80
6.2.8 Imunocitoquímica para NF- κ B (c-Rel)	80
6.2.9 Análise Estatística	81
6.3 RESULTADOS	81
6.3.1 Efeito do BSO sobre a citotoxicidade causada pelo NO ou pelo taxol em células leucêmicas	81
6.3.2 Efeito do BSO, do NO e do taxol nos níveis de glutathiona em células leucêmicas	83
6.3.3 Efeito do BCNU sobre a citotoxicidade causada pelo NO ou pelo taxol sobre células leucêmicas	84
6.3.4 Efeito do BSO, do NO e do taxol na atividade do NF- κ B e na morte de células leucêmicas linfoblásticas	85
6.4 DISCUSSÃO	88
CAPÍTULO 7 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<u>Esquema 1.1 - Sinalização intracelular da apoptose</u>	7
<u>Esquema 1.2: Etapas bioquímicas envolvidas na biossíntese de óxido nítrico pela óxido nítrico sintase</u>	10
<u>Esquema 1.3: Alvos intracelulares do óxido nítrico</u>	12
<u>Figura 2.1 - Efeito citotóxico de doadores de NO em linhagens leucêmicas linfoblásticas</u> ..	20
<u>Figura 2.2: Efeito citotóxico de macrófagos murinos ativados sobre células leucêmicas murinas (barras abertas) e produção de nitrito (barras sombreadas)</u>	21
<u>Figura 3.1: Efeito citotóxico de compostos que alteram o citoesqueleto e de um inibidor de síntese protéica sobre células linfoblásticas leucêmicas</u>	31
<u>Figura 3.2: Efeito citotóxico da associação do SNAP e do taxol sobre células linfoblásticas leucêmicas</u>	34
<u>Esquema 4.1: Resposta celular diferencial dependente da severidade do dano</u>	41
<u>Figura 4.1: Alterações morfológicas em células leucêmicas linfoblásticas L-1210 induzidas por SNAP ou por taxol</u>	46
<u>Figura 4.2: Efeito do SNAP e do taxol na atividade de caspase 3 em células linfoblásticas leucêmicas L-1210</u>	47
<u>Esquema 4.2: Seqüência hipotética dos eventos pós-mitocondrial na apoptose causada pelo NO</u>	50
<u>Esquema 5.1: Ativação do NF-κB</u>	54
<u>Esquema 5.2: Participação do NF-κB na oncogênese</u>	55
<u>Figura 5.1: Efeito citotóxico dos inibidores de NFκB em células de linhagem leucêmica linfoblástica</u>	62
<u>Figura 5.2: Efeito do PDTC sobre a citotoxicidade causada pelo SNAP ou taxol em linhagens de células leucêmicas</u>	64
<u>Tabela 5.1: Efeito do TLCK e do TPCK na citotoxicidade causada pelo SNAP ou pelo taxol em células linfoblásticas leucêmicas murina L-1210</u>	65
<u>Figura 5.3 : Bloqueio da ativação do NF-κB pelo SNAP e pelo taxol em células L-1210</u>	66
<u>Tabela 5.2: Efeito do LPS sobre a citotoxicidade causada pelo SNAP, pelo taxol e pelo PDTC em células leucêmicas murinas L-1210</u>	68
<u>Figura 5.5: Efeito da associação do SNAP e do taxol na atividade do NF-κB e citotoxicidade nas células L-1210</u>	69
<u>Esquema 6.1: Síntese e degradação da glutatona</u>	75
<u>Tabela 6.1: Efeito citotóxico do BSO L-butionina-[S.R]-sulfoximina, inibidor de síntese de GSH) sobre células leucêmicas L-1210 (murina) e CEM (humana)</u>	82
<u>Figura 6.2: Efeito do SNAP e do taxol na ausência e presença de BSO sobre os níveis de glutatona total nas células leucêmicas L-1210</u>	84
<u>Figura 6.3 - Efeito do 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea (BCNU) sobre a citotoxicidade causada pelo SNAP ou taxol em células leucêmicas linfoblásticas humanas CEM</u>	85
<u>Figura 6.4: Efeito do BSO associado ou não com SNAP ou taxol na atividade do NF-κB nuclear em células leucêmicas linfoblásticas humanas CEM</u>	86
<u>Figura 6.5: Efeito do BSO associado ou não a SNAP ou taxol sobre a atividade do NF-κB nuclear e citotoxicidade em células leucêmicas linfoblásticas humanas CEM</u>	87
<u>Esquema 7.1: Mecanismo proposto de citotoxicidade do óxido nítrico: importância da glutatona e envolvimento do NF-B em células linfoblásticas leucêmicas</u>	95

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1	Ativador de proteína 1
Apaf-1	Fator ativador de proteases 1
ATP	Adenosina trifosfato
BCNU	1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea
BSO	L-butionina-[S,R]-sulfoximina
CAD	DNAase ativada por caspase
CDKs	Quinase dependente de ciclina
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
c-IAP1	Inibidor celular de apoptose-1
c-IAP2	Inibidor celular de apoptose-2
DTNB	5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico
EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FAB	Grupo Cooperativo Franco-Americano- Britânico
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina
FMN	Mononucleotídeo de flavina
γ -GCS	Gama glutamilsteína sintetase
γ -GT	Gama-glutamiltanspeptidase
GSH	Glutationa reduzida
GSNO	S-nitrosoglutationa
GSSG	Glutationa oxidada
GTP	Trifosfato de guanosina
HO-1	Heme oxigenase 1
IAP	Proteína inibidora de apoptose
ICE	Enzima conversora de interleucina 1
IKK	I κ -B quinase
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
JNK	c-Jun N-terminal quinase
L-NMMA	L-monometil-arginina
LPS	Lipopolissacarídeos
MAP2	Proteína 2 associada aos microtúbulos

MnSOD	Superóxido dismutase manganês
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NAP	N-acetil-D,L-penicilamina
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARP	Poli(ADP-ribose) polimerase
PBS	Salina tamponada com fosfatos
PDTC	Pirrolidinaditiocarbamato
PMSF	Fluorato de fenilmetionilsulfonil
SIN-1	Morfolinil sidnonimina
SNAP	S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina
SNP	Nitroprussiato de sódio
THB ₄	Tetra-hidrobiopterina
TLCK	N α -p-tosil-L-lisina clorometilcetona
TNB	2-nitrobenzóico
TNF	Fator de necrose tumoral
TPCK	N-tosil-L-fenilalanina clorometilcetona
TRAF1	Fator associado ao receptor TNF-1
TRAF2	Fator associado ao receptor TNF-2

RESUMO

Leucemias constituem um grupo de neoplasias malignas caracterizado pela proliferação clonal de células hematopoiéticas representando cerca de 30% das formas de câncer que acometem crianças e, dos casos diagnosticados, cerca de 75-80% são leucemias linfoblásticas agudas. Atualmente, com os avanços no tratamento, consegue-se remissão total em cerca de 80% das crianças diagnosticadas com a doença; no entanto, em adultos a cura é em torno de 40% menor, e, além disso, os protocolos de tratamento são freqüentemente acompanhados de vários tipos de complicações, que podem variar de leves a severas, comprometendo, assim, a qualidade de vida do paciente. As bases do tratamento terapêutico com compostos antileucemia estão focalizadas na inibição da proliferação celular, na indução de apoptose ou na diferenciação dos blastos leucêmicos. Numerosos trabalhos têm analisado o papel do óxido nítrico (NO) na apoptose. Os resultados ainda são conflitantes, pois, se em algumas situações, o NO é pró-apoptótico, outros relatos mostram que ele protege as células de estímulos apoptóticos. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi estudar a sensibilidade de células de linhagens linfoblásticas leucêmicas de origem humana (CEM) e murinas (L-1210) ao efeito citotóxico do NO, isoladamente ou em associação com drogas antitumorais, bem como os mecanismos citotóxicos envolvidos. Nossos resultados demonstram que os efeitos do NO estão relacionados com o tipo de célula, com a sua concentração e com o tipo de doador de NO. Por outro lado, o taxol, um composto já usado na quimioterapia, que em princípio atuaria de maneira totalmente diferente, apresentou efeito citotóxico semelhante ao NO sobre as células linfoblásticas leucêmicas, ou seja, ambos apresentaram ações independentes de alterações no citoesqueleto, inibiram a atividade do NF- κ B e depletaram os níveis de glutathiona (GSH). Além disso, quando associados, apresentaram efeito citotóxico sinérgico. Sendo assim, concluímos que o NO e o taxol, além de diminuírem os níveis de glutathiona intracelular, o que sensibiliza as células aos danos oxidativos e nitrosativos, também impedem o restabelecimento dos níveis normais de GSH intracelular, através da inibição da atividade do NF- κ B. Provavelmente, o sinergismo de ação entre o NO e o taxol na indução de apoptose em células leucêmicas linfoblásticas é o resultado final de um mecanismo multifatorial que rompe com o

complexo sistema de resistência tumoral. Nesse sentido, a associação do NO e do taxol, ou desses compostos com outros quimioterápicos, pode abrir novos horizontes no tratamento terapêutico das leucemias linfoblásticas.

ABSTRACT

Leukemias are a group of malignant neoplasias characterized by clonal proliferation of hematopoietic cells and represent 30% of all childhood cancers., and, in all the diagnosed cases, 75-80% are acute lymphoblastic leukemia. Using modern therapies, around 80% of all children diagnosed with LLA reach a complete remission, however, the cure rate in adults is around 40% lower than in children. Additionally, the treatment protocols are frequently accompanied by side-effects, which can vary from light to severe, damaging patients' quality of life in lower or higher levels. The treatment of leukemia with antileukemia compounds are focused in inhibiting cellular proliferation, and in the induction of apoptosis or blast differentiation. Clinical treatment protocols cause several side effects, which compromises patient life quality in several degrees. Several reports have analysed the role of nitric oxide (NO) apoptosis. They are conflicting though, since both pro- and anti-apoptotic roles for NO have been described. Therefore, the main goal of the present study was to assess the sensitivity of lymphoblastic leukemia cell lines of murine (L-1210) and human (CEM) origins towards NO, alone or in combination with anti-tumor drugs, as well as the mechanisms underlying the cytotoxic effects. Our results indicate that NO effects varies depending on its concentration, the cell type and the kind of NO donor employed. On the other hand taxol, an established chemotherapeutic compound, which would be expected to have mechanisms of action distinct from those of NO, surprisingly exhibited very similar cytotoxic effects towards lymphoblastic leukemia cell lines. Both compounds displayed cytoskeleton-independent effects, but both inhibited the activity of the transcription factor NF- κ B and depleted glutathione (GSH) levels. Moreover, association of NO with taxol resulted in a synergistic cytotoxic effect. Thus, we conclude that NO and taxol decrease intracellular GSH levels, hence sensitizing cells to both oxidative and nitrosative damage. Moreover, both compounds prevented the recovery of normal GSH levels through inhibition of NF- κ B activity. Probably, the synergism of NO and taxol in inducing apoptosis in lymphoblastic leukemia cells, is the combined result of multifactorial mechanisms which compromise the complex system of tumor cell resistance. In summary, the combination of NO and taxol, or of these compounds with other chemotherapeutic drugs may open new avenues for the treatment of lymphoblastic leukemias.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

Câncer é um termo usado para descrever um grupo de mais de uma centena de doenças que apresentam em comum a proliferação desordenada de células e a incapacidade de diferenciação celular. A palavra *câncer* vem do grego *Karkinos*, “caranguejo”, a qual se refere ao potencial invasivo da doença para outros tecidos. Essa doença é conhecida desde as primeiras civilizações humanas. Os primeiros relatos a respeito dela foram feitos pelo médico Galeno, cuja autoridade nessa área prevaleceu pelo menos até 1500 d.C. e que atribuía a moléstia ao excesso de bile negra.

A observação de que, até o século XIX, o câncer era relativamente raro se explica pelo fato de que a expectativa de vida naquela época era de apenas 35 anos e a maioria dos tipos de câncer desenvolvem-se no período que vai da idade adulta até a senil. Sendo assim, as pessoas morriam antes de desenvolver o câncer, pois contraíam doenças infecciosas próprias da falta de saneamento básico e de uma saúde pública adequada, característica daquela época. Nas raras vezes em que o câncer manifestava-se, era atribuído a um acidente fortuito da natureza ou a uma “vontade de Deus”.

Foi só a partir da última década do século XVIII que surgiram as primeiras explicações para o aparecimento do câncer, as quais se referiam às experiências ou estilos de vida específicos dos indivíduos acometidos, ou estavam relacionados com características hereditárias. Os primeiros relatos que deram origem a essas explicações relacionavam limpadores de chaminé, que tinham contato com a fuligem, com o câncer escrotal e cavalheiros que cheiravam rapé com o câncer nasal.

Durante o século XIX, surgiram poucos relatos reforçando essas hipóteses; no entanto, foi no século XX, com o aumento gradativo da expectativa de vida e com o aparecimento de mais casos de indivíduos com câncer, que explodiu o interesse nessa área. No início desse século, descobriu-se que as pessoas que trabalhavam com os recém-descobertos raios X estavam mais propensas ao desenvolvimento de leucemias e de tumores de pele. Relacionaram cânceres de língua com mulheres que pintavam ponteiros de relógio de pulso com radioluminescente, as quais tinham

o hábito de lamber os pêlos do pincel; e constataram que fumantes de cigarro tinham de vinte a trinta vezes mais chances de desenvolver câncer de pulmão do que não-fumantes (para uma revisão, ver Franks, 1998; Kevies, 1997; Weinberg, 2000).

No século XX, o aumento das pesquisas científicas na área da biologia tumoral e a descoberta de drogas com propriedades antineoplásicas, como a mostarda nitrogenada, identificada na década de 1940, e de uma miríade de outras substâncias com eficácia parcial ou completa contra alguns tipos histológicos marcaram um avanço extraordinário na área oncológica. Entretanto, apesar da expansão rápida da seleção medicamentosa anticâncer, vários tumores sólidos como o câncer de pulmão, de cólon, de mama e de próstata ainda não dispõem de tratamento sistêmico adequado (Kligerman, 1999).

Atualmente, estima-se que aproximadamente uma em cada cinco pessoas, em países prósperos do mundo, morrerá de câncer. O câncer causa a morte de mais de quatro milhões de pessoas por ano em todo o mundo. No Brasil, o câncer é a terceira maior causa de morte, representando 11,84% do total dos óbitos registrados no país, e a segunda por doença depois das doenças circulatórias (27,63% do total). A cada ano atinge pelo menos nove milhões de pessoas, segundo dados da Organização Mundial de Saúde. A prevalência das neoplasias malignas vem aumentando consideravelmente, e estas despendem grande volume de recursos financeiros do governo, o que representa um importante ônus institucional e social. Nesse contexto, embora outras doenças também sejam freqüentes e epidemiologicamente mais importantes, como, por exemplo, doenças cardíacas, doenças parasitárias ou mesmo a fome, o câncer deve ser considerado um problema de saúde pública, e esforços devem ser mobilizados para a sua prevenção e cura (para uma revisão, ver Franks & Teich, 1998; Kligerman, 2001).

Câncer é o ponto final de um longo processo de pelo menos três fases a saber, iniciação, promoção e progressão, que refletem 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 estão envolvidos na patogênese dos processos neoplásicos, os proto-oncogenes, que estimulam 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 desse complexo

sistema por meio da 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. Os proto-oncogenes podem ser alterados por mutações, translocações ou por ampliações originando oncogene, o qual induzirá a expressão de proteínas com função biológica diferente daquela expressa originalmente. Os genes supressores de tumor são freqüentemente alterados por mutações ou deleções. Esses genes normalmente têm a função de regulação negativa da célula durante sua progressão no ciclo celular e proliferação. Dessa forma, a inativação de um gene supressor de tumor pode resultar na perda do controle da regulação negativa e proliferação celular (Tsongalis & Coleman, 1998). Essas mutações gênicas induzem características próprias às células neoplásicas, como proliferação descontrolada; além disso, escapam facilmente do reconhecimento pelos sistemas de defesa imunológica, o que as torna mais resistentes que as células normais. Muitos fatores podem estar envolvidos no desenvolvimento de tumores, como radiações eletromagnéticas, raios X, substâncias químicas como aminas heterocíclicas e infecções virais. Em alguns tipos de câncer, a origem celular, o local do organismo e a variabilidade individual podem influenciar nas características tumorais; entretanto, em alguns tipos, como nas leucemias, o crescimento tumoral é difuso (para uma revisão, ver Kevles, 1997; Franks & Teich, 1998; Hanahan & Weinberg, 2000).

1.2 LEUCEMIAS

Leucemias constituem um grupo de neoplasias malignas caracterizado pela proliferação descontrolada de células hematopoiéticas na medula óssea e nos tecidos linfóides, que, posteriormente, atingem a circulação periférica e podem se infiltrar em outros sistemas orgânicos. A proliferação descontrolada de células leucêmicas inibe a produção das células sanguíneas normais, como os leucócitos, os eritrócitos e as plaquetas. Em decorrência da não-funcionalidade das células leucêmicas, os indivíduos afetados, além de sofrerem de anemia e desordens hemorrágicas, estão mais sujeitos a infecções.

As células leucêmicas originam-se a partir de uma mutação somática em uma única célula-tronco ou célula primordial (*stem cell*), a qual forma o clone leucêmico. 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.

Segundo o *French-American-British Cooperative Group* (FAB), 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, o paciente pode ir a óbito em dias ou semanas, enquanto nas leucemias crônicas o curso clínico é mais brando (Bain, 1990; Franks & Teich, 1998; Pui & Evans, 1998).

O fato de a leucemia ser uma doença genética faz com que a identificação das alterações nas células blásticas seja imprescindível para a escolha do tratamento mais adequado. Hoje, com o avanço tecnológico, além da morfologia, citoquímica e da citogenética, os blastos leucêmicos também são identificados por imunofenotipagem, e, dessa forma, as anormalidades cromossômicas são identificadas de maneira mais precisa, o que permite subclassificações dentro da classificação do FAB. Essas variações permitem a identificação de subgrupos de pacientes com características clínicas distintas, que orientam o tratamento e a monitoração da resposta terapêutica (Rubnitz & Pui, 1999).

As bases do tratamento terapêutico com compostos antileucêmicos estão suportadas na inibição da proliferação (para uma revisão, ver Herr & Debatinet, 2001), na indução de apoptose ou diferenciação dos blastos leucêmicos, o que invariavelmente evoluirá para apoptose (para uma revisão, ver Leszczyniecka *et al.*, 2001).

Considerando os grandes avanços nas pesquisas básicas e clínicas, várias formas de terapia vêm sendo utilizadas para combater as leucemias, como radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e transplante de medula óssea. Apesar de o transplante de medula óssea ser considerado uma importante arma terapêutica em direção à remissão completa das leucemias, apresenta restrições clínicas e socioeconômicas para o paciente. Sendo assim, a quimioterapia é a forma de terapia antileucêmica mais utilizada hoje (Golab *et al.*, 2001). No entanto, a morbidade associada aos quimioterápicos ainda é um obstáculo significativo. Nessas últimas duas décadas a meta dos pesquisadores e oncologistas tem sido a descoberta de drogas antineoplásicas que tenham maior eficiência em induzir morte nas células tumorais e que sejam de fácil administração, pois a maioria dos quimioterápicos,

atualmente, necessita de administração endovenosa prolongada; e com poucos ou insignificantes efeitos colaterais (Gorin *et al.*, 2000).

Indubitavelmente, o entendimento dos mecanismos moleculares de resistência das células leucêmicas à apoptose induzida por quimioterápico e/ou outros compostos se faz necessário para o avanço em direção ao desenvolvimento de compostos antineoplásicos com citotoxicidade mais específica para as células tumorais e com menos efeitos colaterais para o paciente.

1.3 ENVOLVIMENTO DA APOPTOSE NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER E SUAS IMPLICAÇÕES EM SEU TRATAMENTO

Apoptose, termo originalmente criado por Kerr *et al.* (1972), é um processo de morte celular programada, altamente regulado 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. Esse processo tem importantes implicações no entendimento do câncer e no seu tratamento. Em média, um indivíduo adulto normal elimina de 50 a 70 bilhões de células a cada dia por apoptose. No período de um ano, a massa de células erradicadas é igual ao peso corporal de um indivíduo adulto. Se o processo de morte for interrompido, as células se acumulam rapidamente, principalmente se houver um aumento de divisão celular associado, tal como ocorre em vários tumores malignos.

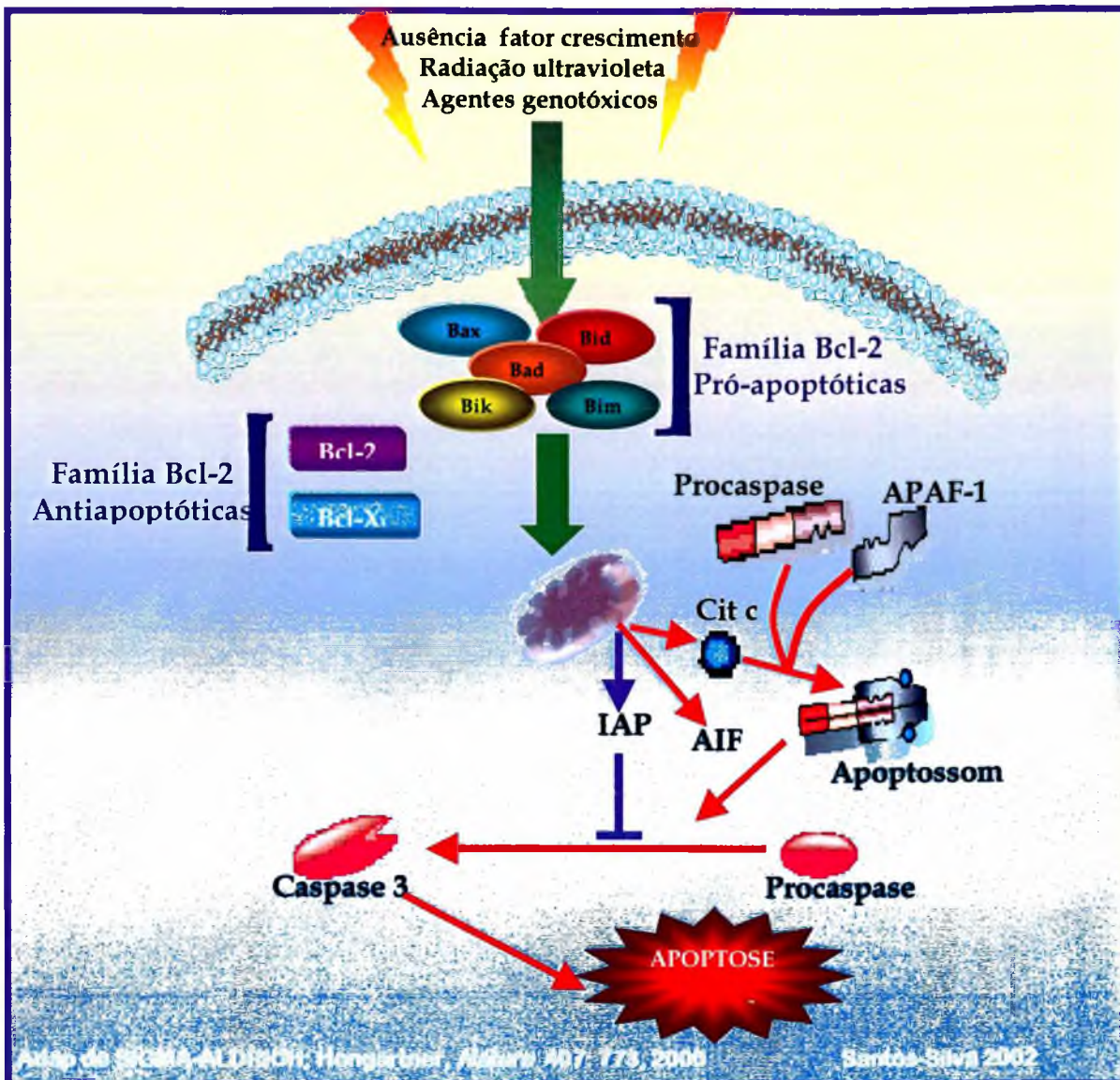
Vários tipos de câncer foram atribuídos a uma desordem no processo de morte celular. Inclusive, as doenças onco-hematológicas foram as primeiras a serem identificadas, como o linfoma folicular de baixo grau (para uma revisão, ver Reed, 2000; Lodish *et al.*, 2000).

Os mecanismos que regulam a apoptose são complexos e consistem na ativação de numerosas sinalizações e de componentes inibitórios, que compõem vários sistemas paralelos ou inter-relacionados, os quais culminam na autodestruição celular. Quando esses mecanismos são alterados, em favor da sobrevivência das células, eles contribuem para o desenvolvimento e persistência do câncer (para uma revisão, ver Reed, 2000).

O processo de apoptose é classicamente caracterizado por alterações morfológicas nas estruturas celulares e subcelulares, incluindo diminuição do tamanho da célula, fragmentação nuclear e condensação da cromatina. Algumas

mudanças morfológicas são freqüentemente correlacionadas a alterações bioquímicas, como fragmentação nuclear, alterações lipídicas na membrana e despolarização da mitocôndria (para uma revisão, ver Granville *et al.*, 1998; Reed, 2000).

Como pode ser visto no Esquema 1.1, o programa de morte celular é acionado apenas na presença de sinais específicos. Vários sinais, externos e internos, podem desencadear um processo apoptótico. Como sinais externos, pode-se incluir a ausência de um fator de crescimento presente no soro, ou a ligação de um “sinal de morte”, como o que ocorre na ativação do receptor Fas, por um ligante Fas (*Fas ligand*), como, por exemplo, os quimioterápicos (Kaufmann & Earnshaw, 2000). Os sinais internos compreendem aqueles que surgem quando, durante o processo de replicação do DNA, acontecem muitos erros e danos a essa macromolécula e o sistema de reparo do DNA não consegue repará-los (Alberts *et al.*, 1997; Weinberg, 1999; Lodish *et al.*, 2000). Outro fator que estimula a apoptose é a liberação do citocromo C pelas mitocôndrias, resultante da transição de permeabilidade de membrana, que pode ativar as caspases, que são os executores da apoptose (para revisão, ver Kannan & Jain, 2000; Saraste & Pulkki, 2000).



Esquema 1.1 - Sinalização intracelular da apoptose

Bax, Bid, Bik, Bim, Ead, proteínas da família Bcl-2 apoptótica; Bcl-2, Bcl-XL, proteínas da família Bcl-2 antiapoptótica; Cit c, Citocromo c, APAF-1, fator ativador de caspase.

As caspases têm um papel preponderante na apoptose. Elas são cisteíno-proteases, homólogas à enzima ICE (do inglês, *Interleukin-1 converting enzyme*), com especial afinidade por clivar ligações peptídicas que se seguem a partir do aminoácido aspartato. Essas enzimas estão presentes na forma de zimogênio (forma inativa) e são ativadas em cascatas proteolíticas. A ativação das procaspases iniciadoras (procaspases 8, 9 e 10) induz a ativação das caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7), as quais quebram substratos específicos, como a laminina, proteínas do citoesqueleto e o inibidor de CAD (DNAase ativada por caspase). A ação das caspases sob esses substratos celulares resulta nas alterações

morfológicas e bioquímicas características encontradas na morte celular por apoptose.

Até o momento, foram clonadas e parcialmente identificadas mais de 14 diferentes caspases em células de mamíferos. Algumas delas não estão envolvidas na apoptose e, sim, desempenham papel como citocinas (para revisão, ver Herr & Debatin, 2001).

A apoptose pode ser inibida ao nível de procaspases iniciadoras ou caspases efetoras, servindo como “pontos de verificação” durante o processo de ativação das caspases. Por exemplo, a família das proteínas antiapoptóticas ADEDs (assim denominadas pela sua função antiapoptótica e pela presença de um domínio efetor de morte) bloqueia a apoptose pela supressão das caspases iniciadoras, as quais são ativadas pelos receptores de fator de necrose tumoral (TNF). Outro grupo de proteínas antiapoptóticas que inibe as caspases iniciadoras é o da família da proteína Bcl-2. As proteínas Bcl-2 são moduladores centrais da apoptose na via mitocondrial, regulando a liberação do citocromo c para o citosol, que, por sua vez, se liga ao fator ativador de caspase Apaf-1, promovendo alterações conformacionais que permitem a ativação da caspase 9 e, subseqüentemente, a ativação em cascata das caspases. As proteínas Bcl-2 são reguladas por fosforilação, a qual pode servir como um mecanismo de modulação da sua atividade; no entanto, há evidências contraditórias de que a fosforilação do Bcl-2 pode ter um efeito anti ou pró-apoptótico (Eastman & Rigas, 1999). A família é constituída de proteínas com funções opostas, isto é, enquanto algumas proteínas inibem a apoptose, como a Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xL, A1 e Mcl-1, outras a ativam, como é o caso da Bax, Bik, Bak, Bad e Bcl-xS. Sob circunstâncias normais, o delicado equilíbrio entre as duas classes de proteínas influencia no resultado final, no qual a célula é induzida à apoptose ou não; entretanto, o desequilíbrio entre Bcl-2 e Bax leva à resistência à sensibilização por estímulos de morte, por exemplo por drogas quimioterápicas. No câncer, o desequilíbrio é em favor da inibição, como pode ser observado no clássico exemplo dos linfomas, cuja translocação dos cromossomos 14:18 resulta na superexpressão de Bcl-2 (do inglês *B-cell lymphoma*), com conseqüente inibição da apoptose. Entretanto, a superexpressão de Bcl-2 tem emergido como um fator de mau prognóstico nos pacientes com leucemia aguda (para um revisão acerca do Bcl-2 e leucemias, ver Kusenda, 1998; Ruvuolo *et al.*, 2001). Por outro lado, alterações na proteína Bax mudam as respostas clínicas à quimioterapia e à radioterapia, pois os

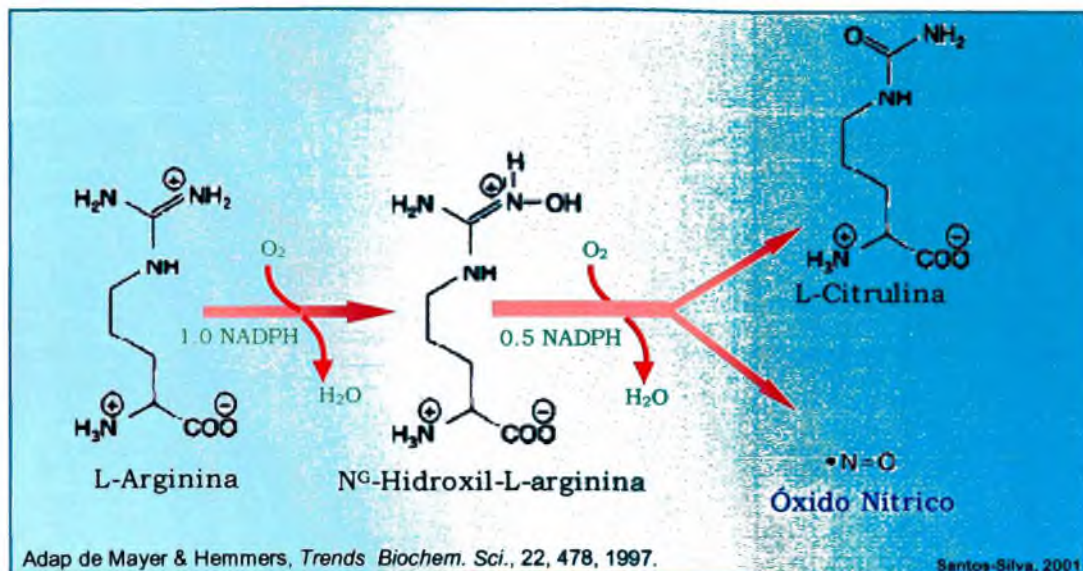
danos causados por esses agentes não são capazes de induzir resposta ao estresse causado na presença de Bax mutado. Ao contrário dessas proteínas, o IAP (proteína inibidora de apoptose) inibe a apoptose por supressão das caspases efetoras (para uma revisão, ver Reed, 2000).

Há evidências na literatura de que a grande parte dos quimioterápicos utilizados na clínica induzem morte celular por apoptose ou alteram processos intracelulares que convergem a ela. O entendimento da sinalização intracelular que induz a apoptose é importante para o conhecimento dos possíveis alvos na intervenção terapêutica e para o esclarecimento dos mecanismos de resistência a drogas (para uma revisão, ver Haq & Zanke, 1998; Kaufmann & Earnshaw, 2000).

1.4 IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DO ÓXIDO NÍTRICO COMO MOLÉCULA CITOTÓXICA NO CÂNCER E NA LEUCEMIA

A demonstração da identidade entre o fator de relaxamento de endotélio (EDRF) e o óxido nítrico (NO), em 1987, e da presença de uma enzima presente em células endoteliais que sintetizava NO abriu o que agora se pode considerar um novo campo na pesquisa biológica (para uma revisão, ver Moncada *et al.*, 1991). Hoje, sabe-se que o NO é um mediador endógeno envolvido em vários eventos fisiológicos, como nos sistemas cardiovascular e nervoso, além de ser uma das mais importantes moléculas efetoras liberadas por células de defesa contra parasitas e células tumorais. O NO também está envolvido em doenças neurodegenerativas, em doenças do sistema cardiovascular, na inflamação e no choque séptico (para uma revisão, ver Moncada *et al.*, 1991; Bredt & Snyder, 1994).

O NO é sintetizado a partir da oxidação do grupamento guanidina do aminoácido L-arginina (Palmer *et al.*, 1988) por uma família de enzimas chamadas de NO sintases (NOS), que origina a N^ω-hidroxi-L-arginina, como um intermediário estável, e depois gera L-citrulina e NO em quantidades equimolares (ver Esquema 1.2). Essa complexa reação envolve o NADPH e o oxigênio molecular como co-substratos fundamentais, e diversos co-fatores, como a tetra-hidrobiopterina (THB₄), o dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), e o mononucleotídeo de flavina (FMN), além da calmodulina, considerada um ativador alostérico da NOS (para uma revisão, ver Mayer & Andrew, 1998).



Esquema 1.2: Etapas bioquímicas envolvidas na biossíntese de óxido nítrico pela óxido nítrico sintase.

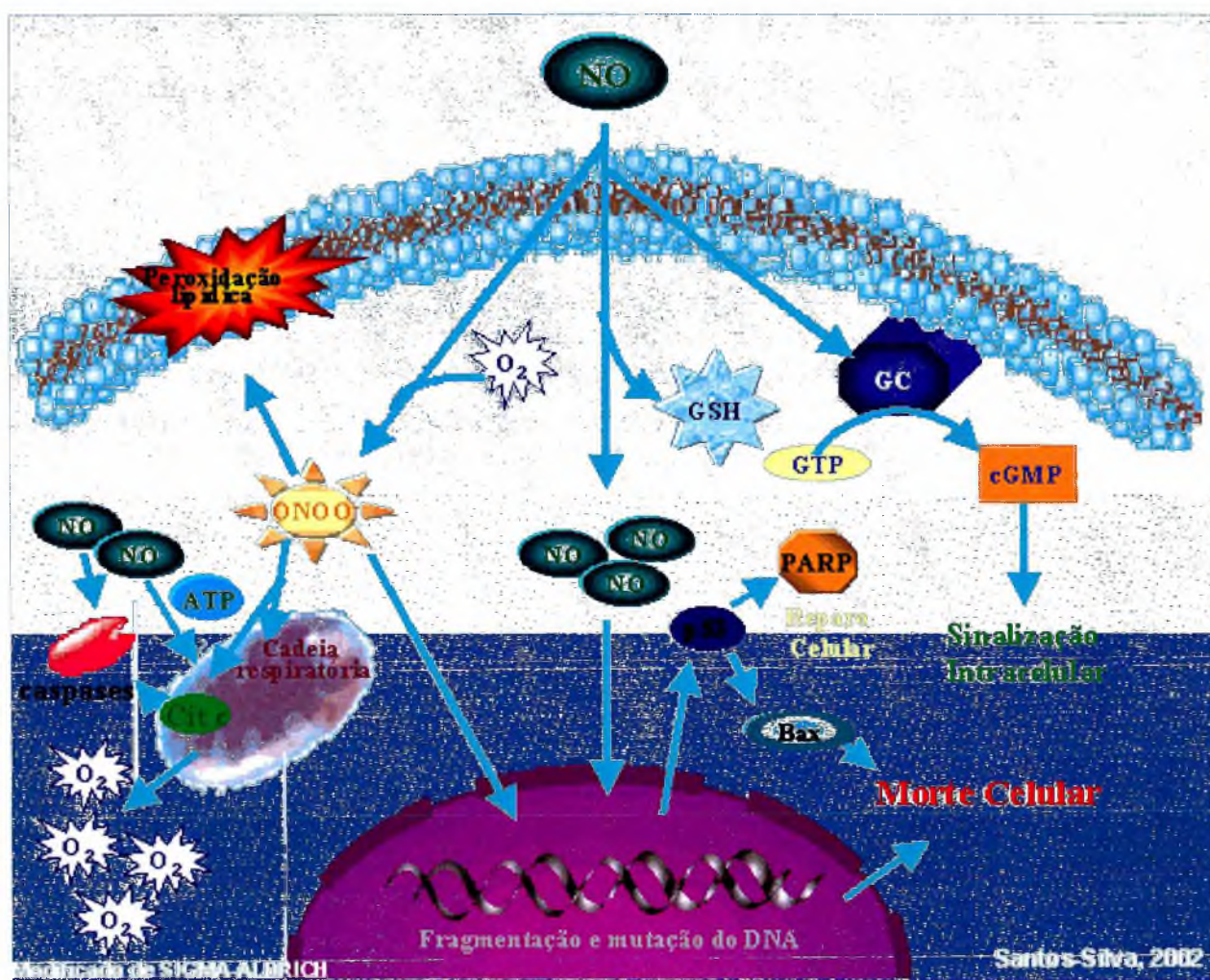
As NOS são enzimas que contêm um grupamento heme e apresentam uma seqüência muito similar (aproximadamente 60% de homologia) à do citocromo P-450 redutase, até então a única enzima descrita em mamíferos que apresentava sítios de ligação para o FAD e o FMN; e na sua forma ativa, as NOS apresentam a conformação de dímeros, com seus monômeros alinhados de tal forma que o domínio oxigenase de cada subunidade interage com o outro para formar o dímero (para uma revisão, ver Knowles & Moncada, 1994; Griffith & Stuehr, 1995). A clonagem e o seqüenciamento dessas enzimas revelaram a existência de três isoformas de NOS, que podem ser expressos constitutivamente em células endoteliais (eNOS) e em neurônios (nNOS), ou ser induzidos por lipopolissacarídeo bacteriano e citocinas em macrófagos e células endoteliais, entre outras células (iNOS induzida) (Moncada *et al.*, 1991). A NOS constitutiva é citosólica, dependente de cálcio/calmodulina, tetra-hidrobiopterina e de outros co-fatores, para liberarem pequenas quantidades de NO, por curtos períodos, em resposta a estímulos físicos ou de receptores. O NO liberado por essas enzimas age como um mecanismo de transdução subjacente a várias respostas, tais como vasodilatação fisiológica e neurotransmissão nos sistemas nervosos central e periférico. Diferentemente da NOS constitutiva, a iNOS, uma vez expressa, sintetiza grandes quantidades de NO por períodos prolongados. A iNOS é citosólica, independente de cálcio, requer tetra-hidrobiopterina e outras substâncias como co-fatores, e têm sua indução inibida, por exemplo, por glicocorticóides (para uma revisão, ver Knowles & Moncada, 1994). Em altas concentrações, o NO produzido pelas iNOS pode interagir

com grupamentos tióis ou proteínas contendo metais e, conseqüentemente, alterar funções protéicas ou iniciar processo de expressão gênica. Além disso, o NO pode causar dano celular ou apoptose (Brüne *et al.*, 1998).

O óxido nítrico gerado em altas concentrações por macrófagos ativados é um dos mais importantes mecanismos de defesa contra patógenos e células tumorais. Hibbs *et al.* (1987) 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 (L-NMMA) 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 ou transformadas (para uma revisão, ver Moncada *et al.*, 1991). A partir desses estudos em diferentes tipos de células, vários mecanismos de citotoxicidade do NO foram propostos. O NO difunde-se facilmente através das membranas e, devido à sua versatilidade, pode interagir com vários componentes celulares.

Um dos alvos do NO é o DNA, onde pode haver interações diretas, tais como a troca de nucleotídeos ou, ainda, a quebra da fita de DNA, como resultado da N-nitrosilação de desoxirribonucleotídeos; ou de maneira indireta, quebrando a fita de DNA por meio da formação de peroxinitrito, N-nitrosaminas ou, ainda, ativando ou inibindo enzimas necessárias para a homeostase nuclear (Kröncke *et al.*, 1997). Danos ao DNA levam a várias conseqüências biológicas, como a indução de mutações e o bloqueio na replicação e na transcrição de genes. Esses danos no DNA são reconhecidos por vários sistemas de reparo celular, os quais envolvem enzimas de reparo do DNA e outros fatores nucleares como a proteína supressora de tumor p53 (para uma melhor visualização, ver Esquema 1.3). Vários trabalhos mostram que, em resposta ao dano no DNA causado por NO, ocorre aumento da expressão de p53 e ativação da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) (para uma revisão, ver Kröncke *et al.*, 1997; Pieper *et al.*, 1999; Murphy, 1999). A constante ativação da PARP em resposta ao extenso dano ao DNA aumenta o consumo de NAD^+ , o que pode levar a célula à morte por depleção energética (Brüne *et al.*, 1998). O NO pode ainda reagir com complexos Fe-S de várias proteínas importantes para a fisiologia celular, alterando suas funções. Entre elas, as mais relevantes são a

cis-aconitase, uma das enzimas-chave do ciclo de Krebs, e as enzimas da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria (Hibbs *et al.*, 1990). A inibição dessas enzimas resulta na depleção dos estoques de ATP e, conseqüentemente, na morte celular devido ao déficit energético (Brüne *et al.*, 1998; Brown, 1999). O NO inibe também a ribonucleotídeo redutase (enzima responsável pela conversão de ribonucleotídeos em desoxirribo-nucleotídeos), interagindo com o radical tirosina, grupos tióis e complexo ferro-não heme presentes no sítio ativo dessa enzima. A redução nos níveis de desoxirribonucleotídeos causa depleção celular dos precursores necessários à síntese de DNA, impedindo, dessa forma, a divisão celular (Hibbs & Taintor, 1986; Drapier & Hibbs, 1988; Hibbs *et al.*, 1990; Feldman *et al.*, 1993).



Esquema 1.3: Alvos intracelulares do óxido nítrico.

NO, óxido nítrico; GC, guanilato ciclase; cGMP, monofosfato cíclico de guanosina; GTP, trifosfato de guanosina; ATP, adenosina trifosfato; p53, proteína p53; Cit c, citocromo c, ONOO⁻, peroxinitrito; H₂O₂, peróxido de hidrogênio.

Numerosos trabalhos têm analisado o papel do NO na morte celular, mas os resultados ainda são conflitantes, pois em algumas situações o NO ativa vias de transdução de sinais que levam à apoptose ou necrose, enquanto em outros casos o NO parece proteger células da apoptose. Essa propriedade dualista parece depender do tipo celular e da concentração de NO (Bonfoco *et al.*, 1995; Kolb, 2000).

As conseqüências da exposição de células leucêmicas aos efeitos do NO estão bem descritas. Em síntese, sabe-se que o NO pode promover a diferenciação de células leucêmicas humanas HL60 (Magrinat *et al.*, 1992), diminuição da proliferação e viabilidade em células leucêmicas linfocíticas não agudas, isoladas de pacientes (Shami *et al.*, 1995). Além disso, a produção de NO endógeno em células leucêmicas mielomonocíticas indiferenciadas aumenta a expressão do antígeno de superfície CD23, envolvido na inibição de proliferação e indução de diferenciação (Quaaz *et al.*, 1994). Da mesma maneira que tem sido demonstrado o envolvimento do NO em mecanismos de proliferação e diferenciação de várias células hematopoiéticas, ele também está envolvido na indução de apoptose em vários tipos de células leucêmicas. Esse envolvimento pode ocorrer de várias formas: por ativação de caspases (Brockhaus & Brune, 1998), por indução da PARP (Kuo *et al.*, 1996), por redução dos níveis de Bcl-2 (Yabuki *et al.*, 1997) ou, ainda, pela formação de peroxinitrito (Lin *et al.*, 1995).

Por outro lado, o NO pode exercer uma função antiapoptótica. O primeiro trabalho sugerindo esse outro papel do NO foi descrito por Genaro *et al.* (1995) em linfócitos B. Esses autores sugeriram que o aumento dos níveis de GMPc, como conseqüência da ativação da guanilato ciclase pelo NO, protegiam os linfócitos B da apoptose. Hoje, sabe-se que o NO pode proteger vários tipos de células normais ou neoplásicas da apoptose e que, além do mecanismo descrito acima, outros possíveis mecanismos podem estar envolvidos, como, por exemplo, por inativação de caspases (para uma revisão, ver Kolb, 2000; Chung *et al.*, 2001), através da S-nitrosilação da cisteína do sítio ativo da enzima e/ou por oxidação (Li *et al.*, 1997; Dimmeler *et al.*, 1997). Um outro mecanismo protetor do NO é pela inibição da liberação do citocromo c da mitocôndria, o qual é um fator-chave na sinalização apoptótica, através da ativação da caspase 9 (Kim *et al.*, 1998).

Entre todos os subcampos da área de NO, o que menos avançou e onde ainda há muitas controvérsias é justamente a sua relação com o câncer. Inúmeras razões contribuem para isso, pois, enquanto algumas células tumorais são muito

sensíveis aos efeitos citotóxicos do NO, outras não o são (para uma revisão, ver Wink *et al.*, 1998; Kolb, 2000). Além disso, algumas células tumorais produzem NO, o que favorece a aceleração do crescimento tumoral, da angiogênese e da metástase (Morcos *et al.*, 1999; Orucevic *et al.*, 1999). O controle da apoptose pelo NO parece ser um importante alvo de investigações. O entendimento e a identificação dos mecanismos pró e antiapoptóticos do NO podem abrir novas possibilidades de tratamento de leucemias e de outros tipos de câncer.

Considerando: i) as informações acerca da importância do NO na atividade citotóxica; ii) que o primeiro caso de leucemia foi descrito há mais de 100 anos e, iii) que apesar das inovações tecnológicas, ainda não se tem uma solução definitiva para a cura da leucemia, e tudo isso somado ao fato de vivermos num país como o Brasil, onde cerca de 80% do sistema de saúde, inclusive a assistência oncológica, é financiado por recursos públicos, resolvemos investigar os efeitos citotóxicos do NO sobre células leucêmicas. Como apenas a descrição do NO nesse processo não é suficiente para avançar nos conhecimentos acerca deste campo, optamos por uma estratégia diferente, que consiste em analisar qual o impacto da associação do NO com uma droga antitumoral, já utilizada na clínica, sobre a efetividade letal do NO e da droga em questão. Assim, foram objetivos deste trabalho:

Geral

Estudar a sensibilidade de células de linhagens leucêmicas de origem humana e murinas ao NO, isoladamente ou em associação com drogas antitumorais, bem como investigar os mecanismos citotóxicos envolvidos.

Específicos

- Estudar o mecanismo citotóxico do NO e do taxol em células de linhagens leucêmicas e quais eventos moleculares seriam mais relevantes para essa citotoxicidade;
- verificar se o NO e o taxol causam morte celular por necrose ou apoptose;
- estudar o envolvimento do NF- κ B e do citoesqueleto nas ações do NO e do taxol;
- investigar a importância dos níveis de glutathiona na proteção celular contra os efeitos citotóxicos do NO e do taxol; e
- avaliar o efeito da associação do NO e do taxol na morte celular.

CAPÍTULO 2

EFEITO CITOTÓXICO DE DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO E DE PEROXINITRITO EM CÉLULAS LINFOBLÁSTICAS LEUCÊMICAS

2.1 INTRODUÇÃO

As primeiras evidências da ação modulatória do NO na apoptose mostraram que o NO induz apoptose em macrófagos murinos (Sarih *et al.*, 1993; Albina *et al.*, 1993) e em fibroblastos (Xie *et al.*, 1994). Atualmente, a interferência do NO na diferenciação, proliferação, citostase e apoptose em vários tipos de células, notavelmente na leucemia, está bem descrito (para uma revisão, ver Kolb, 2000). Entretanto, muitas vezes o papel do NO é contraditório, funcionando como uma “faca de dois gumes”, pois se, por um lado, exerce papel citotóxico, por outro lado, ele é citoprotetor contra vários compostos, inclusive contra quimioterápicos, o que favorece o crescimento tumoral e o desenvolvimento de resistência a drogas. Como visto anteriormente, o NO exibe um efeito contraditório na regulação da apoptose, apresentando efeitos pró e antiapoptóticos. Esse efeito parece depender do tipo de célula, da concentração e de compostos derivados de NO (para uma revisão, ver Kolb, 2000).

Nesse trabalho, buscando compreender melhor o papel do NO na apoptose de células leucêmicas, inicialmente avaliamos sua capacidade de induzir citotoxicidade em linhagens de origem leucêmica linfoblástica humanas e murinas, usando um doador clássico de NO, o S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina (SNAP). Depois, comparamos seu efeito com outros dois doadores de NO, o S-nitrosoglutationa (GSNO) e o nitroprussiato de sódio (SNP), e com NO produzido e liberado por macrófagos ativados. Como muitos dos efeitos do NO são atribuídos à formação de peroxinitrito a partir da sua reação com ânion superóxido, analisou-se essa possibilidade, verificando se o SIN-1 (um doador de peroxinitrito) apresentava citotoxicidade para essas células.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Reagentes

O meio de cultura e o soro fetal (SFB) foram adquiridos da GIBCO (São Paulo, Brasil). O S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina (SNAP) e o S-nitrosoglutationa (GSNO) foram preparados em nosso laboratório, segundo os métodos de Field et al. (1978) e Rockett et al. (1991), respectivamente. O cloridrato de morfolinil sidnonimina (SIN-1) foi gentilmente doado pelo Dr. K. Schonafinger (Hoechst Marion Roussel, Frankfurt am Main, Germany). O LPS de *E. coli* sorotipo 0111:B4 e o Interferon γ (IFN γ) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, EUA), e da Genzyme (EUA), respectivamente. Todas as soluções foram preparadas em meio de cultura.

2.2.2 Linhagens Celulares

Foram utilizadas duas linhagens de células leucêmicas linfoblásticas, L- 1210 (de origem murina) e CEM (de origem humana), e uma linhagem de macrófagos murinos, J774. As células leucêmicas foram mantidas em garrafas plásticas de cultura contendo meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), complementado com 10% de soro fetal, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina e 10 mM HEPES, pH 7,4, em estufa úmida a 37°C, com 5% de CO₂. Os macrófagos foram mantidos em meio RPMI 1640 complementado com 10% de soro fetal, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina e 10 mM HEPES, pH 7,4, em estufa úmida a 37°C, com 5% de CO₂. Para a realização dos experimentos, o número de células viáveis foi avaliado pelo método de Azul de Trypan (0,5%). Um total de 5×10^5 células por poço foi plaqueado em placas de 96 poços.

2.2.3 Tratamentos

2.2.3.1 Doadores de NO e SIN-1

Os compostos foram adicionados às células num volume máximo de 20 μL . Em seguida, as células retomaram à estufa, onde foram incubadas por 24 h nas condições acima descritas. Ao final deste período, foi avaliada a viabilidade celular pelo método do MTT (brometo de dimetiazol difeniltetrazólio).

2.2.3.2 Co-incubação de macrófagos murinos J774 ativados e células leucêmicas murinas

Os macrófagos (5×10^5 cels/poço) foram plaqueados em placas de 96 poços num volume final de 100 μl e foram ativados com 100 ng/ml LPS e 10 U/ml de IFN- γ . Depois de 4 h em estufa, células leucêmicas L-1210 (5×10^5 cels/poço, 100 μl) foram plaqueadas juntamente com os macrófagos. As placas retornaram à estufa, onde foram incubadas por mais 20 h a 37°C, com 5% de CO₂. Ao final deste período foi avaliada a viabilidade celular pelo método do MTT.

2.2.4 Determinação de Nitrito

Os níveis de nitrito foram medidos pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess (Green *et al.*, 1982). Brevemente, 100 μl do sobrenadante de macrófagos ativados foram transferidos para placa de 96 poços, onde foi adicionado o mesmo volume do reagente de Griess. Esse reagente foi preparado na hora do ensaio e consiste na mistura de volumes iguais de reagente A (sulfanilamida 1% dissolvida em H₃PO₄ 10%) e reagente B (alfa-naftil-etilenodiamina 0,1% dissolvida em água de Milli-Q). Após incubação por 10 min à temperatura ambiente, a absorbância foi medida em leitor de placas a 540 nm. Curvas-padrão de nitrito de sódio (0 a 80 μM) foram feitas simultaneamente, e, finalmente, após interpolação por regressão linear, os valores foram expressos como concentração (μM) de nitrito.

2.2.5 Viabilidade Celular (Ensaio do MTT)

A viabilidade celular foi analisada 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 oxidativa de células, funcionando, portanto, como um indicador da função mitocondrial e, por conseguinte, da viabilidade celular. No final dos experimentos as placas foram centrifugadas, o sobrenadante foi removido, e foi adicionado, então, meio de cultura fresco contendo 10% (v/v) de uma solução de MTT (5 mg/ml em PBS). Após incubação por 3 h a 37°C, as placas foram centrifugadas novamente, e o sobrenadante, removido. Esse procedimento de lavagem foi necessário para que não houvesse oxidação do MTT pelos doadores de NO. Finalmente, ao pellet celular foi adicionado álcool isopropílico/HCl 0,04 N (100 µL/poço). Após 10 minutos, os restos celulares foram removidos por centrifugação, e o sobrenadante límpido foi transferido para outra placa, onde foi lido em leitor de placas a 540 nm. A densidade óptica obtida do grupo controle, ou seja, das células sem tratamento, foi considerada como equivalente a 100% de células viáveis. Portanto, quanto maior a densidade óptica obtida no ensaio, maior foi o número de células viáveis.

2.2.6 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro-padrão da média (EPM). Cada experimento foi repetido pelo menos duas vezes, com resultados semelhantes. Para a análise estatística, foi utilizado o teste “t” de Student não pareado, ou análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste *t* de Bonferroni. Um valor de *p* < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

2.3 RESULTADOS

A incubação de células de linhagem leucêmica murinas (L-1210) e humanas (CEM) por 24 h, com concentrações crescentes de SNAP, um doador de NO, causou diminuição do número de células viáveis de maneira concentraçõ-

dependente (Figura 2.1, Painel A). As células CEM foram mais sensíveis ao SNAP (70% de morte, 1 mM) do que L-1210 (40% de morte, 1 mM). A incubação das células L-1210 e CEM com SNAP (1 mM) em intervalos de tempos diferentes mostrou que o efeito citotóxico do NO só foi observado em 24 h (Figura 2.1, Painel B). Para efeito de comparação entre doadores de NO, testamos o efeito citotóxico de dois outros doadores de NO sobre células L-1210. O nitroprussiato de sódio (SNP; Figura 2.1, Painel C) só foi citotóxico em altas concentrações (90% \pm 1% de morte, 1 mM), enquanto o GSNO (S-nitrosoglutathiona) não causou morte celular, mesmo na concentração máxima de 1 mM (Figura 2.1, Painel B).

Para constatar se a morte celular foi realmente causada pelo NO, as células L-1210 foram incubadas com 1 mM de NAP (N-acetil-D,L-penicilamina, o composto não-nitrosilado precursor do SNAP) por 24 h, não havendo morte celular significativa (100% e 99% \pm 4% de células viáveis, para o controle e NAP, respectivamente, n=3). Com a finalidade de verificar a atividade citotóxica do NO produzido por macrófagos ativados contra células leucêmicas, células L-1210 foram incubadas simultaneamente com linhagens de macrófagos murinos J774 ativados com LPS e IFN γ . Como pode ser observado na Figura 2.2, após 24 h de incubação houve uma redução de 54% \pm 6% no número de células L-1210 viáveis. A produção de NO pelos macrófagos ativados foi avaliada pelo aumento dos níveis de nitrito no sobrenadante dessas células. Nessa mesma figura, pode-se observar que o aumento dos níveis de nitrito foi de 38 vezes em relação ao controle, ou seja, do grupo que não foi ativado (2 \pm 0,5 e 40 \pm 2 μ M para os grupos controle e ativados com LPS e IFN γ , respectivamente).

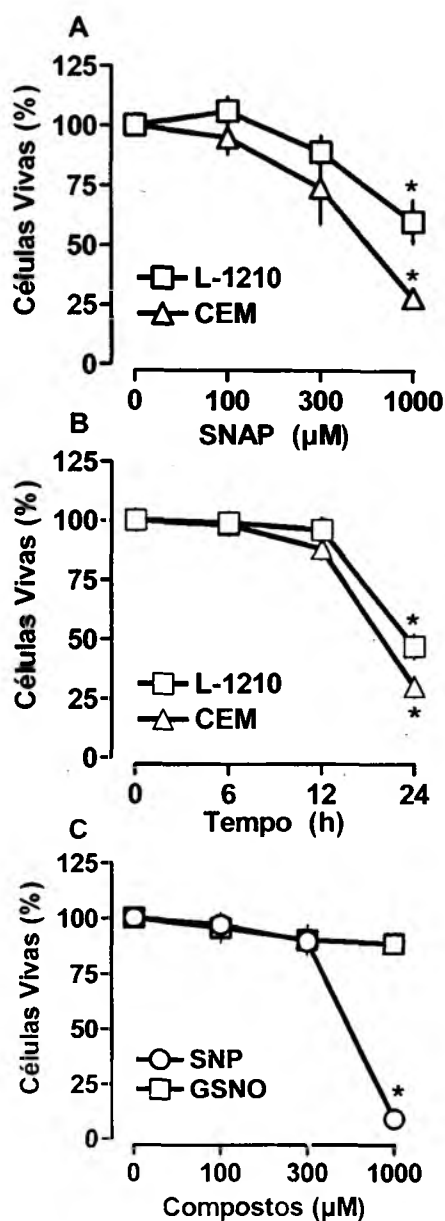


Figura 2.1 - Efeito citotóxico de doadores de NO em linhagens leucêmicas linfoblásticas.

Painel A: Efeito citotóxico do SNAP sobre células leucêmicas murinas (L-1210) e humanas (CEM), **Painel B:** Efeito citotóxico tempo-dependente do SNAP (1000 µM) sobre células leucêmicas murinas (L-1210) e humanas (CEM) e **Painel C:** Efeito citotóxico do GSNO e SNP sobre a linhagem L-1210. Os compostos foram adicionados e incubados por 24 h (painéis A e C), conforme descrito no material e métodos. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm SEM de três amostras. Os mesmos resultados foram obtidos em pelo menos três outros experimentos idênticos. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$ ANOVA seguida de teste t de Bonferroni.

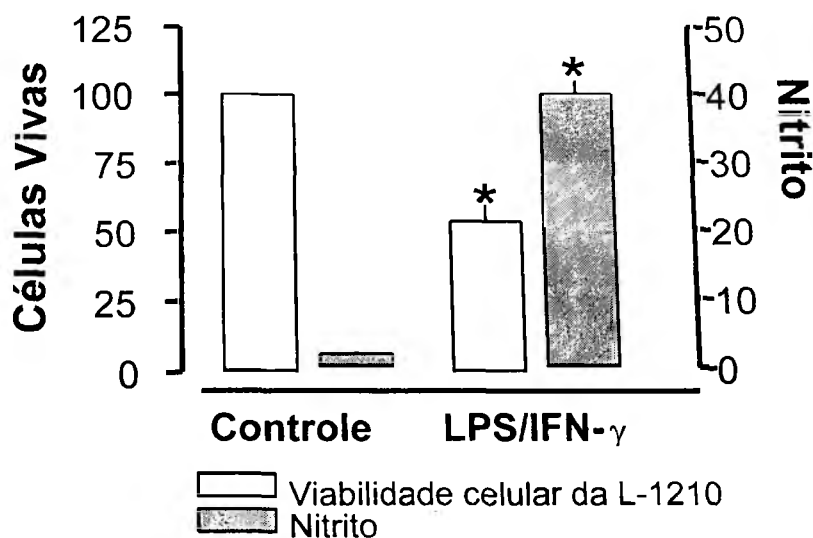


Figura 2.2: Efeito citotóxico do NO, produzido por macrófagos murinos ativados com LPS e IFN γ , sobre células leucêmicas murinas (barras abertas) e produção de nitrito (barras sombreadas).

Os macrófagos (J774) foram ativados com LPS (10 μ g/ml) e IFN- γ (10 U/ml), e após 4 hs células leucêmicas L-1210 foram co-incubadas com os macrófagos por 20 h, conforme descrito em Material e Métodos. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A produção de nitrito pelos macrófagos ativados foi avaliada pelo método de Griess. A densidade óptica do grupo controle corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm SEM de três amostras. Os mesmos resultados foram obtidos em pelo menos três outros experimentos idênticos. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$ teste "t" de Student não-pareado.

Para avaliar a possibilidade de que os efeitos citotóxicos do NO pudessem estar sendo causados pelo ânion peroxinitrito, células L-1210 foram incubadas com concentrações crescentes de SIN-1 por 24 h. No entanto, não houve nenhum efeito nas mesmas concentrações usadas para os doadores de NO (Tabela 2.1).

Tabela 2.1: Efeito citotóxico do SIN-1 (doador de peroxinitrito) em linhagens de células leucêmicas murina L-1210.

Compostos	% células viáveis
Controle	100
SNAP (1000 μ M)	60 \pm 9 *
SIN-1	
100 μ M	91 \pm 6
300 μ M	97 \pm 4
1000 μ M	90 \pm 5

NOTA: As células foram plaqueadas (5×10^5 /poço) em placas de 96 poços, como descrito em Material e Métodos. Os compostos foram adicionados e as células foram incubadas por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm EPM de três amostras. Os mesmos resultados foram obtidos em pelo menos três outros experimentos idênticos. *Estatisticamente diferente do controle $p < 0,05$, ANOVA seguida de teste t de Bonferroni.

2.4 DISCUSSÃO

Está demonstrado que macrófagos ativados em resposta a uma reação imune apresentam atividade citotóxica contra células tumorais (para uma revisão, ver Albina *et al.*, 1998; Hibbs *et al.*, 1988; Drapier & Hibbs, 1988). Além disso, já está descrito que o NO interfere na diferenciação, proliferação e citostase de vários tipos de células tumorais, e, inclusive, de células leucêmicas, porém essa interferência é bastante diversificada e parece depender do tipo de célula, da concentração, da espécie reativa de NO e do doador de NO. Nossos resultados demonstram claramente que o NO é citotóxico para as linhagens leucêmicas estudadas. Essa citotoxicidade deve-se, pelo menos em parte, à cinética de liberação do NO, pois, enquanto os doadores de NO, SNAP e SNP mostraram citotoxicidade de maneira concentração-dependente, o GSNO não foi citotóxico para essas células. O SNP libera NO rapidamente ($t_{1/2}$ de minutos), entretanto o SNAP é considerado um doador de velocidade intermediária ($t_{1/2}$ de 1,3 h), enquanto o GSNO libera NO lentamente ($t_{1/2}$ de 3 h) (Arnelle & Stamier, 1995). A importância da liberação ou produção de NO na citotoxicidade parece estar ligada à capacidade antioxidante de proteção da célula, pois, quando o NO é produzido ou liberado lentamente, os mecanismos antioxidantes são suficientes para proteger as células; no entanto, quando a produção ou liberação excede a capacidade antioxidante da célula, esta não resiste aos efeitos oxidantes causados pelo NO. Além disso, o tempo de exposição ao NO parece ser um fator importante para esgotar a capacidade antioxidante dessas células, pois nossos resultados mostram que o efeito citotóxico do NO foi observado somente após 24 h.

O efeito citotóxico parece realmente ser dependente somente do NO, pois o NAP, o composto não-nitrosilado precursor do SNAP, não causou qualquer alteração na viabilidade das células linfoblásticas. Além disso, macrófagos J774 ativados, que produzem NO na forma de gás, foram eficientes em causar morte nas células leucêmicas L-1210. Esse experimento, embora distante da complexidade fisiológica *in vivo*, mostra-nos a importância fisiológica dos macrófagos na atividade antitumoral. Apesar de vários trabalhos demonstrarem a importância do NO na atividade citotóxica de macrófagos contra células tumorais *in vitro*, pouco se sabe desse mecanismo *in vivo*. O entendimento desse processo *in vivo* poderia abrir novos caminhos no estudo da biologia celular do câncer.

Vários efeitos citotóxicos do NO são atribuídos à sua alta reatividade com o ânion superóxido. Essa reação produz o ânion peroxinitrito, um composto altamente oxidante (Beckman & Koppenol, 1996). O ânion peroxinitrito reage com tióis protéicos e não-protéicos, resíduos de tirosina, ácidos graxos não-saturados e com várias outras moléculas, o que pode levar a sérios danos ao DNA e às mitocôndrias. Na mitocôndria, o peroxinitrito causa extensas alterações protéicas e peroxidação lipídica, que são responsáveis pela inibição irreversível da respiração mitocondrial (Brown, 1999). Trabalhos na literatura mostram que a inibição da cadeia respiratória mediada pelo NO deve-se à formação de peroxinitrito a partir de sua interação com ânion superóxido (MacMillan-Crow *et al.*, 1996; Brown, 1999). No entanto, as células leucêmicas L-1210 parecem ser resistentes aos efeitos oxidantes do peroxinitrito, mesmo em concentrações acima daquelas descritas na literatura, que são suficientes para causar inibição irreversível da cadeia respiratória mitocondrial. Isso sugere que o dano celular causado pelo NO é uma ação direta, independente da formação de peroxinitrito. As razões pelas quais as células leucêmicas L-1210 são resistentes a essa espécie química, notória por sua ação oxidante e citotóxica, ainda são desconhecidas, mas poderiam incluir um bom sistema de defesa antioxidante ou, ainda, que o efeito citotóxico do NO não envolve a inibição irreversível da cadeia respiratória nessas células.

CAPÍTULO 3

PAPEL DO CITOESQUELETO NA CITOTOXICIDADE CAUSADA PELO ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS LINFOBLÁSTICAS LEUCÊMICAS

3.1 INTRODUÇÃO

O citoesqueleto é formado por uma rede complexa de proteínas filamentosas (filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários), que se estendem por todo o citoplasma e exercem um papel importante na manutenção da forma celular, transporte e secreção intracelular, transdução de sinais e ativação de genes (Bershadsky & Vasiliev, 1989; Alberts *et al.*, 1997).

Os microfilamentos (ou filamentos de actina) constituem uma família de filamentos encontrados em todas as células eucarióticas. Os monômeros de actina (G-actina ou actina globular) polimerizam-se, originando os polímeros de actina (F-actina, filamentos de actina ou microfilamentos; para uma revisão, ver Alberts *et al.*, 1997; Cooper, 2000).

Os filamentos intermediários são constituídos de polímeros fibrosos que resistem ao estiramento e desempenham um papel estrutural na célula, mantendo sua integridade. São encontrados no citoplasma da maioria das células animais, mas não de todas, porém sua presença é abundante nas células de vertebrados, particularmente naquelas sujeitas à tensão mecânica. São denominados de intermediários por possuírem um diâmetro intermediário entre os filamentos finos de actina e os microtúbulos (revisto em Alberts *et al.*, 1997).

Os microtúbulos são formados por filamentos de tubulina polimerizada e estão envolvidos em várias funções celulares, entre elas a formação do fuso mitótico necessário para a separação dos cromossomas durante a divisão celular (revisto em Avila, 1990). As tubulinas, por sua vez, são heterodímeros compostos por dois polímeros de 50 KDa denominados de α -tubulina e β -tubulina. Esses dímeros de tubulina possuem a capacidade de polimerização e despolimerização, processo pelo qual os microtúbulos podem sofrer ciclos rápidos de agregação e desagregação e, dessa maneira, exercer suas funções biológicas. Esse processo é muito dinâmico e envolve várias etapas, como nucleação (início do processo de produção do polímero

de tubulina), alongamento (subunidades de tubulina são adicionadas às extremidades livres dos microtúbulos preexistentes), equilíbrio (a polimerização e despolimerização estão em equilíbrio) e despolimerização (desagregação catastrófica). A tubulina está ligada a uma molécula de GTP, que é necessária durante a polimerização. A hidrólise do GTP enfraquece as pontes que mantêm os microtúbulos unidos, favorecendo, dessa maneira, a despolimerização. Além disso, a estabilidade dos microtúbulos é regulada pela presença de algumas proteínas ligadas à tubulina, chamadas de proteínas associadas aos microtúbulos (MAP; revisto em Alberts *et al.*, 1997; Avila, 1997; Cooper, 2000).

Em razão da instabilidade dos dímeros de tubulina, os microtúbulos estão em constante remodelagem. A reorganização maciça dos microtúbulos pode ser observada durante a divisão na fase de mitose do ciclo celular (revisto em Cooper, 2000). Como uma das principais características do câncer é a proliferação descontrolada das células tumorais, os microtúbulos tornaram-se alvo de extensos estudos no tratamento de câncer. Vários estudos clínicos e pré-clínicos com compostos antimicrotúbulos mostram ampla atividade antitumoral contra uma variedade de tipos de células. Vários compostos antimicrotúbulos foram descritos, inicialmente, obtidos a partir de síntese química de substâncias extraídas de plantas e, mais recentemente, de compostos marinhos. Muitos deles podem ligar-se à tubulina, alterando sua polimerização *in vivo* e *in vitro*, e, dessa maneira, interferir na dinâmica dos microtúbulos no citoesqueleto. Entre esses compostos, inclui-se os alcalóides da vinca, a colchicina, e mais recentemente o taxol (para uma revisão, ver Avila, 1997; Jordan & Wilson, 1998).

A colchicina, um alcalóide extraído da *Colchicum autumnale*, que tem sido usado no tratamento de gota desde o tempo dos antigos egípcios. Cada molécula de colchicina liga-se de maneira irreversível à tubulina livre, impedindo sua polimerização, e, dessa forma, impossibilita a mitose e a proliferação celular (revisto em Avila, 1997).

O taxol, denominado paclitaxel pela Organização Mundial de Saúde (OMS), é um taxano diterpênico isolado de cascas do teixo, *Taxus brevifolia* (Wani *et al.*, 1971). Após a sua introdução em ensaios clínicos, a droga foi aprovada para o tratamento de câncer ovariano refratário à cisplatina, em 1992 (Rowinsky *et al.* 1992; Rowinsky & Donehower, 1995). Hoje, o taxol é utilizado no tratamento de vários tipos de câncer, incluindo carcinoma de pulmão, próstata, cabeça e pescoço, e linfoma

(Eisenhauer & Vermorken, 1998), e está na fase I da triagem clínica para o tratamento de leucemias (Rowinsky *et al.*, 1989; Woo *et al.*, 1999). Entretanto, seus benefícios são mais evidentes no tratamento de câncer de mama e ovário (Holmes *et al.*, 1991). A eficiência terapêutica do taxol deve-se aos seus vários mecanismos citostáticos e citotóxicos, incluindo a supressão de síntese protéica (Manfredi & Horwitz, 1982), aumento da sensibilidade de células tumorais a radiações (Liebmann *et al.*, 1994), indução de apoptose (Bhalla *et al.*, 1993) e citólise pela indução do aumento dos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α ; Williams *et al.*, 1992). Esses mecanismos derivam da sua ação sobre os microtúbulos (Schiff *et al.*, 1979; De Brabander *et al.*, 1981), onde o taxol se liga firmemente aos monômeros de tubulina, impedindo a sua despolimerização (Schiff *et al.*, 1979; Manfredi *et al.*, 1982). A estabilização dos microtúbulos resulta na interrupção da divisão celular, mantendo as células na fase G2/M do ciclo celular (Donaldson *et al.*, 1994), o que leva à morte das células neoplásicas, inibindo, assim, a progressão do tumor.

Embora os microtúbulos tenham sido alvo de pesquisas no tratamento do câncer, recentes evidências indicam que eles não são os únicos componentes do citoesqueleto que estão envolvidos na proliferação celular, pois os filamentos de actina também apresentam um papel importante nesse processo. Já está bem descrito na literatura que células transformadas apresentam modificações nos filamentos de actina e que isso ocorre associado a modificações também nas proteínas regulatórias ligadas ao filamento de actina. Essas mudanças refletem a capacidade de proliferação anormal das células neoplásicas e sua habilidade em aderir aos tecidos, aumentado, assim, sua capacidade metastática. Dessa forma, demonstrou-se a possibilidade de os filamentos de actina e proteínas associadas serem alvos na quimioterapia do câncer (para uma revisão, ver Jordan & Wilson, 1998; Pawlak & Helfman, 2001). Hemstreet *et al.* (1996) demonstraram que células malignas são mais sensíveis à citocalasina B do que células normais. As citocalasinas formam um grupo de compostos, originados de fungos, que alteram a polimerização dos filamentos de actina. As isoformas mais usadas são a B e a D. Ambas se ligam de maneira reversível à extremidade “crescente” do filamento de actina, impedindo, assim, o crescimento do filamento pela adição de monômeros de actina, seguido de despolimerização do filamento já formado (revisto em Bershadsky & Vasiliev, 1988; Cooper, 2000).

Recentes estudos indicam que o NO altera a dinâmica do citoesqueleto, tanto em células normais quanto em células transformadas. Doadores de NO e análogos do cGMP inibem a adesão de células mesangiais em proteínas de matriz extracelular através da inibição, via fosforilação, de quinases de adesão focal, importantes na manutenção da integridade dos filamentos de actina (Yao *et al.*, 1998). Em neutrófilos humanos, o NO promove a ADP-ribosilação da actina, fato este que está associado à inibição reversível dos polímeros de F-actina e inibição da adesão (Clancy *et al.*, 1995). O mesmo pode ser observado em células de linhagem leucêmica HL-60, onde o impedimento da formação de F-actina inibe o “*capping*”, que é um evento importante na transdução de sinais da membrana até o núcleo (Lee *et al.*, 1997). O NO pode interagir com resíduos de tirosina e formar a nitrotirosina através de uma reação chamada de nitração. A nitrotirosinação da α -tubulina mediada pelo NO em células de mamíferos altera o funcionamento normal dos microtúbulos, causando dano celular (Eiserich *et al.*, 1999). De maneira indireta, o NO pode interferir no citoesqueleto, aumentando a expressão da proteína 2 associada aos microtúbulos (MAP2; Johnston & Morris, 1994) ou, ainda, ativando-a por meio de fosforilação (Llansola *et al.*, 2001). A MAP2 é uma fosfoproteína neuronal que modula a estabilidade dos microtúbulos e organização espacial na transdução de sinais neuronais.

Como já citado, o NO pode interagir com várias proteínas integrantes do citoesqueleto, alterando sua dinâmica, o que pode resultar em dano celular. Sendo assim, foi objetivo deste capítulo investigar se o efeito citotóxico do NO sobre células linfoblásticas leucêmicas envolvia alterações no citoesqueleto.

Para alcançar esse objetivo, inicialmente estudamos a importância do citoesqueleto na sobrevivência dessas células. Para isso, foram realizados protocolos experimentais contendo curvas concentração-resposta de compostos que alteram a dinâmica do citoesqueleto. A influência das estruturas do citoesqueleto na morte celular foi detectada pelo efeito de compostos em ações específicas sobre os microtúbulos (colchicina e taxol) e microfilamentos (citocalasina B). Depois, sabendo que a dinâmica de polimerização dos microtúbulos e microfilamentos de actina envolve várias proteínas acessórias que regulam sua organização e função, e, ainda, que a inibição de síntese protéica pode levar a uma desordem na organização do citoesqueleto, impedindo a transdução de sinais que levam à proliferação celular, procuramos uma interface entre as alterações no citoesqueleto e a inibição de

síntese protéica. Desse modo, avaliamos o efeito da cicloheximida, um inibidor de síntese protéica, em células L-1210 de linhagem linfoblástica leucêmica murina.

A importância da integridade dos microtúbulos para sobrevivência de células tumorais continua sendo alvo importante de intensas investigações na terapia antitumoral. Como o taxol, um composto estabilizador de microtúbulos, foi citotóxico para as linhagens linfoblásticas leucêmicas L-1210 (murina) e CEM (humana), o primeiro passo experimental em direção à investigação da possibilidade de o efeito citotóxico do NO ser mediado por alterações no citoesqueleto foi pela associação de SNAP e taxol nas células L-1210 e CEM. Os resultados dessa associação nos levaram a acreditar que o efeito citotóxico do taxol não resultava apenas da estabilização dos microtúbulos. O segundo passo, então, foi verificar se os efeitos citotóxicos do NO e do taxol envolviam alterações nos microfilamentos e microtúbulos, ou inibição de síntese protéica. Para verificar esses efeitos, as células leucêmicas foram tratadas com concentrações citotóxicas de SNAP ou taxol e de compostos que alteram a dinâmica do citoesqueleto, ou com inibidor de síntese protéica.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Reagentes

O meio de cultura e o soro fetal (SFB) foram adquiridos da GIBCO (São Paulo, Brasil). O S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina (SNAP) foi preparado em nosso laboratório segundo o método de Field et al. (1978). O taxol foi gentilmente doado pela Bristol-Myers Squibb (São Paulo, Brasil). Todas as soluções foram preparadas em meio de cultura. A colchicina e a citocalasina B foram obtidas da Sigma (St. Louis, MO, USA). Todas as soluções foram preparadas em meio de cultura, exceto a citocalasina B, que foi dissolvida em dimetil-sulfóxido (DMSO).

3.2.2 Linhagens Celulares

Foram utilizadas duas linhagens de células leucêmicas linfoblásticas, L- 1210 (de origem murina) e CEM (de origem humana). As células leucêmicas foram mantidas como descrito na Seção de Material e Métodos do Capítulo 2.

3.2.3 Tratamentos

3.2.3.1 Compostos que alteram a dinâmica do citoesqueleto e inibidor de síntese protéica

Concentrações crescentes de compostos despolimerizantes de microtúbulos (taxol e colchicina), de citocalasina B (despolimerizante de microfilamentos) e de cicloheximida (inibidor de síntese protéica) foram adicionadas às células L-1210 em volume máximo de 20 μ L. Em seguida, as células foram incubadas durante 24 h a 37°C, com 5% de CO₂. Ao final deste período, foi avaliada a viabilidade celular pelo método do MTT.

3.2.3.2 Associação da colchicina, taxol, citocalasina B e cicloheximida com SNAP ou taxol

A colchicina (10 μ M) e a citocalasina B (10 μ M) foram adicionadas às células L-1210, e depois de 3 h de incubação foi adicionado o SNAP (1 mM) ou taxol (10 μ M). O taxol (10 μ M) ou a cicloheximida (25 μ g/ml) foram adicionados juntamente com o SNAP ou o taxol. Após a adição do SNAP ou do taxol, as células retornaram à estufa, onde foram incubadas durante 24 h, nas condições descritas anteriormente. Ao final desse período, a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT.

3.2.4 Associação do SNAP e do taxol

Com o objetivo de analisar a possível interação entre o SNAP e o taxol, foram utilizados dois protocolos experimentais diferentes. No primeiro, o SNAP (300 μ M) e o taxol (10 μ M) foram adicionados separada ou simultaneamente às células leucêmicas linfoblásticas L-1210 (de origem murina) e CEM (de origem humana) em volumes que não excederam a 20 μ l. No segundo protocolo, as células leucêmicas de origem murina (L-1210) foram divididas em dois grupos, A e B. No grupo A, o SNAP foi adicionado às células 6 h, ou 3 h antes, ou simultaneamente ao taxol (cuja adição às células sinalizou o tempo "zero"). No grupo B, as células foram incubadas 6 h ou 3 h com o SNAP (300 μ M). No final da incubação, as placas contendo as

células foram centrifugadas, o sobrenadante, removido, e adicionado, então, meio de cultura fresco. Esse procedimento de lavagem foi necessário para que o SNAP fosse completamente removido do meio. No final da última centrifugação, foram adicionados meio fresco e taxol (10 μ M). Após os diferentes protocolos de tratamento, as células foram incubadas durante 24 h nas mesmas condições descritas anteriormente. Após esse período, a viabilidade celular foi analisada pelo método do MTT.

3.2.5 Viabilidade Celular (Ensaio do MTT)

A viabilidade celular foi analisada pelo método do MTT conforme descrito no Capítulo 2.

3.2.6 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro-padrão da média (EPM). Cada experimento foi repetido pelo menos duas vezes, com resultados semelhantes. Para a análise estatística foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste *t* de Bonferroni. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Efeito citotóxico de compostos despolimerizantes de microtúbulos sobre linhagens leucêmicas linfoblásticas

Quando as células de linhagem leucêmica murinas L-1210 foram incubadas com concentrações crescentes de colchicina durante 24 h, houve diminuição, relativamente discreta, do número de células viáveis (Figura 3.1, Painel A). Na Figura 3.1, Painel B, podemos observar que: a) o taxol também demonstrou citotoxicidade de maneira concentração-dependente; b) o taxol demonstrou maior potência citotóxica para as células L-1210 do que a colchicina, pois na concentração de 30 μ M de taxol houve diminuição de 76% \pm 4% de células viáveis, enquanto na

mesma concentração a colchicina diminuiu apenas $30\% \pm 4\%$ de células viáveis; e c) o efeito citotóxico do taxol foi semelhante para as linhagens de células leucêmicas L-1210 e CEM, em que o efeito máximo observado foi com a concentração de $30 \mu\text{M}$ ($76\% \pm 4\%$ e $83\% \pm 2\%$ de morte celular para L-1210 e CEM, respectivamente).

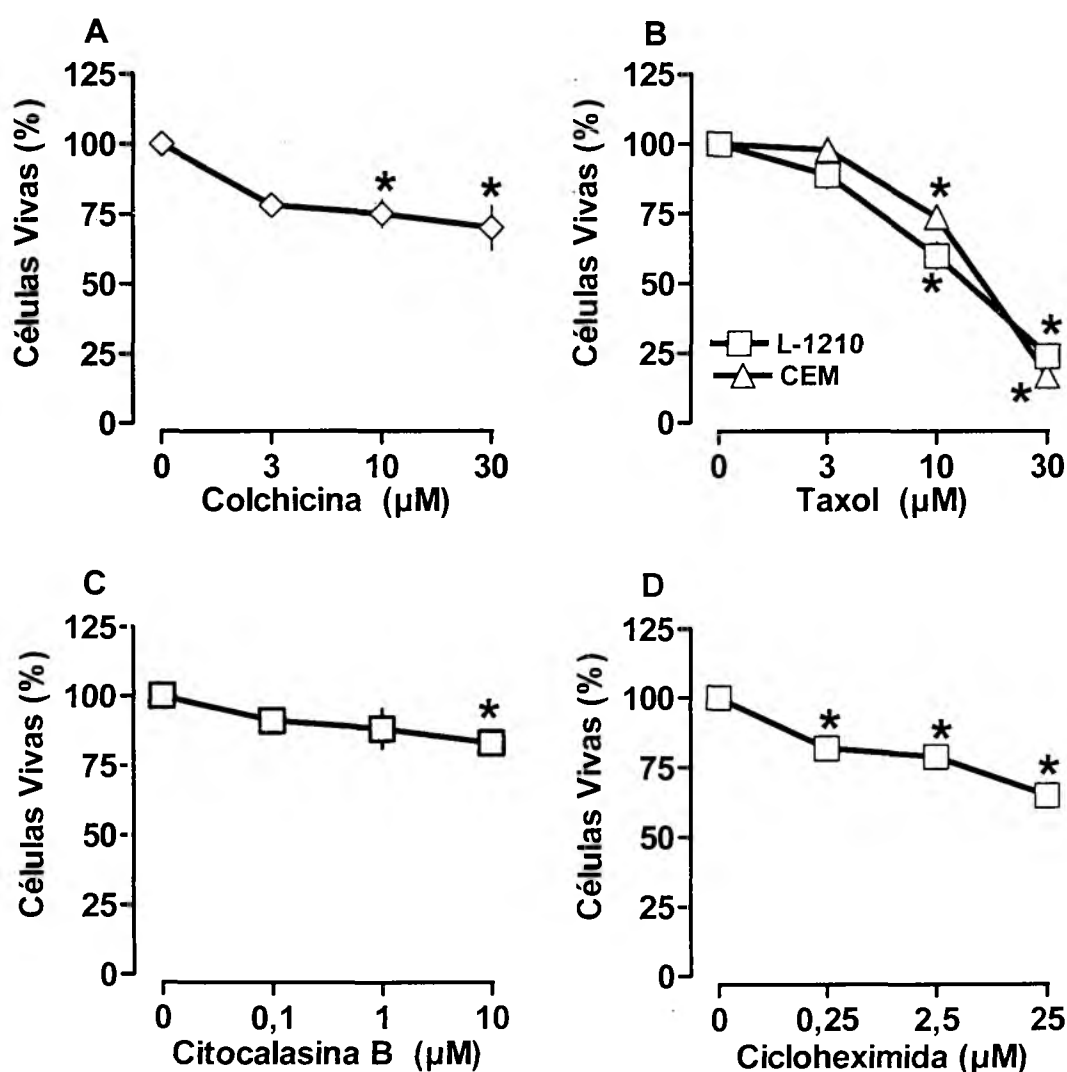


Figura 3.1: Efeito citotóxico de compostos que alteram o citoesqueleto e de um inibidor de síntese protéica sobre células linfoblásticas leucêmicas.

Painel A: Efeito da colchicina (despolimerizante de microtúbulos) sobre células L-1210. **Painel B:** Efeito do taxol (despolimerizante de microtúbulos) sobre células L-1210 e CEM. **Painel C:** Efeito da citocalasina B (despolimerizante de microfilamentos) sobre células L-1210. **Painel D:** Efeito da cicloheximida (inibidor de síntese protéica) sobre as células L-1210. Os compostos foram adicionados e incubados por 24 h, conforme descrito em Material e Métodos. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo-controle corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm EPM de três amostras. Os mesmos resultados foram obtidos em pelo menos três outros experimentos idênticos. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$ ANOVA, seguida de teste t de Bonferroni.

3.3.2 Efeito citotóxico da citocalasina B sobre linhagens leucêmicas linfoblásticas

Como pode ser observado na Figura 3.1, Painel C, a citocalasina B mostrou um efeito citotóxico bastante discreto para as células L-1210 ($17\% \pm 2\%$ de morte celular na concentração de $10 \mu\text{M}$).

3.3.3 Efeito citotóxico da cicloheximida sobre linhagens leucêmicas linfoblásticas

A cicloheximida, um inibidor de síntese protéica, apresentou citotoxicidade para as células L-1210 (Figura 3.1, Painel D), sendo significativa já na primeira concentração testada ($18\% \pm 3\%$ de morte celular). Entretanto, a citotoxicidade desse composto variou pouco em relação ao aumento da concentração ($35\% \pm 2\%$ de morte celular na concentração de $25 \mu\text{g/ml}$).

3.3.4 Efeito de compostos que alteram a dinâmica do citoesqueleto e de inibidor de síntese protéica na citotoxicidade causada pelo SNAP ou taxol em linhagens linfoblásticas leucêmicas

Os resultados apresentados na Tabela 3.1 mostram claramente que a adição de colchicina, citocalasina B ou cicloheximida não alterou o efeito citotóxico do SNAP ou do taxol. Entretanto, quando o SNAP (1 mM) e o taxol ($10 \mu\text{M}$) foram adicionados simultaneamente, houve diminuição expressiva do número de células viáveis (apenas $25\% \pm 5\%$ de células viáveis). Embora não esteja mostrado na Tabela, nós testamos várias combinações de concentrações desses compostos e obtivemos resultados semelhantes.

Tabela 3.1: Efeito da colchicina, do taxol, da citocalasina e da cicloheximida na citotoxicidade causada pelo SNAP ou pelo taxol em células linfoblásticas leucêmicas murinas L-1210.

Compostos	% células vivas
Controle	100
SNAP (1mM)	60 ± 9
+ Colchicina (10 µM)	78 ± 5
+ Cicloheximida (25 µM)	56 ± 2
+ Citocalasina B (10 µM)	77 ± 3
+ Taxol (10 µM)	25 ± 5 *
Controle	100
Taxol (10 µM)	60 ± 5
+ Colchicina (30 µM)	52 ± 2
+ Cicloheximida (25 µM)	56 ± 2
+ Citocalasina B (10 µM)	60 ± 9

NOTA: As células foram plaqueadas (5×10^5 /poço) em placas de 96 poços, como descrito em Material e Métodos. A colchicina e a citocalasina B foram adicionadas às células 3 h antes do SNAP ou do taxol e incubadas 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo-controle corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média ± EPM de três amostras. Os mesmos resultados foram obtidos em pelo menos três outros experimentos idênticos. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao SNAP ou ao taxol, $p < 0,05$ ANOVA, seguida de teste t de Bonferroni.

3.3.5 Efeito da associação do SNAP e do taxol na morte de células linfoblásticas leucêmicas

A associação de concentrações sublimiares (isto é, não-citotóxicas) de SNAP (300 µM) e do taxol (10 µM) nas células L-1210 e CEM causou extensa morte celular em ambas linhagens de células estudadas (29% ± 3% e 31% ± 3% de células viáveis, para L-1210 e CEM, respectivamente; Figura 3.2).

Com o objetivo de se obterem mais informações acerca do substancial decréscimo na viabilidade celular causado pela associação do SNAP com o taxol, dois grupos de células leucêmicas L-1210 foram pré-incubados com SNAP durante 6 h e 3 h antes da adição do taxol. Como mostra a Figura 3.3, Painel B, quando o SNAP não foi removido antes da adição do taxol, a morte celular foi observada quando o SNAP era adicionado às células 3 h antes (47% ± 5% de células mortas)

ou simultaneamente com o taxol ($77\% \pm 5\%$ de células mortas). No Painel C, onde o SNAP foi removido antes da adição do taxol, pode ser observado que não houve morte celular significativa. Como controle positivo, a adição simultânea dos dois compostos causou alta mortalidade celular.

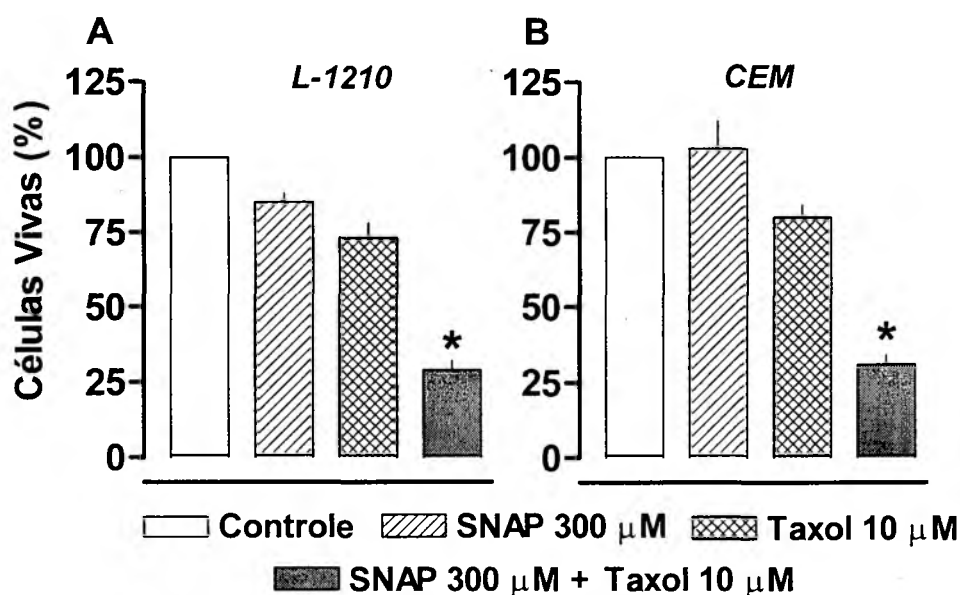


Figura 3.2: Efeito citotóxico da associação do SNAP e do taxol sobre células linfoblásticas leucêmicas.

Painel A: Células leucêmicas murinas (L-1210). **Painel B:** Células leucêmicas humanas (CEM). O SNAP e o taxol foram adicionados separada ou conjuntamente às células, conforme descrito em Material e Métodos. Após 24 h de incubação, 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 idênticos. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo-controle, $p < 0,05$ ANOVA, seguida de teste t de Bonferroni.

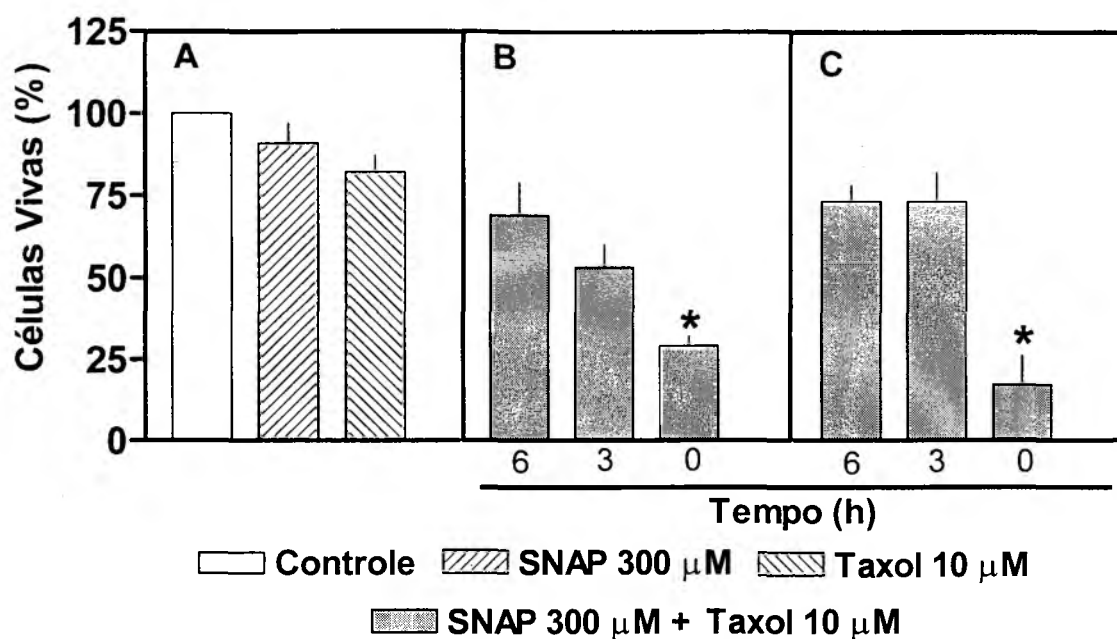


Figura 3.3: Efeito da pré-incubação de SNAP na citotoxicidade causada pelo taxol em células linfoblásticas leucêmicas murina L-1210.

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, como descrito em Material e Métodos. No Painel A, está demonstrado o efeito de concentrações subefetivas de SNAP e de taxol na viabilidade de células L-1210. No Painel B, o SNAP (300 μ M) foi adicionado às células 6 horas, 3 h antes, ou conjuntamente (0 hora) com o taxol (10 μ M). No Painel C, o SNAP foi adicionado às células e, depois de 6 h e 3 h de incubação, foi removido pela lavagem das células com meio fresco, e então o taxol foi adicionado. Após 24 h de incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo-controle corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm EPM de três amostras. Os mesmos resultados foram obtidos em pelo menos três outros experimentos idênticos. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo-controle, $p < 0,05$ ANOVA, seguida de teste t de Bonferroni.

3.4 DISCUSSÃO

A importância da integridade do citoesqueleto na divisão, proliferação e sinalização celular já está bem descrita. Alterações no citoesqueleto caracterizam o resultado final de um processo apoptótico, e, por outro lado, danos ao citoesqueleto causados por drogas que interferem na dinâmica dos microtúbulos e dos microfilamentos podem desencadear apoptose (revisto em Janmey, 1998; Yamazaki *et al.*, 2000). A despolimerização dos microfilamentos de actina demonstrou ter pouca importância nas vias de sinalização de apoptose em células linfoblásticas leucêmicas, já que a citocalasina B não induziu morte substancial dessas células;

mais ainda, pelo fato de a citocalasina não ter alterado o efeito nem do SNAP, nem do taxol, o que pode sugerir que os microfilamentos não tenham papel relevante no mecanismo de morte causado pelo NO e pelo taxol. Como os três tipos de filamentos estão ancorados entre si, pode-se sugerir que o pequeno efeito da citocalasina B ocorreu por uma ação indireta nos microtúbulos. Nossos resultados indicam, contudo, que os microtúbulos têm maior envolvimento nesses eventos.

Vários trabalhos demonstram que drogas que interferem na dinâmica dos microtúbulos causam apoptose em células de linhagens leucêmicas (Bhalla *et al.*, 1993; Martin & Cotter, 1990; Pittman *et al.*, 1994) Nossos resultados corroboram com essas afirmativas, pois o tratamento de células linfoblásticas leucêmicas com colchicina (um composto despolimerizante de microtúbulos) ou com taxol (um composto estabilizador de microtúbulos) causou morte celular. Como já visto na introdução deste capítulo, o taxol e a colchicina interferem de maneira diferente na dinâmica dos microtúbulos; no entanto, isso parece ser importante para a citotoxicidade dessas células, pois a estabilização dos microtúbulos pelo taxol causou mais citotoxicidade do que a despolimerização daquelas estruturas pela colchicina. Em geral, os compostos que interferem nos microtúbulos impedem a formação do fuso mitótico e, desse modo, bloqueiam o ciclo celular, pois essas alterações são reconhecidas por proteínas que compõem o *checkpoint* (pontos de verificação) do ciclo celular. Esse bloqueio, por períodos prolongados, mascara o reconhecimento dos locais de *checkpoint* pelas proteínas envolvidas, e o ciclo celular volta à normalidade. No entanto, há evidências de que o taxol, além de bloquear o ciclo celular, induz a ativação de várias proteínas, tais como JNK, CDKs, Raf1 e Bcl2, envolvidas na regulação da apoptose (para uma revisão, ver Jordan & Wilson, 1998; Gundersen & Cook, 1999; Wang *et al.*, 2000). Portanto, a diferença de potência entre o taxol e a colchicina indica que o efeito citotóxico do taxol em linhagens linfoblásticas leucêmicas não é mediado apenas por alteração nos microtúbulos. Mais ainda, não parece haver envolvimento substancial dos microfilamentos como causadores de apoptose nem como efetores da ação do taxol.

A hipótese de que os efeitos citotóxicos do NO sobre células linfoblásticas leucêmicas poderia ser por meio de alterações no citoesqueleto foi avaliada de forma similar a do taxol, isto é, verificando-se a influência da colchicina e da citocalasina B na citotoxicidade causada pelo SNAP. Da mesma maneira como ocorreu com o taxol, a colchicina e a citocalasina B não interferiram na morte celular

causada pelo NO. Portanto, nossos resultados mostram que a citotoxicidade causada pelo NO também não parece envolver a malha de microtúbulos nem dos microfilamentos.

Uma observação importante do presente grupo de resultados é o fato de que o SNAP e o taxol, quando adicionados simultaneamente às células, causaram mais morte celular do que cada um dos compostos individualmente. Esse achado nos sugeriu duas hipóteses: ou o efeito citotóxico seria o resultado da soma de mecanismos citotóxicos distintos do SNAP e do taxol, ou esses compostos atuariam em mecanismos similares ou iguais e, dessa maneira, teriam um efeito sinérgico aditivo na citotoxicidade para as células linfoblásticas leucêmicas. Para esclarecer qual hipótese estaria correta, realizaram-se outros experimentos utilizando concentrações subefetivas, isto é, não-citotóxicas, de SNAP e de taxol. A associação dos dois compostos resultou numa extensa morte celular, confirmando um sinergismo de ação entre o NO e o taxol. Outro fato interessante é que a pré-incubação dessas células com SNAP, por curtos períodos, diminui o sinergismo de ação entre o NO e o taxol, ou seja, quanto mais próximo da adição de taxol fosse feita a remoção do SNAP, maior era o sinergismo do efeito citotóxico, mostrando que NO interfere no efeito citotóxico do taxol. Portanto, a análise desses resultados sugere que o mecanismo citotóxico do SNAP e do taxol deva ser o mesmo, e, mais ainda, que a presença simultânea do NO é o que permite o sinergismo com o taxol. Esse achado, portanto, permite excluir que o sinergismo ocorra devido a um efeito "residual" do NO. Outra linha de evidências que sugere que o NO e o taxol devam compartilhar mecanismos moleculares similares é o fato de que NO em baixas concentrações apresenta um efeito protetor contra o efeito citotóxico causado por compostos antimicrotúbulos, como, por exemplo, o efeito do taxol em células leucêmicas humanas HL-60 (Pae *et al.*, 1999) e da vincristina em células de neuroblastoma humano NB-39-nu (Ogura *et al.*, 1998). Dessa maneira, pode ser que baixas concentrações de NO "enfraqueçam" os mecanismos efetores de citotoxicidade do taxol, o que diminui o efeito desse composto. Na verdade, esse mecanismo poderia até mesmo explicar a resistência de algumas leucemias à quimioterapia antimicrotúbulos, em que as células leucêmicas se beneficiam do NO produzido pelo hospedeiro, utilizado normalmente para a regulação de funções fisiológicas como vasodilatação, neurotransmissão, etc.

Muitas drogas estão sendo desenvolvidas utilizando-se a inibição de síntese protéica como estratégia terapêutica contra células tumorais (Caraglia *et al.*, 2000). Os resultados mostrados nesta seção com cicloheximida confirmam os dados da literatura, os quais afirmam que a biossíntese protéica é um processo central na sobrevivência das células. No entanto, nossos resultados também mostram que o efeito citotóxico do NO e do taxol não parece envolver inibição de síntese protéica.

Em resumo, nossos resultados indicam que o NO e o taxol são citotóxicos para ambas as linhagens leucêmicas estudadas, que a associação dos dois resulta em um efeito sinérgico citotóxico importante e que parece ser independente de alterações no citoesqueleto ou na síntese protéica.

CAPÍTULO 4

INDUÇÃO DE APOPTOSE PELO ÓXIDO NÍTRICO E PELO TAXOL EM CÉLULAS LINFOBLÁSTICAS LEUCÊMICAS

4.1 INTRODUÇÃO

A morte celular pode ocorrer por dois caminhos distintos: por apoptose, no qual as células ativam um programa de morte programada prolongado; ou por necrose, no qual as células morrem rápida e descontroladamente. *In vivo*, a necrose habitualmente resulta de um dano celular extremo, enquanto a apoptose é a consequência de danos mais brandos ou de sinais extracelulares específicos (Bonfoco *et al.*, 1995).

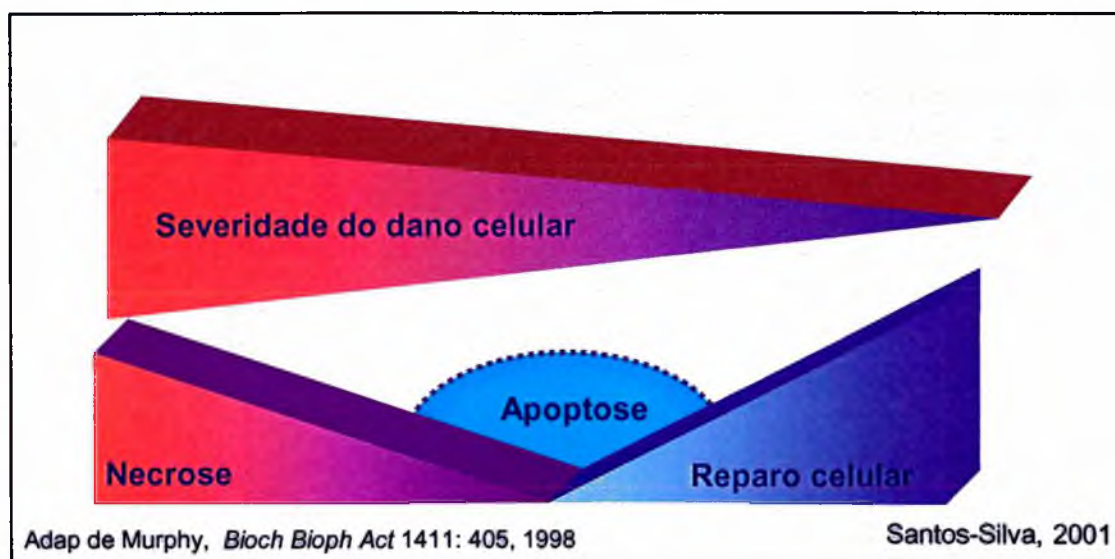
Apoptose, ou morte celular programada, é um processo caracterizado por uma série de alterações morfológicas e bioquímicas específicas, em resposta a estímulos internos e externos, que levam à morte celular em poucas horas. O processo apoptótico é o resultado final do desequilíbrio entre eventos pró e antiapoptóticos que culminam na ativação das caspases. Essas enzimas proteolíticas têm como alvo uma grande gama de proteínas intracelulares, incluindo várias proteínas estruturais. Por isso, durante a apoptose, pode-se observar: i) no núcleo, fragmentação do DNA e condensação da cromatina; ii) na membrana, presença de projeções citoplasmáticas, denominadas *blebs* ("bolhas"), exposição de resíduos de fosfatidilserina e de outros antígenos de superfície, e, finalmente, iii) formação e liberação de corpos apoptóticos (vesículas contendo restos citoplasmáticos e fragmentos de núcleo), que são facilmente reconhecidos e fagocitados pelos macrófagos e por outras células fagocíticas (Quadro 4.1). Diferentemente da necrose, em que ocorre a perda da integridade da membrana, com liberação do seu conteúdo citoplasmático, a apoptose não desencadeia uma resposta inflamatória, sendo normalmente referida como uma morte "silenciosa" (para uma revisão, ver Granville *et al.*, 1998; Lodish *et al.*, 2000).

Quadro 4.1: Diferenças entre apoptose e necrose

	Apoptose	Necrose
Aparência celular	✓ Retração	✓ Aumento do volume
Núcleo	✓ Condensação e lobulação ✓ Fragmentação do DNA	✓ Sem alteração expressiva
Membrana citoplasmática	✓ Formação de protusões (blebs) ✓ Exposição de resíduos de fofatidilserina	✓ Lise ✓ Extravasamento do conteúdo celular
Mitocôndria	✓ Sem alteração expressiva	✓ Aumento do volume
Metabolismo	✓ Expressão de genes (Bcl-2, Bax) ✓ Síntese protéica ✓ Ativação de proteases	✓ Sem alteração expressiva

Concentrações elevadas de NO provocam estresse oxidativo, causando danos ao DNA e ativação da PARP, alterações no metabolismo energético celular, na função mitocondrial e homeostase do cálcio. Todos esses eventos ocorrem simultaneamente, e o grau de intensidade do dano celular causado pelo NO está associado com a capacidade antioxidante das células que são inerentes às características individuais de cada tipo celular. Na presença de um dano, uma célula pode seguir um de três caminhos: reparar o dano, entrar em apoptose ou morrer por necrose (Esquema 4.1). Se o dano for suficientemente extenso para depletar os níveis de ATP ou inativar as caspases, a apoptose torna-se impossível, e a célula morre por necrose. Se o dano for mais moderado, a célula consegue induzir a proteína p53 e reparar o dano durante a parada do ciclo celular ou deliberadamente induzir apoptose. Em algumas situações, a célula pode iniciar um processo de

apoptose e depois, com a depleção de ATP e a inativação de caspases, progredir para necrose (Leist & Nicotera, 1997; Murphy, 1998).



Esquema 4.1: Resposta celular diferencial dependente da severidade do dano.

Numerosos trabalhos têm analisado o papel do NO na apoptose, mas os resultados ainda são conflitantes, pois, em algumas situações, o NO ativa vias de transdução de sinais que levam à apoptose, enquanto, em outros casos, o NO parece proteger células da apoptose. Essa propriedade dualista parece depender do tipo celular e da concentração do NO (para uma revisão, ver Kolb, 2000).

Os efeitos citotóxicos do taxol também parecem depender das características individuais de cada célula. Em algumas células, o taxol exerce apenas efeito citostático, enquanto, em outras, induz a ativação de várias proteínas, como JNK, CDKs, Raf1 e Bcl2, envolvidas na regulação da apoptose (Wang *et al.*, 2000), ou induz o aumento dos níveis de TNF- α , o que leva à citólise (Williams *et al.*, 1992).

Como os resultados do presente trabalho, até este ponto, nos deram indicativos de que o NO e o taxol pudessem estar atuando no mesmo mecanismo (ou mecanismos similares) para causar citotoxicidade em células de linhagem leucêmica, o objetivo seguinte foi verificar se o NO e o taxol induziam morte celular por apoptose. Para isso, as células L-1210 foram incubadas com SNAP e com taxol por 24 horas, e depois a viabilidade celular foi avaliada pelo método de fluorescência. Nesse método, pode-se caracterizar as células apoptóticas de duas maneiras: por meio de diferenças na permeabilidade aos corantes fluorescentes e por alterações morfológicas características. Em seguida, investigamos o

envolvimento da ativação das caspases na apoptose induzida pelo NO e pelo taxol, por meio da quantificação da atividade de enzimas da classe da CPP32 (caspase 3), a qual é considerada uma molécula executora-chave em vários processos apoptóticos.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Reagentes

O meio de cultura e o soro fetal (SFB) foram adquiridos da GIBCO (São Paulo, Brasil). O S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina (SNAP) foi preparado em nosso laboratório segundo o método de Field et al. (1978). O taxol foi gentilmente doado pela Bristol-Myers Squibb (São Paulo, Brasil). O laranja de acridina, o brometo de etídio e o substrato peptídico Ac-DEVD-pNA foram adquiridos da Merck (São Paulo, Brasil), da GIBCO (São Paulo, Brasil) e da BioSource International Inc. (Califórnia, USA), respectivamente. O SNAP e o taxol foram preparados em meio de cultura; o laranja de acridina e o brometo de etídio, em PBS.

4.2.2 Linhagem Celular

Foi utilizada a linhagem de células leucêmicas linfoblásticas murinas, L-1210. As células leucêmicas foram mantidas como descrito anteriormente, no capítulo 2.

4.2.3 Tratamentos

O SNAP e o taxol foram adicionados às células num volume máximo de 20 μ L. Em seguida às adições de compostos, as células foram incubadas por 8 h para determinação da atividade de caspases, ou por 24 h para viabilidade celular, ambas a 37°C, com 5% de CO₂.

4.2.4 Viabilidade Celular (Microscopia de Fluorescência)

As células apoptóticas foram visualizadas usando dois corantes fluorescentes: o laranja de acridina, que é permeável à membrana, e o brometo de etídio, que é impermeável, nas concentrações de 10 e 5 µg/ml, respectivamente (Geng *et al.*, 1998).

De forma resumida, 10 µl da suspensão de células foram transferidos para lâminas de vidro, onde foi adicionado o mesmo volume do reagente fluorescente. Esse reagente foi preparado na hora do ensaio e consiste na mistura de volumes iguais do reagente laranja de acridina (10 µg/ml) e do brometo de etídio (5 µg/ml). A mistura de células e corantes fluorescentes foi recoberta com lamínula e selada com esmalte de unha. Esse procedimento foi necessário para que não houvesse ressecamento da mistura. Após incubação por 10 min à temperatura ambiente, as lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-FLA), usando objetiva de 40x. Nesse ensaio, as células viáveis exibem coloração verde (proveniente do laranja de acridina), e as apoptóticas exibem coloração alaranjada (proveniente do brometo de etídio). Campos representativos foram fotografados com filme Kodak, ASA 100. As fotos foram digitalizadas, e as imagens, tratadas com o programa PhotoEditor, da Microsoft Corporation, USA.

4.2.5 Determinação da Atividade da Caspase 3

A atividade enzimática da caspase 3 foi avaliada por meio da sua atividade sobre o substrato peptídico Ac-DEVD-pNA, cuja seqüência equivale ao sítio de reconhecimento de clivagem da caspase 3 nos seus substratos protéicos. O substrato Ac-DEVD-pNA é composto por um tetrapeptídeo sintético DEVC (Asp-Glu-Val-Asp) e pelo cromóforo p-nitroanilida (pNA). Na presença da caspase 3, o substrato é clivado em dois fragmentos. A pNA livre tem coloração amarela, cuja intensidade é proporcional à quantidade de pNA livre, que, por sua vez, é proporcional à atividade da enzima. No final dos tratamentos, as placas contendo as células (5×10^5 células/ml) foram centrifugadas, o sobrenadante foi removido, e adicionado, então, PBS. Esse procedimento foi repetido duas vezes para remoção de proteínas do meio de cultura. O *pellet* celular foi ressuspensão com 200 µL de

tampão A (100 mM HEPES, 140 mM NaCl e coquetel de inibidores de proteases, incluindo 0,5 mM PMSF, 5 µg/ml pepstatina e 10 µg/ml leupeptina, pH 7,4). A suspensão foi lisada em ultra-som (Ultrasonic Processor, Cole-Parmer, IL, USA). O citosol foi obtido a partir da centrifugação dos lisados a 12.000 g por 20 min, a 4°C. A concentração protéica citosólica foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A reação enzimática consistiu na mistura de 100 µg da proteína citosólica (100 µl) e de 400 µM de Ac-DEVD-pNA dissolvido em 100 µl de tampão B (100 mM HEPES, 20% de glicerol e coquetel de inibidores de proteases, pH 7,4). Após um período de 3 h a 37°C, a densidade óptica foi quantificada em leitor de placas a 405 nm.

4.2.6 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. Cada experimento foi repetido pelo menos duas vezes, com resultados semelhantes. Para a análise estatística, foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste *t* de Bonferroni. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.3 Resultados

4.3.1 Indução de Apoptose em Linhagens de Células Leucêmicas Linfoblásticas

L-1210

Quando as células leucêmicas murinas L-1210 foram incubadas com concentrações crescentes de SNAP (100, 300 e 1000 µM) e taxol (3, 10 e 30 µM) durante 24 h, houve diminuição do número de células viáveis, conforme mostrado nos capítulos precedentes. Como pode ser observado na Figura 4.1, no grupo controle (Painel A), as células apresentaram, quase na sua totalidade, uma coloração esverdeada, que corresponde ao grande número de células viáveis. Nos Painéis B e C, que mostram células incubadas com SNAP (1mM) e com taxol (10 µM), respectivamente, a maioria das células apresentou coloração alaranjada,

característica de células apoptóticas. Além da perda de seletividade da permeabilidade membranar, a morfologia celular observada foi característica de apoptose, como redução da relação núcleo/citoplasma, diminuição do tamanho celular, condensação da cromatina, multilobulação nuclear, e presença de *blebs* citoplasmáticos.

4.3.2 Efeito do SNAP e o do Taxol sobre a Atividade da Caspase 3

A incubação das células L-1210 com SNAP (1 mM) ou taxol (10 μ M) por 6 h causou acentuada diminuição da atividade da caspase 3, quando comparada ao grupo-controle (células sem tratamento). Em paralelo, foi realizada a viabilidade celular pelo MTT, após incubação de 24 h com SNAP ou taxol. Nesse experimento, os resultados apresentaram-se semelhantes àqueles encontrados anteriormente. O SNAP e o taxol reduziram o número de células viáveis para $60\% \pm 9\%$ e $65\% \pm 3\%$, respectivamente, quando comparados ao controle. Vale ressaltar que o SNAP e o taxol não causaram morte celular com 8 h de incubação.

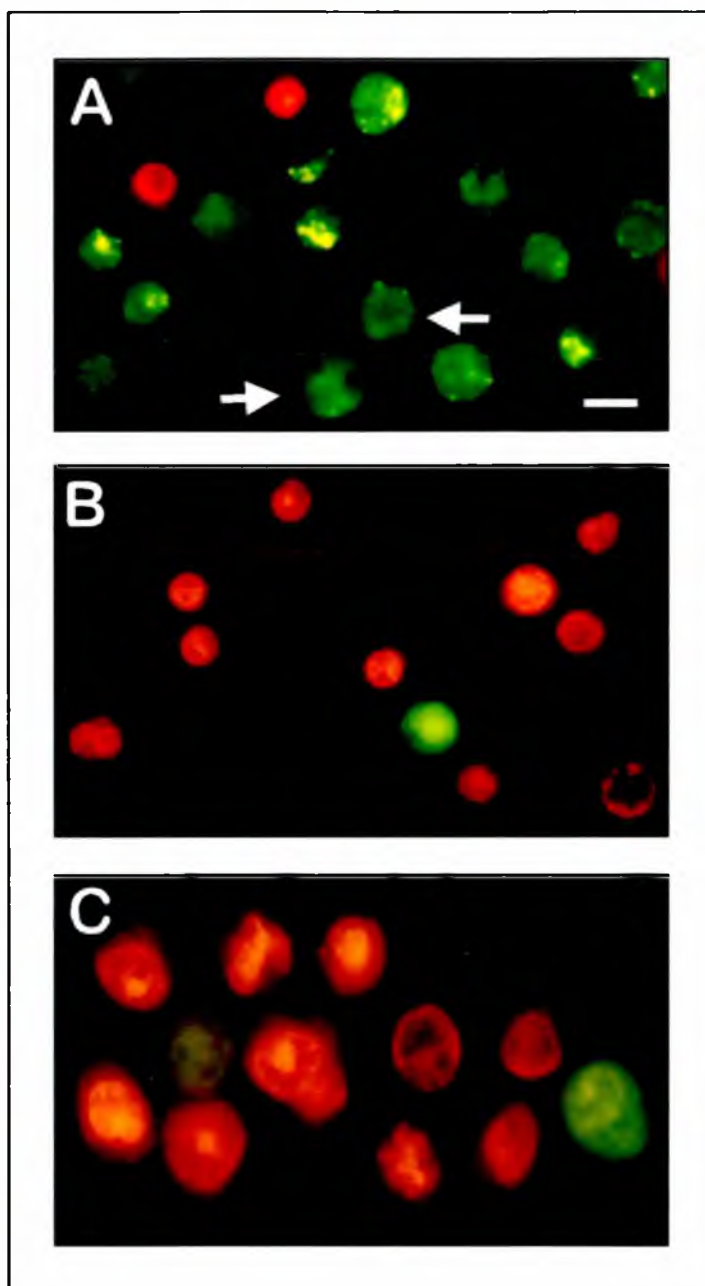


Figura 4.1: Alterações morfológicas em células leucêmicas linfoblásticas L-1210 induzidas por SNAP ou por taxol.

Painel A: Controle, **Painel B:** SNAP 1 mM e **Painel C:** taxol 30 μM . As células foram incubadas com os compostos por 24 h e a viabilidade celular foi avaliada pelo método de fluorescência com laranja de acridina e brometo de etídio, conforme descrito em Material e Métodos. Campos representativos foram fotografados. As células viáveis exibem coloração verde, e as apoptóticas exibem coloração alaranjada. A barra representa 10 μm , e o aumento total é de 400x (Painéis A e B), e de 1000x (Painel C).

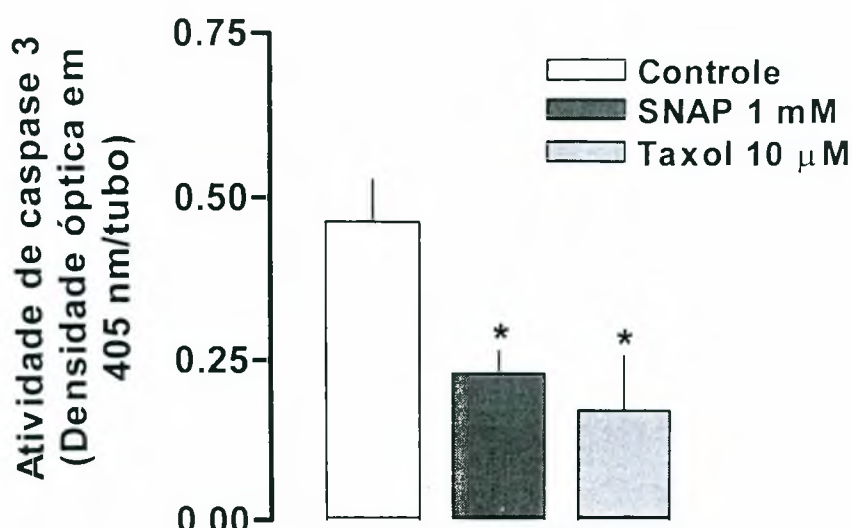


Figura 4.2: Efeito do SNAP e do taxol na atividade de caspase 3 em células linfoblásticas leucêmicas L-1210.

O SNAP e o taxol foram adicionados às células, conforme descrito em Material e Métodos. Após 8 h de incubação, as células foram lisadas, e a atividade de caspase 3 foi avaliada com o substrato peptídico específico Ac-DEVD-pNA por 3 h a 37°C. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de três amostras. Os mesmos resultados foram obtidos em pelo menos três outros experimentos idênticos. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. $p < 0,05$ ANOVA, seguida de teste t de Bonferroni.

4.4 DISCUSSÃO

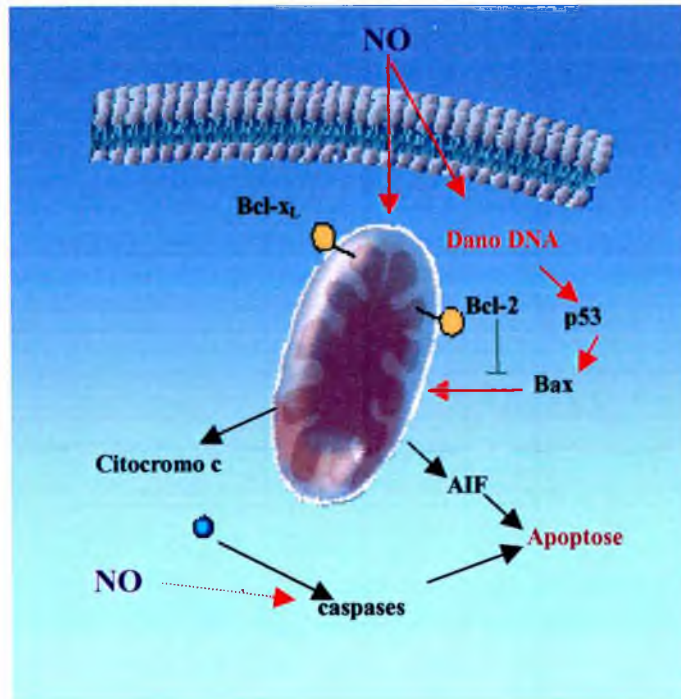
O fato de uma célula entrar em apoptose é o resultado do desequilíbrio entre efetores pró e antiapoptóticos intracelulares. Há evidências de que o NO, em concentrações relativamente baixas, próximas daquelas encontradas na fisiologia normal, tenha ações antiapoptóticas, como, por exemplo, pela inibição da atividade das caspases por S-nitrosilação, por indução de proteínas antiapoptóticas ou pelo aumento dos níveis de cGMP. Por outro lado, o NO, em altas concentrações, tem ações pró-apoptóticas, por meio da sua interação com oxigênio molecular ou com o radical superóxido, formando compostos altamente oxidantes, os quais inibem enzimas importantes para o metabolismo celular e diminuem os níveis de glutathiona intracelular. Assim, a diferente suscetibilidade das células a esses múltiplos fatores (fisiológicos ou patológicos) pode conduzi-las à apoptose ou necrose, dependendo do tipo de célula e da concentração do NO (Kröncke *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998).

Nossos resultados mostram claramente que o efeito citotóxico do NO e do taxol sobre células leucêmicas linfoblásticas L-1210 dá-se por apoptose, pois as células tratadas com esses compostos apresentaram características morfológicas compatíveis com apoptose, tais como condensação da cromatina, multilobulação nuclear, presença de *blebs* citoplasmáticos e aumento da relação núcleo/citoplasma.

Recentemente, foi descrito que a ativação da caspase 3 é um pré-requisito para a seqüência de eventos que levam à ativação da DNAase, responsável pela conseqüente quebra do DNA e pelas alterações morfológicas encontradas nas fases finais da apoptose (Enari *et al.*, 1998). Enquanto alguns trabalhos mostram que a apoptose induzida pelo NO é mediada pela ativação da caspase 3 (Yabuki *et al.*, 1997; Brüne *et al.*, 1998, Messmer *et al.*, 1998), outros demonstram que o NO pode interagir com a cisteína presente no sítio catalítico da caspase 3 e, dessa maneira, inativá-la por S-nitrosilação (Dimmeler *et al.*, 1997; Mohr *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997; Melino *et al.*, 1997). Nossos resultados foram claros em relação a essa questão, pois tanto o NO quanto o taxol inibiram a atividade da caspase 3 nas células leucêmicas L-1210. Essa aparente contradição com o fato de que tanto o NO quanto o taxol causam apoptose pode significar várias possibilidades. Uma delas seria a de que o NO e o taxol induzem apoptose por mecanismos independentes de caspases. De fato, embora a caspase 3 tenha um papel fundamental na apoptose de algumas células, esse cenário não parece ser universal, e sim dependente do tecido, do tipo de célula e de estímulos citotóxicos específicos (Porter & Jänicke, 1999). A inibição da caspase 3 pelo taxol provavelmente ocorreria por um mecanismo indireto, pela fosforilação e inativação do fator Bcl-2 (Yamazaki *et al.*, 2000), que controla a liberação do citocromo c da mitocôndria, que, por sua vez, ativa a caspase 3 (Haldar *et al.*, 1995). Já está esclarecido que uma variedade de estímulos induz alterações na função mitocondrial que seriam suficientes para causar morte celular na ausência da ativação das caspases (Green & Kroemer, 1998). Entretanto, na apoptose independente de caspases, não há alterações morfológicas características resultantes da ativação da caspase 3, como, por exemplo, a fragmentação do DNA e a formação de *blebs* na membrana citoplasmática, pois essas alterações representam o resultado da atividade proteolítica dessa enzima sobre várias proteínas envolvidas na regulação do citoesqueleto, entre elas α -foldrina e gelsolin, e sobre o ICAD (inibidor de DNAase dependente de caspases ativada) (Green & Reed, 1998). Como nossos resultados evidenciaram características morfológicas

típicas da ativação da caspase 3, é de se supor que essa protease esteja sendo ativada em algum momento do processo. Assim, é possível que o tempo de análise da atividade da caspase (8 h após o estímulo), embora baseado na literatura, não seja adequado para nosso tipo celular. Pode ser que nesse tempo, a caspase 3 já tenha sido “alvo” da ativação das caspases iniciadoras, como descrito no Capítulo 1. Outra possibilidade é que, nessas células, a caspase 3 seja menos importante que as demais, mas, como o substrato que foi utilizado é específico para a caspase 3, não estaríamos dosando a atividade da caspase principal. Nesse sentido, o relato mostra que a ativação da caspase 7, que tem função proteolítica semelhante à da caspase 3 sobre α -foldrina, gelsolin e ICAD (Porter & Jänicke, 1999), pode dar suporte a essa hipótese e explicar essas alterações morfológicas encontradas. Finalmente, outra possível explicação para a dissonância entre as alterações morfológicas e a redução da atividade da caspase 3 seria pela perda da polaridade da membrana plasmática, condensação da cromatina e degeneração do DNA, causadas pelo fator indutor de apoptose mitocondrial (AIF) liberado pela mitocôndria durante a apoptose independente de caspases (Daugas *et al.*, 2000; Doerfler *et al.*, 2000).

Assim, embora se evidencie uma redução da atividade de caspase 3 tanto pelo NO quanto pelo taxol, nossos resultados, pelas razões discutidas acima, não permitem assegurar que a apoptose induzida por esses dois compostos seja totalmente independente da ativação de caspases, em vista do padrão morfológico encontrado nas células. Entretanto, os dados sugerem que, mesmo na eventualidade da participação importante de outras caspases na apoptose induzida por NO e por taxol, a caspase 3 não parece ser a executora principal dessa apoptose. Finalmente, vale lembrar que o efeito do NO e do taxol na caspase 3 consistiu de uma redução da atividade (da ordem de 50%), e, dessa maneira, a parcela restante da caspase 3 ainda poderia ser responsável por uma participação substancial no fenômeno. O Esquema 4.2 ilustra algumas possibilidades para explicar os efeitos citotóxicos do NO e do taxol, seja por mecanismos independentes de caspases, seja pela ativação de caspases diferentes da caspase 3.



Esquema 4.2: Seqüência hipotética dos eventos pós-mitocôndria na apoptose causada pelo NO.

NO, óxido nítrico; AIF, fator indutor de apoptose; p53, proteína p53; Bcl-2, Bcl-xL e Bax, proteínas da família Bcl-2.

CAPÍTULO 5

ENVOLVIMENTO DA ATIVIDADE DO NF- κ B NA CITOTOXICIDADE CAUSADA PELO ÓXIDO NÍTRICO E PELO TAXOL EM CÉLULAS LINFOBLÁSTICAS LEUCÊMICAS

5.1 INTRODUÇÃO

A sobrevivência das células do nosso organismo é dependente da sua habilidade em responder rápida e eficientemente a diferentes estímulos provenientes do meio externo. Frequentemente, isso ocorre por meio de mudanças no programa de expressão gênica que conduz à síntese de proteínas relevantes. Ocasionalmente, a resposta celular torna-se descontrolada e, em decorrência disso, pode ocorrer o aparecimento de células que não respondem adequadamente aos estímulos normais, iniciando um processo de tumorigênese. As células eucarióticas possuem várias vias de transdução de sinais, que são os eventos que fazem a ligação entre os estímulos externos e as mudanças específicas na expressão gênica. Uma dessas vias envolve a participação do fator de transcrição NF- κ B, que responde rapidamente a vários estímulos de estresse (químicos, físicos, oxidantes, etc.). O NF- κ B tem um papel importante no desenvolvimento e na diferenciação celular, na apoptose e na resposta adaptativa a mudanças no balanço redox da célula. Vários trabalhos demonstram que a regulação aberrante da ativação do NF- κ B está associada a várias doenças, inclusive o câncer (Mercurio *et al.*, 1999).

O fator de transcrição NF- κ B (do inglês, *Nuclear Factor kappa B*) foi originalmente descrito em linfócitos B maduros como sendo responsável pela transcrição do gene da cadeia leve *kappa* da imunoglobulina, de onde advém seu nome (Sen *et al.*, 1986). Durante algum tempo, acreditou-se que ele fosse exclusivo de linfócitos B maduros e presente constitutivamente no núcleo destas células. Mais tarde, observou-se que o NF- κ B, na grande maioria das células, estava no citoplasma, associado a uma proteína inibitória, a I κ -B, e, dessa forma, permanecia inativo a maior parte do tempo. Isso se deve ao fato de que os primeiros ensaios utilizavam apenas os núcleos celulares, o que impedia a visualização do fator no citoplasma.

A ativação constitutiva do NF- κ B não é uma característica exclusiva dos linfócitos B maduros, tendo um papel importante na manutenção de fenótipos de várias outras células já diferenciadas, como, por exemplo, neurônios, plasmócitos, macrófagos, etc. (para uma revisão, ver Ghosh *et al.*, 1998).

O NF- κ B é um dímero formado por duas proteínas da família *Rel*. Cinco proteínas foram clonadas e caracterizadas em células de mamíferos: Rel A (também conhecida como p65), c-Rel, Rel B, NF- κ B₁ (p50/p105) e NF- κ B₂ (p52/p100). Do NF- κ B₁ e NF- κ B₂ originam-se a p50 e a p52, por clivagem proteolítica. Entretanto, a primeira molécula a ser descrita era constituída pelas subunidades p50 e p65. Por isso, muitas vezes, essas subunidades são referidas como sendo o próprio NF- κ B, e não apenas como uma das muitas formas variantes (revisado em Ghosh *et al.*, 1998). As diferentes combinações dos monômeros protéicos conferem grande especificidade no reconhecimento das seqüências de DNA em cada variante e, conseqüentemente, regulação diferencial da expressão gênica. Além disso, existe diferença na capacidade de transativação de cada tipo de NF- κ B, ou seja, diferentes combinações podem ser mais ou menos eficientes em induzir a expressão de certos genes, provavelmente por interagir de forma desigual com o complexo de transcrição basal e/ou outros fatores de transcrição. Apesar de a grande maioria dos NF- κ B estar associada à ativação da transcrição gênica, certos dímeros podem funcionar como complexos de inativação ou repressão da transcrição de alguns genes. Dessa forma, p50/p65, p50/c-Rel, p65/p65 e p65/c-Rel são ativadores de transcrição, enquanto os homodímeros p50 e p52 são repressores (revisado em Ghosh *et al.*, 1998).

Cada membro dessa família possui uma região conservada de 300 aminoácidos chamada de RHD (do inglês, *Rel Homology Domain*). Nessa região encontram-se os sítios responsáveis pela ligação ao DNA, associação ao I κ -B e dimerização. Nessa região também se encontra a seqüência de localização nuclear que, uma vez exposta, participa da translocação do fator do citoplasma para o núcleo (revisado em Ghosh *et al.*, 1998).

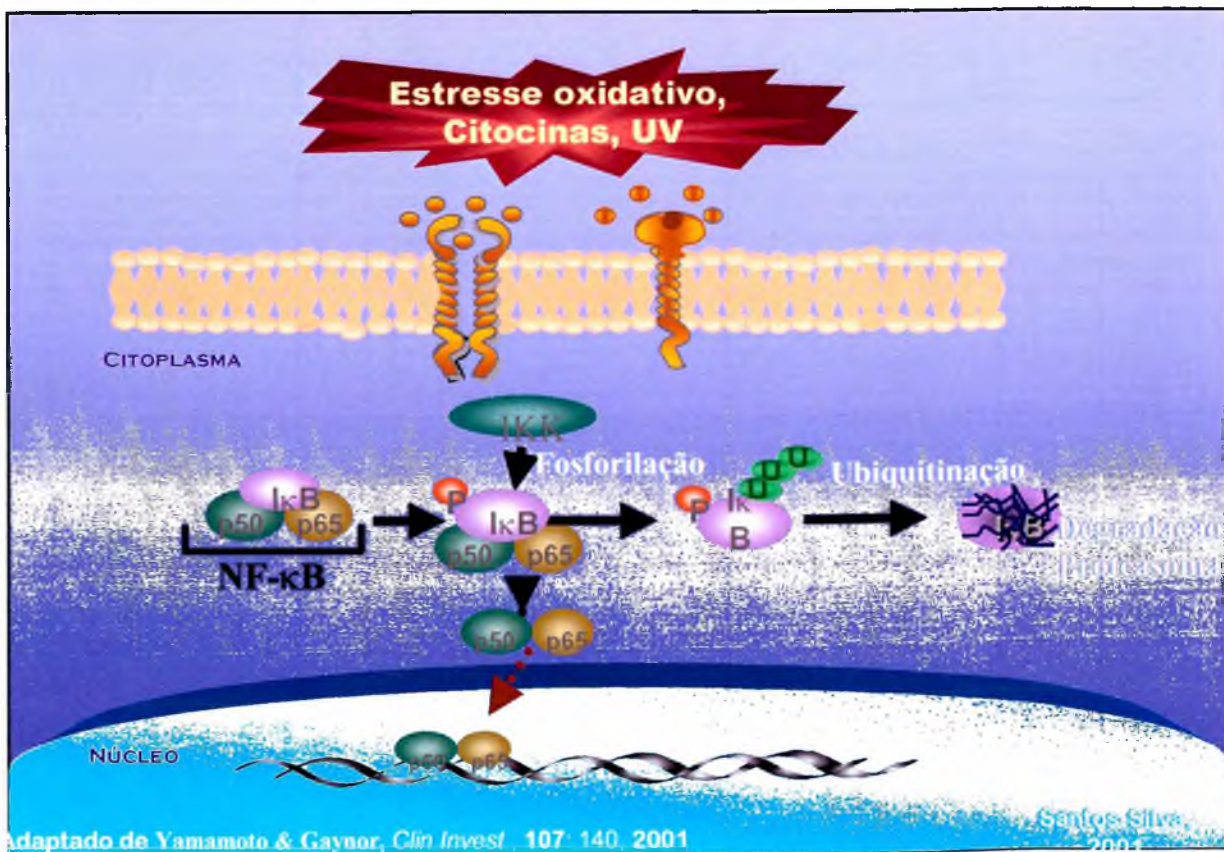
Como já mencionado, a ativação do NF- κ B é regulada pelo seu inibidor citoplasmático, o I κ -B. Vários genes I κ -B foram identificados, como I κ -B α , I κ -B β , I κ -B ϵ e I κ -B γ . O produto desses genes tem como função impedir a translocação do NF- κ B para o núcleo. O I κ -B interage fisicamente com o NF- κ B, bloqueando a sua

seqüência de reconhecimento no DNA. Diferentemente dos outros membros dessa família, o Bcl-3 estimula a transcrição, pois interage com as subunidades p50 e p52 do NF- κ B, promovendo sua localização nuclear (para uma revisão, ver Mayo *et al.*, 2000). Essas proteínas inibitórias possuem múltiplas regiões de homologia, chamadas de repetições de anquirina. Esses domínios são regiões de interação proteína/proteína. A interação específica entre as repetições de anquirinas e as regiões RHD parece ser crucial na regulação do NF- κ B. Além disso, essas repetições de anquirina formam sítios de ligação entre as proteínas de membrana e a tubulina, mostrando que o estado de ativação do NF- κ B também pode ser modulado pelo citoesqueleto. Rosette *et al.* (1995) demonstraram que a despolimerização de microtúbulos aumenta a degradação de I κ -B, ativando o NF- κ B e induzindo, assim, a expressão gênica. Cada I κ -B difere no número de repetições de anquirina, aparentemente influenciando na especificidade com que cada I κ -B ligue-se com os dímeros da família Rel. Algumas proteínas da família Rel, como o p105 e o p100, também apresentam os domínios com repetições de anquirina, podendo, muitas vezes, ser classificadas como pertencentes à família das I κ -B (revisto em Ghosh *et al.*, 1998).

Como pode ser visto no Esquema 5.1, o NF- κ B pode ser ativado rapidamente por uma variedade de estímulos, incluindo citocinas inflamatórias, assim como TNF- α e IL-1, sinais de ativação de células T, fatores de crescimento, mitógenos, radiação e indutores de estresse. A ativação do NF- κ B está associada, normalmente, com a fosforilação do I κ -B, o que muda sua afinidade pelo NF- κ B. Recentemente, um complexo quinase conhecido como I κ -B quinase (IKK) foi identificado e, quando ativado, fosforila os resíduos Ser32 e Ser36 do I κ -B α , o que resulta na sua dissociação do NF- κ B (para revisão, ver Karin & Ben-Neriah, 2000). Uma vez dissociado do seu inibidor, o NF- κ B transloca-se para o núcleo, onde se liga às seqüências específicas de DNA presentes nas regiões regulatórias de genes envolvidos nas respostas imunes, inflamatórias, controle de crescimento celular e apoptose, modulando a transcrição desses genes. Enquanto isso, o I κ -B dissociado do NF- κ B sofre ubiquitinação, que o marca para ser degradado por um complexo multienzimático proteolítico, o proteasoma (revisto em Ghosh *et al.*, 1998). A

degradação do I κ B é controlada por três complexos protéicos: I κ B quinase (IKK), I κ B ligase da ubiquitina e 26S proteasoma (para revisão, ver Karin & Ben-Neriah, 2000).

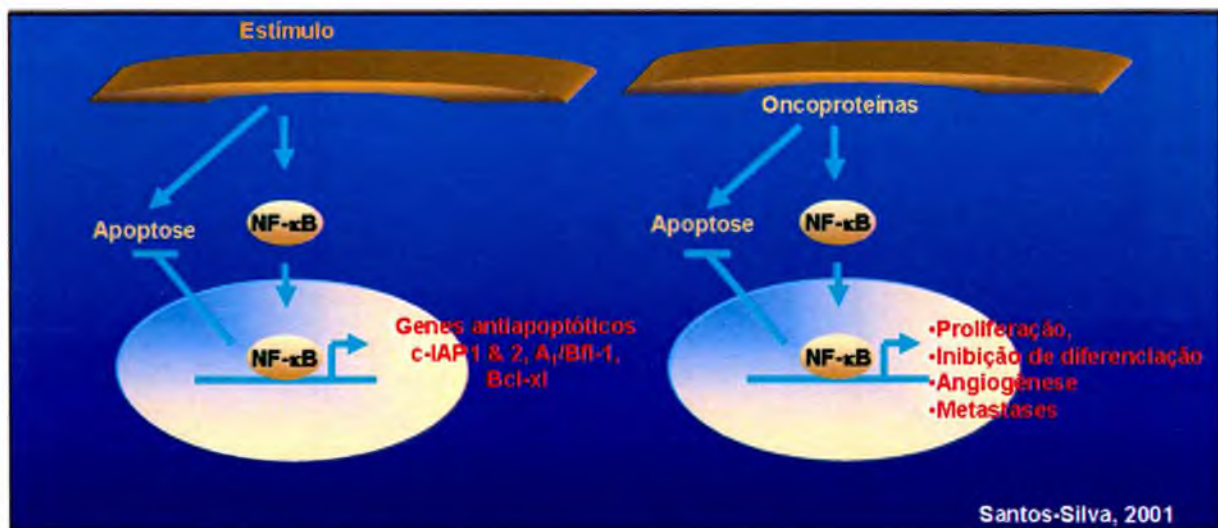
Células tumorais apresentam uma variedade de mutações que afetam vários processos, incluindo aqueles que sustentam o crescimento celular, seja pelo bloqueio da inibição de crescimento e apoptose, reparo do DNA, seja permitindo que a célula tumoral escape do sistema imunológico. As vias de sinalização que controlam a proliferação celular, sobrevivência e oncogênese são de fundamental importância para o entendimento da biologia tumoral. Aberrações cromossômicas que afetam a estrutura ou expressão dos genes que controlam essas vias são frequentemente encontradas no desenvolvimento e progressão de tumores. Vários trabalhos mostram que alterações gênicas nos membros da família NF- κ B modificam as vias de controle da transcrição de proteínas que contribuem para o desenvolvimento tumoral e metástase. No câncer humano, os genes mais relevantes são os que codificam c-Rel, NF- κ B₁ (p105/p50), NF- κ B₂ (p100/p52) e Bcl-3, os quais estão envolvidos com rearranjos e ampliações gênicas (para uma revisão, ver Baldwin, 2001).



Esquema 5.1: Ativação do NF- κ B. NF- κ B, fator nuclear kappa B; I κ B, proteína inibitória do NF- κ B; IKK, proteína quinase I κ B.

Muitos tipos de leucemias e linfomas humanos apresentam atividade constitutiva do NF- κ B no núcleo. Essa ativação desregulada do NF- κ B foi identificada inicialmente na doença de Hodgkin. Essa doença é um tipo de linfoma caracterizado pela presença de células mononucleares de Hodgkin, de células multinucleadas de Reed-Sternberg e de imunidade celular anormal. Essa persistente atividade do NF- κ B é crítica para proliferação, resistência à apoptose e formação tumoral (Bargou *et al.*, 1997). Além das leucemias e linfomas, a atividade persistente do NF- κ B nuclear tem sido demonstrada em outros tipos de câncer, como câncer de mama, cólon, ovário, bexiga, entre outros (para uma revisão, ver Rayet & Gélinas, 1999).

O NF- κ B participa da oncogênese de duas formas: supressão da apoptose ou indução de proliferação celular. O NF- κ B induz a expressão de vários inibidores de apoptose, incluindo c-IAP1, c-IAP2, TRAF-1, TRAF-2, A20, IEX-1L e homólogos de Bcl-2/Bfl-1/A1 e BclX (ver Esquema 5.2). O controle da proliferação celular pelo NF- κ B deve-se, em parte, à ativação de fatores de crescimento, citocinas e outros fatores envolvidos na resposta ao estresse, proliferação celular e progressão do ciclo celular, como, por exemplo, o c-myc e a ciclina D1. Além disso, o NF- κ B participa da expressão de genes importantes na invasão tumoral e metástase (para uma revisão, ver Rayet & Gélinas, 1999; Baldwin, 2001). Sendo assim, o uso de inibidores de NF- κ B, associado a quimioterápicos usados correntemente na clínica oncológica, poderá abrir novos caminhos na terapia do câncer.



Esquema 5.2: Participação do NF- κ B na oncogênese.

NF- κ B, fator nuclear kappa B; c-IAP1 & 2, proteínas antiapoptóticas 1 e 2; A₁/Bfl-1 e Bcl-xl, proteínas da família Bcl-2.

Recentes trabalhos demonstram o envolvimento do NO na regulação da atividade do NF- κ B. A ativação do NF- κ B é essencial para a transcrição do gene da NOS induzida ou NOS2 (Xie *et al.*, 1994). O NO produzido pela iNOS, por um mecanismo de *feedback* negativo, pode bloquear a ativação prolongada do NF- κ B e, dessa forma, controlar a transcrição gênica (Park *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1998; Sekkai *et al.*, 1998), limitando, por exemplo, a inflamação crônica (Taylor *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1998). Interessantes analogias entre o NO e o NF- κ B vêm sendo exploradas, principalmente no que diz respeito à apoptose, entretanto muitas controvérsias surgiram, pois, enquanto alguns grupos de pesquisa demonstram que o NO e o NF- κ B estão envolvidos com proteção das células contra apoptose, outros mostram justamente o inverso (revisto em Kröncke *et al.*, 1997; Wong, 1998; Janssen-Heining *et al.*, 2000). Como já citado, os efeitos citotóxicos do NO são dependentes da sua concentração e do tipo celular; conseqüentemente, a ativação ou a inibição do NF- κ B podem ser observadas em resposta ao NO (para uma revisão, ver Janssen-Heining *et al.*, 2000). Por exemplo, baixas concentrações de NO ou de doadores relacionados (0,1 a 10 μ M) ativam o NF- κ B em linfócitos humanos (Lander *et al.*, 1993); entretanto, altas concentrações (0,2 a 0,5 mM) inibem a ativação do NF- κ B em hepatócitos (Taylor *et al.*, 1997), células T (Sekkai *et al.*, 1998), células endoteliais (Peng *et al.*, 1995) e células musculares lisas (Shin *et al.*, 1996). Experimentos *in vitro* mostram que o NO em altas concentrações impede a ligação dos heterodímeros do NF- κ B, p50/p65 e dos homodímeros p50 e p65 ao DNA (Matthews *et al.*, 1996); no entanto, o mecanismo preciso pelo qual o NO inibe a ativação do NF- κ B ainda é controverso. Vários mecanismos foram propostos, entre eles através da S-nitrosilação da cisteína 62 da subunidade p50, crítica para a ligação do NF- κ B ao núcleo em células respiratórias humanas e macrófagos murinos (Marshall & Stamler, 2001), ou através da interação do NO com sulfidrilas de proteínas, formando S-nitrosotióis, o que pode resultar na inativação de proteínas sensíveis à oxirredução, tais como enzimas, receptores e fatores de transcrição, incluindo o NF- κ B (Matthews *et al.*, 1996; Arnele & Stamler, 1995; Zhang *et al.*, 1999), ou ainda através da oxidação direta de subunidades do NF- κ B, o que diminui sua dissociação com o I- κ B, impedindo sua translocação e/ou ligação com o DNA (Zhang *et al.*, 1999). Por outro lado, o NO pode ativar o NF- κ B, o que pode ocorrer de duas maneiras: a) por um mecanismo indireto, ou seja, através da S-nitrosilação

do resíduo de cisteína no domínio de ligação da proteína p^{21ras} a guanina, que induz a ativação do NF-κB (Lander *et al.*, 1995); ou b) por estimulação da atividade da IKKα (para uma revisão, ver Bogdan, 2001).

Em síntese, nossos resultados até aqui mostram que o NO e o taxol induzem apoptose em células linfoblásticas leucêmicas por uma via que parece ser independente da ativação de caspases. Além disso, o NO e o taxol parecem ter o mesmo mecanismo de ação na indução de apoptose nessas células. Embora a morte celular causada por esses dois compostos não pareça depender de alterações no citoesqueleto, como o taxol liga-se à tubulina e estabiliza os microtúbulos, pode-se, ainda, supor que isso cause alguma alteração na fisiologia celular. O citoesqueleto tem papel fundamental no controle de translocação do NF-κB para o núcleo, pois a estabilização do IκB depende da sua ancoragem nos microtúbulos pelo domínio de repetição de anquirinas presentes no inibidor. Sendo assim, a despolimerização dos microtúbulos promovida pelo taxol leva à dissociação do IκB do dímero, com conseqüente ativação do NF-κB (Rosette *et al.*, 1995). No entanto, Huang *et al.* (2000) defendem a hipótese de que a ativação do NF-κB pelo taxol é independente da sua ação sobre o citoesqueleto. Por outro lado, Spence *et al.* (1999) demonstraram que o taxol, em concentrações baixas (5 μM), inibe a atividade do NF-κB em fibroblastos murinos NIH3T3 e células embrionárias de rim humano 293; porém, em concentrações altas (30 μM), aumenta a atividade do NF-κB.

Com base nessas informações e nas evidências da participação do NF-κB no controle da apoptose em diferentes tipos de células, o próximo foco de investigação foi analisar o possível envolvimento do NF-κB na apoptose induzida pelo NO e pelo taxol. Como já mencionado, várias células tumorais apresentam atividade constitutiva do NF-κB, o que lhes confere algumas características inerentes ao desenvolvimento neoplásico, como indiferenciação, proliferação e resistência à apoptose. Então, inicialmente, foram investigadas a presença e a importância da atividade constitutiva do NF-κB na sobrevivência das células leucêmicas linfoblásticas. Como não existem inibidores seletivos para NF-κB, foram utilizados como ferramentas farmacológicas o PDTC, o TLCK e o TPCK, bem demonstrados na literatura como sendo inibidores da atividade do NF-κB. Constatadas a presença e a importância da atividade constitutiva do NF-κB na sobrevivência dessas células, o segundo aspecto a ser analisado foi verificar se a apoptose induzida pelo NO e

pelo taxol envolvia a ativação ou a inibição da atividade do NF- κ B. Para isso, inicialmente, foi avaliado se os inibidores da atividade do NF- κ B alteravam a citotoxicidade causada pelo NO e pelo taxol nas células leucêmicas linfoblásticas L-1210 e CEM; posteriormente, a atividade do NF- κ B foi confirmada com ensaio mais específico para tal, o ensaio de deslocamento em gel (EMSA). Os resultados desses experimentos nos sugeriram que a atividade constitutiva do NF- κ B era de fundamental importância para a sobrevivência dessas células. Então, buscando esclarecer melhor a correlação entre a inibição da atividade constitutiva do NF- κ B e a morte celular nas células leucêmicas linfoblásticas, realizamos curvas concentração-resposta de NO, taxol e PDTC, ou associação de concentrações subletais, isto é, não-citotóxicas, de NO e taxol, que foram analisadas no *immunoblotting* para c-Rel paralelamente à viabilidade celular.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Reagentes

O meio de cultura e o soro fetal (SFB) foram adquiridos da GIBCO (São Paulo, Brasil). O S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina (SNAP) foi preparado em nosso laboratório, segundo o método de Field et al. (1973). O taxol foi gentilmente doado pela Bristol-Myers Squibb (São Paulo, Brasil). O LPS de *E. coli* sorotipo 0111:B4, o pirrolidinaditiocarbamato (PDTC), o N α -p-tosil-L-lisina clorometilcetona (TLCK) e o N-tosil-L-fenilalanina clorometilcetona (TPCK) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Todas as soluções foram preparadas em meio de cultura, exceto o PDTC, que foi dissolvido em dimetil sulfoxido (DMSO).

5.2.2 Linhagens Celulares

Foram utilizadas as linhagens de células leucêmicas linfoblásticas 1210 (de origem murina) e CEM (de origem humana). As células leucêmicas foram mantidas como descrito anteriormente, na seção Material e Métodos do Capítulo 2.

5.2.3 Tratamentos

5.2.3.1 Inibidores de NF- κ B

Concentrações crescentes de PDTC, de TLCK e de TPCK foram adicionadas às células L-1210 em volume máximo de 20 μ L. As células foram incubadas durante 24 h a 37°C, com 5% de CO₂. Ao final desse período, foi avaliada a viabilidade celular pelo método do MTT.

5.2.3.2 Associação de PDTC, de TLCK e de TPCK com SNAP ou taxol

O TLCK (10 μ M) e o TPCK (10 μ M) foram adicionados separada ou juntamente com o SNAP (300 μ M) ou taxol (10 μ M) às células leucêmicas linfoblásticas L-1210. O PDTC (0,1, 0,3 e 1 μ M) foi adicionado separada ou simultaneamente ao SNAP (100, 300 e 1000 μ M) ou taxol (1,10 e 30 μ M) às células. Após a adição dos compostos, as células retornaram à estufa, onde foram incubadas durante 24 h, nas condições descritas anteriormente. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT.

5.2.3.3 Associação de LPS com SNAP, taxol ou PDTC

O LPS (100 ng/ml) foi adicionado separada ou simultaneamente ao SNAP (1 mM), taxol (10 μ M), ou PDTC (1 μ M) às células leucêmicas linfoblásticas L-1210. Após a adição dos compostos, as células foram incubadas durante 24 h, nas condições descritas anteriormente. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT.

5.2.4 Viabilidade Celular (Ensaio do MTT)

A viabilidade celular foi analisada pelo método do MTT, conforme descrito em Material e Métodos do Capítulo 2.

5.2.5 Preparação de Extrato Nuclear

O extrato nuclear foi obtido por processo de lise (Dignam *et al.*, 1983). Após o tratamento de 2 h com os compostos estudados, a 37°C, com 5% de CO₂, as placas contendo as células foram centrifugadas, o sobrenadante foi removido, e adicionado, então, PBS. Esse procedimento foi repetido três vezes. Finalmente, o *pellet* celular foi ressuspensão com 900 µl de tampão A gelado (10 mM HEPES, pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM ditioneitol e 0,5 mM PMSF). Após 15 min de incubação no gelo, foram acrescentados 100 µl de NP-40 0,5%, e os núcleos foram obtidos por centrifugação a 1.800 x g durante 5 min, a 4 °C. O *pellet* nuclear foi lavado com tampão A e centrifugado a 4.000 x g por 5 min, a 4°C. Ao *pellet* nuclear foram adicionados 100 µl de tampão C (20 mM HEPES, pH 7,9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM ditioneitol, 1 mM PMSF, 1 µg/ml pepstatina, 1 µg/ml leupeptina e 20% glicerol). Depois de 30 min de incubação no gelo, os extratos nucleares foram obtidos após a separação do sobrenadante por centrifugação a 12.000 x g, 10 min, a 4°C, e armazenados a -70°C. A proteína do extrato nuclear foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

5.2.6 Ensaio da mobilidade por deslocamento em gel pela ligação de extratos nucleares com o oligonucleotídeo consenso para NF-κB

Nesse ensaio, oligonucleotídeos de dupla fita com consenso para NF-κB marcados com isótopos radioativos são adicionados às amostras, e, depois, o complexo proteína-DNA é submetido à eletroforese em gel não-desnaturante. Na presença do dímero do NF-κB, a proteína se liga ao DNA e, dessa maneira, diminui a mobilidade eletroforética. Inicialmente, os oligonucleotídeos de dupla-fita com consenso para NF-κB (5'- AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3', 10 pmol) foram marcados com 40 µCi [γ -³²P] ATP (3.000 Ci/ml) na presença de 20 U de T4 polinucleotídeo quinase por 1 h, a 37°C. Depois, quantidades iguais de proteínas dos extratos nucleares de células leucêmicas linfoblásticas L-1210 (5 µg) foram adicionadas à mistura de reação, contendo 1,5 µg poli(dI-dC:dI-dC) (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK), 4 µl tampão (50 mM HEPES, pH 7,9, 20% glicerol, 5 mM EDTA, 5 mM ditioneitol, 0,5 µg BSA) e 40.000 cpm do

oligonucleotídeo de consenso para NF- κ B (5'- AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3', Santa Cruz Biotechnology, USA) ou do oligonucleotídeo mutante (5'- AGT TGA GGC GAC TTT CCC AGG C-3', Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), num volume final de 20 μ l, e incubadas à temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, os complexos proteína-DNA foram submetidos à eletroforese em gel não-desnaturante (4% de acrilamida), e a mobilidade foi visualizada pela exposição do gel seco ao filme Kodak X-Omat.

5.2.7 Ensaio de *immunoblotting* para NF- κ B (c-Rel)

Para estudar a atividade do NF- κ B, usamos o extrato nuclear das células leucêmicas linfoblásticas L-1210. Os extratos nucleares foram desnaturados em tampão de amostra (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol, e 0,001% azul de bromofenol), aquecidos em banho de água fervente por 3 min. As proteínas dos extratos nucleares (30 μ g) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS a 12% (Laemmli, 1970). Depois, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C Pure, Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA), seguidas de bloqueio com Tween-TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,1% Tween-20) e imunomarcação com anticorpo primário específico anti-c-Rel de coelho (em diluição de 1:500; StressGen Biotechnologies Co. Victoria, BC, Canadá). Depois de extensivas lavagens com Tween-TBS, a identificação da proteína c-Rel foi realizada por meio da incubação por 1 hora com anticorpo secundário anti-IgG biotina-conjugado de coelho (em diluição de 1:1.000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e com estreptavidina conjugada com peroxidase (diluição de 1:1.000; Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA). As proteínas imunorreativas foram visualizadas com o corante 3,3'-diaminobenzidina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), que, na presença de H₂O₂ e da peroxidase ligada ao anticorpo secundário, é oxidado, formando um precipitado de cor castanha. Finalmente, as bandas de proteínas marcadas foram quantificadas por densitometria usando-se o programa Scion Image Software (Scion Co., MD, USA).

5.2.8 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro-padrão da média (EPM). Cada experimento foi repetido pelo menos três vezes, com resultados semelhantes. Para a análise estatística foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste *t* de Bonferroni. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Efeito citotóxico dos inibidores de NF- κ B sobre células leucêmicas

A incubação de células L-1210 com concentrações crescentes de inibidores de NF- κ B resultou na diminuição do número de células viáveis de maneira concentração-dependente (Figura 5.1). O PDTC apresentou maior citotoxicidade para as células leucêmicas do que o TLCK ou o TPCK. Por exemplo, na concentração de 10 μ M de PDTC, houve diminuição de 90% \pm 0,1% de células viáveis, enquanto, na mesma concentração, o TLCK e o TPCK diminuíram apenas 30% \pm 6% e 23% \pm 5% o número de células viáveis, respectivamente.

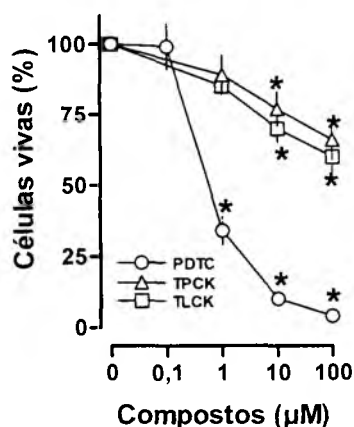


Figura 5.1: Efeito citotóxico dos inibidores de NF κ B em células de linhagem leucêmica linfoblástica.

O PDTC, o TPCK e o TLCK foram adicionados às células e incubados por 24 h, conforme descrito na seção Material e Métodos. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo-controle corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm EPM de três amostras. Os mesmos resultados foram obtidos em pelo menos três outros experimentos idênticos. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$ ANOVA, seguida de teste *t* de Bonferroni.

5.3.2 Efeito do PDTC, TLCK e TPCK sobre a citotoxicidade causada pelo NO ou pelo taxol

O PDTC foi citotóxico de maneira concentração-dependente para as células L-1210 e CEM. O efeito máximo observado foi com 1 μM de PDTC ($54\% \pm 4\%$ e $67\% \pm 1\%$ de morte para L-1210 e CEM, respectivamente). Entretanto, concentrações mais baixas de PDTC (300 nM) já foram suficientes para causar morte celular ($30\% \pm 6\%$ e $36\% \pm 1\%$ de células mortas para L-1210 e CEM, respectivamente; Figura 5.2, Painel E, L-1210, e Painel F, CEM). A co-incubação de PDTC com SNAP potencializou o efeito citotóxico do NO para ambas as linhagens de células leucêmicas (Figura 5.2, Painel A, L-1210, e Painel D, CEM). Por exemplo, a co-incubação de L-1210 e CEM com concentrações não-citotóxicas de SNAP (100 μM) e PDTC (300 nM) causou $50\% \pm 1\%$ e $60\% \pm 1\%$ de morte celular, respectivamente. O efeito potencializador do PDTC foi ainda mais evidente na presença do taxol (Figura 5.2, Painel B, L-1210, e Painel D, CEM), onde observamos que o efeito citotóxico do taxol (1 μM , concentração que mata apenas $18\% \pm 1\%$ e $17\% \pm 1\%$ de células L-1210 e CEM, respectivamente) foi muito potencializado na presença de PDTC (300 nM; $82\% \pm 1\%$ e $81\% \pm 1\%$ de morte celular).

O TLCK e o TPCK não alteraram os efeitos citotóxicos causados pelo NO ou pelo taxol (Tabela 5.1).

5.3.3 Bloqueio da ativação do NF- κ B pelo SNAP e pelo taxol em células leucêmicas

Como pode ser observado na Figura 5.3, as células L-1210 não tratadas apresentaram uma pequena, mas detectável, ligação do NF- κ B ao DNA (atividade do NF- κ B, vista na linha 1 do auto-radiograma); entretanto, as células incubadas com SNAP (1mM), com taxol (10 μM) ou com PDTC (1 μM), isoladamente ou em associação, não apresentaram atividade de NF- κ B. Como controles positivos, células tratadas com LPS ou PMA apresentaram forte atividade do NF- κ B. Vale ressaltar que os extratos nucleares tratados com PMA e oligonucleotídeos mutados não apresentaram atividade do NF- κ B, demonstrando especificidade do sítio de ligação do NF- κ B ao DNA.

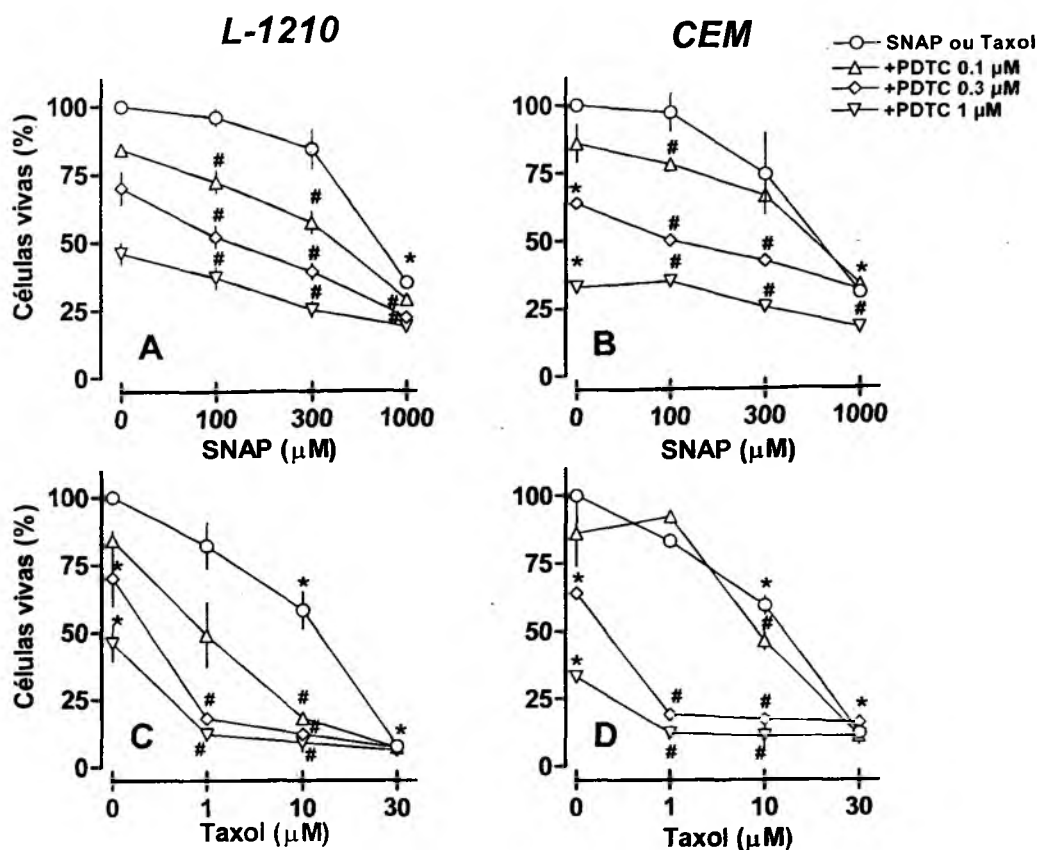


Figura 5.2: Efeito do PDTC sobre a citotoxicidade causada pelo SNAP ou taxol em linhagens de células leucêmicas.

As células usadas foram de linhagem murina L-1210 (Painéis A e B) e de linhagem humana CEM (Painéis C e D). O SNAP ou taxol foram adicionados às células na presença ou na ausência de PDTC e incubados por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm EPM de três amostras. Os mesmos resultados foram obtidos em três outros experimentos idênticos. *Estatisticamente diferente do controle e # estatisticamente diferente das concentrações de SNAP ou taxol sem PDTC, $p < 0,05$, ANOVA seguida de teste t de Bonferroni.

Tabela 5.1: Efeito do TLCK e do TPCK na citotoxicidade causada pelo SNAP ou pelo taxol em células linfoblásticas leucêmicas murina L-1210.

Compostos	% células viáveis
Controle	100
TLCK (10 μ M)	60 \pm 6 *
TPCK (10 μ M)	66 \pm 7 *
SNAP (300 μ M)	89 \pm 3
+ TLCK (10 μ M)	41 \pm 4 *
+ TPCK (10 μ M)	70 \pm 4 *
Taxol (10 μ M)	66 \pm 4 *
+ TLCK (10 μ M)	50 \pm 5 *
+ TPCK (10 μ M)	45 \pm 3 *

NOTA: As células foram plaqueadas (5×10^5 /poço) em placas de 96 poços, como descrito em Material e Métodos. Os compostos foram adicionados, e as células foram incubadas por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo-controle corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm EPM de três amostras. Os mesmos resultados foram obtidos em pelo menos três outros experimentos idênticos. * Estatisticamente diferente do controle $p < 0,05$ ANOVA, seguida de teste t de Bonferroni.

5.3.4 Efeito do NO e do taxol sobre a atividade do NF- κ B e a relação com a morte de células leucêmicas linfoblásticas

Como pode ser observado na Figura 5.4, Painéis A-C, as células L-1210 apresentaram atividade constitutiva do NF- κ B (c-Rel), e concentrações baixas de PDTC (0,1 μ M) foram suficientes para inibir completamente essa atividade constitutiva (Painel C). No entanto, o SNAP e o taxol só inibiram a atividade constitutiva do NF- κ B nas concentrações de 300 μ M e 10 μ M, respectivamente. Comparativamente, o NO e o taxol, nessas mesmas concentrações, inibiram 80% \pm 2% e 75% \pm 2% da atividade constitutiva do NF- κ B, respectivamente, quando comparadas ao controle; entretanto, nessas mesmas concentrações, causaram apenas 30% de morte celular. Em relação ao PDTC, foi observado o mesmo perfil, isto é, concentrações baixas de PDTC (0,1 μ M) inibiram completamente a atividade do NF- κ B; no entanto, a morte celular só foi observada em concentrações acima de 1 μ M. O LPS (100 ng/ml) aumentou 2,5 vezes a atividade do NF- κ B nas células L-1210 e não alterou a viabilidade celular em relação ao controle.

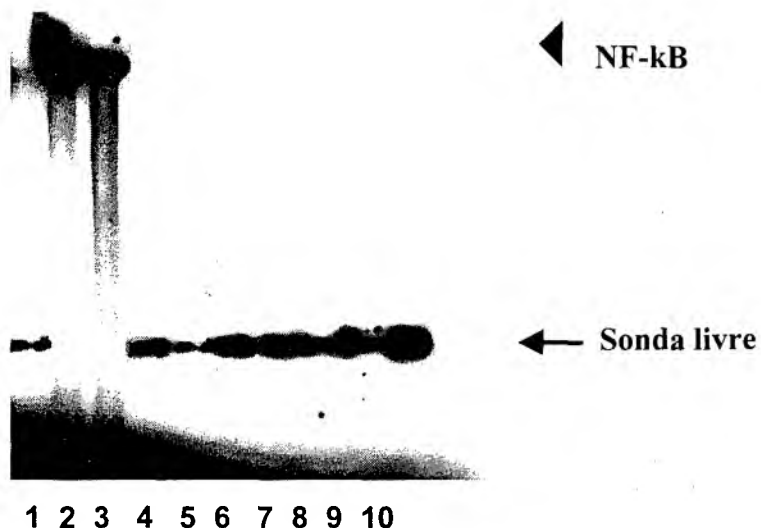


Figura 5.3 : Bloqueio da ativação do NF-kB pelo SNAP e pelo taxol em células L-1210.

As células foram incubadas com os compostos por 2 horas e, em seguida, foram obtidos os extratos nucleares. O ensaio de deslocamento da ligação em gel com extratos nucleares de células L-1210 foi realizado como descrito em Material e Métodos. Linha 1: células controle; linha 2: PMA (200 nM); linha 3: LPS (100 ng/ml); linha 4: PDTC (1 μ M); linha 5: SNAP (1 mM); linha 6: SNAP (1 mM) + PDTC (1 μ M); linha 7: taxol (10 μ M); linha 8: taxol (10 μ M)+ PDTC (1 μ M); linha 9: SNAP (1 mM) + taxol (10 μ M); linha 10: células estimuladas com PMA e incubadas com oligonucleotídeo mutante para NF-kB. As posições do complexo DNA/NF-kB e da sonda livre estão indicadas.

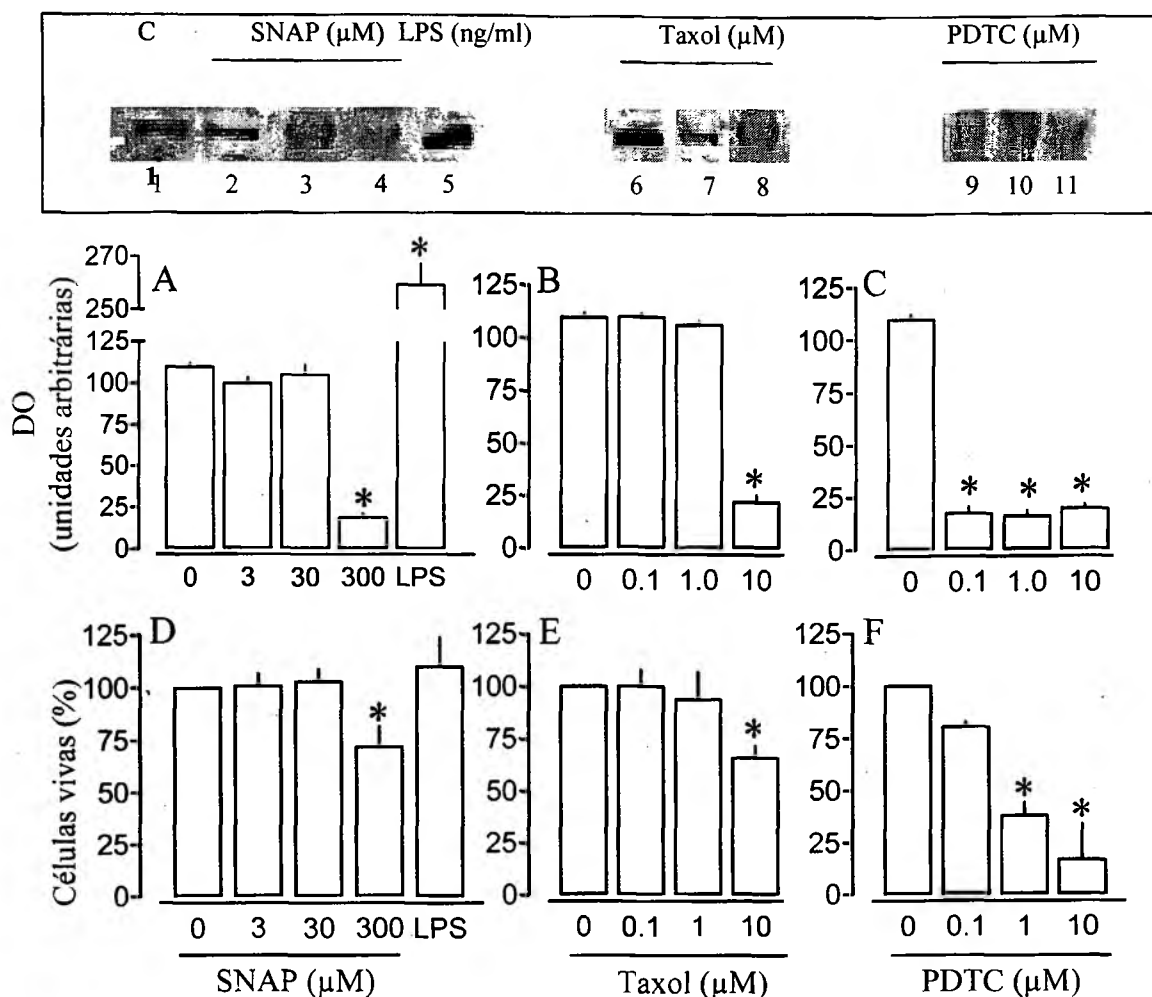


Figura 5.4: Efeito do SNAP e do taxol sobre a atividade do NF- κ B nuclear e citotoxicidade nas células L-1210.

As células foram incubadas com os diversos compostos por 2 h, e os extratos nucleares foram obtidos por lise celular. O *immunoblotting* para o NF- κ B foi realizado usando anticorpo primário anti-c-Rel de coelho, como descrito em Material e Métodos. Os painéis de A a C correspondem à densitometria das áreas imunorreativas e os de D a F correspondem à viabilidade celular dos mesmos grupos de compostos usados para no *immunoblotting*, porém com 24 h de incubação. Cada ponto representa a média \pm EPM de três amostras. Os mesmos resultados foram obtidos em três outros experimentos idênticos. * Estatisticamente diferente do controle, $p < 0,05$ ANOVA seguida de teste t de Bonferroni.

5.3.5 Efeito do LPS sobre a citotoxicidade causada pelo NO, pelo taxol e pelo PDTC

Os resultados apresentados na Tabela 5.2 mostram claramente que a adição de LPS 100 ng/ml não alterou o efeito citotóxico do SNAP, do taxol ou do PDTC. Embora não esteja demonstrado na Tabela 5.2, a adição do LPS, 2 h antes dos outros compostos, apresentou resultados semelhantes.

Tabela 5.2: Efeito do LPS sobre a citotoxicidade causada pelo SNAP, pelo taxol e pelo PDTC em células leucêmicas murinas L-1210.

Composto	% células viáveis
Controle	100
SNAP (1mM)	40 ± 9 *
SNAP (1mM) + LPS (100 ng/ml)	39 ± 4 *
Controle	100
Taxol (10 µM)	77 ± 5
Taxol (10 µM) + LPS (100 ng/ml)	75 ± 2
Controle	100
PDTC (1 µM)	39 ± 6 *
PDTC (1 µM) + LPS (100 ng/ml)	29 ± 2 *

NOTA: As células foram plaqueadas (5×10^5 /poço) em placas de 96 poços, como descrito em Material e Métodos. Os compostos foram adicionados, e as células foram incubadas por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo-controle corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média ± EPM de três amostras. Os mesmos resultados foram obtidos em três outros experimentos idênticos. * Estatisticamente diferente do controle, $p < 0,05$ ANOVA, seguida de teste t de Bonferroni.

5.3.6 Efeito da associação do SNAP e taxol na atividade do NF-κB

Essa série de experimentos (Figura 5.5) mostra que concentrações não citotóxicas de SNAP (300 µM) e de taxol (10 µM), quando adicionados separada ou simultaneamente às células L-1210, diminuíram a atividade constitutiva do NF-κB. A associação desses compostos diminuiu $80\% \pm 4\%$ da atividade constitutiva do NF-κB e causou $75\% \pm 9\%$ de morte celular, quando comparados ao controle.

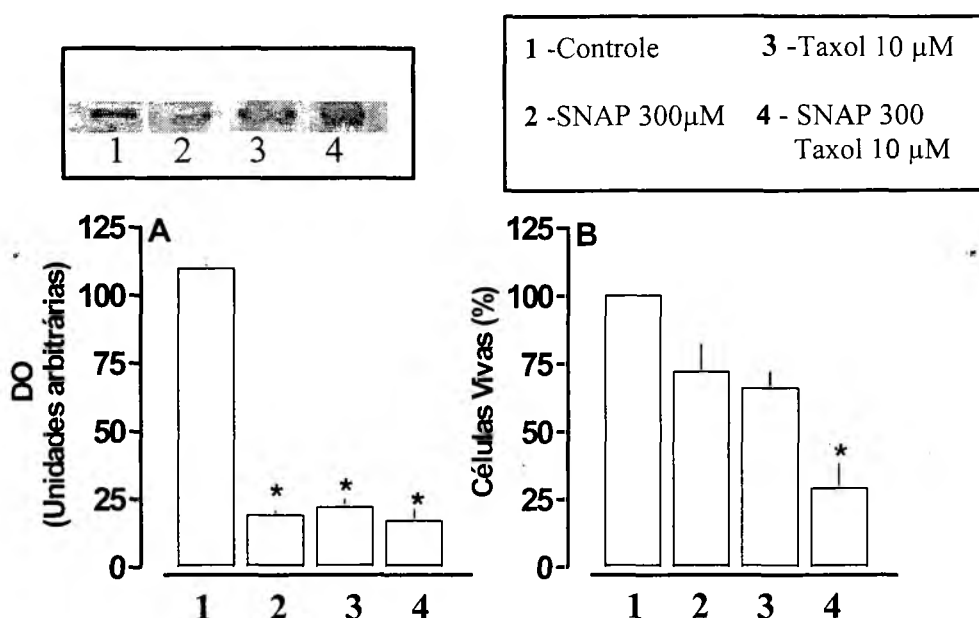


Figura 5.5: Efeito da associação do SNAP e do taxol na atividade do NF- κ B e citotoxicidade nas células L-1210.

As células foram incubadas com SNAP e taxol separada ou conjuntamente por 2 h, e então, foram lisadas para obtenção dos extratos nucleares. O *immunoblotting* para o NF- κ B foi realizado usando anticorpo primário anti-c-Rel de coelho, como descrito em Material e Métodos. O Painel A corresponde à densitometria das áreas imunorreativas; o Painel B corresponde à viabilidade celular dos mesmos grupos de compostos usados no *immunoblotting*, porém com 24 h de incubação. Cada ponto representa a média \pm EPM de três amostras. Os mesmos resultados foram obtidos em três outros experimentos idênticos. * Estatisticamente diferente do controle $p < 0,05$ ANOVA, seguida de teste *t* de Bonferroni.

5.4 DISCUSSÃO

Vários fatores contribuem para determinar se uma célula entrará em apoptose ou não. Dentre esses fatores, o NF- κ B ocupa posição de destaque, pois ele está envolvido na transcrição de várias proteínas, tanto pró- como antiapoptóticas (Foo & Nolan, 1999). Entretanto, o mecanismo de regulação que define qual proteína será transcrita ainda não está esclarecido, especialmente quando se refere a células tumorais, pois muitos tipos de tumores apresentam atividade constitutiva do NF- κ B como consequência de translocações e deleções nos genes do NF- κ B e I- κ B (Gilmore *et al.*, 1996). O papel do NF- κ B na morte de células tumorais ainda é controverso, pois algumas drogas antitumorais têm explicado seus efeitos citotóxicos pela ativação do NF- κ B (Hwang & Ding, 1995). Outros trabalhos, entretanto,

mostram que a ativação do NF- κ B por quimioterápicos suprime a morte celular, levando à quimiorresistência (revisto em Mayo & Baldwin, 2000).

Portanto, nesse segmento do trabalho, buscando compreender melhor o mecanismo de indução de apoptose causado pelo NO e pelo taxol, estudamos se o efeito citotóxico desses compostos poderia ocorrer através do NF- κ B. Nossos resultados mostraram que compostos conhecidos por inibirem o NF- κ B, como o PDTC (Schreck *et al.*, 1992), o TLCK (Schini-Kerth *et al.*, 1997) e o TPCK (Henkel *et al.*, 1993), foram citotóxicos de maneira concentração-dependente para as células leucêmicas. Esses dados sugerem a presença de uma atividade constitutiva do NF- κ B nessas células, de forma similar ao encontrado para leucemia de células T (Mori *et al.*, 1999), e sugerem também que essa atividade está relacionada com a sobrevivência dessas células. Entretanto, dos compostos estudados, o PDTC mostrou-se o mais potente. Embora nossos dados não possam responder o porquê dessa diferença, uma possível explicação seria o fato de que nenhum dos inibidores da atividade do NF- κ B atua direta e seletivamente sobre o fator. Na literatura, muitos mecanismos de ação foram propostos para explicar o efeito inibitório desses compostos sobre o NF- κ B. Por exemplo, embora o modo de ação do PDTC não esteja totalmente esclarecido, Schreck *et al.* (1992) sugeriram que o PDTC suprimia reversivelmente a liberação da subunidade I κ B da forma citoplasmática latente do NF- κ B, bloqueando, assim, sua ativação. Duas explicações foram propostas para justificar essa supressão: a) seqüestro de espécies reativas de intermediários do oxigênio (Schreck *et al.*, 1992), ou b) através da propriedade quelante de metais, comuns aos ditiocarbamatos como o PDTC (Pinkus *et al.*, 1996). Enfim, são muitas as evidências a respeito da capacidade do PDTC em causar inibição da atividade do NF- κ B em resposta a diferentes estímulos. O efeito inibitório do TLCK e do TPCK sobre a atividade do NF- κ B é explicado por meio do bloqueio da degradação do I κ B pelo proteossoma, impedindo, assim, a translocação do NF- κ B para o núcleo. Há também evidências de que os compostos da classe das clorometilcetonas também interferem em outros mecanismos de transdução de sinal (Henkel *et al.*, 1993; Schini-Kerth *et al.*, 1997).

Diferentemente do TLCK e do TPCK, a co-incubação de PDTC com NO potencializou o efeito citotóxico do NO e do taxol para as linhagens de células leucêmicas. Esses resultados sugerem que o sinergismo entre o PDTC e o NO ou

taxol poderia estar causando morte celular pela inibição da atividade basal do NF- κ B. De fato, essas primeiras evidências foram confirmadas no ensaio de mobilidade por deslocamento em gel para NF- κ B, onde se viu que, de fato, as células leucêmicas apresentam atividade constitutiva do NF- κ B e que esta atividade constitutiva foi inibida pelo NO e pelo taxol, seja de maneira isolada ou associada. Além disso, nossos resultados também indicam que a inibição da atividade do NF- κ B pelo NO e pelo taxol não envolve o bloqueio de degradação do I- κ B pelo proteasoma, diferentemente do mecanismo de inibição do NF- κ B pelo NO, sugerido por Kolb (2000), pois a co-incubação com bloqueadores do proteasoma não alteraram a apoptose induzida pelo NO e pelo taxol.

Mutações no I- κ B α detectadas no linfoma de Hodgkin sugerem a presença da atividade constitutiva do NF- κ B nas células de Hodgkin (para uma revisão, ver Baldwin, 2001). A presença constitutiva do NF- κ B em células neoplásicas pode conferir resistência à apoptose e à quimioterapia. Dependendo do estímulo e da célula, o NF- κ B pode ser um fator antiapoptótico, por meio da expressão de proteínas antiapoptóticas, como a TRAF 1 e 2, ou c-IAP 1 e 2, que bloqueiam a caspase 8 (Wang *et al.*, 1996), ou da expressão de membros da família Bcl-2, que controlam a liberação do citocromo c da mitocôndria (para uma revisão, ver Mayo & Baldwin, 2000). A expressão constitutiva do membro da família Bcl-2, o A1/Bfl-1, inibe a apoptose em linfócitos B derivados do c-Rel mutado em camundongos, sugerindo que a ativação constitutiva do NF- κ B, nesses casos, é importante para a sobrevivência dessas células (Grumont *et al.*, 1999). O c-Rel codifica um potente ativador transcricional de genes, que localiza o sítio de ligação do NF- κ B no DNA. A amplificação do gene humano c-Rel no cromossoma 2p14-15 foi observada em várias neoplasias hematológicas, como no linfoma difuso de grandes células (DLCL), no linfoma primário mediastinal de células B e no linfoma primário de grandes células. Embora ainda não esteja claro se a amplificação do gene c-Rel inicia o processo de transformação ou progressão do tumor, ele está frequentemente associado com os estágios avançados da doença. Em linfomas humanos, a alteração mais observada no c-Rel é a amplificação do gene, mas também podemos encontrá-lo "rearranjado" em linfoma folicular e em linfoma difuso de grandes células (para uma revisão, ver Rayet & Gélinas 1999). A presença constitutiva do c-Rel no núcleo das células linfoblásticas leucêmicas L-1210 foi detectada por meio do ensaio

de *immunoblotting* para c-Rel. Porém, embora o NO e o taxol inibam a atividade do NF- κ B, contendo a subunidade c-Rel, nessas células, o dado fundamental deste bloco de resultados é o de que não parece haver uma relação direta entre a inibição do NF- κ B e a morte celular. Essa afirmativa é baseada no exame comparativo dos resultados dos experimentos de *immunoblotting* com os da viabilidade celular. Como visto, o NO e o taxol, nas concentrações de 300 e 10 μ M, respectivamente, causaram apenas 30% de morte celular e, no entanto, nessas mesmas concentrações, virtualmente anularam a atividade constitutiva do NF- κ B (80% e 75%, respectivamente). Em relação ao PDTTC, observamos o mesmo, isto é, concentrações muito baixas de PDTTC (0,1 μ M) inibiram completamente a atividade do NF- κ B, enquanto morte celular só foi vista com concentrações de 1 μ M. Apesar de o PDTTC apresentar um efeito citotóxico importante ou, ainda, aumentar o efeito causado pelo NO e pelo taxol contra células leucêmicas, não podemos atribuir esse efeito somente à inibição do NF- κ B, pois, freqüentemente, esse composto é utilizado como antioxidante ou quelante de metais (Nobel *et al.*, 1995), ou, por exemplo, ativando c-Jun N-terminal quinase (JNK; Chen *et al.*, 1999). Outra razão pela qual parece não haver uma relação direta entre níveis de atividade do NF- κ B e a morte celular foi a observação de que células incubadas com LPS aumentam 2,5 vezes a atividade do NF- κ B, mas, no entanto, esse aumento da atividade do NF- κ B não protege as células dos efeitos citotóxicos do SNAP, do taxol e do PDTTC. Sendo assim, concluímos que a apoptose causada nas células leucêmicas pelo NO e pelo taxol não parece ser diretamente dependente da inibição do NF- κ B. Por outro lado, não podemos afirmar que a presença da atividade constitutiva da subunidade c-Rel e de outros membros da família Rel não esteja relacionada com a expressão gênica de proteínas antiapoptóticas.

Esse conjunto de informações confirma nossa hipótese de que o NO e o taxol possam ter o mesmo mecanismo de ação na indução de apoptose em células leucêmicas linfoblásticas, o que é reforçado pela análise do *immunoblotting* para NF- κ B realizado em paralelo ao experimento de citotoxicidade, em que mostra que NO e taxol, associados ou não, foram capazes de inibir consideravelmente a atividade do NF- κ B. Assim, nossos resultados mostram que ocorreu um sinergismo dos dois compostos em relação à citotoxicidade, mas ambos já haviam inibido substancialmente a atividade do NF- κ B, reafirmando que o mecanismo pelo qual o

NO e o taxol causam morte parece não guardar uma relação direta com a atividade do NF- κ B.

Nossos resultados demonstram que a atividade do NF- κ B não é um fator determinante para a proliferação e/ou resistência à apoptose em células tumorais leucêmicas, revelando quão complexos são os mecanismos intracelulares de defesa de uma célula tumoral. Provavelmente, a inibição da atividade constitutiva do NF- κ B pelo NO e pelo taxol é apenas um dos múltiplos fatores que contribuem para o esgotamento das defesas intracelulares e que, finalmente, levam as células à apoptose.

CAPÍTULO 6

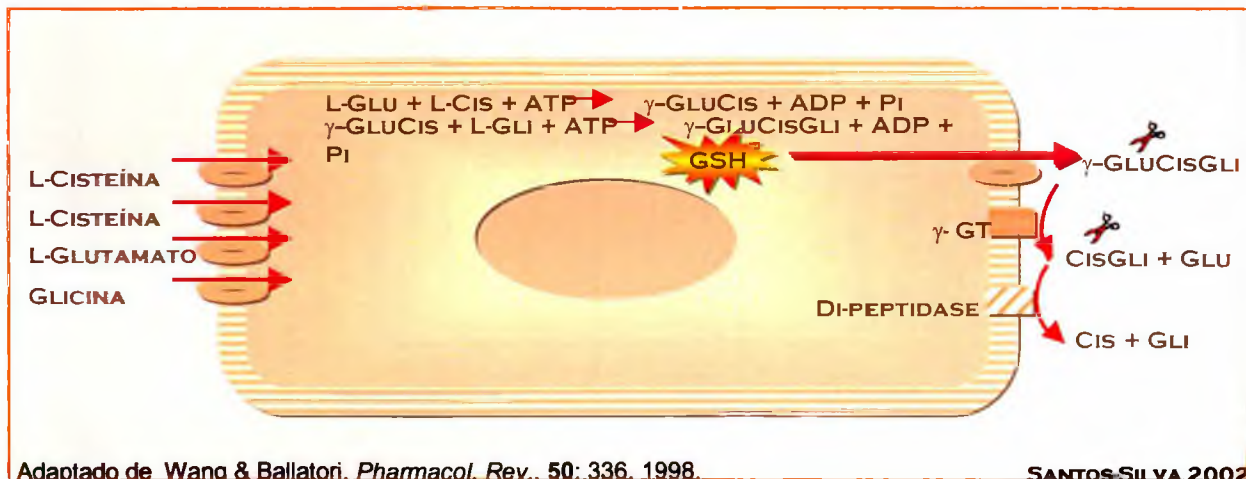
PAPEL DA GLUTATIONA NA CITOTOXICIDADE CAUSADA PELO ÓXIDO NÍTRICO E PELO TAXOL EM CÉLULAS LINFOBLÁSTICAS LEUCÊMICAS

6.1 INTRODUÇÃO

Níveis adequados de glutathiona reduzida (GSH) intracelular são cruciais para o funcionamento de sistemas de defesa importantes contra agentes pró-oxidantes, para a metabolização de drogas tóxicas eletrofílicas e na modulação das respostas imune e inflamatória (para uma revisão, ver Wang & Ballatori, 1998; Rahman & MacNee, 2000).

A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo (L-glutamil-L-cisteinil-L-glicil) que contém o resíduo de cisteína um grupamento tiol (sulfidrila), importante para o desempenho das funções do GSH. O estado redox da GSH é crítico para vários eventos biológicos, tais como ativação transcricional de genes específicos, modulação da transdução de sinais sensíveis à variação do ambiente redox, regulação da proliferação celular, da apoptose e da inflamação (para uma revisão, ver Rahman & MacNee, 2000). Os níveis intracelulares de GSH dependem do balanço entre o consumo (na verdade, oxidação) e a síntese "de novo". Como pode ser visto no Esquema 6.1, a GSH é sintetizada em todas as células de mamíferos (Meister & Tate, 1976) e depende de duas enzimas, quais sejam, a gama glutamilsteína sintetase (γ -GCS) e a glutathiona sintetase (Meister & Anderson, 1983). Em geral, a atividade da γ -GCS determina os níveis de síntese da GSH. Vários agentes biológicos e farmacológicos podem afetar as vias de transdução de sinais que envolvem a regulação da síntese de GSH, como, por exemplo, modulando a transcrição dos genes cujo produto é a γ -GCS (Rahman & MacNee, 1999; Griffith, 1999; Lu, 1999). Embora a síntese de GSH ocorra dentro da célula, a sua biodegradação ocorre fora dela, ou seja, na região externa da membrana plasmática, onde estão localizadas as enzimas gama-glutamiltrispeptidase (γ -GT) e a di-peptidase. Os aminoácidos remanescentes da ação dessas enzimas sobre a

glutathiona podem ser reaproveitados para uma nova síntese (para uma revisão, ver Wang & Ballatori, 1998).

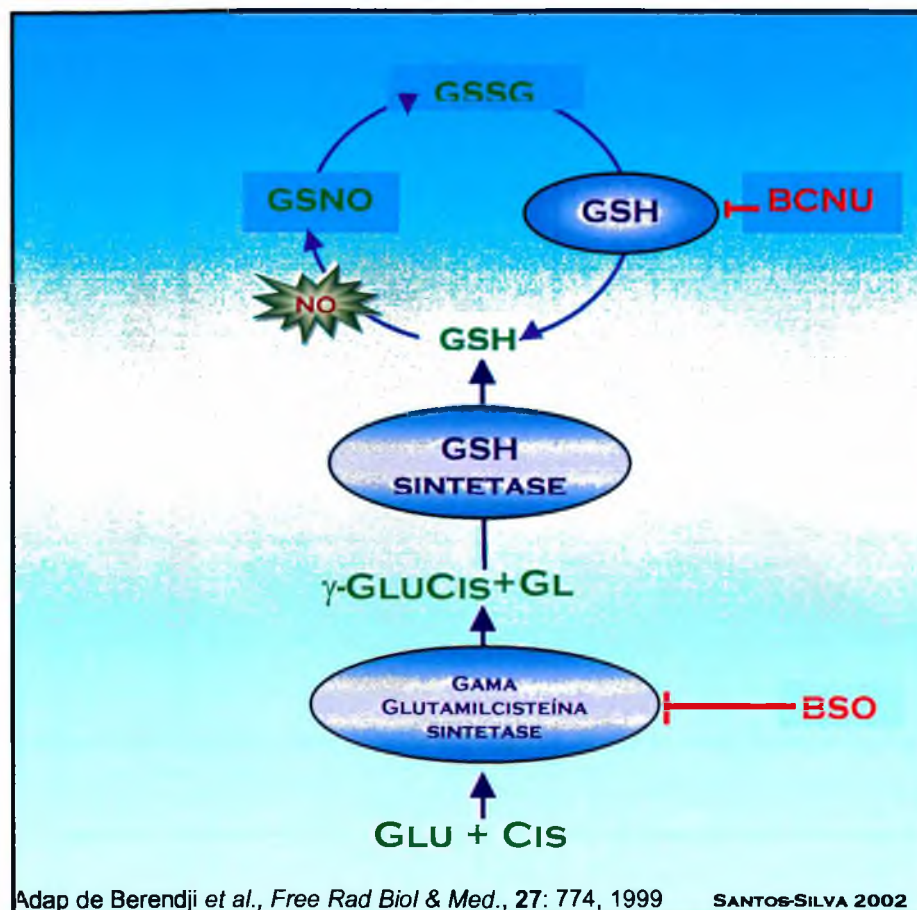


Esquema 6.1: Síntese e degradação da glutathiona.

L-Glu, L-Glutamato; L-Cis, L-cisteína; Gli, Glicina; γ -GT, gama-glutamiltanspeptidase

Com exceção dos seres anaeróbicos, a grande maioria dos seres vivos depende do oxigênio molecular para produção de energia (para uma revisão, ver Halliwell & Gutteridge, 1989). Durante o metabolismo aeróbico, alguns compostos intermediários de oxigênio são liberados, incluindo superóxido e peróxido de hidrogênio. Essas espécies químicas podem levar à produção de radicais tóxicos de oxigênio, que causam peroxidação lipídica e alterações no metabolismo celular. A GSH é predominantemente a primeira defesa anti-oxidante intracelular contra esses produtos tóxicos de oxigênio, particularmente na mitocôndria, local onde ocorre a maior produção desses radicais (Deleve & Kaplowitz, 1991). Os compostos intermediários de oxigênio são reduzidos pela GSH por meio de várias isoformas de GSH peroxidase. Como consequência, a GSH é oxidada a GSSG (glutathiona oxidada), que é rapidamente reduzida novamente para GSH pela enzima GSSG redutase, na presença de fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), formando um ciclo redox, como pode ser visto no Esquema 6.2. Em níveis normais de estresse oxidativo e nitrosativo, a atividade da GSSG redutase e quantidades de NADPH são suficientes para manter o equilíbrio GSH/GSSG (mais de 98% da glutathiona total é constituída por GSH). Entretanto, se o nível de estresse aumentar muito ou se, por outros fatores, houver limitação da atividade da enzima GSSG redutase ou redução dos níveis de NADPH, poderá haver acúmulo da GSSG, que será degradada fora da célula (como explicado acima), aumentando o requerimento de síntese “de novo” de GSH. O consumo de GSH e o acúmulo de GSSG geram

mudanças no estado redox intracelular. Essas alterações ativam a transcrição de genes, entre eles o da γ -CGS (para uma revisão, ver Griffith, 1999).



Esquema 6.2 Ciclo Redox da Glutaciona.

Glu, Glutamato; Cis, cisteína; Gli, Glicina; GSH, glutaciona reduzida; GSSG, glutaciona oxidada; BSO, L-butionina-[S,R]-sulfoximina; BCNU, 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea.

A expressão de níveis significantes de γ -GT tem sido relatada em vários tipos de neoplasmas humanos, como o câncer de ovário (Hanigan *et al.*, 1994; Paolicchi *et al.*, 1996), de pulmão (Blair *et al.*, 1997), de cólon (Munjaj, 1980; Murata *et al.*, 1997), de sarcoma (Hochwald *et al.*, 1997), no melanoma (Supino *et al.*, 1992) e nas leucemias (Tänger *et al.*, 1995; Morel *et al.*, 1986). Como a γ -GT tem um papel crucial na síntese de GSH, sua expressão aumentada favorece o desenvolvimento de resistência a drogas quimioterápicas (muitas delas fortes oxidantes) por células tumorais (Godwin *et al.*, 1992; Hanigan *et al.*, 1994).

O NO pode interagir com tióis protéicos ou tióis de baixo peso molecular, incluída a GSH, formando S-nitrosotióis (Tsikas *et al.*, 1999; Kostka *et al.*, 1999).

Vários trabalhos demonstram que o NO pode regular muitos processos fisiológicos *in vivo* por meio da formação de S-nitrosotióis, como, por exemplo, a vasodilatação (Ignarro *et al.*, 1987), a agregação plaquetária (Hirayama *et al.*, 1999), a apoptose (Mohr *et al.*, 1997) e a proliferação celular (Lander *et al.*, 1997). Por exemplo, Clancy *et al.* (1994) mostraram que o NO reage com o GSH intracelular e ativa o *shunt* da hexose monofosfato em neutrófilos humanos, sugerindo uma função adicional para o composto intermediário nitrosoglutationa (GSNO). O GSNO também pode inibir a enzima creatina quinase ligada ao retículo endoplasmático, que é imprescindível no processo de transdução de energia (Wolosker *et al.*, 1996). A formação de nitrosotióis, entre outras propriedades, pode contribuir para o efeito deletério do NO. Essa afirmativa decorre de pelo menos duas razões: a) esses compostos são considerados verdadeiros estoques intracelulares de NO; e b) possuem estruturas químicas muito mais estáveis (geralmente têm meia-vida de horas) do que o NO e mantêm as mesmas propriedades biológicas desse gás, ao atuarem como verdadeiros doadores endógenos de NO (para detalhes acerca de S-nitrosotióis, ver Gaston, 1993). Por outro lado, o NO pode, ainda, depletar os níveis de GSH por meio da S-nitrosilação de enzimas envolvidas no metabolismo da GSH, como a glutationa peroxidase (Asahi *et al.*, 1995), a glutationa S-transferase (Clark & Debnam, 1988), a γ -glutamil cisteína sintetase (Han *et al.*, 1995) e a glutationa redutase (Becker *et al.*, 1995), e, dessa forma, alterar as defesas antioxidantes intracelulares, resultando em dano oxidativo e/ou nitrosativo.

Os níveis de GSH são importantes para suprimir a apoptose mediada por diferentes compostos oxidantes, inclusive o NO (Kane *et al.*, 1993; Ghibelli *et al.*, 1998). Além disso, sabe-se que a GSH tem papel importante na resistência a drogas e que a sua depleção resulta em desagregação de microtúbulos, provavelmente pela oxidação de alguns resíduos de cisteína da tubulina, o que antagoniza o efeito de compostos que interagem com microtúbulos, como, por exemplo, o taxol (Liebmann *et al.*, 1993). Como até aqui os nossos resultados demonstraram que a citotoxicidade causada pelo NO e pelo taxol em células leucêmicas parecem obedecer a uma mesma via, resolvemos investigar se a apoptose causada pelo NO e pelo taxol dependeriam de alterações nos níveis de glutaciona nas células leucêmicas linfoblásticas. Para isso, inicialmente, avaliamos o efeito citotóxico do NO e do taxol em células leucêmicas, cujos níveis de GSH foram diminuídos pela presença de um inibidor específico de γ -glutamilcisteína sintetase, o L-butionina-

[S,R]-sulfoximina (BSO; Richman & Meister, 1975). Depois, após o tratamento com a associação de BSO e NO ou taxol, os níveis de glutathiona intracelulares foram dosados pelo método bioquímico proposto por Tietze (1969). A partir desses resultados, com o intuito de obter mais informações acerca do mecanismo de depleção de glutathiona por esses compostos, analisamos o efeito do 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea (BCNU), um inibidor da GSH redutase (Babson & Reed, 1978) sobre o efeito citotóxico do NO e do taxol. Finalmente, considerando os resultados anteriores desse trabalho, no qual demonstramos que o NO e o taxol inibem a atividade do NF- κ B, buscamos avaliar se haveria alguma relação entre a GSH e a atividade desse fator de transcrição. Para isso, investigamos o envolvimento do NF- κ B no efeito citotóxico causado pela associação do BSO e NO ou taxol.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Reagentes

O meio de cultura e o soro fetal bovino (FCS) foram adquiridos da GIBCO (São Paulo, Brasil). O S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina (SNAP) foi preparado em nosso laboratório segundo o método de Field et al. (1978). O taxol foi gentilmente doado pela Bristol-Myers Squibb (São Paulo, Brasil). O L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO, inibidor da enzima γ -glutamilcisteína sintetase), o 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea (BCNU; inibidor da GSH redutase) e a albumina sérica bovina (BSA) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). O Triton X-100 foi adquirido da Amersham Pharmacia Biotech (San Francisco, CA). Todas as soluções foram preparadas em meio de cultura, com exceção daquelas preparadas para imunocitoquímica, que foram diluídas com PBS.

6.2.2 Linhagens Celulares

Foram utilizadas as linhagens de células leucêmicas linfoblásticas L-1210 (de origem murina) e CEM (de origem humana). As células leucêmicas foram mantidas como descrito anteriormente, na seção Material e Métodos do Capítulo 2.

6.2.3 Tratamentos

6.2.3.1 Associação de BSO, de BCNU com SNAP ou taxol

O BSO (1, 10 e 100 μM) foi adicionado às células 12 h antes do SNAP (100 e 1000 μM) ou do taxol (1 e 10 μM). O BCNU (100 μM) foi adicionado às células 2 h antes do SNAP (100 e 1000 μM) ou do taxol (1 e 10 μM). Após a adição dos compostos, as células retornaram à estufa, onde foram incubadas durante 24 h nas condições descritas anteriormente.

6.2.4 Viabilidade Celular (Ensaio do MTT)

A viabilidade celular foi analisada pelo método do MTT, conforme descrito na seção Material e Métodos do Capítulo 2.

6.2.5 Determinação dos níveis de glutathiona

A glutathiona total (GSH + GSSH) foi quantificada usando-se o método da glutathiona redutase proposto por Tietze (1969). Nesse método, os grupamentos sulfidrilas da GSH interagem com o ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB), originando a GSTNB (forma oxidada de GSH), que, na presença da glutathiona redutase e de NADPH, é reduzida novamente a GSH. Concomitantemente à formação de GSTNB e GSH, há liberação de ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), um composto de coloração amarela. Sendo assim, a intensidade de cor produzida pelo TNB é diretamente proporcional à atividade da glutathiona redutase sobre a GSTNB e dos níveis de GSH intracelular. Resumidamente, após o tratamento com BSO, SNAP ou taxol, como descrito anteriormente, as placas contendo as células (5×10^5 células/0,2 ml) foram centrifugadas, o sobrenadante foi removido, e foram adicionados 200 μL de PBS. Esse procedimento foi repetido duas vezes para remoção de proteínas do meio de cultura. O *pellet* celular foi ressuspensão em 100 μL de água Milli-Q gelada contendo 1 mM EDTA, e a suspensão foi lisada em ultra-som (Ultrasonic Processor, Cole-Parmer, IL, USA). O citosol foi obtido a partir da

centrifugação dos lisados a 12.000 g por 20 min, a 4°C. A reação enzimática consistiu na mistura de 20 µl de sobrenadante e 180 µl da solução de reação (DTNB 75 µM; NADPH 120 µM; glutathione redutase 1 U/ml e EDTA 10 mM em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4). A mudança de cor foi imediatamente lida em leitor de placas (KC4 Bio-Tek® plate reader, Winooski, USA) a 412 nm. Os valores representam a média das leituras (absorbância, dA/min) realizadas minuto a minuto, durante 5 min. Curvas-padrão de GSH (1 nM-1 µM) foram feitas simultaneamente aos experimentos, e, finalmente, após interpolação por regressão linear, os valores foram expressos em pmol glutathione total/min/10⁵ células.

6.2.6 Preparação de Extrato Nuclear

O extrato nuclear foi obtido por processo de lise (Dignam *et al.*, 1983), conforme descrito, na seção Material e Métodos do Capítulo 4.

6.2.7 Ensaio de *immunoblotting* para NF-κB (c-Rel)

Para estudar a atividade do NF-κB, usamos o extrato nuclear das células leucêmicas linfoblásticas CEM. O procedimento foi semelhante ao descrito anteriormente na seção Material e Métodos do Capítulo 5.

6.2.8 Imunocitoquímica para NF-κB (c-Rel)

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados como descrito por Garcia-Abreu *et al.*, (2000). Após o tratamento com os compostos a serem analisados, as células (10⁶ cells/ml) foram centrifugadas em citocentrífuga, (Cytospin 3, Shandon Southern Products, Atsmoore, UK), fixadas com uma mistura de paraformaldeído 4% e sacarose 4% (ambos diluídos em PBS), durante 20 min, à temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1% diluído em PBS durante 5 min, à temperatura ambiente. Depois, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com uma solução de BSA

5% durante 30 min e as proteínas foram imunomarcadas com anticorpo primário monoclonal anti-c-Rel de coelho (diluído 1:50, StressGen Biotechnologies Corp. Victoria, BC, Canadá) *overnight* a 4°C. Subseqüentemente, as células foram lavadas com PBS, e a proteína investigada foi identificada por meio de incubação com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com biotina (diluído 1:50; Santa Cruz Biotechnology, San Diego, CA, USA) por 1 h, e depois com estreptoavidina conjugada com Cy3 (diluuição de 1:50; Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) por mais 1 h, à temperatura ambiente. Todas as lâminas foram contracoradas com 4,6-diamino-2-fenilidone (DAPI), para melhor visualização do núcleo, e depois seladas com solução contendo N-propilgalactato (20 mM) e glicerol (20%), ambos diluídos em PBS. As imagens foram fotografadas usando câmera digital (Sony DXC 151A CCD) ligada a microscópio de fluorescência (Olympus BX40) e processadas no programa Adobe Photoshop (San Jose, CA, USA).

6.2.9 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro-padrão da média (EPM). Cada experimento foi repetido pelo menos três vezes, com resultados semelhantes. Para a análise estatística, foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste *t* de Bonferroni. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Efeito do BSO sobre a citotoxicidade causada pelo NO ou pelo taxol em células leucêmicas

O BSO não apresentou efeito citotóxico para as células CEM até a concentração de 10 μ M, enquanto na de 100 μ M causou cerca de 60% de morte celular (Tabela 6.1). Já para a linhagem L-1210, esse composto causou citotoxicidade já visível na concentração de 1 μ M (cerca de 30% de morte celular), que, curiosamente, não teve padrão dose-resposta, já que as concentrações maiores causaram a mesma citotoxicidade (Tabela 6.1). De qualquer maneira, em

nenhuma das concentrações empregadas, o BSO foi capaz de causar a morte de mais do que 30% das células.

A incubação simultânea de BSO com SNAP potencializou o efeito citotóxico do doador de NO em ambas as linhagens de células leucêmicas (Figura 6.1, Painel A, L-1210, e Painel C, CEM). Por exemplo, a co-incubação de L-1210 e CEM com BSO (100 μM) e com concentrações não-citotóxicas de SNAP (100 μM) causou morte celular da ordem de 70%. O efeito potencializador do BSO também foi observado na presença do taxol (Figura 6.1, Painel B, L-1210, e Painel D, CEM), onde pode ser observado que o efeito citotóxico do taxol (10 μM , concentração que mata cerca de 20% e 40% de células L-1210 e CEM, respectivamente) foi muito potencializado na presença de BSO (100 μM ; em torno de 70-80% de morte celular para as linhagens L-1210 e CEM, respectivamente).

Tabela 6.1: Efeito citotóxico do BSO L-butionina-[S,R]-sulfoximina, inibidor de síntese de GSH) sobre células leucêmicas L-1210 (murina) e CEM (humana).

Composto	Células viáveis (%)	
	L-1210	CEM
Veículo	100	100
BSO		
1 μM	72 \pm 2*	99 \pm 6
10 μM	67 \pm 6*	100 \pm 5
100 μM	63 \pm 5*	63 \pm 5*

NOTA: As células foram plaqueadas (5×10^5 /poço) em placas de 96 poços, como descrito em Material e Métodos. O composto foi adicionado, e as células foram incubadas por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm EPM de três amostras. Os mesmos resultados foram obtidos em pelo menos três outros experimentos idênticos.
* Estatisticamente diferente do controle $p < 0.05$ ANOVA, seguida de teste t de Bonferroni.

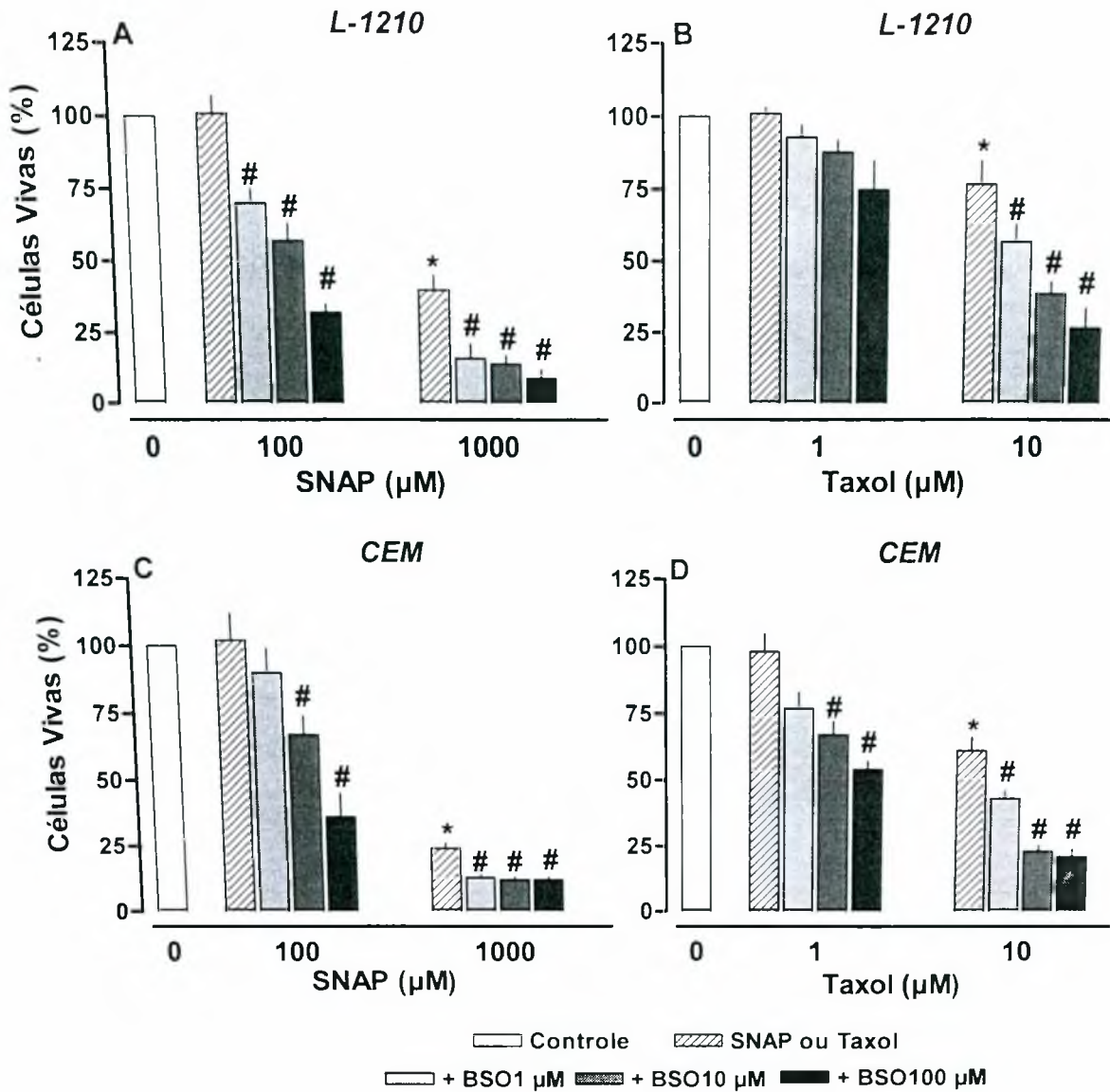


Figura 6.1: Efeito do L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO) sobre a citotoxicidade causada pelo SNAP ou pelo taxol em linhagens de células leucêmicas.

As células usadas foram de leucemia linfoblástica murina L-1210 (Painéis A e B) e humana CEM (Painéis C e D). O BSO foi adicionado às células 12 h antes do SNAP ou do taxol. Após a adição deles, as células foram incubadas por mais 24 h. A densidade óptica do grupo controle corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm EPM de três amostras. Os mesmos resultados foram obtidos em pelo menos dois outros experimentos idênticos. * Estatisticamente diferente do controle e # estatisticamente diferente SNAP ou de taxol na ausência de BSO, $p < 0,05$ ANOVA, seguida de teste t de Bonferroni.

6.3.2 Efeito do BSO, do NO e do taxol nos níveis de glutatona em células leucêmicas

Como pode ser observado na Figura 6.2, o BSO causou diminuição dos níveis de GSH de maneira concentração-dependente. O efeito máximo do BSO na depleção da GSH ocorreu na concentração de 10 μM (cerca de 90% de redução em relação ao controle). No entanto, concentrações mais baixas de BSO (1 μM) já foram suficientes para reduzir os níveis de GSH. Além do BSO, o SNAP e o taxol também diminuíram os níveis de GSH de maneira concentração-dependente, sendo o efeito máximo observado nas concentrações de 1.000 μM e 30 μM (cerca de 80% de redução para ambos os compostos). Importante potencialização na redução dos

níveis de GSH foi observada com a associação de BSO, seja com SNAP, seja com taxol. Por exemplo, a concentração de 300 μM de SNAP, que causou redução de cerca de 60% nos níveis de GSH, teve este valor aumentado para mais de 90% quando associado ao BSO (1 μM). O mesmo foi observado em relação ao taxol, que, na concentração de 10 μM , causa uma redução da ordem de 20%, e que, na presença de BSO (1 μM), vai a mais de 80%.

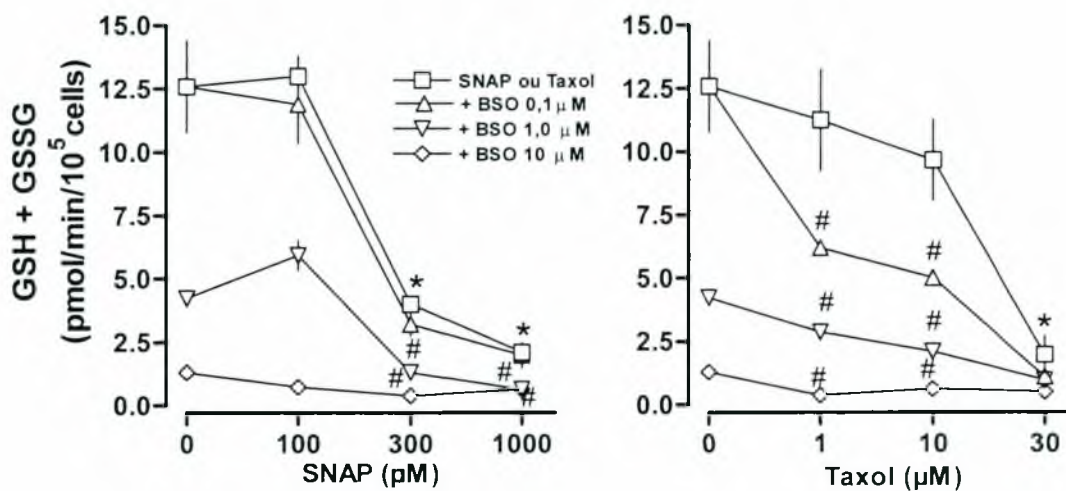


Figura 6.2: Efeito do SNAP e do taxol na ausência e presença de BSO sobre os níveis de glutatona total nas células leucêmicas L-1210.

O BSO foi adicionado às células 12 horas antes do SNAP (Painel **A**) ou do taxol (Painel **B**). Após mais 24 horas de incubação, as células foram lisadas, e os níveis de GSH foram quantificados pelo método de Tietze (1969), conforme descrito em Material e Métodos. Cada ponto representa a média \pm EPM de três amostras. Os mesmos resultados foram obtidos em pelo menos dois outros experimentos idênticos. * Estatisticamente diferente do controle e # estatisticamente diferente das concentrações de BSO, SNAP ou taxol sem associação, $p < 0,05$ ANOVA, seguida de teste t de Bonferroni.

6.3.3 Efeito do BCNU sobre a citotoxicidade causada pelo NO ou pelo taxol sobre células leucêmicas

A Figura 6.3 indica que a associação de concentrações não-citotóxicas de BCNU (100 μM) com SNAP (Painel A) mostrou ter um efeito potencializador do doador de NO quando este foi empregado na concentração de 1 mM. Nessa concentração, o SNAP matou cerca de 50% das células, valor este que foi duplicado pela associação com BCNU. O mesmo perfil ocorreu com o taxol (Painel B), em que o efeito potencializador do BCNU só foi visível quando associado à maior concentração de taxol (10 μM ; 50% versus 80% de morte celular). Vale ressaltar

que, embora não mostrado, foram testadas concentrações mais baixas de BCNU, mas só se encontraram alterações na viabilidade celular nas concentrações mostradas.

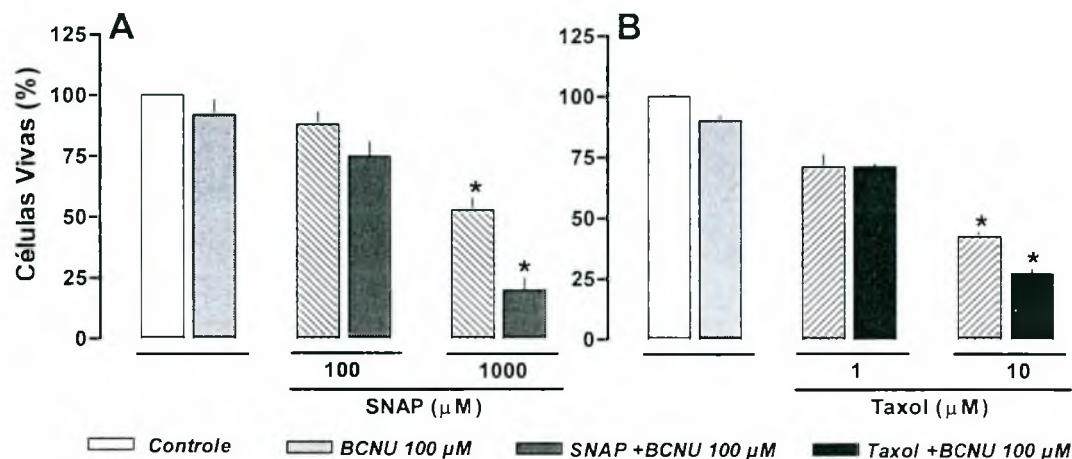


Figura 6.3 - Efeito do 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosouréia (BCNU) sobre a citotoxicidade causada pelo SNAP ou taxol em células leucêmicas linfoblásticas humanas CEM.

O BCNU foi adicionado às células conjuntamente ao SNAP (Painel A) ou com taxol (Painel B) e incubados por 24 h. A densidade óptica do grupo controle corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm EPM de três amostras. Os mesmos resultados foram obtidos em três outros experimentos idênticos. * Estatisticamente diferente do controle e # estatisticamente diferente das concentrações de SNAP ou taxol sem BCNU, $p < 0,05$, ANOVA seguida de teste t de Bonferroni.

6.3.4 Efeito do BSO, do NO e do taxol na atividade do NF- κ B e na morte de células leucêmicas linfoblásticas

A análise da microscopia de fluorescência para c-Rel intranuclear (Figura 6.4) revelou que o grupo controle apresenta intensa fluorescência nuclear devido à presença de NF- κ B intranuclear. No entanto, tanto o NO como o taxol diminuíram substancialmente a fluorescência intranuclear. Curiosamente, a intensidade de fluorescência nuclear foi maior após o tratamento com BSO, quando comparado ao controle. Entretanto, a associação de BSO, seja com SNAP, seja com taxol, resultou em uma marcada supressão da fluorescência nuclear.

Como pode ser observado na Figura 6.5, Painel A, as células CEM apresentaram atividade constitutiva do NF- κ B (c-Rel), e, de forma semelhante aos resultados observados com as células L-1210, o SNAP (300 μ M) e o taxol (10 μ M) inibiram mais de 90% dessa atividade constitutiva do NF- κ B. No entanto, o BSO

(100 μM) aumentou cerca de duas vezes a atividade constitutiva do NF- κB . Além disso, pode-se observar que o aumento da atividade do NF- κB pelo BSO não alterou o efeito inibitório do NO e do taxol sobre esse fator de transcrição. Nessa figura pode-se observar ainda que, embora o BSO tenha aumentado a atividade do NF- κB , ele não alterou o efeito inibitório do NO e do taxol sobre o NF- κB quando em associação com esses compostos. Comparativamente a esses resultados, a associação do BSO com o NO ou o taxol causou um aumento de cerca de 30% de morte celular quando comparado com o NO e o taxol separadamente.

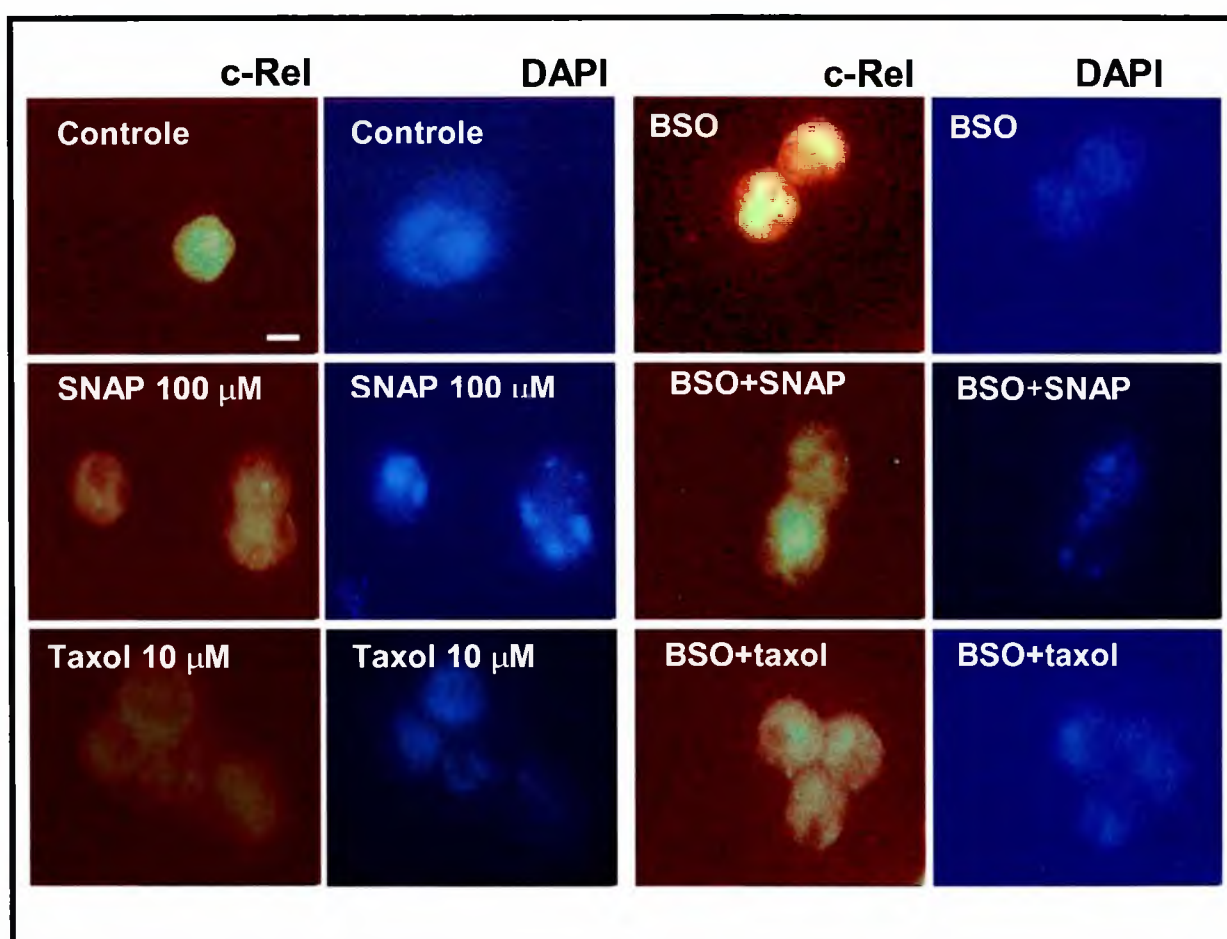


Figura 6.4: Efeito do BSO associado ou não com SNAP ou taxol na atividade do NF- κB nuclear em células leucêmicas linfoblásticas humanas CEM.

As células foram incubadas com BSO, SNAP ou taxol separada ou conjuntamente por 2 h. As lâminas contendo as células foram fixadas em paraformaldeído 4%, e sacarose 4% e permeabilizadas com Triton X-100 0,1%. A imunocitoquímica para o NF- κB foi feita usando anticorpo primário anti-c-Rel de coelho, identificado com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com biotina, e com estreptoavidina conjugada com Cy3. As lâminas foram contracoradas com DAPI para facilitar a visualização dos núcleos, como descrito em Material e Métodos. Campos representativos foram fotografados. A barra representa 10 μm ; objetiva de 100X.

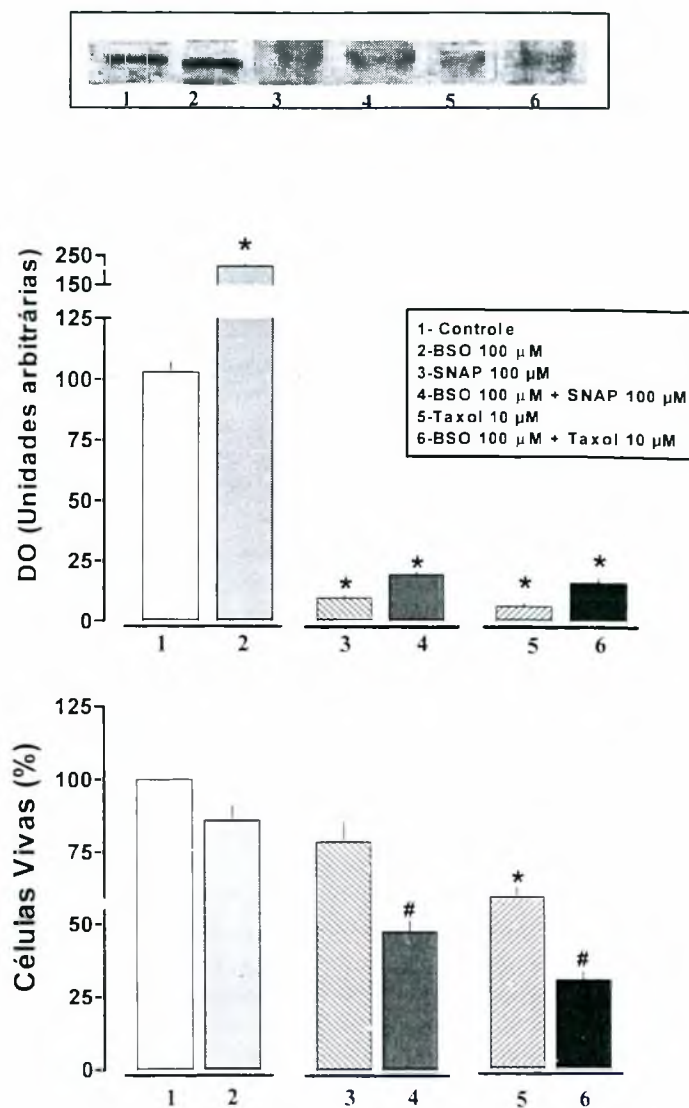


Figura 6.5: Efeito do BSO associado ou não a SNAP ou taxol sobre a atividade do NF- κ B nuclear e citotoxicidade em células leucêmicas linfoblásticas humanas CEM.

As células foram incubadas com BSO, SNAP ou taxol separada ou conjuntamente por 2 h e, então, foram lisadas para obtenção dos extratos nucleares. O *immunoblotting* para o NF- κ B foi realizado usando anticorpo primário anti-c-Rel de coelho, como descrito em Material e Métodos. O Painel **A** corresponde à densitometria das áreas imunorreativas; o Painel **B** corresponde à viabilidade celular dos mesmos grupos usados no *immunoblotting*, porém com incubação de 24 h. Cada ponto representa a média \pm EPM de três amostras. Os mesmos resultados foram obtidos em dois outros experimentos idênticos. * Estatisticamente diferente do controle e # estatisticamente diferente SNAP ou de taxol na ausência de BSO $p < 0,05$ ANOVA, seguida de teste t de Bonferroni.

6.4 DISCUSSÃO

O entendimento da complexa interação entre os diferentes mecanismos de defesa em resposta ao estresse celular pode identificar alvos moleculares de sensibilidade ou resistência em células tumorais e contribuir para novas intervenções na terapia do câncer. A demonstração de que a depleção de glutathione aumenta a sensibilização de células tumorais aos efeitos citotóxicos de vários compostos alquilantes e radiações já está bem descrita. Elevados níveis de glutathione intracelular estão associados à resistência de várias linhagens celulares tumorais a drogas quimioterápicas, como leucemia linfoblástica L-1210 (Kramer *et al.*, 1987), plasmocitoma humano (Medh *et al.*, 1991), carcinoma gástrico (Barranco *et al.*, 1990), carcinoma ovariano (Louie *et al.*, 1985) e rabdomyossarcoma (Rosenberg *et al.*, 1989).

Como já citado anteriormente, o estado dos níveis de GSH é fundamental na defesa contra vários agentes tóxicos e, além disso, é um dos alvos intracelulares mais importantes do NO. Vários trabalhos demonstram que o tratamento de diferentes tipos de células com doadores de NO pode resultar em aumento, diminuição ou, ainda, deixar inalterados os níveis de glutathione intracelular. Essas diferenças parecem explicar a sensibilização diferencial em células de mamíferos aos efeitos citotóxicos do NO (para uma revisão, ver Berendji *et al.*, 1999). Alguns trabalhos mostram que a depleção de GSH aumenta a sensibilização de células aos efeitos citotóxicos do NO (Wink *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1994; Luperchio *et al.*, 1996). Fundamentados nessas informações, levantamos a hipótese de que a “relativa” resistência das células L-1210 e CEM aos doadores de NO poderia ser justificada pela sua alta capacidade antioxidante, mediada por altos níveis de GSH. Nossos resultados mostram que o NO realmente diminuiu os níveis de glutathione nas células leucêmicas L-1210 de maneira concentração-dependente e que, quando comparados à curva concentração-resposta da viabilidade celular, foi observada uma estreita correlação. De fato, somente concentrações acima de 300 μM de SNAP são capazes de depletar os níveis de glutathione, e é exatamente a partir dessa concentração que se observa a diminuição na viabilidade das células leucêmicas linfoblásticas. Assim, os resultados apontam para o fato de que o efeito do NO na glutathione pode ser um importante determinante do seu efeito citotóxico. A depleção de glutathione não parece ser, por si só, suficiente para determinar morte nessas

células, pois, quando as mesmas foram tratadas com BSO, um inibidor da GGS, houve uma substancial depleção dos níveis de glutathiona e, no entanto, não foi acompanhada de morte celular significativa. Importante foi o fato de que o BSO, quando associado ao SNAP, potencializou os efeitos citotóxicos do doador de NO, sugerindo que a presença da GSH nas células leucêmicas linfoblásticas confere proteção aos efeitos deletérios do NO. Ao contrário do relatado por Libmann *et al.* (1993), o BSO também potencializou os efeitos citotóxicos do taxol, e, além disso, curiosamente, o taxol por si só também causou redução nos níveis de glutathiona. Embora nossos resultados não expliquem o mecanismo dessa ação do taxol, uma importante correlação pode ser feita entre a fosforilação da proteína antiapoptótica Bcl-2 pelo taxol (Haldar *et al.*, 1995) e a regulação dos níveis de GSH por essa proteína (para maiores detalhes, ver Voehringer & Meyn, 1998).

Outro fato importante a ser ressaltado é que o NO e o taxol não estão apenas diminuindo os níveis de GSH por oxidação desta a GSSG, pois os níveis de glutathiona medidos compreendem a glutathiona total. Assim, nossos resultados sugerem que a depleção da glutathiona pelo NO e pelo taxol pode estar também envolvendo a inibição da síntese de GSH.

Como descrito anteriormente, o NO pode inibir enzimas importantes no metabolismo da glutathiona, como, por exemplo, a γ -GCS (Han *et al.*, 1995) e a glutathiona redutase (Becker *et al.*, 1995). Os resultados até aqui apresentados mostram que a inibição de síntese de GSH pelo BSO potencializa a depleção de glutathiona e os efeitos citotóxicos causados pelo NO e pelo taxol. Buscando obter mais informações acerca do mecanismo de depleção de glutathiona por esses compostos e sua relação com a morte celular, investigamos a capacidade das células leucêmicas linfoblásticas em restaurar a GSH, por meio da análise de viabilidade celular após tratamento das células CEM com a associação de um inibidor de glutathiona redutase, o BCNU, com o NO ou o taxol. A depleção dos níveis de GSH pelo BCNU é um processo mais demorado, pois esse composto bloqueia apenas a reciclagem da GSH a partir da GSSG, mas não impede a síntese “de novo” de GSH. Essa diferença pode ser observada para as células leucêmicas CEM, pois a potencialização da morte celular só foi observada com concentrações mais altas de NO e de taxol, sugerindo que os níveis de GSH ainda remanescentes nessas células foram capazes de neutralizar, pelo menos parcialmente, os efeitos oxidantes desses dois compostos em concentrações mais baixas. Nossos dados não nos

permitem afirmar, mas reforçam a hipótese de que a depleção dos níveis de glutathiona pelo NO e pelo taxol envolve a inibição da enzima γ -GCS, pois, em concentrações mais altas, o NO e o taxol esgotaram os estoques de GSH e, quando associados ao inibidor de glutathiona redutase, que impede a reciclagem de GSH, induziram a morte celular. Sendo assim, mais experimentos foram necessários para responder a essa questão.

Durante o estresse oxidativo ou nitrosativo, a diminuição dos níveis de GSH e o aumento de GSSG estão associados ao aumento da expressão de γ -GCS (para uma revisão, ver Rahman & MacNee, 2000), que é mediada pela ativação do NF- κ B (Manna *et al.*, 1999). Inicialmente, a atividade do NF- κ B nas células CEM foi visualizada por imunocitoquímica, na qual se observou que a atividade constitutiva do NF- κ B foi aumentada quando essas células foram tratadas com BSO. Entretanto, quando essas células foram tratadas com o doador de NO ou com taxol, houve considerável diminuição da atividade nuclear do NF- κ B, mesmo quando esses compostos estavam associados ao BSO. Esses achados foram confirmados com os experimentos de *immunoblotting*, e, realmente, os resultados mostraram que a depleção dos níveis de glutathiona pelo BSO induziu um aumento de duas vezes na atividade do NF- κ B. No entanto, embora o NO ou o taxol tenham diminuído os níveis de glutathiona intracelular, eles não contribuíram para o aumento da expressão de γ -GCS, pois inibiram a atividade do NF- κ B. Além disso, anularam o efeito do BSO sobre a atividade do NF- κ B. Isso justifica a potencialização do efeito citotóxico do NO e do taxol sobre as células leucêmicas linfoblásticas, uma vez que esses compostos, além de depletar os níveis de glutathiona, tornam as células mais vulneráveis aos seus danos oxidativos e nitrosativos, e impedem indiretamente a síntese de GSH, que é a maior arma antioxidante intracelular.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer é uma das doenças mais complexas que a medicina já enfrentou, caracterizada por apresentar inúmeras mutações gênicas, as quais conferem às células tumorais uma resistência desigual. Mas essa não é a única razão pela qual elas parecem estar quase sempre “um passo adiante” das defesas do organismo hospedeiro. A outra grande razão dessa capacidade de escapar das defesas imunológicas é que, diferentes de bactérias e vírus, células tumorais não apresentam alvos moleculares completamente estranhos ao hospedeiro. É por isso que o desenvolvimento de drogas citotóxicas, tendo apenas as células tumorais como alvo principal, tornou-se um dos maiores desafios da ciência médica (Rostad, 1991; Eltahir *et al.*, 1998). Nas últimas duas décadas, enormes avanços no entendimento da biologia molecular tumoral contribuíram para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos. Atualmente, estão em estudo 354 novas drogas aplicadas experimentalmente em 23.000 pessoas em todo o mundo, mas a perspectiva de tratamento efetivo de pacientes com câncer de mal prognóstico ainda está distante (Brun *et al.*, 1997; Dunton, 1997; Piccart, 1996; Rahman *et al.*, 1997; Buchalla *et al.*, 2001).

Uma vez diagnosticado o câncer, uma variedade de opções de tratamento são consideradas, dependendo do tipo de tumor, da sua extensão e localização. A maioria das terapias antileucêmicas envolve a administração sistêmica de quimioterápicos, entretanto essa estratégia terapêutica é freqüentemente acompanhada por diversos e severos efeitos colaterais, que comprometem a qualidade de vida do paciente. O efeito colateral mais grave é a imunossupressão, que freqüentemente leva os pacientes a óbito por comprometimento da resposta imune contra patógenos ou pela recidiva da doença, pois a ausência de um sistema imune eficaz favorece a sobrevivência de células leucêmicas residuais ao tratamento (Chanock & Pizzo, 1997; Finiewicz & Larson, 1999).

Como a proliferação desregulada e a inibição da apoptose são características fundamentais no desenvolvimento tumoral, estes dois pontos tornaram-se alvos importantes de intervenção terapêutica na prática oncológica. Nesse contexto, o óxido nítrico surge como uma molécula de grande importância, pois, além de ser

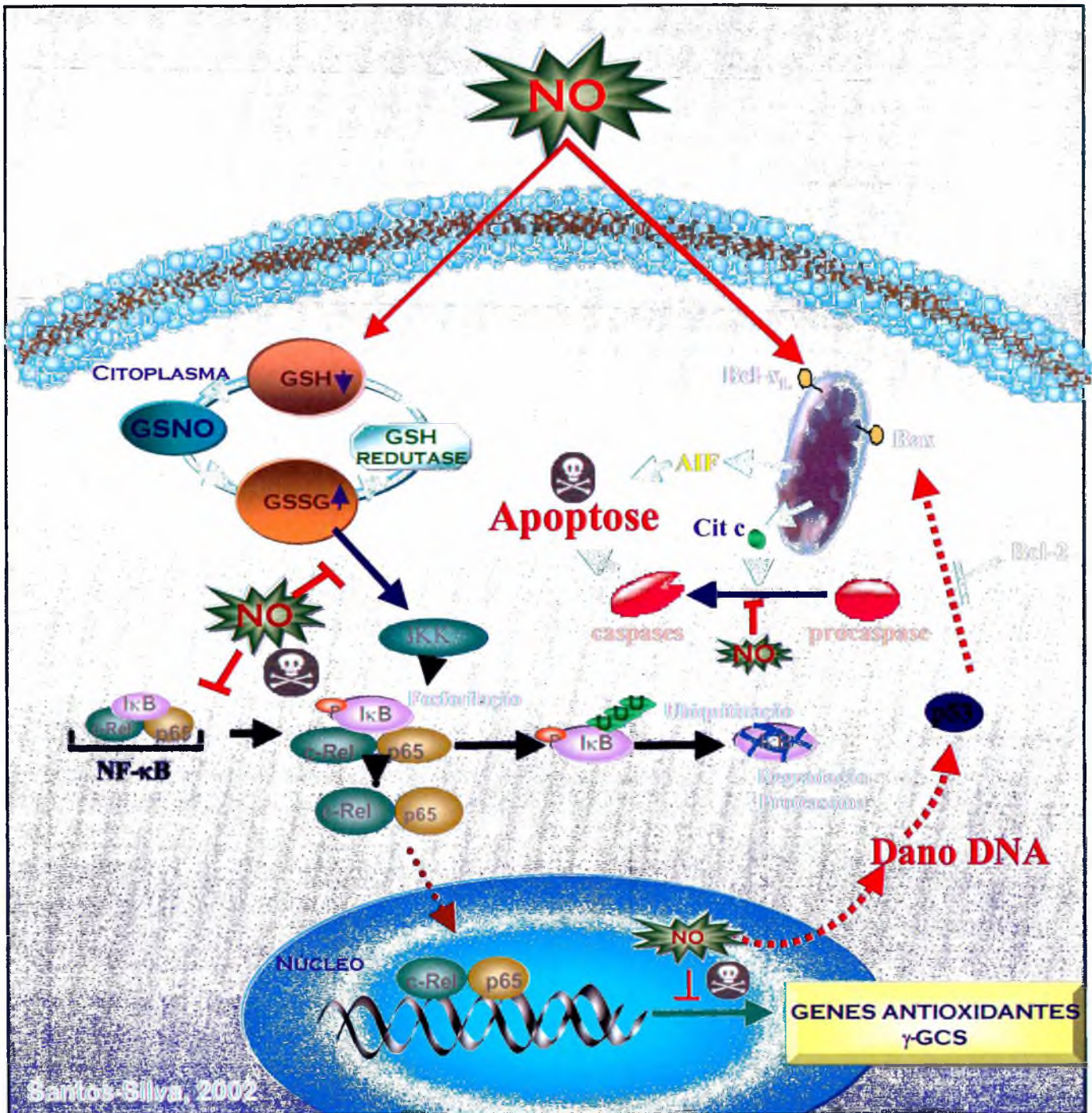
citotóxica para uma variedade de tipos de células tumorais, ainda modula a resposta imune do hospedeiro, o qual é um mecanismo de defesa natural contra células tumorais. Essa modulação ocorre por meio da ativação de macrófagos, células endoteliais e linfócitos *natural killer* (células NK), e liberação de citocinas (para uma revisão, ver Kim *et al.*, 2001; Cifone *et al.*, 2001). Uma das citocinas liberadas durante a ativação de macrófagos é a IL-12, que estimula a proliferação e citotoxicidade de linfócitos T e de células NK, e induz a secreção de outras citocinas com atividade antitumoral, como, por exemplo, o IFN- γ . Devido a essas propriedades, a IL-12 vem sendo considerada como uma forte candidata para uso em imunoterapia antitumoral, inclusive com excelentes respostas no tratamento de leucemias (Dunussi-Joannopoulos *et al.*, 1999).

Nossos resultados mostram que os efeitos do NO estão relacionados com o tipo de célula, com a sua concentração e com o tipo de fonte produtora/doadora de NO. A relativa resistência ao efeito citotóxico do NO mostrada pelas duas linhagens leucêmicas empregadas nesse trabalho ficou evidenciada pelo achado de que essas células somente foram sensíveis aos efeitos citotóxicos do NO após longos períodos de exposição a concentrações relativamente altas de doadores de NO (EC_{50} da ordem de 100-200 μ M contra 1-2 μ M para efeito vasodilatador, por exemplo). Mais ainda, a eficiência dos doadores de NO em causar morte nas células leucêmicas está diretamente relacionada com a cinética de liberação de NO, pois, como foi observado, quanto mais rápida foi essa liberação, mais efetivo era o doador de NO. Está bem demonstrado na literatura que estresses oxidativo e nitrosativo resultam na ativação de fatores de transcrição sensíveis ao estado redox celular, notadamente o NF- κ B e o AP-1 (c-Fos/c-Jun, ativador de proteína 1; para uma revisão, ver Rahaman & MacNee, 2000). Essa ativação tem como consequência a transcrição de genes antioxidantes, tais como γ -GGS, MnSOD (superóxido dismutase manganês) e heme oxigenase 1(HO-1). Com base nessas informações, as evidências de que vários tipos de células tumorais apresentam atividade constitutiva de NF- κ B (para uma revisão, ver Rayet & Gélinas, 1999), inclusive ambas as linhagens leucêmicas aqui estudadas, nos levaram a criar a hipótese de que a presença desses fatores de transcrição poderia conferir vantagem de sobrevivência à célula. Interessante foi o fato de que a incubação dessas linhagens leucêmicas com NO causou importante inibição da atividade constitutiva do NF- κ B e, mais, que não parecia haver uma

relação direta entre a inibição do NF- κ B e a morte celular causada pelo NO. Outro achado muito importante do presente trabalho foi que o taxol, um composto já usado na quimioterapia, parece compartilhar mecanismos de ação citotóxica semelhantes aos do NO. As ações citotóxicas do taxol e do NO foram independentes de alterações no citoesqueleto, mas ambos causaram inibição da atividade constitutiva do NF- κ B, que, em princípio, não guardava relação direta com a intensidade de morte celular. Muito interessante foi a observação de que doadores de NO associados ao taxol mostraram efeito citotóxico sinérgico. No entanto, a correlação entre o efeito inibitório sobre o NF- κ B causado tanto pelo NO quanto pelo taxol, e a morte celular ainda deixavam questionamentos a serem investigados. A relação entre a morte celular e a atividade de NF- κ B foi elucidada com a continuação do trabalho. Após estudos comparativos entre o NO e o taxol, que, em princípio, atuariam de maneira totalmente diferente, observamos que os efeitos citotóxicos deles sobre células leucêmicas linfoblásticas usam vias muito semelhantes, ou seja, ambos inibem a atividade do NF- κ B e depletam os níveis de GSH. Os resultados aqui apresentados foram claros em relação aos efeitos citotóxicos do NO e do taxol estarem diretamente ligados à capacidade antioxidante da célula, pois seus efeitos citotóxicos foram acentuados com a depleção prévia dos níveis de GSH. A compilação de evidências obtidas nesse estudo nos permite sugerir um dos prováveis múltiplos mecanismos de citotoxicidade para o NO em células leucêmicas. Como pode ser observado no Esquema 7.1, após a adição de NO às células leucêmicas linfoblásticas, ele se difundiria pela membrana e, no citosol, interagiria com GSH, originando GSSG. Pela ação da glutathione redutase, a glutathione oxidada seria novamente reduzida a GSH. A diminuição dos níveis de GSH é crítica para a ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B e AP-1, sensíveis ao estado redox da célula. A ativação do NF- κ B e do AP-1 resulta na transcrição de genes antioxidantes, incluindo o da γ -GCS. O ponto crucial para o entendimento da relação entre inibição da atividade de NF- κ B, a depleção de GSH e a morte celular nas células leucêmicas L-1210 e CEM parece ser o fato de que o NO (e o taxol), além de depletar os níveis de glutathione, inibe a atividade do NF- κ B, impedindo, assim, a transcrição de genes responsáveis pela síntese “de novo” da GSH, e, dessa forma, anula a capacidade de resposta da célula tumoral ao estresse inicial. Esse aspecto é muito interessante quando se refere a tratamentos oncológicos, pois um dos

mecanismos adaptativos de células tumorais ao estresse oxidativo provocado por drogas quimioterápicas é por meio da ativação de NF- κ B, responsável pela transcrição de genes antioxidantes. Sendo assim, o NO e o taxol, além de diminuir os níveis de glutathiona intracelular (e, portanto, sensibilizando as células aos danos oxidativos e nitrosativos), impediriam o restabelecimento dos níveis normais de GSH intracelular. A diminuição das defesas antioxidantes parece contribuir para os efeitos deletérios do NO e do taxol, em particular sobre os danos no DNA, na mitocôndria e na depleção energética. A ausência do taxol no Esquema 7.1 decorre da falta de dados para propor mecanismos moleculares, pelos quais, o taxol depleta os níveis intracelulares de GSH e inibe a atividade do NF- κ B. Entretanto, nossos resultados suportam a afirmativa de que esses dois agentes citotóxicos, estruturalmente tão díspares, compartilham pelo menos dois mecanismos moleculares que devem estar relacionados aos seus efeitos citotóxicos para células leucêmicas murinas e humanas.

A quimioterapia convencional está freqüentemente associada ao desenvolvimento de resistência a drogas e toxicidade, o que limita a eficiência terapêutica. Alternativamente, muitas tentativas são feitas para atenuar as conseqüências de um tratamento prolongado com quimioterápicos, como, por exemplo, a associação de drogas ou combinações de tratamentos diferentes, como a radioterapia e a imunoterapia, ou o uso de agentes indutores de diferenciação celular ou inibidores de angiogênese associados à terapia (para uma revisão, ver Leszczyniecka *et al.*, 2001). Provavelmente, o sinergismo de ação entre o NO e o taxol na apoptose de células leucêmicas linfoblásticas é o resultado final de um mecanismo multifatorial que rompe com o complexo sistema de resistência tumoral. Além disso, outro aspecto importante a ser considerado é que o uso desses dois agentes não permite o desenvolvimento de resistência mediado pela ativação do NF- κ B que se segue à depleção de GSH intracelular. Sendo assim, concluímos que associação do NO e do taxol, ou desses compostos com outros quimioterápicos, pode abrir novos horizontes no tratamento terapêutico da leucemia linfoblástica.



Esquema 7.1: Mecanismo proposto de citotoxicidade do óxido nítrico: importância da glutatona e envolvimento do NF-κB em células linfoblásticas leucêmicas.

NO, óxido nítrico; AIF, fator indutor de apoptose; p53, proteína p53; Bcl-2, Bcl-xL e Bax, proteínas da família Bcl-2; GSH, glutatona reduzida; GSSG, glutatona oxidada; NF-κB, fator nuclear kappa B; IκB, proteína inibitória do NF-κB; IKK, proteína quinase IκB; Cyt c, citocromo c.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBINA JE, CUI S, MATEO RB, REICHNER JS (1993) Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. **J. Immunol.** 150: 5080-5085.
- ALBINA JE, REICHNER JS (1998) Role of nitric oxide in mediation of macrophages cytotoxicity and apoptosis. **Cancer Metastasis Rev.** 17: 39-53.
- ALBERTS B, BRAY D, ROBERTS K, WATSON JD (1997) *Biologia Molecular da Célula*, Artes Médicas Sul, Brasil.
- ARNELLE DR, STAMLER JS (1995) NO⁺, NO[•], and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. **Arch. Biochem. Biophys.** 318: 279-285.
- ASAHI M, FUJII J, SUZUKI K, SEO HG, KUZUYA T, HORI M, TADA M, FUJII S, TANIGUCHI (1995) Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity. **J. Biol. Chem.** 270:21035-9.
- AVILA J (1997) The use of microtubule poisons on tumor cells. **Cancer J.** 10: 315-318.
- BABSON JR, REED DJ (1978). Inactivation of glutathione reductase by 2-chlorethyl nitrosourea-derived isocyanates. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 83: 754-762.
- BAIN BJ (1990) *Leukaemia Diagnosis. A guide to the FAB classification*. Gower Medical Publishing, London, England.
- BALDWIN ASJ (2001) The transcription factor NF- κ B and human disease. **J. Clin. Invest.** 107: 3-6.
- BALDWIN AS (2001) Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. **J. Clin. Invest.** 107: 241-246.
- BARGOU RC, EMMERICH F, KRAPPMANN D, BOMMERT K, MAPARA MY, ARNOLD W, ROYER HD, GRINSTEIN E, GREINER A, SCHEIDEREIT C, DÖRKEN B (1997) Constitutive Nuclear Factor- κ B-Rel A Activation Is Required for Proliferation and Survival of Hodgkin's Disease Tumor Cells. **J. Clin. Invest.** 100: 2961-2969.
- BARRANCO SC, TOWNSEND CM Jr, WEINTRAUB B, BEASLEY EG, MACLEAN KK, SHAEFFER J, LIU NH, SCHELLENBERG K (1990) Changes in glutathione content and resistance to anticancer agents in human stomach cancer cells induced by treatments with melphalan in vitro. **Cancer Res.** 50:3614-3618.

- BERENDJI, KOLB-BACHOFEN V, MEYER KL, KRÖNCKE KD (1999) Influence of nitric oxide on the intracellular reduced glutathione pool: different cellular capacities and strategies to encounter nitric oxide-mediated stress. **Free Radic. Biol. Med.** 27: 773-780.
- BECKER K, GUI M, SCHIRMER RH. (1995) Inhibition of human glutathione reductase by S-nitrosoglutathione. **Eur. J. Biochem.** 234:472-8.
- BECKMAN JS, KOPPENOL WH (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Amer. J. Physiol.** 271: C1424-C1437.
- BERGER SJ, GOSKY K, ZBOROWSKA E, WILSON JKV, BERGER NA (1994) Sensitive Enzymatic Cycling Assay for Glutathione: Measurements of Glutathione Content and Its Modulation by Buthionine Sulfoximine *in vivo* and *in vitro* in Human Colon Cancer. **Cancer Res.** 54: 4077-4083.
- BERSHADSKY A, VASILIEV J. (1989) Cytoskeleton and internal organization. In: **Cytoskeleton**, Bershinsky A and Vasiliev J (eds), pp. 167-201. Plenum Press: New York.
- BHALLA K, IBRADO AM, TOURKINA E, TANG C, MAHONEY ME, HUANG Y (1993) Taxol induces internucleosomal DNA fragmentation associated with programmed cell death in human myeloid leukemia cell. **Leukemia** 7: 563-568.
- BLAIR SL, HEERDT P, SACHAR S, ABOLHODA A, HOCHWALD S, CHENG H, BURT M (1997) Glutathione metabolism in patients with non-small cell lung cancers. **Cancer Res.** 57:152-5.
- BONFOCO E, KRAINC D, ANKARCRONA M, NICOTERA P, LIPTON AS (1995) Apoptosis and Necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intensive insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical culture. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92: 7162-7166.
- BOGDAN C (2001) Nitric oxide and the regulation of gene expression. **Trends. Cell Biol.** 11: 66-75.
- BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72 : 248-254.
- BREDT DS, SNYDER SH (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. **Ann. Rev. Biochem.** 63: 175-195.
- BROCKHAUS F, BRUNE B U937 apoptotic cell death by nitric oxide: Bcl-2 downregulation and caspase activation. **Exp. Cell Res.** 1998; 238: 33-41.
- BROWN GC (1999) Nitric Oxide and mitochondrial respiration. **Biochem. Biophys. Acta** 1411: 351-369.

- BRÜNE B, VON KNEHTEN A, SANDAU KB (1998) Nitric oxide and its role in apoptosis. **Eur. J. Pharmacol.** 351: 261-272.
- BUCHALLA AP, POLES C, TEICH DH (2001) Cresce a prevenção e o índice de cura do câncer. **VEJA** 34: 90-97.
- CARAGLIA M, BUDILLON, VITALE G, LUPOLI G, TAGLIAFERN P, ABBRUZZESE (2000) Modulation of molecular mechanisms involved in protein synthesis machinery as a new toll for the control of cell proliferation. **FEBS Lett.** 267: 3919-3936.
- CHANOCK SJ, PIZZO PA (1997) Infectious complications of patients undergoing therapy for acute leukemia: current status and future prospects. **Semin. Oncol.** 24: 132-140.
- CHEN YR, SHRIVASTAVA A, TAN TH (1999) Down-regulation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) phosphatase M3/6 and activation of hydrogen peroxide and pyrrolidine dithiocarbamate. **Oncogene** 93: 2360-2368.
- CHEN Z, HAGLER J, PALOMBELLA VJ, MELANDRI F, SCHERER D, BALLARD D, MANIATIS T (1995) Signal-induced, site-specific phosphorylation targets I κ -B α to the ubiquitin proteasome degradation pathway. **Genes Dev.** 9: 1586-1597.
- CHOY H, AKERLEY W, DEVORE RF (1999) Concurrent paclitaxel, carboplatin, and radiation therapy for locally advanced non-small cell lung cancer. **Semin. Oncol.** 26: 36-43.
- CHUNG HT, PAE HO, CHOI BM, BILLIAR TR, KIM YM (2001) Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 282:1075-1079.
- CIFONE MG, ULISSE S, SANTONI A (2001) Natural killer cells and nitric oxide. **Int. Immunol.** 1: 1513-1524.
- CLANCY RM, LESZCZYNSKA-PIZIAK J, AMIM A, LEVARTOVSKY, ABRAMSON SB (1995) Nitric oxide stimulates ADP-ribosylation of actin in human neutrophils. **J. Leukoc. Biol.** 58: 196-202.
- CLANCY RM, LEVARTOVSKY D, LESZCZYNSKA-PIZIAK J, YEGUDIN J, ABRAMSON SB. (1994) Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitroglutathione as a bioactive intermediary. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 91: 3680-3684.
- CLARK AG, DEBNAM P. (1988) Inhibition of glutathione S-transferases from rat liver by S-nitroso-L-glutathione. **Biochem. Pharmacol.** 37:3199-3201.
- CLEMENTI E, BROWN GC, FEELISCH M, MONCADA S (1998) Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: Crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 95: 7631-7636.

COOPER GM (2000) **The Cell: A Molecular Approach**. 2th ed., Editora ASM Press and Sinauer Associates, Inc., USA.

DAUGAS E, NOCHY D, RAVAGNAN L, LOEFFLER M, SUSIN SA, ZAMZAMI N, KROEMER G (2000) Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. **FEBS Lett.** 476:118-23.

DE BRABANDER M, GEUENS G, NUYDENS R, WILLEBRORD R, DE MEY J (1981) Taxol induces the assembly of free microtubule in living cells and blocks the organizing capacity of the centrosomes and kinetochores. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 78: 5608-5612.

DELEVE LD, KAPLOWITZ N (1991) Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Pharmacol. Ther.** 52:287-305.

DIGNAM JD, LEOVITZ RM, ROEDER RG (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. **Nucleic Acids Res.** 5: 1475-1489.

DIMMELER S, HAENDELER J, NEHLS M, ZEIHNER AM (1997) Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 β -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. **J. Exp. Med.** 185 :601-607.

DOERFLER P, FORBUSH KA, PERLMUTTER RM. (2000) Caspase enzyme activity is not essential for apoptosis during thymocyte development. **J. Immunol.** 164:4071-4079.

DONALDSON KL, GOOLSBY KL, WAHL AF (1994) Cytotoxicity of the anticancer agents cisplatin and taxol during cell proliferation and the cell cycle. **Int. J. Cancer** 57: 847-855.

DRAPIER JC, HIBBS JB (1988) Differentiation of murine macrophages to express non-specific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. **J. Immunol.** 140: 2829-2838.

DUNTON CJ (1997). New options for the treatment of advanced ovarian cancer. **Semin. Oncol.** 24: S2-S11.

DUNUSSI-JOANNOPOULOS K, RUNYON K, ERICKSON J, SCHAUB RG, HAWLEY RG, LEONARD JP (1999) Vaccines With Interleukin-12-Transduced Acute Myeloid Leukemia Cells Elicit Very Potent Therapeutic and Long-Lasting Protective Immunity **Blood** 94: 4263-4273.

EASTMAN A, RIGAS JR. (1999) Modulation of apoptosis signaling pathways and cell cycle regulation. **Semin. Oncol.** 26: 7-16;

- EISERICH JA, ESTEVEZ AG, BAMBERG TV, YE YZ, CHUMLEY PH, BECKMAN JS, FREEMAN B (1999) Microtubule dysfunction by posttranslational nitrotyrosination of α -tubulin: A nitric oxide-dependent mechanism of cellular injury. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 96: 6365–6370.
- EISENHAUER EA, VERMORKEN JB (1998) The Taxoids: Comparative clinical pharmacology and therapeutic potential. **Drugs** 55: 5-30.
- ELTAHIR A, HEYS SD, HUTCHEON AW, SARKAR TK, SMITH I, WALKER LG, AH-SEE AK, EREMIN O (1998) Treatment of large and locally advanced breast cancers using neoadjuvant chemotherapy. **Am. J. Surg.** 175: 127–132.
- ENARI M, SAKAHIRA H, YOKOYAMA H, OKAWA K, IWAMATSUA, NAGATA S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature** 391:43-50.
- FELDMAN PL, GRIFFITH OW, STUEHR DJ (1993) Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric oxide synthase by L-NG-methylarginine requires NADPH-dependent hydroxylation. **J Med Chem** 36:491-496.
- FIELD L, DILTS RV, RAVICHANDRAN R, LENHERT PG, CARNAHAN GE (1978) An unusually stable thionitrite from N-acetyl-D,L-penicillamine; X-ray crystal and molecular structure of 2-(acetylamino)-2-carboxy-1,1-dimethylethyl thionitrite. **J. Chem. Soc. Comm.** pp 249–250.
- FINIEWICZ KJ, LARSON RA (1999) Dose-intensive therapy for adult acute lymphoblastic leukemia. **Sem. Oncol.** 26: 6-20.
- FOO SY, NOLAN GP (1999) NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. **Trends. Genet.** 15: 229-235.
- FRANKS LM, TEICH NM (1998) Introduction to the cellular and molecular biology of cancer . In **What is cancer?** Franks LM (ed), pp 1-20 and **Epidemiology of cancer**, Key *et al* (ed), pp 34-59, Oxford University Press Inc., New York.
- GASTON B, REILLY J, DRAZEN JM, FACKLER J, RAMDEV P, ARNELLE D, MULLINS M E, SUGARBAKER DJ, CHEE C, SINGEL DJ (1993). Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90: 10957-10961.
- GARCIA-ABREU J, MENDES FA, ONOFRE GR, DE FREITAS MS, SILVA LCF, MOURA NETO V, CAVALCANTE LA (2000). Contribution of heparan sulfate to the non-permissive role of the midline glia to the growth of midbrain neurites. **Glia** 29, 260-272.
- GENARO AM, HORTELANO S, ALVAREZ A, MARTINEZ C, BOSCA L (1995) Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl levels. **J. Clin. Invest.** 95: 1884-1890.

- GENG YJ, AZUMA T, TANG JX, HARTWIG JH, MUSZYNSKI M, LIBBY QWP, KWIATKOWSKI DJ (1998) Caspases-3-induced gelsolin fragmentation contributes to actin cytoskeletal collapse, nucleolysis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells exposed to proinflammatory cytokines. **Eur J. Cell Biol.** 77: 294-302.
- GHIBELLI L, FANELLI C, ROTILIO G, LAFAVIA E, COPPOLA S, COLUSSI C, CIVITAREALE P, CIRIOLO MR.(1998) Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. **FASEB J.** 12:479-86.
- GHOSH S, May MJ and Kopp EB (1998) NF-kappaB and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. **Ann. Rev. Immunol.** 16: 225-260.
- GILMORE TD, KOEDOOD M, PIFFAT KA, WHITE DW (1996) Rel/NF-kB/Ik-B proteins and cancer. **Oncogene** 13:1367-1378.
- GODWIN AK, MEISTER A, O'DWYER PJ, HUANG CS, HAMILTON TC, ANDERSON ME (1992) High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 89:3070-4.
- GOLAB J, ZAGOZDZON R, KAMINSKI R, KOZAR K, GRYSKA K, IZYCKI D, MACKIEWICZ A, STOKLOSA T, GIEMASZ A, LASEK W, JAKÓBISIAK M (2001) Potentiation antitumor effectiveness of combined chemo-immunotherapy with interleukin- 12 e 5-fluorouracil of L1210 leukemia *in vivo*. **Leukemia** 15: 613-620.
- GORIN NC, ESTEY E, JONES R, LEVITSKY HI, BORRELLO I, SLAVIN S (2000) New Developments in the therapy of acut myolocytic leukemia. **Hematology** 69-89.
- GRANVILLE DJ, CARTHY CM, HUNT DWC, MCMANUS BM (1998) Apoptosis: Molecular aspects of cell death and disease. **Lab. Invest.** 78: 893-913.
- GREEN D, KROEMER G. (1998) The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? **Trends. Cell Biol.** 8: 267-271.
- GREEN DR, REED JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281:1309-12.
- GRIFFITH OW (1999) Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione syntesis. **Free Radic. Biol. Med.** 27: 922-935.
- GRIFFITH OW, STUEHR DJ (1995) Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. **Ann. Rev. Phisiol.** 57: 707-736. GREEN LJ, WAGNER DA, GLOGOWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.** 126:131-138.
- GRUMONT RJ, ROURKE IJ, GERONDAKIS S (1999) Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. **Genes Dev.** 13: 400-411.

- GUNDERSEN GG, COOK TA (1999) Microtubules and signal transduction. **Curr. Opin. Cell Biol.** 11: 81-94.
- GUTTERIDGE JM, HALLIWELL B (1989). Iron toxicity and oxygen radicals. **Baillieres Clin. Haematol.** 2:195-256.
- HALDAR S, JENA N, CROCE CM (1995) Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92: 4507-4511.
- HAN J, STAMLER JS, LI H, GIFFITH OW (1995) Inhibition of γ -glutamylcysteine synthetase by S-nitrosylation. In: **The Biology of Nitric oxide**, Stamler JS, Gross S, Moncada S, Higgs A (eds), pp 114, Portland Press: London.
- HANAHAHAN D, WEINBERG RA The hallmarks of cancer.(2000) **Cell** 100: 57-70.
- HANIGAN MH, FRIERSON HF JR, BROWN JE, LOVELL MA, TAYLOR PT. (1994) Human ovarian tumors express gamma-glutamyl transpeptidase. **Cancer Res.** 54:286-90.
- HAQ R, ZANKE B (1998) Inhibition of apoptotic signaling pathways in cancer cells as a mechanism of chemotherapy resistance. **Cancer Metastasis Rev.** 17:233-239.
- HEMSTREET GP III, RAO J, HURST RE, BONNER RB, WALISZEWSKI P, GROSSMAN HB, LIEBERT M, BANE BL (1996) G-actin as a risk factor and modulatable endpoint for cancer chemoprevention trials. **J. Cell Biochem. Suppl.** 25:197-204.
- HERR I, DEBATIN K-M (2001) Cell stress response and apoptosis in cancer therapy. **Blood** 98: 2603-2614.
- HENCKEL T, MACHLEIDT T, ALKALAM I, KRONKE M, BEN-NERIAH Y, BAUERLE PA (1993) Rapid proteolysis of I κ B is necessary for activation of transcription factor NF- κ B **Nature** 365: 182-185.
- HIBBS JB, TAINTOR RR (1987) Activated macrophages-mediated cytotoxicity: Use of the *in vitro* cytotoxicity assay for study of bioenergetic and biochemical changes that develop in tumor target cells. **Meth. Enzymol.** 132 : 508-520.
- HIBBS JB, TAINTOR RR, VAVRIN Z, GRANGER DL, DRAPIER JC, AMBER IJ, LANCASTER JR (1990) Synthesis of nitric oxide from a terminal guanidino nitrogen atom of L-arginine: a molecular mechanism regulating cellular proliferation that targets intracellular iron. In: **Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system: Proceedings of the Symposium on Biological Importance of Nitric Oxide**, Moncada S, Higgs A (eds), pp 189-223, Elsevier: Amsterdam.
- HIBBS JBJR, TAINTOR RR, VAVRIN Z, RACHLIN EM (1988) Nitric Oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 157: 87-94.

- HIRAYAMA A, NORONHA-DUTRA AA, GORDGE MP, NEILD GH, HOTHERSALL JS (1999) S-nitrosothiols are stored by platelets and released during platelet-neutrophil interactions. **Nitric Oxide** 3:95-104.
- HOCHWALD SN, ROSE DM, BRENNAN MF, BURT ME (1997) Elevation of glutathione and related enzyme activities in high-grade and metastatic extremity soft tissue sarcoma. **Ann. Surg. Oncol.** 4:303-9.
- HOLMES FA, WALTERS RS, THERIAULT RL, FORMAN AD, NEWTON LK, RABER MN, BUZDAR AU, FRYE AU, HORTOBAGYI GN (1991) Phase II trial of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.** 83: 1797-1805.
- HUDIS CA (1999) The current state of adjuvant therapy for breast cancer: focus on paclitaxel. **Semin. Oncol.** 26:1-5.
- HUANG Y, JOHNSON KR, NORRIS JS, FAN WEIMIN (2000) Nuclear Factor- κ B signaling pathway may contribute to the mediation of paclitaxel-induced apoptosis in solid tumor cells. **Cancer Res.** 60: 4426-4443.
- HWANG S, DING A (1995) Activation of NF κ B in murine macrophages by taxol. **Cancer Biochem. Biophys.** 14: 265-272.
- IGNARRO LJ, BYRNS RE, WOOD KS (1987) Endothelium-dependent modulation of cGMP levels and intrinsic smooth muscle tone in isolated bovine intrapulmonary artery and vein **Circ. Res.** 60:82-92.
- JANMEY PA (1998) The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. **Physiol. Rev.** 78: 763-781.
- JANSSEN-HEININGER Y, POYNTER ME, BAEUERLE PA (2000) Recent advances towards understanding redox mechanisms in activation of Nuclear Factor κ B **Free Radic. Biol. Med.** 9: 1317-1327.
- JOHNSTON HM, MORRIS BJ (1994) NMDA and Nitric Oxide Increase Microtubule-Associated Protein 2 Gene Expression in Hippocampal Granule Cells. **J. Neurochem.** 63 : 379-382.
- JORDAN MA, WILSON L (1998) Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. **Curr. Opin. Cell Biol.** 10: 123-130.
- KANE DJ, SARAFIAN TA, ANTON R, HAHN H, GRALLA EB, VALENTINE JS, ORD T, BREDESEN DE (1993) Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. **Science** 262:1274-1277.
- KANNAN K, JAIN SK (2000) Oxidative stress and apoptosis. **Pathophysiology** 7:153-163.
- KARIN M, BEN-NERIAH Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. **Annu. Rev. Immunol.** 18:621-663.

- KAUFMANN SH, EARNSHAW (2000) Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. **Exp. Cell Res.** 256: 42-49.
- KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer** 26:239-57.
- KEVLES DJ (1997) A busca do impopular: uma história de coragem, vírus e câncer **em Histórias esquecidas da ciência**, Sacks O, Miller J, Gould SJ, Kevies DJ, Lewontin RC (eds), pp 61-91, Editora: Paz e Terra.
- KIM Y-M, BOMBECK C A, BILLIAR TR (1998) Nitric Oxide as bifunctional regulator of apoptosis. **Circ. Res.** 84: 253-256.
- KIM Y-M, ZAMORA R, PETROSKO P, BILLIAR TR (2001) The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. **Int. Immun.** 1: 1421-1441.
- KLIGERMAN J (1999) Desafios para a oncologia brasileira no novo milênio. **Revista Brasileira de Cancerologia** 45: Editorial.
- KLIGERMAN J (2001) Estimativas sobre incidência e mortalidade por câncer no Brasil – 2001. **Revista Brasileira de Cancerologia** 47: 111-114.
- KNOWLES RG, MONCADA S (1994). Nitric oxide synthase in mammals. **Biochem. J.** 298: 249-258.
- KOLB JP (2000) Mechanisms involved in the pro- and anti-apoptotic role of NO in human leukemia. **Leukemia** 14:1685-1694.
- KOSTKA P, XU B, SKILES EH (1999) Degradation of S-nitrosocysteine in vascular tissue homogenates: role of divalent ions. **J. Cardiovasc Pharmacol.** 33: 665- 670.
- KRAMER RA, GBREENEK, AHMAD S, VISTICA DT (1987) Chemosensitization of L-phenylalanine mustard by the thiol-modulating agent buthionine sulfoximine. **Cancer Res.** 47:19593-1597.
- KRÖNCKE K-D, FEHSEL K, KOLB-BACHOFEN V (1997) Nitric Oxide: Cytotoxicity versus Cytoprotection – How, Why, When, and Where? **Nitric Oxide: Biology and Chemistry** 1: 107-120.
- KUO ML, CHAU YP, WANG JH, SHIAH SG (1996) Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase block nitric oxide-induced apoptosis but not differentiation in human leukemia HL-60 cells. **Biochem. Biophys Res Commun** 219: 502-508.
- KUSENDA J (1998) Bcl-2 family proteins and leukemia. **Neoplasma** 45: 117-122.
- LAEMMLI UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685.

- LANDER, HM, SCHAJPAL, P, LEVINE, DM, NOVOGRODSKY A (1993) Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds **J. Immunol.** 150: 1509-1516.
- LANDER, HM, OGIESTE JS, PEARCE SF, LEVI R, NOVOGRODSKY A (1995) Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21 ras **J. Biol.Chem.** 270: 7017-7020.
- LEE JH, RYU H, HAN MK, KIM UH, CHUNG HT. (1997) Nitric oxide inhibits capping in HL-60 cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 232: 827-831.
- LEIST M, NICOTERA P (1997) The shape of cell death. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 236:1-9.
- LEPOIVRE M, CHENAIS B, YAPO A, LEMAIRE G, THELANDER L, RENU J-P (1990) Alterations of ribonucleotide reductase activity following induction of the nitrite-generating pathway in adenocarcinoma cells. **J. Biol. Chem.** 265: 14143-14149.
- LEU RW, LEU NR, SHANNON BJ, FAST DJ (1991) IFN-gamma differentially modulates the susceptibility of L1210 and P815 tumor targets for macrophage-mediated cytotoxicity **J. Immunol.** 147: 1816-1818.
- LESZCZYNIECKA M, ROBERTS T, DENT P, GRANTE S, FISHER PB (2001) Differentiation therapy of human cancer:basic science and clinical applications **Pharmacol. Ther.** 90: 105– 156.
- LI J, BILLIAR TR, TALANIAN RV, KIM YM (1997) Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 240: 419-424.
- LIEBMANN J, COOK JÁ, FISHER J, TEAGUE D, MITCHELL JB (1994) In vitro studies of taxol as a radiation sensitizer in human tumor cells. **J. Natl. Cancer Inst.** 86: 441-446.
- LIEBMANN JE, HAHN SM, COOK JÁ, LIPSCHULTZ C, MITCHELL JB, KAUFMAN DC (1993) Glutathione depletion by L-buthionine sulfoximine antagonizes taxol cytotoxicity. **Cancer Res.** 53: 2066-2070.
- LIN KT, XUE JY, NOMEN M, SPUR B, WONG PY (1995) Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. **J. Biol Chem** 270: 16487-16490.
- LLASOLA M SAEZ R, FELIPO V (2001) NMDA- induced phosphorylation of the microtubule-associate protein MAP-2 is mediated by activation of nitric oxide synthase and MAP kinase. **Eur J. Neurosci** 13: 1283-1291.
- LODISH H, BERK A, ZIPURSKY SL, MATSUDARA P, BATIMORE D, DARNELL, P (2000) *Molecular Cell Biology*. 4th ed., Editora W.H. Freeman and Company, USA.

- LOUIE KG, BEHRENS BC, KINSELLA TJ, HAMILTON TC, GROTZINGER KR, MCKOY WM WINKER MA, OZOLS RF. (1985) Radiation survival parameters of antineoplastic drug-sensitive and resistant human ovarian cancer cell lines and their modification by buthione sulfoximine. **Cancer Res.** 45;2110-2115.
- LU SC (1999) Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. **FASEB J.** 13:1169-1183.
- LUPERCHIO S, TAMIR S, TANNENBAUM SR (1996) NO-induced oxidative stress and glutathione metabolism in rodent and human cells. **Free Radic. Biol. Med.** 21: 513-519.
- MACMILLAN-CROW LA, CROW JP, KERBY JD, BECKMAN JS, THOMPSON JÁ (1996) Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93: 11853-11858.
- MAGRINAT G, MASON SN, SHAMI PJ, WEINBERG JB (1992) Nitric oxide modulation of human leukemia cell differentiation and gene expression. **Blood** 80: 1880-1884.
- MANFREDI JJ, PARNES J, HORWITZ SB (1982) Taxol binds to cellular microtubules. **J. Cell Biol.** 94: 688-696.
- MANNA SK, KUO MT, AGGARWAL BB (1999) Overexpression of γ -glutamylcysteine synthetase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor κ B and activator protein 1. **Oncogene** 18: 4371-4382.
- MATTHEWS JR, BOTTING CH, PANICO M, MORRIS HR, HAY RT (1996) Inhibition of NF-kappa B DNA binding by nitric oxide. **Nucleic Acids Res.** 24: 2236-2242.
- MAYO MW, BALDWIN AS (2000) The transcription factor NFkB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. **Biochim. Biophys. Acta** 1470: M55-M62.
- MAYER B, ANDREW P (1998) Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.** 358:127-133, 1998.
- MARSHALL HE, STAMLER JS (2001) Inhibition of NF- kappa B by S-nitrosylation. **Biochem.** 40: 1688-1693.
- MARTIN SJ, COTTER TG (1990) Disruption of microtubules induces an endogenous suicide pathway in human leukemia HL-60. **Cell Tissue Kinet** 23: 545-559.
- MEDH RD, GUPTA V, AWASTHI YC (1991) Reversal of melphalan resistance *in vivo* and *in vitro* by modulation of glutathione metabolism. **Biochem. Pharmacol.** 42:439-441.

- MEISTER A, TATE SS (1976) Glutathione and related γ -glutamyl compounds: Biosynthesis and utilization. **Annu. Rev. Biochem.** 45: 559-604.
- MEISTER A, ANDERSON ME (1983) Glutathione. **Annu. Rev. Biochem.** 52:711-60.
- MELINO G, BERNASSOLA F, KNIGHT RA, CORASANITI MT, NISTICO G, FINAZZI-AGRO A (1997) S-nitrosylation regulates apoptosis. **Nature** 388:432-433.
- MERCURIO F, MANNING AM (1999) NF- κ B as a primary regulator of the stress response. **Oncogene** 18: 6163-6171.
- MESSMER UK, REIMER DM, BRUNE B (1998) Protease activation during nitric oxide-induced apoptosis: comparison between poly(ADP-ribose) polymerase and U1-70kDa cleavage. **Eur. J. Pharmacol.** 349:333-43.
- MOHR S, ZECH B, LAPETINA EG, BRUNE B (1997) Inhibition of caspase-3 by S-nitrosation and oxidation caused by nitric oxide. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 238:387-91.
- MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.** 43: 109-142.
- MOREL A, LOSA G, CARREL S, HEUMANN D, VON FLIEDNER VE (1986) Determination of ectoenzyme activities in leukemic cells and in established hematopoietic cell lines. **Am J. Hematol.** 21:289-98.
- MORI N, FUJII M, IKEDA S, YAMADA Y, TOMONAGA M, BALLARD DW, YAMAMOTO N (1999) Constitutive activation of NF- κ B in primary adult T-cell leukemia cells. **Blood** 93: 2360-2368.
- MORCOS E, JANSSON OT, ADOLFSSON J, KRATZ G, WIKLUND NP (1999) Endogenously formed nitric oxide modulates cell growth in bladder cancer cell lines. **Urology** 53:1252-1257.
- MUNJAL DD (1980) Concurrent measurements of carcinoembryonic antigen, glucosephosphate isomerase, gamma-glutamyltransferase and lactate dehydrogenase in malignant, normal adult, and fetal colon tissues. **Clin. Chem.** 26:1809-1812.
- MURATA J, RICCIARDI-CASTAGNOLI P, DESSOUS L'EGLISE MANGE P, MARTIN F, JUILLERAT-JEANNERET L (1997) Microglial cells induce cytotoxic effects toward colon carcinoma cells: measurement of tumor cytotoxicity with a gamma-glutamyl transpeptidase assay. **Int. J. Cancer.** 70:169-74.
- MURPHY MP (1999) Nitric Oxide and cell death. **Biochem. Biophys. Acta** 1411: 401-414.

- NOBEL CSI, KIMLAND M, LIND B, ORRENIUS S, SLATER AFG (1995) Dithiocarbamates induced apoptosis in thymocytes by raising the intracellular level of redox-active copper. **J. Biol. Chem.** 270: 26202-26208.
- OGURA T, DEGEORGE G, TATEMACHI M, ESUMI H (1998) Suppression of anti-microtubule agent-induced apoptosis by nitric oxide: possible mechanism of a new drug resistance. **J. Cancer Res.** 89: 199-205.
- ORUCEVIC A, BECHBERGER J, GREEN AM, SHAPIRO RA, BILLIAR TR, LALA PK (1999). Nitric oxide production by murine mammary adenocarcinoma cells promotes tumor-cell invasiveness. **Int. J. Cancer** 8: 889-896.
- PAE H-O, YOO J-C, CHOI B-M, KANG C-L, KIM J-D, CHUNG H-T (1999) Apoptotic cell death induced by taxol is inhibited by nitric oxide in human leukemia HL-60 cells. **Immunopharmacol Immunotoxicol** 21: 667-682.
- PALMER RMJ, ASHTON DS, MONCADA S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, 333: 664-666.
- PAOLICCHI A, POMPELLA A, TONARELLI P, GADDUCCI A, GENAZZANI AR, ZUNINO F, PRATESI G, TONGIANI R. (1996) Gamma-glutamyltranspeptidase activity in human ovarian carcinoma. **Anticancer Res.** 16:3053-8.
- PARK SK, LIN HS, MURPHY S (1997) Nitric oxide regulates nitric oxide synthase-2 gene expression by inhibiting NF- κ B binding to DNA. **Biochem. J.** 322: 609-613.
- PAWLAK G, HELFMAN DM (2001) Cytoskeleton changes in cell transformation and tumorigenesis. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 11: 41-47.
- PENG HB, LIBBY P, LIAO JK (1995) Induction and stabilization of I-kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B **J. Biol. Chem.** 270: 14214-14219.
- PENG HB, SPIECKER M, LIAO JK (1998) Inducible nitric oxide: an autoregulatory feedback inhibitor of vascular inflammation. **J. Immunol.** 161: 1970-1976.
- PICCART M (1996) Treatment of advanced breast cancer: current status. **Anticancer Drugs** 7: 5-7.
- PIEPER AA, VERMA A, ZHANG J, SNYDER SH (1999) Poly (ADP-ribose), nitric oxide and death. **Trends. Pharmacol. Sci.** 20: 171-181.
- PINKUS R, WEINER LM, DANIEL V (1996) Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kappaB, and glutathione S-transferase gene expression. **J. Biol. Chem.** 271:13422-13429.
- PITTMAN SM, STRICKLAND D, IRELAND CM (1994) Polymerization of tubulin in a apoptotic cells is not cell cycle dependent. **Exp. Cell Res.** 215: 263-272.

- PORTER AG, JANICKE RU (1999) Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6:99-104.
- PUI C-H, EVANS WE (1998) Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 339: 605-615.
- QUAAZ F, SOLA B, ISSALY F, KOLB JP, DAVI F, MENTZ F, AROCK M, PAUL-EUGENE N, KORNER M, DUGAS B, MOSSALAYI MK (1994) Growth arrest and terminal differentiation of leukemic myelomonocytic cells induced through ligation of surface CD23 antigen. *Blood* 84: 3095-3104.
- RAHNMAN I, MACNEE W (2000) Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 1405-1420.
- RAHMAN ZU, FRYE DK, BUZDAR AU, SMITH TL, ASMAR L, CHAMPLIN RE, HORTOBAGYI GN (1997) Impact of selection process on response rate and long-term survival of potential high-dose chemotherapy candidates treated with standard-dose doxorubicin-containing chemotherapy in patients with metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 15: 3171-3177.
- RAYET B, GÉLINAS C (1999) Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 18: 6938-6947.
- REED J (2000) Apoptosis and cancer: strategies for integrating program cell death. *Semin. Hematol.* 37: 9-16.
- RICHMAN PG, MEISTER A (1975) Regulation of γ -glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J. Biol Chem.* 250: 1422-1426.
- ROCKETT KA, AWBURN MM, COWDEN WB, CLARK IA (1991) Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect. Immunol.* 59: 3280-3283.
- ROSENBERG MD COLVIN OM, GRIFFITH OW, BIGNER SH, ELION GB, HORTON JK LILLEY E BIGNER DD, FRIEDMAN HS. (1989) Establishment of a melphalan-resistant rhabdomyosarcoma xenograft with cross-resistance to vincristine and enhanced sensitivity following buthionine sulfoximine-mediated glutathione depletion. *Cancer Res.* 49:6917-6922.
- ROSETTE C, KARIN M (1995) Cytoskeletal control of gene expression: depolymerization of microtubules activates NF-kappaB. *J. Cell Biol.* 128: 1111-1119.
- ROSTAD ME (1991) Current strategies for managing myelosuppression in patients with cancer. *Oncol. Nurs. Forum* 18: 17-15.
- ROWINSKY EK, ONETTO N, CANETTA RM, ARBUCK SG (1992) Taxol: The first of the taxanes, an important new class of antitumor agents. *Semin. Oncol.* 19: 646-662.

- ROWINSKY EK, BURKE PJ, KARP JE, TUCKER RW, ETTINGER DS, DONEHOWER RC (1989) Phase I and pharmacodynamic study of taxol in refractory acute leukemias. **Cancer Res.** 49: 4640-4747.
- ROWINSKY EK, DONEHOWER RC. (1995) Paclitaxel (taxol) **N. Engl. J. Med.** 13:1004-1014.
- RUBNITZ JE, PUI C-H (1999) Molecular diagnostics in the treatment of leukemia. **Curr. Opin. Hematol.** 6: 229-235.
- RUVUOLO PP, DENG X, MAY WS (2001) Phosphorylation of Bcl-2 and regulation of apoptosis. **Leukemia** 15: 515-522.
- SARASTE A, PULKKI K (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc Res.** 45: 528-537.
- SARIH M, SOUVANNAVONG V, ADAM A (1993) Nitric oxidase synthase induces macrophages death by apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 191: 503-508.
- SCHIFF PB, FANT J, HORWITZ SB (1979) Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. **Nature** 22: 665-667.
- SCHRECK R, MEIER B, MANNEL DN, DROGE W, BAUEUERLE PA (1992) Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells **J. Exp. Med.** 175(5): 1181-1194.
- SEN R, BALTIMORE D (1986) Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a post-translational mechanism. **Cell** 47: 921-928.
- SEKKAI D, AILLET F, ISRAEL N, LEPOIVRE M (1998) Inhibition of NF-kappa B and HIV-1 long terminal repeat transcriptional activation by inducible nitric oxide synthase 2 activity. **J. Biol. Chem.** 273: 3895-9000.
- SCHINI-KERTH VB, BOESE M, BUSSE R, FISSLTHALER B, MULSCH A (1997) N-alpha-tosyl-L-lysine chromethylketone prevents expression of iNOS in vascular smooth muscle by blocking activation of NF-kappa B. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 17: 672-679.
- SHAMI PJ, MOORE JO, GOCKERMAN JP, HATHORN JW, MISUKONIS MA, WEINBERG JB (1995) Nitric oxide modulation of the growth and differentiation of freshly isolated acute non-lymphocytic leukemia cells. **Leukemia Res.** 19: 527-533.
- SHAMI PJ, WEINBERG JB (1996). Differential effects of nitric oxide on erythroid and myeloid colony growth from CD34+ human bone marrow cells. **Blood** 87: 977-982.

- SHIN WS, HONG Y-H, PENG H-B, CATERINA RD, LIBBY P, LIAO JK (1996) Nitric oxide attenuates vascular smooth muscle cell activation by interferon-gamma. **J. Biol. Chem.** 271: 11317-11324.
- SPENCER W, KWON H, CREPIEUX P, LECLERC N, LIN R, HISCOTT J. (1999) Taxol selectively blocks microtubule dependent NF-kappaB activation by phorbol ester via inhibition of I-kappaBalpha phosphorylation and degradation. **Oncogene** 14: 495-505.
- SUPINO R, MAPELLI E, SANFILIPPO O, SILVESTRO L (1992) Biological and enzymatic features of human melanoma clones with different invasive potential. **Melanoma Res.** 2: 377-384.
- TANGER M, ITTENSON A, FRANKE A, FREY A, GASSEN HG, ANSORGE S (1995) gamma-Glutamyl transpeptidase-cellular expression in populations of normal human mononuclear cells and patients suffering from leukemias. **Ann. Hematol.** 70: 237-42.
- TAYLOR BS, KIM YM, WANG Q, SHAPIRO RA, BILLIAR TR, GELLER DA (1997) Nitric Oxide down regulates hepatocyte-inducible nitric oxide synthase gene expression. **Arch. Surg.** 132: 1177-1183.
- TIETZE F (1969) Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal. Biochem** 27, 502-522.
- TSIKAS D, SANDMANN J, ROSSA S, GUTZKI FM, FROLICH JC (1999) Investigations of S-transnitrosylation reactions between low- and high-molecular-weight S-nitroso compounds and their thiols by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **Anal. Biochem.** 270: 231-41.
- TSONGALIS GJ, COLEMAN WB (1998) Molecular Oncology: diagnostic and prognostic assessment of human cancers in the clinical laboratory. **Cancer Invest.** 16:485-502.
- VAN DE LOOSDRECHT AA, NENNIE E, OSSENKOPPELE GJ, BEELEN RHJ, LANGENHUIJSE MMAC (1991) Cell mediated cytotoxicity against U937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. **J. Immunol. Methods** 141: 15-22.
- VOEHRINGER DW, MEYN RE. (1998) Reversing drug resistance in bcl-2-expressing tumor cells by depleting glutathione. **Drug Resistance Updates** 1:345-351.
- WANG CY, MAYO MW, BALDWING ASJ (1996) TNF and cancer therapy-induced apoptosis: Potentiation by inhibition of NF-kappa B. **Science** 274: 784-787.
- WANG W, BALLATORI N (1998) Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Functions. **Pharmacol. Rev.** 50: (3).

- WANG Y, DUNCAN R, ANN DK, HAMM-ALVAREZ SF (2000) Identification of a novel taxol-sensitive kinase activity associated with the cytoskeleton. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 277: 525-530.
- WALKER MW, KINTER MT, ROBERTS RJ, SPITZ DR (1994) Nitric oxide-induced cytotoxicity: involvement of cellular resistance to oxidative stress and the role of glutathione in protection. **Pediatr. Res.** 37: 41-49.
- WANI MC, TAYLOR HL, WALL ME, COGGAN P, MCPHAIL AT (1971) Plant antitumor agents VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **J. Am. Chem. Soc.** 93: 2325-2327.
- WEINBERG RA (2000) **Uma célula renegada: como o câncer começa**. Ed. Rocco, RJ.
- WINK DA, NIMS RW, DARBYSHIRE JF, CHRISTODOULOU D, HANBAUER L, COX GW, LAVAL F, LAVAL J, COOK JA, KRISHNA MC, DEGRAFF WG, MITCHELL JB (1994) Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O₂ reaction. **Chem. Res. Toxicol.** 7:519-525.
- WINK DA, VODOVOTZ Y, COOK JA, KRISHNA MC, KIM S, COFFIN D, DEGRAFF W, DELUCA AM, LIEBMANN J, MITCHELL JB (1998) The role of nitric oxide chemistry in cancer treatment. **Biochemistry** 63: 802-809.
- WILLIAMS S, MUTCH DG, XU L, COLLINS JL (1992) Divergent effects of taxol on tumor necrosis factor- α -mediated cytolysis of ovarian carcinoma cells. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 167: 1870-1876.
- WOLOSKER H, PANIZZUTTI R, ENGELENDER S (1996) Inhibition of creatine kinase by S-nitrosoglutathione. **FEBS Lett.** 392: 274-276.
- WOO MH, RELLING MV, SONNICHSEN DS, RIVERA GK, PRATT CB, PUI C-H, EVANS WE, PAPPO AS (1999) Phase I Target systemic exposure study of paclitaxel in children with refractory acute leukemia. **Clin. Cancer Res.** 5: 543-549.
- WONG HR (1998) Nuclear factor κ B and nitric oxide regulation life and death: nonsense or harsh reality? **Crit. Care Med.** 26: 1470-1471.
- XIE Q-W, KASHIWABARA Y, NATHAN C (1994) Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. **J. Biol. Chem.** 269: 4705-4708.
- YABUKI M, KARIYA S, INAI Y, HAMAZAKI K, YOSHIOKA T, YASUDA T, HORTON AA, UTSUMI K (1997) Molecular mechanisms of apoptosis in HL-60 cells induced by a nitric oxide-releasing compound **Free Radic. Res.** 27(3): 325-335.
- YAMAZAKI Y, TSURUGA M, ZHOU D, FUJITA Y, SHANG X, DANG Y, KAWASAKI K, OKA S (2000) Cytoskeleton disruption accelerates caspases-3 activation and alters the intracellular membrane reorganization in DNA damage-induced apoptosis. **Exp. Cell Res.** 259: 64-78.

YAO J, SCHOECKLMANN HO, PROLS F, GAUER S, STERZEL RB (1998) Exogenous nitric oxide inhibits mesangial cell adhesion to extracellular matrix components. **Kidney Int.** 53: 598-608.

ZHANG J, VELSOR LW, PATEL JM, POSTLETHWAIT EM, BLOCK ER(1999) Nitric oxide-induced reduction of lung cell and whole lung thioredoxin expression is regulated by NF-kappaB. **Am. J. Physiol.** 277:L787-L793.