



**Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Bioquímica Médica**

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA  
LINHAGEM LEUCÊMICA HUMANA MDR**

**FLAVIO EDUARDO PINTO DA SILVA**

**2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**FLAVIO EDUARDO PINTO DA SILVA**

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA  
LINHAGEM LEUCÊMICA HUMANA MDR**

Dissertação de Mestrado submetida à  
Universidade Federal do Rio de Janeiro visando a  
obtenção do título de Mestre em Química  
Biológica

Orientador: Vivian M Rumjanek

Rio de Janeiro  
Junho, 2007

## Sumário

Lista de abreviaturas: .....	xvii
<b>1. Introdução .....</b>	<b>22</b>
1.1. Resistência a múltiplas drogas .....	23
1.2. Proteínas ABC.....	25
1.3. Proteína ABCB1 ou Pgp .....	29
1.3.1. Estrutura da proteína Pgp (ABCB1) .....	30
1.4. A Proteína MRP1 (ABCC1).....	33
1.4.1. Estrutura da MRP1 (ABCC1) .....	34
1.5. A proteína ABCG2 ou BCRP .....	35
1.5.1. Estrutura da proteína BCRP (ABCG2).....	36
1.6. Moduladores das proteínas relacionadas ao fenômeno de MDR .....	37
1.7. Leucemias .....	39
1.7.1. Leucemia mielóide crônica .....	40
1.8. Quimioterápicos utilizados no tratamento de neoplasias.....	41
1.9. Nucleotídeos. Correlação entre transportadores de ATP e transportadores ABC.....	43
1.10. Estudos em linhagens resistentes .....	45
1.11. Justificativa .....	46
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>49</b>
<b>2.2 Objetivo Secundário:.....</b>	<b>50</b>
<b>3. Materiais e Métodos .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1. Materiais.....</b>	<b>52</b>
3.2. Métodos.....	57
3.2.1. Linhagens celulares.....	57
3.2.2. Seleção da linhagem resistente .....	57
3.2.3. Tempo de duplicação celular .....	58
3.2.4. Teste de citotoxicidade .....	58
3.2.5. Detecção das proteínas de resistência a múltiplas drogas por citometria de fluxo..	59
3.2.6. Teste de extrusão de rodamina 123.....	60
3.2.7. Teste de extrusão de CFDA .....	60
3.2.8. Detecção de Bcl-2 .....	61
3.2.10. Análise do ciclo celular.....	61
3.2.11. Proliferação celular através da incorporação de [ <sup>3</sup> H]-timidina no DNA .....	62
3.2.12. Western blot.....	62
3.2.13. Tratamento com ATP.....	63
3.2.14. Tratamento com UTP.....	63
3.2.15. Tratamento com agonistas .....	63
3.2.16. Tratamento com antagonistas .....	64
3.2.17. Tratamento com adenosina .....	64
3.2.18. Tratamento com apirase.....	64
3.2.19. Detecção da apoptose por anexina V .....	64
<b>4. Resultados .....</b>	<b>66</b>
4.1. Seleção e caracterização da nova linhagem FEPS .....	67
4.1.1. Comportamento proliferativo da linhagem FEPS.....	68
4.1.2. Perfil de resistência .....	68
4.1.3. Determinação da expressão e atividade dos transportadores ABC na linhagem FEPS .....	71
4.1.4. Determinação da viabilidade celular no tratamento com moduladores da MDR na linhagem FEPS .....	74

4.1.5. Expressão de Bcl-2 .....	76
4.1.6. Expressão de P53 .....	77
4.2. Efeito de ATP extracelular em linhagens resistentes .....	77
4.2.1. Efeito do ATP na viabilidade celular.....	78
4.2.2. Efeito da adição extracelular de nucleotídeos na incorporação de [ <sup>3</sup> H]-timidina no DNA das linhagens K562 e Lucena 1 .....	78
4.2.3. Viabilidade celular após o tratamento com o nucleotídeo UTP <sub>0</sub> .....	80
4.2.4. Efeito do agonista e de antagonistas de P2x7 na viabilidade celular.....	81
4.2.5. Efeito da Apirase .....	83
4.2.6. Efeito de adenosina no crescimento celular.....	85
4.2.7. Efeito de ATP <sub>0</sub> , UTP <sub>0</sub> e adenosina na indução de apoptose.....	86
<b>5. Discussão .....</b>	<b>89</b>
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>96</b>
<b>7. Referências .....</b>	<b>99</b>
<b>8. Anexo .....</b>	<b>109</b>

## FICHA CATALOGRÁFICA

Pinto-Silva, Flavio Eduardo

Seleção e caracterização de uma nova linhagem leucêmica humana MDR / Flavio Eduardo Pinto da Silva. – Rio de Janeiro: UFRJ / IBqM, 2007.

xviii, 108 f. : il. ; 31 cm.

Orientadora: Vivian Mary Barral Dood Rumjanek

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ Instituto de Bioquímica Médica / Programa de Pós-graduação em Química Biológica, 2007.

Referências bibliográficas: f. 73-82.

1. Resistência a Múltiplas Drogas. 2. ATP Extracelular. 3. Daunorrubicina. 4. Glicoproteína-P. 5. MRP1. I. Rumjanek, Vivian Mary Barral Dood. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós-graduação em Química Biológica. III. Título.

## **SUPORTE FINANCEIRO**

Este trabalho foi realizado no laboratório de Imunologia Tumoral do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da professora Vivian M. Rumjanek. Com financiamento da Fundação Ari Frauzino FAF/Oncobiologia, CNPQ, FINEP

## DEDICATÓRIA

Dedico essa Tese em primeiro lugar a minha mãe, *in memoriam*, que lutou muito por minha educação. Aos familiares e amigos.



## AGRADECIMENTOS

Ao longo desse tempo na vida científica, percebi que não escrevemos uma tese sozinho, a todo momento você é moldado por todas as pessoas ao seu redor, absorvendo suas melhores características, incorporando na vida e em seu trabalho. Essa tese pertence a todos que conviveram comigo e me moldaram com as melhores idéias, experiências e também sentimentos.

Realmente não sei por onde começar, entrei no laboratório em 1800 e fui declarado em 2006, pelo IFAN, patrimônio cultural do Laboratório de Imunologia Tumoral.

Impossível tentar lembrar de todas as pessoas que passaram pelo laboratório no período em que estive desenvolvendo o meu trabalho. Conseguiria, sem problema, se minha memória permitisse. Não me atreverei tentar nesse ousado trabalho, falar de todos que passaram pela minha vida no lab, falarei somente das pessoas que estiveram próximo, nesse “curto” período em que escrevi minha tese.

Entre no laboratório de Imunologia tumoral no século passado e após entrevista com a Vivian e a análise do calibre de minha veia, fui aprovado. Na época uma das situações que marcou foi a primeira palestra que assisti sobre incidência de câncer e alguns hábitos alimentares. Descobri, após essa palestra, que a alimentação influenciava muito na incidência de casos de câncer e logo pensei: nossa, por estar no laboratório de Imunologia **Tumoral**, a alimentação de todos os membros deve ser super balanceada! Logo após o seminário, todos foram comprar seu refrigerante e seu salgado: foi a minha primeira lição científica, onde aprendi que nem tudo é o que parece ser.

Ao começar, efetivamente, colocando a mão na massa, fui observar Sebastião fazer seu repique. Como chato e curioso, fiquei atrás dele olhando e perguntando. Das dez

perguntas feitas, ele me respondeu duas. Demorei em descobrir que ele não gosta de falar quando está no fluxo. Com o tempo nos tornamos amigos e aprendi e aprendo muito com sua experiência de laboratório e como não me machucar nas partidas de futebol. Obrigado por tudo.

Agradeço também a Jackeline uma pessoa linda e ótima mãe , aprendi muito com nossas conversas. Muito obrigado Jackie. Ao André (guerreiro) outro patrimônio do laboratório. Uma pessoa boa cujo nome é trabalho, só de vez enquanto que ele tira uma folguinha para pescar no mangue.

Infelizmente não tem uma boa opinião em relação aos políticos, mas fazer o que?.... Obrigado André.

Nessa mesma semana, comecei a ser ensinado pela aluna de mestrado Alcira. Fiquei impressionado com sua organização e metodologia. Logo no início, nos identificamos com nossas histórias da biologia. Descobrir nesse dia que eram necessários 32µl para preencher todo o espaço da câmara de Neubauer.

Após Alcira conheci a Karen e a Beth, que estavam enroladas com suas teses e não puderam me dar atenção. Fiquei parado atrás das duas incomodando, logo elas disseram: “Acho que podemos dar uma tese para ele ler”. A partir daí, comecei a entender um pouco a linha de pesquisa do laboratório. Agradeço muito a Beth por ter aprendido sobre o papel da prolactina no sistema imune. Obrigado por tudo Beth

Com o tempo descobri que Karen era a única amiga que me defendia em algum assunto no qual envolvia religião. Sempre me deu força nos momentos difíceis e com sua perseverança, me ensinou a não desistir, principalmente a ser preciso no que faz. (os 32µl veio dela.).

Avançando no tempo conheci Luiz Fernando, um excelente profissional que deu a minha primeira e única boneca INFLÁVIO... mudou minha vida! Nunca mais as festas de

final de ano foram as mesmas. Sandrinha que arranhou o meu primeiro emprego e Neusa, uma pessoa muito boa, que me ajudou muito em Cabo Frio. Muito obrigado por tudo.

Agradeço ao Nelson, por ter me ensinado a ser disciplinado nos experimentos e por ter me feito rir com os ratos mais sarados que já vi, além de ter feito perder uma manhã de sábado para carregar esteira dos ratos sarados.

Dando um salto no tempo, agradeço também a atual equipe de pesquisa do laboratório: Maria e Thiago sempre animados, Paula super prestativa e alegre, Amanda companheira de sexta à noite no fluxo e Fernanda Dois por ser atenciosa .

Alguns amigos, durante essa jornada, ficaram mais perto e me perturbaram muito. Começo com o Eduardo Moscovis, que sempre paciente e calmo, me ensinou e ensina como ser um Ferris Bueller. A Clarissa (Julie), que com sua calma e seu charme mostrou como resolver um problema com “tranquilidade “ e como hipnotizar alguém para coletar sangue. A Clarice(Clack) que me ensinou as coisas mais mirabolantes do computador e principalmente, aprender a viver, superando grandes obstáculos que a vida nos impõe. Muito obrigado! A Dani por mostrar como ser espontânea e decidida. A mãe mais linda que conheço.

Agradeço a Andréia , minha primeira aluna oficial que orientei...apesar de ter sido somente na primeira semana, pois na segunda ela já estava ligando para minha casa perguntando onde estava. Acompanho com muito orgulho seu crescimento na faculdade. Acho até que seu crescimento não é muito difícil, já que sua alimentação é ótima. Só come comida gostosa

Agradeço também a uma pessoa, que de última hora, veio trabalhar comigo: Nathi. Logo no início, me identifiquei muito com ela e por incrível que pareça, não consigo dizer não às coisas que me pede. Se não fosse por sua ajuda , independência e seu lado metido, não conseguiria fazer os experimentos de crescimento celular. Aprendi observar nessa taurina, que não existe obstáculos que não possam ser ultrapassados. Ainda faremos vários

experimentos juntos. Mas agradeço de coração por tudo.(senão tivesse + de 4 linhas, ela ia brigar.)

A Fernanda (FÊ), uma pessoa verdadeira, descendente de Noé e que me ajudou em vários experimentos de atividade. Mostrou também, como ser econômica e arrumada, carinhosa com seus bichinhos (cão ferozes enormes) e sem frescuras em relação a comida. Formatou o índice e referências desta tese (Trabalho de cão) Agradeço pela grande ajuda que me destes na elaboração desse trabalho. Já ia esquecendo, agora é noiva!!! A primeira do Lab!!

As lindas jornalistas do Instituto Nacional de Imprensa: Claudia Jurberg, que impressionou com seu crescimento no laboratório. No início, lutando para conseguir uma notinha e agora com o ONCONEWS. Além disso, me tornou uma celebridade instantânea com repercussões até hoje. Marina, que chegou a pouco tempo e conquistou o laboratório com seu sorriso e seu jeito alegre. Obrigado funcionária padrão!

A Juliana, que me ajudou muito nos experimentos e na formatação da tese, senão fosse ela, a banca não conseguiria achar as figuras. Agradeço pela grande ajuda e pelos momentos alegres que vivemos e ainda vamos viver. Ju, obrigado pela força e ajuda intelectual.

A Luciana Serrão, uma amiga sensível em conhecer as pessoas e uma ótima profissional. Obrigado pela força dentro e fora do Fundão.

Ao meu amigo do Fundão e fora do Fundão: o português Raphael, que me ajudou e apoiou muito na tese. Acompanho o seu crescimento profissional com muito orgulho. O único defeito é que ele é muito teimoso, não vê as melhorias do nosso governo. Ainda vamos discutir muito sobre o efeito estufa e brigar muito sobre a política. Muito obrigado!

Agradeço a minha família e as minhas três mães: tia Odete, tia Armanda e a que acha que é :Lúcia ,minha irmã. A culpa de ter feito biologia é dela .cansei de ir para o fundão domingo só para acomnha-la em seus experimentos.

Ao meu pai que patrocinou 70% dessa tese sem entender muito qual a verdadeira função.

Ao meu cunhado, por consertar meu computador com defeitos sobrenaturais três vezes durante a tese.

Ao meu lindo sobrinho Rapha , que torna a vida mais bela.

A minha namorada, que me deu força e alimento para terminar esse trabalho.

Agradeço também a Dona Ruth, que mesmo sem entender o porquê de tanto papel espalhado, nunca jogou um artigo meu fora.

Nada disso poderia ter sido construído se não fosse pela oportunidade que recebi da Vivian. Todos que estão no laboratório de Imunologia tumoral, não estão somente pela linha de pesquisa, mas pelo ambiente de trabalho. Aprende-se de tudo um pouco. Um pequeno comentário na hora do almoço, vira uma discussão sem precedentes. Conviver com a Vívian é um aprendizado inestimável. A boa convivência entre os membros do LIT se dá pelo exemplo de inteligência, bondade e humildade transmitida pela “chefa”. Particularmente, Vivian esteve presente nos momentos mais difíceis e alegres de minha vida. Não tenho palavras para agradecer. Muito obrigado!!! Considero-a como uma pessoa da minha família, a minha quinta mãe.

Agradeço também a nossa segunda “chefa”, Dr Ottília. Não existe elogio inédito para acrescentar as características dela, pois todos já foram ditos, com exceção de que o laboratório de Imunologia Tumoral não funciona direito sem ela. Percebi ao longo do tempo, que todas as pessoas que entram e não vêem Doutora Ottília perguntam: “Dr Ottília não vem hoje?” Nós do LIT, sabemos que somos felizardos por estar convivendo e aprendendo como uma pessoa tão nobre. Todas as dúvidas de cálculos e química são resolvidas por ela.

Na revisão de minha tese, com sua educação e postura, disse que precisava padronizar algumas referências e colocar outras. Ao chegar em casa, percebi que estava TUDO

ERRADO. Ela fala que não, mas senão fosse por ela, não teria a fórmula do crescimento celular de minha tese. Só tenho que dizer duas palavras: parabéns e obrigado!!!

Agradeço também a Porf; Márcia Capella, que mesmo saindo de férias, aceitou revisar minha tese. Uma ótima pessoa, pesquisadora e mãe. Muito obrigado!

Agradeço a Banca, por ter aceitado o meu convite. No início do Mestrado ficamos escolhendo quem é menos “carrasco” para a compor, mas ao longo do tempo, esse fator vai para segundo plano. O primeiro, nesta escolha, passa ser a pessoa. Ao conhecer Raquel (que me ajudou muito), Cerli e Paulinho, na mesma hora fizeram parte da minha lista. Muito obrigado.

**EPIGRAFE**

Que estranha é a sina que  
cabe a nós, mortais.  
Cada um de nós está aqui  
para uma temporada; com  
que propósito, não se sabe  
[...] Os ideais que têm  
iluminado meu caminho, e  
repetidamente me têm  
renovado a coragem para  
enfrentar a vida com ânimo,  
são a Bondade, a Beleza e a  
Verdade.

ALBERT EINSTEIN

## Resumo

Atualmente, a resistência a múltiplas drogas (*Multiple Drug Resistance*) é o maior obstáculo para o sucesso de uma terapia anti-neoplásica. O fenômeno de resistência a múltiplas drogas (MDR) se manifesta quando células tumorais não resistentes são expostas a algum tipo de quimioterapia, tornando-se resistentes não só ao fármaco exposto, mas a várias outras drogas com mecanismos de ação e estruturas diferentes. Alguns tumores, mesmo antes de qualquer tipo de tratamento, já apresentam o fenótipo MDR. No presente trabalho selecionamos e caracterizamos *in vitro* a linhagem leucêmica humana FEPS (MDR) e a comparamos com a sua linhagem parental K562 e uma outra linhagem MDR, também derivada da K562, a Lucena 1. Foi verificado que a linhagem FEPS expressa as proteínas Pgp (ABCB1) e MRP1 (ABCC1), envolvidas com a extrusão de quimioterápicos para fora da célula, o que a torna mais resistente aos quimioterápicos vincristina e daunorrubicina. Por outro lado não foram encontradas diferenças entre as linhagens K562, Lucena 1 e FEPS com relação à expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e p53, que poderiam estar relacionadas com a resistência observada. Outro aspecto abordado nesse trabalho, foi a utilização de nucleotídeos extracelulares, para avaliar se eles poderiam modular a viabilidade celular das linhagens. K562, Lucena 1 e FEPS já que existem poucos estudos relacionando o efeito de nucleotídeos extracelulares e proteínas de resistência a múltiplas drogas. Foi observada uma diminuição de 50% da viabilidade celular a partir da concentração de 2,5mM de ATP<sub>0</sub> (ATP extracelular) nas linhagens estudadas. A indução de morte celular nas células K562, Lucena1 e FEPS não foi obtida somente pelo efeito do ATP<sub>0</sub> mas também com o produto final da hidrólise do mesmo, a adenosina. O desenvolvimento e caracterização de uma nova linhagem amplia as possibilidades de abordagem para uma terapia anti-MDR.



## Abstract

In nowadays, multidrug resistance (MDR) is the main obstacle to a successful anti-cancer therapy. The MDR phenomenon occurs when non resistant tumour cells exposed to a chemotherapeutic treatment become resistant not only to the drug being used but to many other drugs with different structures and mode of action. Some tumours may present the MDR phenotype to even before therapy. In the present work a new resistant human leukemic cell line, FEPS (MDR), was selected and characterized *in vitro* and compared to the parental cell line K562 as well as to another MDR cell line known as Lucena 1 and also derived from K562. It was observed that the cell line FEPS cells express the proteins Pgp (ABCB1) and MRP1(ABCC1), both involved with the extrusion of chemotherapeutics to the outside of the cell, inducing an increased resistance to vincristine and daunorubicin. Conversely, no differences among K562, Lucena1 and FEPS cell lines were found in relation to the expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and p53, discarding the possibility of their contribution to the resistance process. Another aspect, approached in the present work, was the use of extracellular nucleotides in the modulation of cell viability of K562, Lucena 1 and FEPS. A 50% decrease in cellular viability was seen with concentrations of 2,5mM ATP<sub>0</sub> (extracellular) ATP. The development and characterization of a new cell line enlarges the possibilities of studying of anti-MDR therapies.

### Lista de abreviaturas

ABC	ATP Binding Cassete
ABCB1	ATP Binding Cassete- Subfamília B Membro1
ABCC1	ATP Binding Cassete- Subfamília C Membro1
ABCG2	ATP Binding Cassete- Subfamília G Membro2
AIDS	Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida (Acquired Immunodeficiency Syndrome )
AD	Actinomicina-D
ATP	Adenosina Trifosfato
ATP <sub>0</sub>	Adenosina Trifosfato Extracelular
ATPox	Adenosina Trifosfato oxidado
BCIP	5-Bromo-4 cloro-3-indolil fosfato p-toluidina
Bcl-2	Proteína pró-apoptótica
BCRP	Proteína de Resistência Câncer de Mama (Breast Cancer Resistance Protein)
BzATP	3 -0-(4-benzoyl) benzoil-ATP(BzATP) Agonista P2X <sub>7</sub>
CD34 <sup>+</sup>	Marcado de Células Tronco Hematopoéticas
CD39	Ecto-Apirase
cDNA	Ácido Desoxiribonucléico complementar (complementary DNA)
CFDA	5-(6) carboxil fluoresceína diacetato, Marcador Fluorescente para ABCC1 -
CSA	Ciclosporina A
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNR	Daunorrubicina
FEPS	Linhagem celular obtida a partir da linhagem K562 exposta a Daunorrubicina
GSH-	Glutathiona

H69AR	Linhagem de Carcinoma de células pequena de pulmão
IAPS	Enzima Inibidoras de Caspases
INDO	Indometacina
Jurkat	Linhagem Celular de Leucemia humana de Linfócito T do Adulto
K562	Linhagem celular de Eritroleucemia humana
KN62	Bloqueador do receptor P2X <sub>7</sub>
LLC	Leucemia Linfóide Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
Lucena 1	Linhagem K562 exposta a Daunorrubicina
MCF-7	Linhagem de Celular de Câncer de mama
MDR	Resistência a múltiplas drogas ( <i>multidrug resistance</i> )
MRP	Proteína relacionada à resistência a múltiplas drogas ( <i>multidrug resistance-associated protein 1</i> ), o mesmo que ABCC1
MTT	[Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol]
MXR	Proteína de Resistência a Xenobiótico ( <i>Mitoxantrone -Resistance Xenobiotic</i> ).
	O mesmo que ABCG2 e BCRP
NDB1	Domínio de ligação de Nucleotídeo ( <i>Nucleotídeo Binding Domain</i> )
NBT	Nitro Blue Tetrazol
P2X	Receptor Ionotrófico
P2Y	Receptor Metabotrófico
P53	Gene Supressor de Tumor
PBS	Solução salina tamponada ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
Pgp	Glicoproteína-P ( <i>P-glycoprotein</i> ); o mesmo q eu ABCB1
PI	Iodeto de propídeo ( <i>Propidium iodide</i> )

PRB	Probenecide
Rho	Rodamina 123
RNAm	Acido Ribonucléico mensageiro
RPMI	Royal Park Medical Institute -Meio de cultura celular
SFB	Soro fetal bovino
TFP	Trifluoperazina
TMD	Domínio Transmembranar ( <i>Transmembrane Domain</i> )
UDP	Uridina Difosfato
UMP	Uridina Monofosfato
UTP	Uridina Trifosfato
VCR	Vincristina
VP	Verapamil

## Lista de Figuras

Figura 1. Esquema das proteínas ABC.....	26
Figura 2. Funções fisiológicas das proteínas ABC. ....	27
Figura 3. Estrutura da Pgp.....	32
Figura 4. Três vias de atuação da ABCC1.....	34
Figura 5. Estrutura da proteína MRP1/ABCC1.....	35
Figura 6. Estrutura da ABCG2. ....	37
Figura 7. Alvo de ação dos principais fármacos utilizados no tratamento do câncer.....	41
Figura 8. Receptores de nucleotídeos e as proteínas de membrana.....	45
Figura 9. Foto das linhagens K562 e FEPS.....	67
Figura 10. Tempo de duplicação (em horas) das células K562, Lucena 1 e FEPS.....	68
Figura 11. Viabilidade celular. ....	70
Figura 12. Expressão das proteínas ABCC1 e ABCB1.....	72
Figura 13. Expressão da proteína ABCC1 na linhagem celular FEPS por Western Blot.....	72
Figura 14. Ensaio de atividade das proteínas Pgp (ABCB1) e MRP (ABCC1).....	73
Figura 15. Viabilidade celular com os moduladores Ciclosporina (CSA) e Indometacina (Indo). ....	75
Figura 16. Expressão da proteína Bcl-2. ....	76
Figura 17. Expressão da proteína P53.....	75
Figura 18. Viabilidade celular na presença de ATP <sub>0</sub> .....	76
Figura 19. Efeito da exposição de diferentes doses de ATP <sub>0</sub> e UTP <sub>0</sub> na incorporação de <sup>3</sup> H timidina das células K562 e Lucena .....	77
Figura 20. Comparação do efeito do UTP <sub>0</sub> e ATP <sub>0</sub> na viabilidade celular.....	78
Figura 21. Efeito do BzATP na viabilidade celular das linhagens K562 e Lucena 1.....	79
Figura 22. Antagonista do receptor de ATP (KN62) .....	80
Figura 23. Efeito da Apirase sobre a morte induzida pelo ATP <sub>0</sub> .....	82
Figura 24. Efeito da adenosina na proliferação e viabilidade celular.....	83
Figura 25. Comparação entre as linhagens FEPS e Lucena 1.....	84
Figura 26. Efeito de ATP <sub>0</sub> , adenosina e UTP <sub>0</sub> na indução de apoptose e necrose nas linhagens K562 (A) e Lucena (B).....	85
Figura 27. Efeito de Adenosina na indução de apoptose e necrose nas linhagens K562 e FEPS.....	86

## Lista de tabelas

Tabela 1. Transportadores ABC em células humanas: funções, localização e doenças.....	28
Tabela 2. Alguns moduladores de Transportadores ABC .....	38
Tabela 3. Fármacos mais utilizados na quimioterapia.....	42

## **1. Introdução**

### 1.1. Resistência a múltiplas drogas

Atualmente, a resistência a múltiplas drogas (*Multiple Drug Resistance*) é o maior obstáculo para o sucesso de uma terapia anti-neoplásica. A forma de superá-la ou mesmo explorá-la, constitui uma área de grande interesse para os pesquisadores e oncologistas.

O fenômeno de resistência a múltiplas drogas (MDR) se manifesta quando células tumorais não resistentes são expostas a algum tipo de quimioterapia, tornando-as resistentes não só ao fármaco exposto, mas a várias outras drogas com mecanismos de ação e estruturas diferentes. Alguns tumores, mesmo antes de qualquer tipo de tratamento, já apresentam o fenótipo MDR.

Trabalhando com diferentes agentes quimioterápicos, Biedler e Riehm (1971) mostraram que linhagens celulares resistentes à actinomicina D (AD) apresentavam resistência cruzada a mitramicina, vinblastina, vincristina, puromicina, daunomicina, demecolchicina e mitomicina C. O grau de resistência era inversamente proporcional à detecção de  $^3\text{H-AD}$  nuclear, sugerindo que a resistência à actinomicina-D desenvolvida por essas células era resultado de diferenças qualitativas na membrana celular que não permitiam o acúmulo do quimioterápico no meio intracelular.

Ainda na década de 70, vários estudos foram feitos com linhagens tumorais que apresentavam o fenótipo MDR. Um destes estudos, realizados por Dano (1973), mostrou que células de tumor de Ehrlich, resistentes a daunomicina e a vincristina, apresentavam um acúmulo maior dos quimioterápicos quando sua fonte de energia era inibida. Dano atribuiu este acúmulo à diminuição da taxa de efluxo. Esses dados sugeriam que tanto a vincristina como a daunomicina eram transportadas para o meio extracelular pelo mesmo mecanismo (DANO,1973). Assim, a idéia da permeabilidade celular estar interferindo na resistência a múltiplas drogas começou a ser mais investigada.



Em 1976, Juliano e Ling, estudando uma linhagem de células MDR de ovário de hamster chinês, identificaram uma proteína de membrana de 170kDa que conferia às células resistência a altas concentrações de colchicina. Esses autores achavam que a proteína recém descoberta de 170kDa afetava a permeabilidade celular. Por suas características, essa proteína recebeu o nome de glicoproteína-P ou Pgp, hoje conhecida como ABCB1.

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, três grupos de pesquisa obtiveram clones e sequenciaram os genes responsáveis por codificar a Pgp em hamsters (GERLACH e ENDICOTT e col., 1986), humanos (CHEN e col., 1986) e ratos (GROS e col., 1988). Chen e colaboradores 1986, através da determinação do cDNA chegaram à sequência completa da Pgp (ABCB1). O estudo da estrutura da Pgp, mostrou que suas características eram semelhantes às da super-família de proteínas transportadoras ABC (proteínas ligadoras de ATP conhecidas como ATP Binding Cassette).

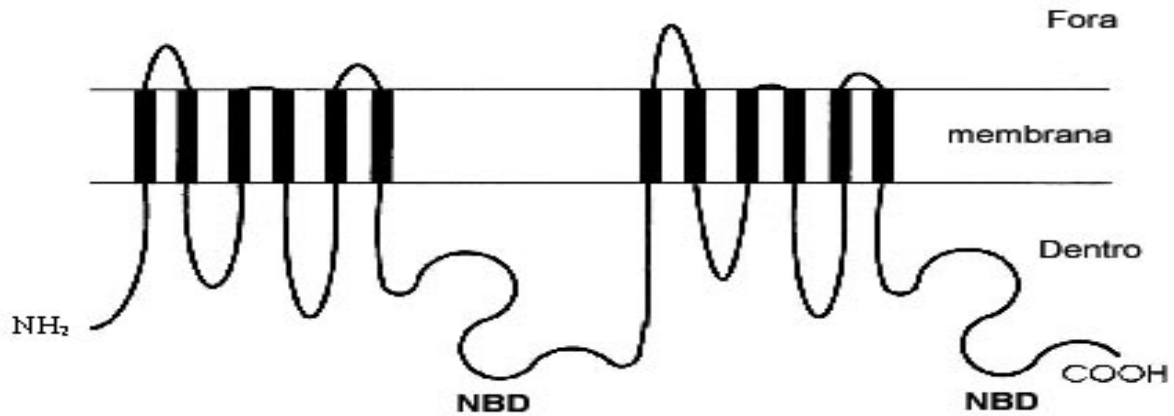
Dois anos depois, Gros e colaboradores (1988), utilizando experimentos de transfecção e analisando a sequência de aminoácidos a partir de amostras de cDNA, determinaram que existia uma grande similaridade entre alguns transportadores bacterianos e a Pgp. Eles mostraram que a transfecção do gene que codificava a Pgp (gene *mdr*) era capaz por si só de conferir resistência a múltiplas drogas. Esses experimentos confirmaram a observação de Fojo e col (1987) que mostraram, em tumores humanos e, principalmente, carcinoma adrenocortical, que após tratamento com quimioterápico as células tumorais tiveram um aumento de 6 vezes na expressão do gene *mdr1*. Além da Pgp, a expressão de outras proteínas transportadoras da família ABC também foi relacionada ao fenômeno MDR, entre elas, a MRP (Proteína Associada a Resistência a Múltiplas Drogas, atualmente renomeada ABCC1) e a BCRP (Proteína de Resistência ao Câncer de Mama), hoje conhecida como ABCG2.

Apesar de o transporte de quimioterápicos ser uma das formas de resistência múltipla mais estudada, a MDR, normalmente, é um fenômeno multifatorial envolvendo falha no mecanismo de apoptose, aumento de mecanismos antioxidantes. (NUESSLE e col.,1999, TRINDADE e col.,1999 )

## 1.2. Proteínas ABC

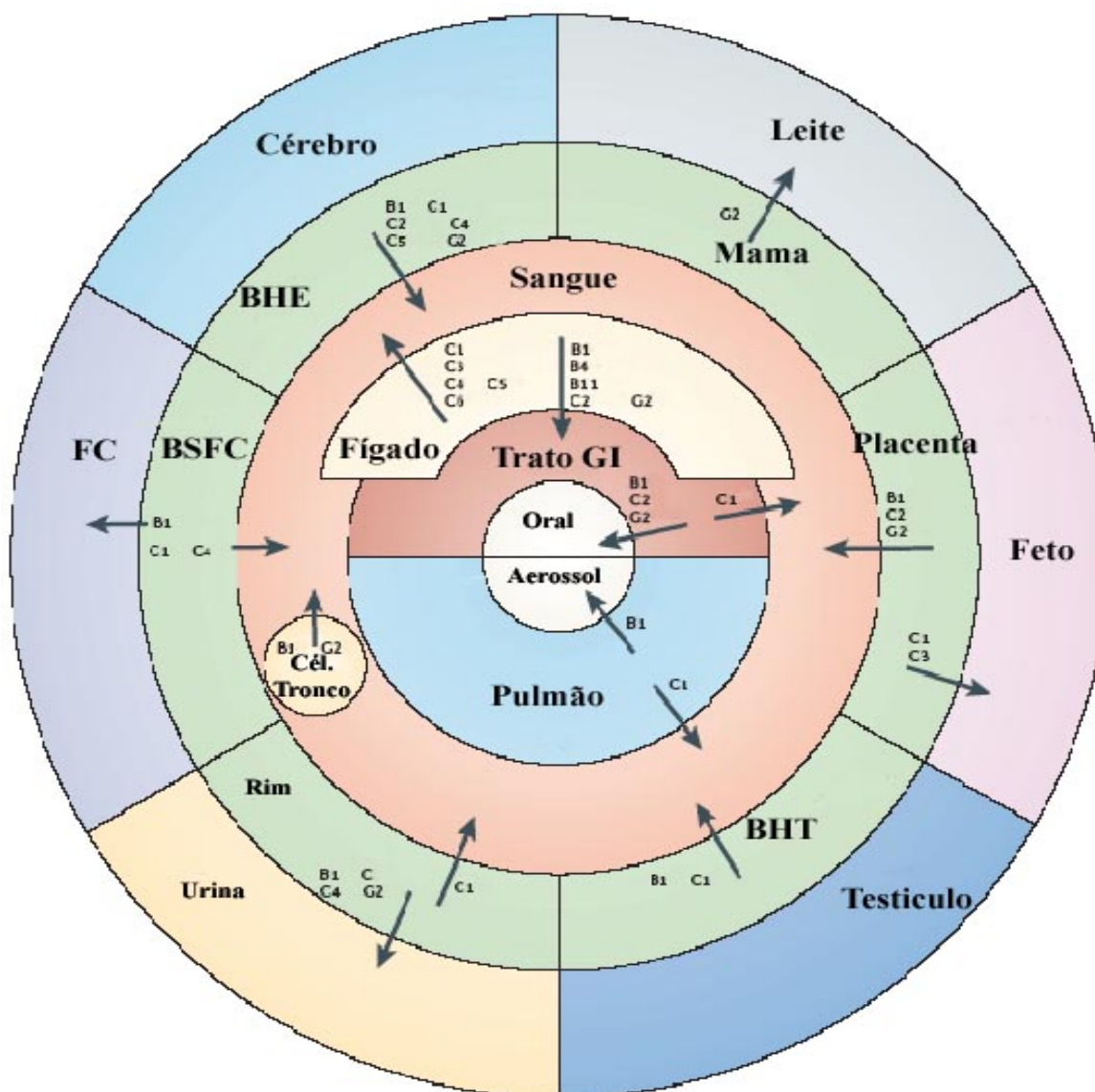
Essa família constitui uma das maiores famílias de proteínas transportadoras de membrana, encontradas, praticamente, em todos os tipos de células. O número de transportadores ABC varia de acordo com a espécie. Por exemplo, bactérias *Escherichia coli* possuem cerca de 70 transportadores ABC. Em bactérias, os transportadores ABC são unidirecionais e estão, predominantemente, envolvidos no transporte importante e essencial de componentes que não podem ser obtidos por difusão, como açúcar, vitaminas e íons metálicos, para dentro das células. Nos eucariotos, muitas proteínas ABC transportam componentes do citoplasma para compartimentos intracelulares, como por exemplo: retículo endoplasmático, mitocôndria e peroxissoma, ou para o meio extracelular (DEAN e col., 2001).

Os membros da superfamília ABC, ou transportadores ABC são em geral, constituídos por quatro domínios centrais e cada um dos domínios é codificado como um polipeptídeo separado. Dois domínios transmembranares (TMDs) formam a via por onde o substrato atravessa a membrana e se liga a locais específicos para o transporte. Os outros dois domínios servem para ligação do ATP (Nucleotide **B**inding **D**omain ou **NBD**). A conservação de todas essas características delimita e define a família ABC (**Figura1**).



**Figura 1. Esquema das proteínas ABC.** Observam-se dois domínios transmembranares e seus dois sítios de ligação do ATP.

De acordo com estudos do genoma humano, existem cerca de 50 transportadores ABC nesta espécie, sendo que 48 já foram identificados e seqüenciados, e muitos destes transportadores possuem funções fisiológicas já conhecidas em células normais (**Figura 2**). Além disso, o transporte feito pelas proteínas ABC é capaz de reduzir a disponibilidade e alterar a distribuição tecidual de certas substâncias, sendo importantes alvos para o desenvolvimento de novos fármacos pelas indústrias farmacêuticas. Essa alteração de absorção parece refletir uma função protetora contra a ação de xenobióticos.



**Figura 2. Funções fisiológicas das proteínas ABC.** As setas indicam a direção do transporte e as letras a proteína ABC responsável pelo transporte BHT - Barreira hemato-testicular, BSFC - Barreira Hemato-cérebro-espinhal, FC - Fluido Cérebro-espinhal, BHE – Barreira Hemato-encefálica. Figura adaptada de SZAKÁCS e col., 2006.

Mutações em alguns dos transportadores ABC são causas de doenças genéticas como, por exemplo, a doença de Tangier, fibrose cística, Dubin-Johnson entre outras (**Tabela 1** adaptada de STEFKOVÁ e col 2004).

**Tabela 1. Transportadores ABC em células humanas: funções, localização e doenças.**

<b>Nome</b>	<b>Função</b>	<b>Localização normal</b>	<b>Doença</b>
ABCA1	Transporte de fosfolipídios e colesterol	Presente em todas as células	Doença de Tangier Hipoaproteinemia
ABCA2	MDR Transporte de esterol	Cérebro, pulmão, rins, baço, coração, fígado, ovário e testículos	Desconhecida
ABCA4	Transporte de pigmentos da retina	Fotorreceptores	Retinite pigmentosa, degeneração macular
ABCB1	MDR Transporte xenobióticos	Intestino, fígado, rim, barreira hemato-encefálica etc	Desconhecida
ABCB2	Transporte de peptídeos	Todas as células	Imunodeficiência
ABCB3	Transporte de Peptídeos	Todas as células	Imunodeficiência
ABCB4	Transporte de ácido biliar	Fígado	Colestase intra-hepática
ABCB6	Transporte de ferro	Mitocôndrias	Desconhecida
ABCB7	Transporte de ferro	Mitocôndrias	Sideroblastose, anemia hemolítica crônica
ABCC1	MDR Transporte de GSH	Ampla distribuição	Desconhecida

ABCC2	Transporte de ácido biliar	Hepatócitos, rins	Síndrome Dubin-Johnson
ABCC4	Transporte de nucleosídeo	Próstata	Desconhecida
ABCC6	Desconhecido	Fígado e rim	Pseudoxanthoma elasticum
ABCC7	Canal de Cl <sup>-</sup>	Tecido exócrino	Fibrose-cística
ABCC8	Receptor de Sulfoniluréia	Pâncreas	Desconhecida
ABCD1	Transporte de ácidos graxos	Peroxisomas	Adreno-leucodistrofia
ABCE1	Proteína ligadora de oligoadenilato	Ovário, testículos e baço	Desconhecida
ABCG1	Transporte de colesterol	Macrófagos	Desconhecida
ABCG2	MDR	Placenta, intestino, mamas	Desconhecida
ABCG5	Transporte de esterol	Fígado, intestino	Sitosterolemia
ABCG8	Transporte de esterol	Fígado, intestino	Sitosterolemia

### 1.3. Proteína ABCB1 ou Pgp

Desde a sua descoberta em 1976, por Juliano e Ling, como uma proteína capaz de promover o transporte de substâncias tóxicas para fora da célula, a Pgp (ABCB1) tem sido estudada com relação a sua capacidade de conferir resistência aos mais variados compostos.

A Pgp (ABCB1) é responsável pelo transporte dos quimioterápicos mais utilizados na clínica nos tratamentos de pacientes com câncer, como por exemplo: alcalóides da Vinca, antraciclina, epipodofilotoxinas e taxanos (AMBUDKAR e col., 1999). Além disso, como dito anteriormente, está envolvida na absorção e biodisponibilidade de diversas substâncias, e possui um papel importante no comprometimento da quimioterapia de pacientes com AIDS por ser capaz de transportar os fármacos utilizados para o tratamento desta doença (JONES e col., 2001).

Existem diferentes isoformas da Pgp (ABCB1), com uma homologia entre elas maior do que 70 %. Nos humanos, a Pgp (ABCB1) é codificada por dois genes de resistência a múltiplas drogas, *mdr1* e *mdr3* (também designado como *mdr2*) que estão localizados no braço longo do cromossomo 7 (7q21) (CALLEN e col., 1987). O produto do gene *mdr1* em humanos é capaz de transportar drogas hidrofóbicas catiônicas ou neutras, enquanto que a outra isoforma codificada pelos genes *mdr2* ou *mdr3* possui afinidade por fosfolipídios, que são secretados pelos hepatócitos na bile.

No final da década de 80 Thiebaut e colaboradores (1987) mediram os níveis de RNAm do gene *mdr1* e, com auxílio de um anticorpo específico, determinaram a localização celular específica da Pgp (ABCB1). Esses autores constataram que em humanos a maior expressão de Pgp foi encontrada nas células da adrenal, rim, fígado, cólon, pulmão, jejuno, reto, cérebro e próstata. No entanto, esta molécula também está expressa em linfócitos humanos de sangue periférico e em células tronco hematopoéticas (DRACH e col.,1992) principalmente em células tronco CD34<sup>+</sup> (CHAUDHARY e RONINSON,1991).

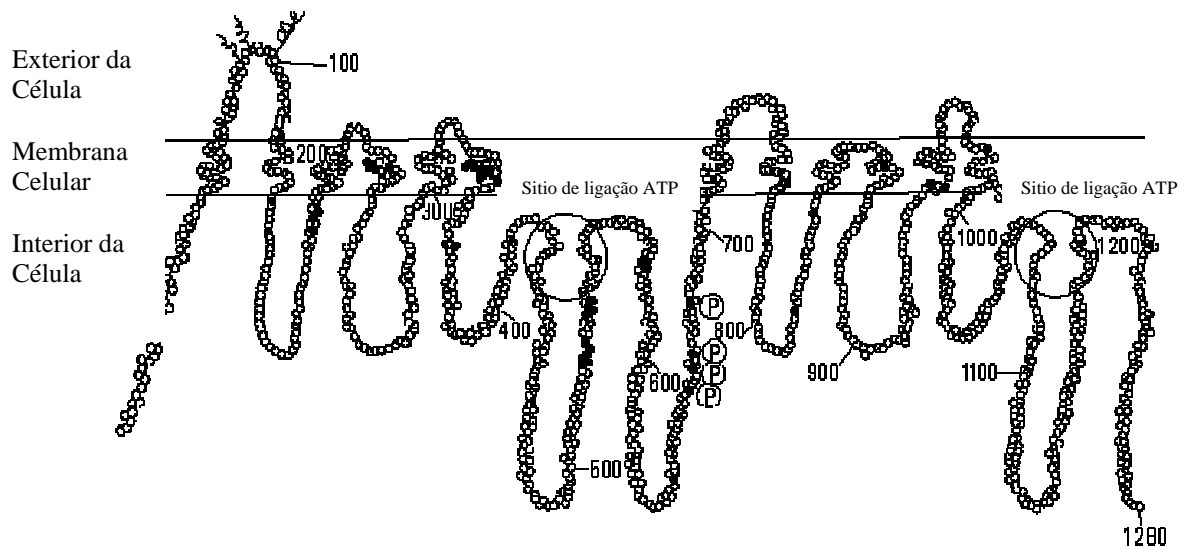
### **1.3.1. Estrutura da proteína Pgp (ABCB1)**

Em 1993 a codificação do gene humano *mdr1* permitiu estudar a estrutura da Pgp (ABCB1) e a partir desses estudos, se chegou a um modelo topológico (**Figura 3**) descrito por Gottesman e Pastan em 1993.

A Pgp (ABCB1) é formada por 1280 aminoácidos organizados em duas partes homólogas, cada uma com 610 aminoácidos unidos por uma região com 60 aminoácidos. Cada metade possui um domínio hidrofóbico com seis alfas hélices, um domínio citossólico e um domínio ligante de nucleotídeo NDB1 e NDB2. As porções N e C-terminal, assim como os dois sítios de ligação do ATP, possuem um caráter hidrofílico e localizações citoplasmáticas (AZZARIA e col., 1989;ROSENBERG e col.,1997) (**Figura 3**).

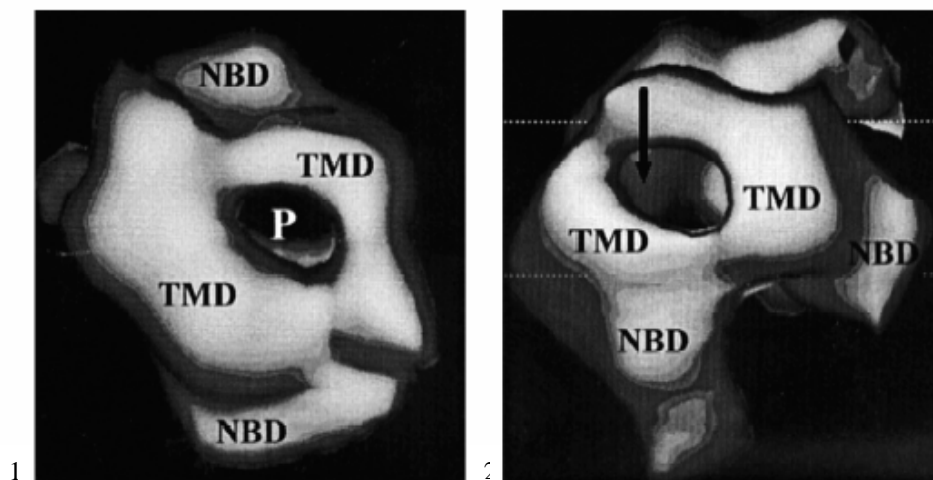


A



Gottesman e Pastan, 1993

B



**Figura 3. Estrutura da Pgp.** A. Estrutura bidimensional da Pgp (ABCB1) descrita por Gottesman e Pastan, 1993. B. Reconstrução 3D da Pgp determinada por microscópio eletrônico e análise de imagens. Vista perpendicular da superfície extracelular da membrana mostrando dois domínios transmembranares e dois lobos considerados domínios para ligação de nucleotídeos projetados para a face citoplasmática e membrana plasmática. Vista aproximada da Pgp, as linhas horizontais representam a membrana lipídica. TMD Domínio transmembranar, NBD sítio de ligação ao Nucleotídeo, P - poro. ROSENBERG e col 1997.

As drogas que interagem com Pgp (ABCB1) podem ser alocadas em três categoriais de acordo com seus efeitos: **1)** componentes que estimulam a atividade ATPásica em baixas concentrações, mas inibem em altas (vinblastina e verapamil); **2)** drogas que estimulam atividade ATPásica sem inibição (valinomicina); **3)** agentes que inibem a atividade ATPásica tanto basal quanto estimulada por drogas, como a ciclosporina A e bramicidina D (KARWATSKY, e col., 2003).

Um bom entendimento do mecanismo de reconhecimento do substrato pela Pgp (ABCB1) será um passo importante para o desenvolvimento de drogas no tratamento do câncer.

#### **1.4. A Proteína MRP1 (ABCC1)**

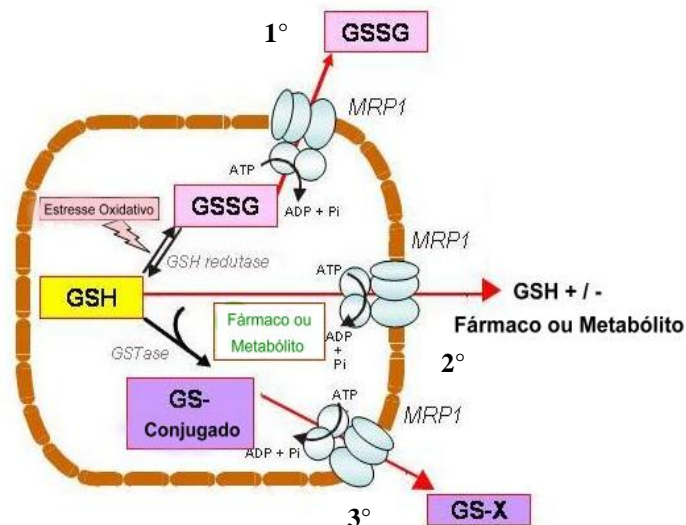
A proteína relacionada a resistência a múltiplas drogas MRP1 (ABCC1) foi identificada pela primeira vez em 1992 em células de pulmão H69AR resistentes a antraciclina (COLE e col.,1992).

A MRP1 (ABCC1) pertence a sub-família de proteínas ABCC, que hoje é composta por pelo menos 10 membros, cujas funções ainda não foram completamente esclarecidas. (BOUMENDJEL e col., 2005). São elas: MRP1 (ABCC1), MRP2 (ABCC2), MRP3 (ABCC3), MRP4 (ABCC4), MRP5 (ABCC5), MRP6 (ABCC6), MRP7 (ABCC10), MRP8 (ABCC11), MRP9 (ABCC12) e MRP10 (ABCC13) essa última mais presente em células de fígado.

A proteína MRP1 (ABCC1) é capaz de conferir resistência a várias moléculas hidrofóbicas, que são também substratos da Pgp (ABCB1). No entanto, as proteínas ABCC conseguem transportar também moléculas hidrofílicas, como por exemplo a glutathiona (GSH), glucoronatos, sulfatos conjugados e anions orgânicos (**Figura 4**). Além disso, a MRP1

(ABCC1) pode transportar seus substratos (fármacos ou metabólitos) conjugados à molécula de GSH (VERSANTVOORT e col., 1995)

Além de conferir resistência em alguns tumores, a MRP (ABCC1) está expressa em uma grande variedade de tecidos normais e linhagens celulares. A presença da MRP1(ABCC1) foi detectada em células do pulmão (COLE e col.,1992), testículos (AUGUSTINE e col.,2005), células mononucleares do sangue periférico (ECHEVARRIA-LIMA e col., 2007), células mononucleares da medula óssea (LEGRAND e col., 1996; KYLE CEZAR e col., 2007), timócitos (Leite e col.,2006) e macrófagos (LEITE e col., 2007). Uma expressão mais baixa foi encontrada em células da placenta, células renais, útero, fígado, glândula salivar e baço (NOOTER e col.,1995).



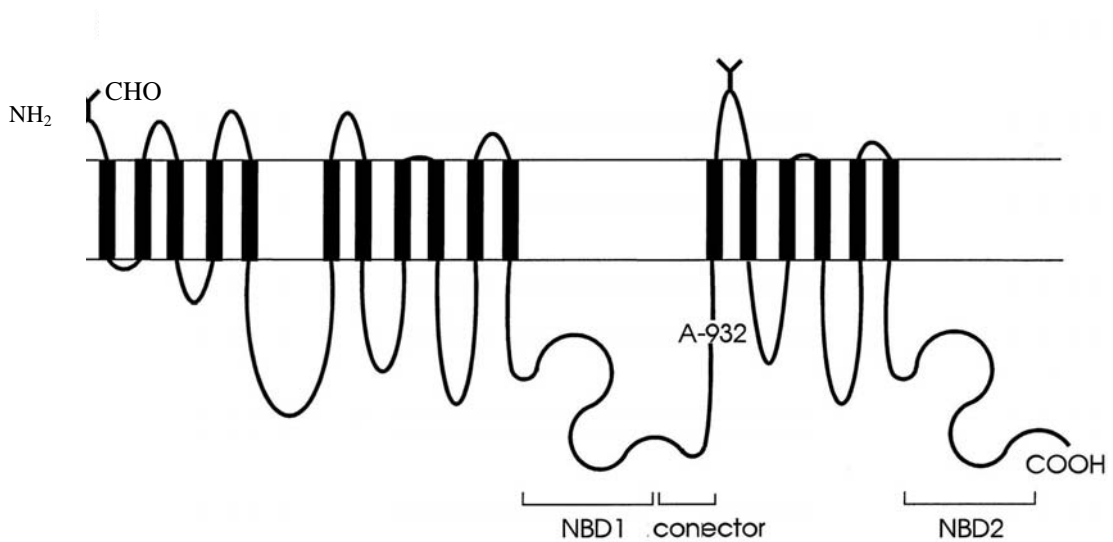
**Figura 4. Três vias de atuação da ABCC1.** 1º No estresse oxidativo o GSH reduzido (GSH) é oxidado (GSSG) e transportado pela MRP1 (ABCC1). 2º o GSH é associado a um fármaco ou metabólito carregado e transportado 3º GSH é conjugado a um fármaco ou metabólito e transportado pela MRP (ABCC1). Adaptado de BOUMENDJEL e col.,2005).

#### 1.4.1. Estrutura da MRP1 (ABCC1)

O gene responsável pela codificação da proteína MRP1 ou ABCC1 em humanos está localizado no cromossomo 16. A análise da seqüência de 1531 aminoácidos mostrou se tratar

de uma proteína da família ABC de transportadores possuindo 190kDa (KRISHNAMACHARY e CENTER, 1993).

Semelhante às outras proteínas ABC, a família ABCC tem no seu centro estrutural dois domínios transmembranares (TMDS), cada domínio transmembranar está ligado a um NBD. No entanto, diferentemente da maioria dos transportadores ABC, a ABCC1 contém um terceiro domínio transmembranar com cinco segmentos transmembrana, precedido por uma terminação com NH<sub>2</sub> (**Figura 5**).



**Figura 5. Estrutura da proteína MRP1/ABCC1.** Observa-se 3 domínios transmembranares com dois sítios de ligação de ATP (NBD). Retirada e adaptada do site <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/6460/mrp1.jpg>

### 1.5. A proteína ABCG2 ou BCRP

Em 1999 foi descoberta uma outra proteína de resistência a múltiplas drogas denominada MXR/BCRP, atualmente chamada de ABCG2. Inicialmente, esta proteína foi encontrada a partir de cDNA obtido de células isoladas de carcinoma de cólon humano e em células MCF-7 (células câncer de mama), fazendo os cientistas perceberem que se tratava de um novo transportador da família ABC ( MIYAKE e col, 1999).

No ano seguinte à descoberta, Litman e colaboradores (2000), compararam linhagens que expressavam as proteínas ABCB1, ABCC1 e ABCG2 e concluíram que a linhagem MCF-7, que expressava ABCG2, foi mais efetiva no transporte de mitoxantrona e topotecan e com estes estudos foi estabelecido um novo e eficaz transportador MDR.

Trabalhos recentes mostram que além do cólon, mama, pulmão e câncer gástrico as proteínas ABCG2 estão presentes em células blásticas de pacientes com leucemia aguda e leucemia linfoblástica aguda, nesse caso mais específico em células B (ROSS e col., 2000).

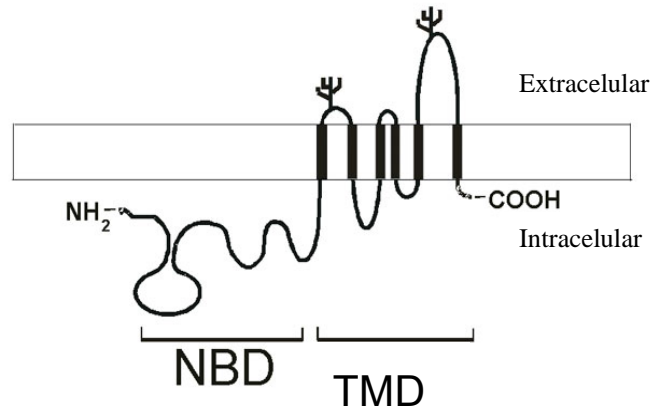
Análises citogenéticas determinaram que a localização do gene que codifica a proteína ABCG2 está na banda 4q21-4q22 nas células com o cromossomo 4 normal. Células que adquiriram resistência aos substratos da proteína ABCG2 apresentam uma amplificação desse gene (KRISHNAMURTHY e SCHUETZ, 2005).

Apesar de sua expressão aumentada em algumas células tumorais, a proteína ABCG2 está presente em diversos tecidos normais e originalmente foi descrita na placenta humana (ALLIKMETS e col., 1998). Sua localização na parte apical da membrana em células epiteliais e ao longo de todo o tracto-gastrointestinal, sugere que o principal papel desta proteína seja a defesa contra substâncias xenobióticas (LESLIE, e col., 2005). Semelhante ao observado com Pgp (ABCB1) e MRP1 (ABCC1) a ABCG2 também se encontra em células tronco da medula óssea (ZHOU e col., 2001).

### **1.5.1. Estrutura da proteína BCRP (ABCG2)**

A proteína BCRP (ABCG2) é constituída por 655 aminoácidos, com seis regiões transmembranares e a estrutura primária da proteína é muito semelhante à metade de uma proteína da família ABC (**Figura 6**). Esta proteína possui apenas um domínio transmembrana e um sítio de ligação para o nucleotídeo. Outra característica são as glicosilações encontradas nas alças extracelulares. Embora a sua estrutura seja menor em comparação a outras proteínas

da superfamília ABC de transportadores (é um hemi-transportador), para o funcionamento desta proteína há a necessidade de que se forme um dímero (ROBEY e col., 2001).



**Figura 6. Estrutura da ABCG2.** NBD local de ligação do nucleotídeo e TMD Domínio transmembranar (Adaptado de MAO e UNADKAT, 2005).

### 1.6. Moduladores das proteínas relacionadas ao fenômeno de MDR

Desde os trabalhos originais de Tsuruo e colaboradores (1981), utilizando inibidores do canal de cálcio (verapamil), se verificou que fármacos, utilizados para o tratamento de outras doenças, poderiam servir como moduladores do fenótipo MDR. Dentre essas substâncias estão incluídas verapamil (VP), o imunossupressor ciclosporina A (CSA) (SLATER e col., 1986), o antagonista da calmodulina trifluoperazina, (TFP) (GOUDEAU e GOUDEAU col., 2001), tamoxifeno (CALLAGHAN e HIGGINS, 1995) etc. Originalmente, essas substâncias eram estudadas em relação a sua capacidade de inibir a atividade da Pgp (ABCB1), mas atualmente os estudos se estenderam a várias moléculas da superfamília ABC (Tabela 2, adaptada de SZAKÁCS e col., 2006).

**Tabela 2. Alguns moduladores de Transportadores ABC**

<b>Transportadores</b>	<b>Inibidores dos Transportadores ABC</b>
<b>ABCB1</b>	Amiodarone, Ciclosporina, Quinidina, Quinina, Verapamil, Nifedipina, Desniquildepina, PSX-833, VX-710 (Bricodar), GF120918 (Elacridar), LY335979 (Zosuguidar), Dissulfiram, Pluronic L61, Trifluoperazina
<b>ABCC1</b>	Ciclosporina, Quinidina, Quinina, Verapamil, Bricodar, LY475776, V-104, Dissulfiram, MK-571, Isoxazoles Tricíclico, Probenecide, Indometacina
<b>ABCC2</b>	Ciclosporina, PSC-833, MK-571
<b>ABCC4</b>	MK-571
<b>ABCG2</b>	Ciclosporina, Bricodar, GF120918 (Elacridar), XR-9576 (Tariquidar), FTC (Fumitremorgin C)

Embora a descoberta de agentes moduladores das proteínas associadas ao fenômeno de MDR tenha sido uma esperança no tratamento de indivíduos com tumores resistentes, muitos destes fármacos apresentam diversos efeitos tóxicos que comprometem a sua utilização terapêutica em conjunto com a quimioterapia convencional.

O VP é uma fenilquilamina capaz de bloquear os canais de cálcio dependentes de voltagem. Apesar de ser um reversor da resistência a vincristina e vinblastina em linhagens tumorais que super-expressam Pgp (ABCB1), suas doses são limitadas, devido a sua toxicidade cardíaca (TSURUO e col.,1981).

A Ciclosporina-A é um undecapeptídeo cíclico, neutro e lipofílico extraído do fungo *Tolypocladium inflatum gams*. A CSA foi um imunossupressor utilizado em grande escala na prevenção da rejeição de órgãos transplantados. Seu mecanismo de ação envolve um receptor para ciclofilina (Cyp), e o complexo Cyp-CSA é capaz de inibir a calcineurina (fosfatase

serina/treonina dependente de  $\text{Ca}^{++}$ ) que está ativada em uma série de vias de sinalização. A formação do complexo CypA-CSA-Calcineurina inibe a atividade catalítica da calcineurina, impedindo a ativação de fatores que regulam a transcrição de genes relacionados a estimulação da proliferação do linfócito T, como o receptor para proteína IL-2. (GOTHEL e MARAHIEL, 1999). Hoje em dia existem compostos derivados da ciclosporina A que não são imunossupressores. O papel da CSA como reversor da MDR foi revisto, onde além da CSA-A foram também utilizados vários análogos de ciclosporina na modulação do fenômeno MDR (RUMJANEK col., 2001)

Várias substâncias são capazes de reverter a atividade da MRP, como a indometacina (um anti-inflamatório não esteroide) (DRAPER e col.,1997) e o probenecide (um inibidor do tráfego de vesículas e transporte de íons orgânicos (GOLLAPUDI e col., 1997). A função farmacológica primária das drogas inibidoras da Pgp (ABCB1) e da MRP (ABCC1) não se correlaciona, em termos de potência, com a sua capacidade em modular MDR. Os efeitos colaterais causados pelos moduladores é um fator limitante para obtenção de concentrações adequadas destes agentes em tratamentos. O segundo aspecto é a inibição da atividade fisiológica desses transportadores, como por exemplo, na barreira hematoencefálica, (MARQUES-SANTOS e col., 1999). Por essa razão os moduladores dos transportadores ABC não estão encontrando grande aceitação na clínica, mas são importantes em estudos não clínicos sobre sua atividade e função.

### **1.7.Leucemias**

No Brasil a estimativa em 2006 para novos casos de leucemia foi de 9550b (INCA 2006). Leucemias são doenças de origem clonal e tem como características o acúmulo de células anormais, da linhagem atingida, em determinada etapa da diferenciação. Outros aspectos são comprometimentos difusos da medula óssea situação essa que é caracterizada, na



maioria das vezes, pela elevação do número de células com ou sem conseqüências da disfunção da medula óssea: anemia, trombocitopenia e leucopenia, (GALE e BUTTURINI,1992).

As leucemias podem ser divididas em leucemias agudas: LMA- leucemia mielóide aguda, LLA- leucemia linfóide aguda, e leucemias crônicas: LMC-leucemia mielóide crônica e LLC-leucemia linfóide crônica.

Neste trabalho serão utilizadas células da linhagem K562, obtidas de uma paciente de, que sofria de leucemia mielóide crônica (LOZIO e col., 1981)

### **1.7.1. Leucemia mielóide crônica**

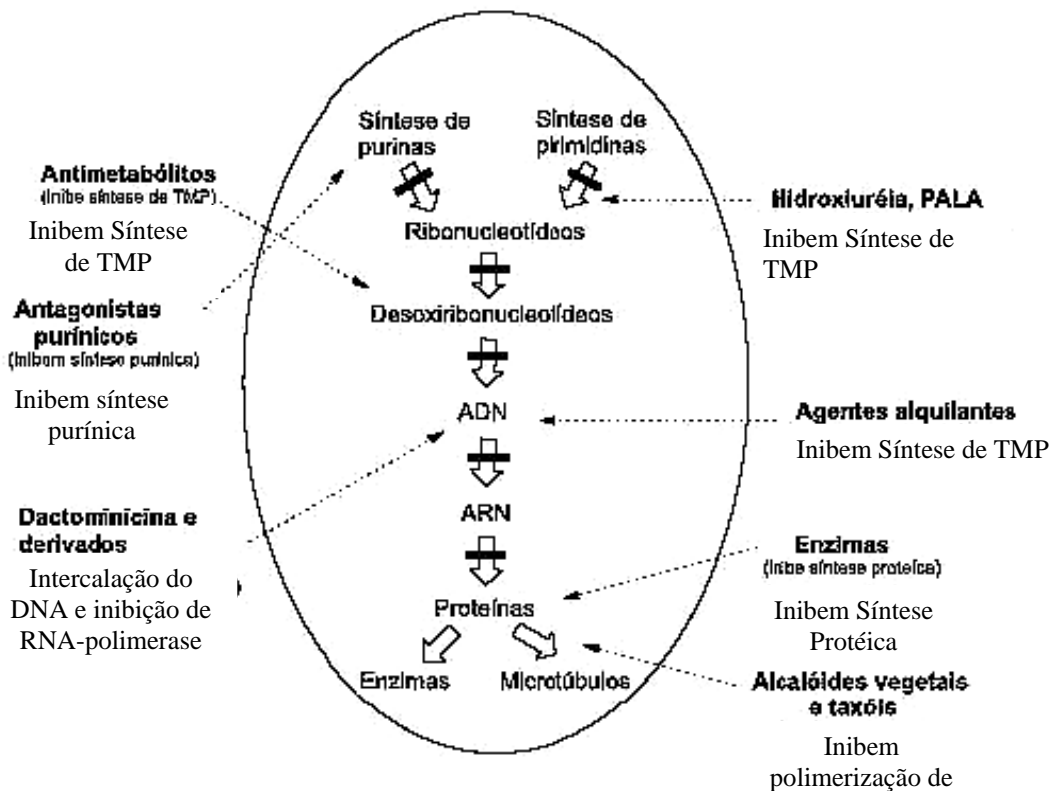
Leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença que exhibe anormalidade hematológica específica resultante da transformação de uma única célula tronco pluripotente. A maioria dos pacientes com LMC possui o cromossomo Philadelphia que é resultado de uma translocação de parte do gene *abl* do cromossomo 9 para o gene *bcr* no cromossomo 22; essa mutação resulta em um gene quimérico *bcr-abl* que leva a célula a produzir uma proteína quinase alterada que sinaliza sem sofrer os mecanismos fisiológicos de regulação, levando a um aumento da proliferação celular (KURZROCK e col., 1988). Um dos tratamentos no combate a LMC, é feito com a utilização de Mesilato de Imatinibi, que atua como um inibidor seletivo da tirosina quinase, funcionando como um antagonista contra proteína mutada *bcr/abl* e inibindo os receptores de tirosina quinase classe 3 (FROLOV e col., 2003).

A fase crônica da LMC dura aproximadamente 4 anos, progredindo, invariavelmente, para uma fase acelerada ou blástica nas quais as células perdem, parcialmente ou completamente, as suas capacidades de diferenciação e amadurecimento.

**1.8. Quimioterápicos utilizados no tratamento de neoplasias**

O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais, entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais. Alguns hormônios ou seus inibidores também podem ser empregados como coadjuvantes no tratamento do câncer. Apesar de não serem citotóxicos eles se ligam a receptores citoplasmáticos específicos, que direcionam a síntese ou inibição de proteínas importantes para o crescimento e a multiplicação celular (ALMEIDA e col., 2005).

As células neoplásicas possuem várias diferenças metabólicas quantitativas em comparação com as células normais, tornando-as mais susceptíveis aos diversos anti-metabólicos ou análogos estruturais das bases nitrogenadas (CALABRESI e CHABNER, 2005). A grande maioria dos agentes anti-neoplásicos vão atuar em uma via essencial de sobrevivência celular (**Figura 7**).



**Figura 7.** Alvo de ação dos principais fármacos utilizados no trat (CALABRESI e CHANBNER, 1995) TMP (Timidilato Mono Fosfato).

A maior parte dessas vias interfere na divisão celular, cada classe de drogas atua em um alvo específico da célula e sua utilização se dá de acordo com as características de cada tipo de tumor. As classes de fármacos mais utilizadas são os alcalóides da vinca, antraciclinas, epipodofilotoxinas, inibidor de cinases, captotencinas e tiopurinas (**Tabela 3**, ALMEIDA e col.,2005).

**Tabela 3. Fármacos mais utilizados na quimioterapia**

**Agentes Ciclo Celular Específicos**

**Agentes antimetabólitos**

Análogo do ácido fólico

Antagonistas das pirimidinas

Análogos das purinas e inibidores correlatos

**Agentes Hormonais**

Adrenocorticosteróides

Progestinas

Estrogênios

Androgênios

Antiestrogênio

Antiandrôgenio

Análogo do hormônio liberador de gonadotropina

Inibidor da aromatase

Inibidor do hormônio peptídico

**Produtos Naturais**

Alcalóides vegetais

Alcalóides da vinca

**Agentes Ciclo Celular Não Específicos**

**Produtos Naturais**

**Antibióticos naturais**

Mitomicina C

Dactinomicina

Plicamicina

Bleomicina

Daunorrubicina

Doxorrubicina

Alcalóides pirrolizidínicos

**Complexos de Coordenação de platina**

Cisplatina (cis-DDP)

Carboplatina (CBDCA)

**Agentes Alquilantes Diversos**

Mostardas nitrogenadas

Nitrosuréias

Triazenos

Alquil sulfonados

Podofilotoxinas (Epipodofilotoxinas)

Paclitaxel (Taxol)

Há três décadas, antraciclinas vêm sendo usadas como primeira linha de tratamento na quimioterapia em diversos tipos de tumores sólidos e hematológicos. A daunorrubicina (DNR), assim como as demais antraciclinas, são antibióticos produzidos por bactérias da espécie *streptomyces*. Dentre os mecanismos celulares que fazem parte do modo de ação da DNR na célula podem ser citados: formação de radicais livres, ligação e intercalação com DNA e toxicidade membranar. Entretanto, o principal fator indutor de morte celular desta substância reside na inibição da atuação da enzima Topoisomerase II (NIELSEN e col., 1996).

Embora a DNR seja transportada por transportadores ABC, a resistência a antraciclicina em células tumorais, assim como a de outros quimioterápicos, é frequentemente multifatorial.

### **1.9. Nucleotídeos. Correlação entre transportadores de ATP e transportadores ABC**

Nos últimos anos verificou-se que nucleotídeos podem ser importantes agentes de sinalização celular. O conceito de neurotransmissor purinérgico começou a existir após a descoberta de receptores purinérgicos e o importante papel do ATP extracelular em diferentes tipos de células nos mais variados processos bioquímicos, inclusive na indução de morte celular (BURNSTOCK, 2007).

Os efeitos desencadeados pelos nucleotídeos são decorrentes do engajamento destas moléculas a seus receptores específicos. Os receptores para nucleotídeos podem ser divididos em P1 e P2, de acordo com diversos critérios como, por exemplo, a via de transdução de sinal e farmacologia (DI VIRGILIO e col., 2001). Os receptores do tipo P1 são receptores para

adenosina, que são divididos em quatro subtipos (A1, A2A, A2B e A3). Os receptores P2 estão divididos em duas famílias P2X e P2Y. Os receptores P2Y são metabotróficos, possuem 8 membros (P2Y 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13 e 14) os quais encontram-se distribuídos em uma grande variedade de tecidos. Os receptores P2X são ionotrópicos formadores de canais iônicos. Até o momento foram clonados sete subtipos de receptores P2X (P2X 1-7) em mamíferos, que apresentam ampla distribuição em diferentes tecidos ( BURNSTOCK e KNIGHT., 2004).

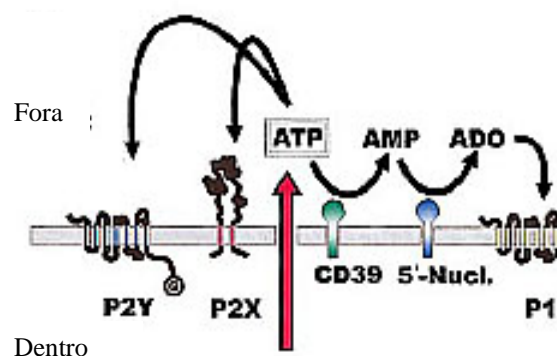
Os nucleotídeos encontram-se presentes em altas concentrações no citoplasma (ATP 5-10mM e UTP 0,5-1mM) enquanto que no compartimento extracelular sua concentração é mantida na ordem de nanomolar (ATP 1-10nM) (DI VIRGILIO, 2005). O principal mecanismo responsável pelo controle da concentração do ATP extracelular é a ação de um grupo de enzimas denominadas ectonucleotidasas. Estas enzimas podem ser encontradas associadas ao lado extracelular da membrana plasmática, mas também podem estar presentes no meio intersticial ou nos fluidos corporais (ZIMMERMANN, 2000). A metabolização extracelular dos nucleotídeos é afetada por ecto-enzimas como CD39 (ecto-apirase) e CD73 (ecto-5`-nucleotidase), expostos na membrana celular (ADRIAN e col., 2000).

Tem sido proposto que os transportadores ABC, incluindo o regulador da condução transmembranar na fibrose cística (CFTR) e a proteína ABCB1 (Pgp) atuem contribuindo na liberação de ATP em alguns modelos celulares (AL-AWQATI , 1995). Alguns autores relacionam a externalização do ATP acoplado ao substrato que é transportado pela Pgp (ABCB1) (ABRAHAM e col., 2001).

Foi identificada uma co-expressão de Pgp (ABCB1) e ecto-5`-nucleotidase (5`Nu). Estudos mostram que células que superexpressam Pgp (ABCB1), frequentemente apresentam alta expressão de 5`Nu (UJHAZY e col.,1994, LEDOUX e col.,1997, BERNARDO e col., 2006). Nesses trabalhos foi proposto que havia uma relação entre a expressão destas duas moléculas. A 5`Nu serviria como uma molécula acessória, hidrolisando ATP e fornecendo

seus precursores para transportadores dependentes deste nucleotídeo (DI VIRGILIO e col., 2001).

Uma outra molécula também expressa em leucócitos e na diferenciação de linhagens de leucemia promielocíticas (ADRIAN e cols., 2000) é o CD39 (Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase ou ecto-apirase) que é capaz de degradar ATP; além disso, está envolvido na inibição da agregação plaquetária (KACZMAREK e col.,1996) e respostas do sistema imune (GRANSTEIN, 2002) (**Figura 8**).



**Figura 8. Receptores de nucleotídeos e as proteínas de membrana.** Essas proteínas CD39 (Ecto-apirase) e CD73 -5`nucleotidase) hidrolisam o ATP em seus subprodutos. ADO-Adenosina (DI VIRGILIO e col., 2001).

### 1.10. Estudos em linhagens resistentes

Um dos primeiros estudos no estabelecimento de uma linhagem resistente a múltiplas drogas foi realizado em 1983 com indução de resistência *in vitro* da linhagem K562, uma eritroleucemia humana, selecionada através de doses crescentes de Vincristina (TSURUO e col., 1983). A partir desse trabalho, foi possível estudar *in vitro* os mecanismos que estariam envolvidos no fenômeno de MDR.

Para iniciar um estudo com um transportador ABC, se utilizam duas técnicas: **1.** as células são selecionadas com concentrações crescentes de drogas citotóxicas; **2.** as células são transfectadas com transportadores específicos. Em meados da década de noventa vários trabalhos de seleção e transfecção de linhagens de células tumorais *in vitro* foram feitos a fim de estudar melhor um determinado transportador (SLAPAK e col., 1994). Com estes estudos

foi descoberta uma gama de substâncias não-relacionadas estruturalmente, que são capazes de atuar nos transportadores ABC.

A partir da técnica de Tsuruo, Rumjanek e colaboradores, (1994) selecionaram uma linhagem resistente que apresentava características MDR, a linhagem Lucena 1, obtida a partir da exposição das células K562 a doses crescentes de vincristina. Foi verificado que essas células apresentavam uma superexpressão de Pgp (ABCC1) e uma amplificação gênica do gen *mdr1*. Além disso, a linhagem Lucena 1 apresentou uma série de outras características que a distinguem da parental K562 (RUMJANEK e col., 2001).

### **1.11. Justificativa**

Linhagens selecionadas através de drogas parecem ser os melhores modelos para o estudo das proteínas MDR. Apesar da transfecção do gene *mdr* ser um método rápido e muito utilizado para expressão do fenótipo de resistência a múltiplas drogas, neste método a célula expressa somente a proteína MDR específica, ao contrário do que acontece com as linhagens selecionadas *in vitro* ou em pacientes que recebem doses progressivas dos fármacos. Nesses casos, não só outros mecanismos de resistência podem vir a ser selecionados em paralelo como por exemplo a mutação da p53, a super-expressão da Bcl-2, a super-expressão de IAPs (Enzimas inibidoras das caspases), mecanismos anti-oxidantes como aumento nos níveis da catalase, como também é possível a expressão de mais de um transportador ABC (CAVALCANTI e col.,2004; SHI e col., 2007).

Linhagens apresentando diferentes padrões de resistência, e não somente um único mecanismo, se comportam de forma pouco estudada. Por esta razão torna-se importante, a partir de uma única célula parental, possuir diferentes linhagens com padrões diferentes e conhecidos.

Para esses estudos o ideal seria utilizar, em paralelo com quimioterápicos, substâncias capazes de induzir morte celular sem terem sua eficácia comprometida pelas proteínas ABC. Dentro deste contexto, as moléculas resultantes da hidrólise do ATP, poderiam ser utilizadas.

A tentativa de burlar o mecanismo MDR ou utilizá-lo como uma vantagem terapêutica é uma nova abordagem que precisa ser explorada e para isso são necessárias linhagens bem caracterizadas, preferencialmente originadas de uma linhagem sensível comum. É dentro deste contexto que este nosso trabalho se insere.

O que este trabalho busca é encontrar um modelo que se assemelhe ao processo de resistência multifatorial observado *in vivo*





## **2. Objetivos**

**2.1 Objetivo Principal:**

Produzir e caracterizar uma linhagem MDR a partir da linhagem parental K562, utilizando para seleção o quimioterápico daunorrubicina.

**2.2 Objetivo Secundário:**

Verificar se nucleosídeos podem ser citotóxicos para células MDR.

### **3. Materiais e Métodos**

### 3.1. Materiais

**Adenosina** - SIGMA- dissolvida em solução salina na concentração estoque de 100mM e mantido a -20°C.

**Anexina V** – kit de detecção- SIGMA.

**Anticorpo anti-Bcl-2-PE** – anticorpo feito em camundongo, Anti-humano e rato – SANTA CRUZ – mantido em geladeira a 4°C.

**Anticorpo anti-IgG2a/FITC**- Anticorpo feito em cabra, Anti-camundongo,-SANTA CRUZ- mantido na geladeira a 4°C.

**Anticorpo anti-MRP-(ABCC1)** – Anticorpo feito em rato, anti-camundongo e humano ALEXIS, Clone- ALX-801-007 mantido a 4° C.

**Anticorpo anti-Pgp (ABCB1)** - Anticorpo feito em camundongo,- anti-humano – DAKO, Clone 4E3, mantido a 4°C.

**Anticorpo anti-p53** – Anti corpo feito em camundongo-anti-humano-Dako Clone DO-7

**Apirase** - cedido gentilmente pelo Laboratório de Imunobiofísica mantido -20°C

**ATP (Adenosine 5`-Trifosfato)** - SIGMA- dissolvida em salina na concentração estoque de 100mM e mantida a -20°C.

**ATPox (ATP oxidado-300 $\mu$ M)** - Cedido gentilmente pelo Laboratório de Imunobiofísica.

**BzATP-( Estoque 10mM)**- Antagonista do receptor P2X<sub>7</sub> Cedido gentilmente pelo Laboratório de Imunobiofísica/IBCCF/UFRJ.

**CFDA-5-(6) carboxil fluoresceína diacetato (CFDA)**- MOLECULAR PROBES - Solução estoque de CFDA 10mM dissolvida em DMSO e mantida a -20°C, sendo diluído em meio RPMI no momento do uso

**Ciclosporina A (CSA)** – NOVARTIS PHARMA AG- Solução estoque 50mg/ml diluída em RPMI na concentração 500 $\mu$ g/ml e mantida em geladeira a 4°C.

**Daunorrubicina (DNR)**– UNITED MED - Concentração estoque de 2mg/ml diluído em meio RPMI na concentração 0,2mg/ml e mantida em alíquotas a -20C, até o momento do uso.

**DMSO (Dimetil Sulfóxido)** – SIGMA.

**Indometacina**- SIGMA- 30mM diluída em DMSO- Mantida a -20C°.

**Iodeto de Propídeo** - SIGMA- dissolvido em água destilada e estocado em uma concentração de 1mg/ml mantido a 4°C.

**Líquido de Cintilação** - 200mg de POPOP –SIGMA-(1,4-bis [5-Phenyl-2oxazoly] benzene; 2,2-p-0) diluído em 1 litro de tolueno

**Meio RPMI 1640** – SIGMA- diluído em água MilliQ, suplementado com  $5 \times 10^5$  M de beta-mercaptoetanol, 25mM de Tampão Herpes, 60mg/l de penicilina, 100mg/l de estreptomicina e 2g/l de Bicarbonato de Sódio. Mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso.

**MTT (Brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazol)**- SIGMA- solução estoque 5mg/ml diluída em salina e mantida na geladeira a  $4^{\circ}\text{C}$ .

**Probenecide (PRB)** - SIGMA- solução estoque 25mM diluída em água destilada com pH 12 e depois ajustado para o pH 10 com HCl. A solução é mantida na geladeira a  $4^{\circ}\text{C}$ .

**Ribonuclease A (RNase)**- SIGMA- Dissolvida em água destilada e estocada na concentração de 10mg/ml a  $-20^{\circ}\text{C}$ .( Rockville, USA).

**Rodamina 123 (Rho 123)**- SIGMA. Estoque 1 mg/ml diluído em salina na concentração  $10\mu\text{g/ml}$  e mantido em alíquotas no congelador sendo diluído em meio RPMI no momento do uso.

**Solução de Permeabilização ( FACS Lysing Solution) Becton and Dickinson** -concentrada 10 vezes-mantida na geladeira  $4^{\circ}\text{C}$

**Solução Concentrada para Análise em Citometria de Fluxo**-concentrada 5 vezes 1ml de Triton 1%, 0,5ml de RNAase, 10mg/ml, 250 $\mu\text{l}$  de PI 1 mg/ml e 3,75ml de HBSS (Hank's Buffered Saline).

**Solução salina**- 9g/l de NaCl, dissolvidos em água destilada.

**Soro Fetal Bovino (SFB)**- GIBCO BRL- distribuído em alíquotas e mantido congelado a -20°C.

**Substrato para a fosfatase alcalina** [100 mmol/l NaCl, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 100 mmol/l Tris pH=9.5, 75 mg/ml de “nitroblue tetrazolium chloride” (NBT) e 50 mg/ml of “5-bromo-4-cloro-3-Indolylphosphate p-toluidine salt”(BCIP)] (Technologies, Rockville, USA).

**Sulfato de Vincristina (VCR)** Onconvin - ELI LILLY DO BRASIL LTDA - Concentração estoque 1mg/ml diluída em RPMI na concentração de 6µM e mantida em alíquotas no congelador até o momento do uso.

**Tampão de lise** -100mM NaCl, 10mM EDTA pH8,0, 25mM MgCl<sub>2</sub>.

**Salina Tamponada com Fosfato (PBS)** - 8g de NaCl, 0,2g de KCl, 1,15g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O e 0,2g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O, solubilizados em 1 litro de água deionizada com pH ajustado para 7,4.

**Tampão TBS** – 12g de trizma base, 90g de NaCl, pH 7,4.

**Triton X 100 1%**- SIGMA- 1ml de Triton X-100 diluído em 100ml de água deionizada.

**UTP (Uridina 5`-trifosfato)** - solução estoque 100mM, cedido gentilmente pelo laboratório de Imunobiofísica .



**Verapamil (VP)- SIGMA** - solução estoque 2,5mg/ml (5mM) diluída em água destilada e mantida em alíquotas no congelador até o momento do uso, quando é diluída em RPMI para uma concentração intermediária de 50uM.

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Linhagens celulares**

Foi utilizada como linhagem parental a linhagem celular de eritroleucemia humana K562, que foi originalmente obtida por Lozzio e col., 1981 de uma paciente de 53 anos do sexo feminino em 1970, que sofria de leucemia mielóide crônica.

Em vários experimentos foi utilizada para controle de células expressando Pgp (ABCC1), a linhagem Lucena 1, que possui características MDR derivada da K562 (RUMJANEK e col., 2001).

As células K562 (não MDR) e Lucena 1 foram mantidas em cultura, na concentração de  $2 \times 10^4$  células/ml em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), em estufa a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ , com passagens regulares duas vezes por semana. No caso da célula Lucena 1, o meio foi suplementado com sulfato de vincristina (VCR) na concentração final de 60nM.

### **3.2.2. Seleção da linhagem resistente**

Para seleção da linhagem celular resistente a múltiplas drogas descrita neste trabalho e denominada FEPS, as células K562 foram ajustadas em  $2 \times 10^4$  cels/ml e expostas a doses crescentes do fármaco daunorrubicina (DNR) a partir de 9,4ng/ml, com passagens regulares duas vezes por semana acompanhada com o aumento gradativo da concentração de DNR. Essas células passaram a resistir à DNR até 466nM sendo mantidas em meio contendo essa concentração.

### 3.2.3. Tempo de duplicação celular

Para avaliar o tempo de duplicação celular de cada linhagem, as células foram contadas após 72 h em cultura nas condições descritas acima. O valor de X encontrado, em quantidade de ciclos celulares, foi extraído da seguinte equação:  $N_f = 2^x N_0$ , onde  $N_f$  é o número total de células encontrado após o tempo proposto, e  $N_0$  é a concentração inicial de células na cultura. Se no decorrer de 72 h ocorreram X duplicações, conclui-se que o tempo de cada duplicação pode ser calculado dividindo 72 horas por X, que é deduzido da fórmula acima.

Ex:  $N_f = 2^x \cdot N_0$  onde a concentração final foi  $13,25 \times 10^4$

$$13,25 \times 10^4 = 2^x (2 \times 10^4)$$

$$\frac{13,25 \times 10^4}{2 \times 10^4} = 6,625 = 2^x \quad \log 6,625 = \log 2^x \quad X = \frac{\log 6,625}{\log 2} = \frac{0,8212}{0,301} = 2,73$$

No período de 72h aconteceram 2,73 duplicações

### 3.2.4. Teste de citotoxicidade

O método colorimétrico quantitativo MTT (brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2-5 difeniltetrazol) foi utilizado para medir a viabilidade celular, como descrito por Mosmann (1983). As células K562 e FEPS foram repicadas 3 dias antes do experimento para que estivessem em fase de crescimento geométrico. No momento do experimento, as células foram colocadas em cultura (200ul por poço) em placa de 96 poços com fundo chato em meio RPMI com 10% de SFB, a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, na concentração final de  $2 \times 10^4$  de células/ml (em triplicatas), na presença ou ausência de VCR e DNR, ou outras substâncias a serem testadas. Depois de 3 dias de cultura, 20ul MTT (5mg/ml) foram adicionados às células e estas novamente incubadas por 3 h. Após esse período, as células

foram centrifugadas, o sobrenadante removido e 200µl de DMSO (dimetilsulfóxido) foram adicionados às todos os poços para dissolver os cristais de formazana, produzindo uma solução homogênea. Para a medida de densidade óptica a leitura foi realizada num leitor de Elisa (Bio Rad-Modelo 3550-UV- Microplate Reader) em um comprimento de onda de 490nm .

### **3.2.5. Detecção das proteínas de resistência a múltiplas drogas por citometria de fluxo**

Utilizamos anticorpos específicos contra as seguintes proteínas humanas: anti-ABCB1 (anti-Pgp) e anti-ABCC1 (anti-MRP1) para identificação das proteínas de resistência a múltiplas drogas.

As células FEPS foram ajustadas para  $2 \times 10^5$  células/ml, lavadas com PBS e ressuspendidas em 200µl de PBS contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) em temperatura ambiente. Após esse procedimento as células foram incubadas com os anticorpos anti-ABCC1 (MRP) e anti-ABCB1 (Pgp) por 30 min a 25°C em tubos separados. No caso do anticorpo anti-ABCC1 foi necessário permeabilizar previamente a célula por 30 min com a solução de permeabilização diluída 1:10 em água destilada, para a marcação intracelular da proteína MRP (ABCC1). Após este período, as células foram lavadas e incubadas por 30 min a 25°C com o anticorpo secundário anti-IgG2a/FITC diluído em PBS contendo 5% de SFB. Mais uma vez as células foram lavadas e ressuspendidas em 200µl de PBS com 5% SFB e analisadas por citometria de fluxo (FACScalibur – Becton- Dickinson). A análise estatística dos resultados obtidos no FACS foi realizada no programa WINMDI.

### 3.2.6. Teste de extrusão de rodamina 123

Este teste, baseado nos trabalhos de Neyfakh (1988) foi utilizado para verificar a atividade funcional da Pgp (ABCB1).

As células K562 e FEPS, repicadas 3 dias antes do experimento, foram ajustadas para a concentração de  $5 \times 10^5$  células/ml em meio RPMI com 5% de SFB. Adicionou-se então o corante Rodamina 123 (Rho 123) para uma concentração final de 200ng/ml. As células foram incubadas a 37°C por 30 min, na presença desse corante, sendo depois centrifugadas, ressuspensas em meio RPMI com 5% de SFB e deixadas para extrusão do corante, por 30min a 37°C. A seguir, as amostras foram lavadas, ressuspensas em salina gelada e mantidas em baixas temperaturas até serem analisadas por citometria de fluxo.

Para estudar a modulação do transportador foram adicionados, junto com a Rho 123 e também na fase de extrusão do corante, os reversores Ciclosporina (CSA) e verapamil (VP) em várias concentrações.

### 3.2.7. Teste de extrusão de CFDA

As células FEPS foram ajustadas para a concentração de  $5 \times 10^5$  células/ml, incubadas com o substrato CFDA (500uM) (VAN DER KOLK e col., 1998), em meio RPMI suplementado com 5% de SFB, na presença ou na ausência dos seus reversores: Indometacina (Indo 300µM) ou Probenecide (PRB 2,5mM) por 30 min a 37° C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, centrifugando-as a 200g por 7 min e ressuspensas em meio RPMI com 5% de SFB, para permitir extrusão do CFDA na presença ou ausência dos reversores por mais 30 min. Após esse período, as células foram novamente lavadas ressuspensas em PBS e analisadas no citômetro de fluxo.

### **3.2.8. Detecção de Bcl-2**

As células K562 e FEPS e Jurkat, foram ajustadas para  $2 \times 10^5$  células/ml, centrifugadas e o sedimento ressuspendido na solução de permeabilização, diluída 1:10, por 30 min para a permeabilização e fixação das estruturas celulares. Após 30 min as células foram lavadas com PBS contendo 5% de soro e logo depois incubadas com o anticorpo anti-Bcl-2-PE (1:300) por 30 min em temperatura ambiente. Novamente as células foram lavadas, ressuspendidas em PBS e analisadas por citometria de fluxo.

### **3.2.9 Detecção de p53**

As células K562, FEPS e Lucena foram ajustadas para  $2 \times 10^5$  células/ml, centrifugadas e o sedimento ressuspendido na solução de permeabilização, diluída 1:10, por 30 min. Após 30 min as células foram lavadas com PBS contendo 5% de soro e logo depois incubadas com o anticorpo anti-P53 (1:50) por 30 min em temperatura ambiente. Novamente as células foram lavadas, ressuspendidas em PBS contendo 5% de soro e, após este período, as células foram incubadas por 30 min a 25°C com o anticorpo secundário anti-IgG2a/FITC diluído em PBS contendo 5% de SFB. Mais uma vez as células foram lavadas e ressuspendidas em 200µl de PBS e analisadas por citometria de fluxo (FACScalibur – Becton- Dickinson)

### **3.2.10. Análise do ciclo celular**

As células foram ajustadas na concentração de  $1 \times 10^6$  células/ml, centrifugadas e ao sedimento foram adicionados 200µl da solução de ciclo e 500µl de HBSS. Após esse processo as células foram analisadas no citômetro de fluxo.

### 3.2.11. Proliferação celular através da incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina no DNA

A análise da proliferação celular de células K562, Lucena e FEPS foi aferida através da incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina no DNA. As células foram cultivadas em placas de 96 poços, na concentração inicial de  $2 \times 10^4$  células/ml. Após os períodos de incubação (24, 48 e 72h), as células foram expostas a 0,5 $\mu$ Ci de [<sup>3</sup>H-timidina] por poço durante 6 horas. As suspensões celulares foram então colhidas e aplicadas em papel filtro e deixadas secar no papel *overnight*. Após esse período os papéis eram lavados com água para retirar <sup>3</sup>H –timidina não incorporada. Após a lavagem e a secagem, os papéis foram colocados em frascos contendo 5 ml de líquido de cintilação. Cada frasco teve a sua radioatividade medida em aparelho de cintilação líquida do tipo Packard. Este ensaio permite inferir sobre a quantidade de [<sup>3</sup>H]-timidina incorporado no DNA durante a divisão celular.

### 3.2.12. Western blot

A expressão de ABCC1 na FEPS foi avaliada e comparada por “imunoblotting”, usando um anticorpo contra um peptídeo sintético correspondente a um epítipo da ABCC1 (FLENS e col., 1994). As células foram homogeneizadas com tampão de lise contendo coquetel de inibidores de protease e centrifugado a 200g por 15min a 4°C. Os *pellets* foram ressuspensos em 100 $\mu$ l de tampão de lise e congelados a -20°C. As proteínas (50-100 $\mu$ g/lane) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose. Após a transferência, as membranas foram incubadas a temperatura ambiente por 18h com o anti-ABCC1 (IgG) diluído em tampão TBS , contendo 20 $\mu$ g/ml de leite desnatado. Após esse período, foi feita a incubação com anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina (anti-IgG de camundongo), diluído

(1:1000). A revelação foi feita pela adição do substrato para a fosfatase (NBT/BCIP) por 5 min. Esse substrato produz formazanas insolúveis de cor violeta para a detecção no immunoblotting. Como controle positivo foram usados linfócitos humanos normais ABCC1. A fim de excluir a possibilidade de ligação inespecífica do anticorpo secundário, no mesmo experimento foi feita a incubação somente com o anticorpo secundário e nenhuma banda foi detectada.

### **3.2.13. Tratamento com ATP**

As células foram contadas utilizando uma câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração final de  $2 \times 10^4$  céls/ml, em meio RPMI com 10% SFB. Em seguida, as células foram incubadas com ATP em várias concentrações (1, 2.5, 5 e 10mM) por um período de 72h.

### **3.2.14. Tratamento com UTP**

As células foram contadas através de câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração final de  $2 \times 10^4$  céls/ml em meio com SFB. Em seguida, as células foram incubadas com UTP nas concentrações de 1 e 5mM por um período de 72h. Como controle positivo foram feitas as mesmas concentrações com ATP.

### **3.2.15. Tratamento com agonistas**

Para analisar o papel do receptor P2X<sub>7</sub> no processo de morte celular utilizou-se o agonista BzATP que foi incubado com as células K562 e Lucena 1 na concentração de 1mM por um período de 72h.



### **3.2.16. Tratamento com antagonistas**

As células foram pré-tratadas com dois antagonistas do receptor P2X7, ATPox (ATP oxidado-300 $\mu$ M) e KN62 (5 $\mu$ M). O ATPox foi incubado com as células por quatro horas e depois retirado do meio. O inibidor KN62 foi mantido no meio por todo período de incubação.

Após esse procedimento, ATP foi adicionado ao meio nas concentrações de 1, 2,5, 5 e 10mM.

### **3.2.17. Tratamento com adenosina**

As células foram contadas e ajustadas para uma concentração final de  $2 \times 10^4$  células/ml, em meio com SFB, e em seguida, as células foram incubadas com adenosina em várias concentrações (1, 2,5, 5 e 10mM) por um período de 72h.

### **3.2.18. Tratamento com apirase**

As células foram contadas utilizando uma câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração final de  $2 \times 10^4$  células/ml. Em seguida, as células foram incubadas com Apirase 3U na presença de ATP nas concentrações de 1 e 2,5mM por um período de 72h.

### **3.2.19. Detecção da apoptose por anexina V**

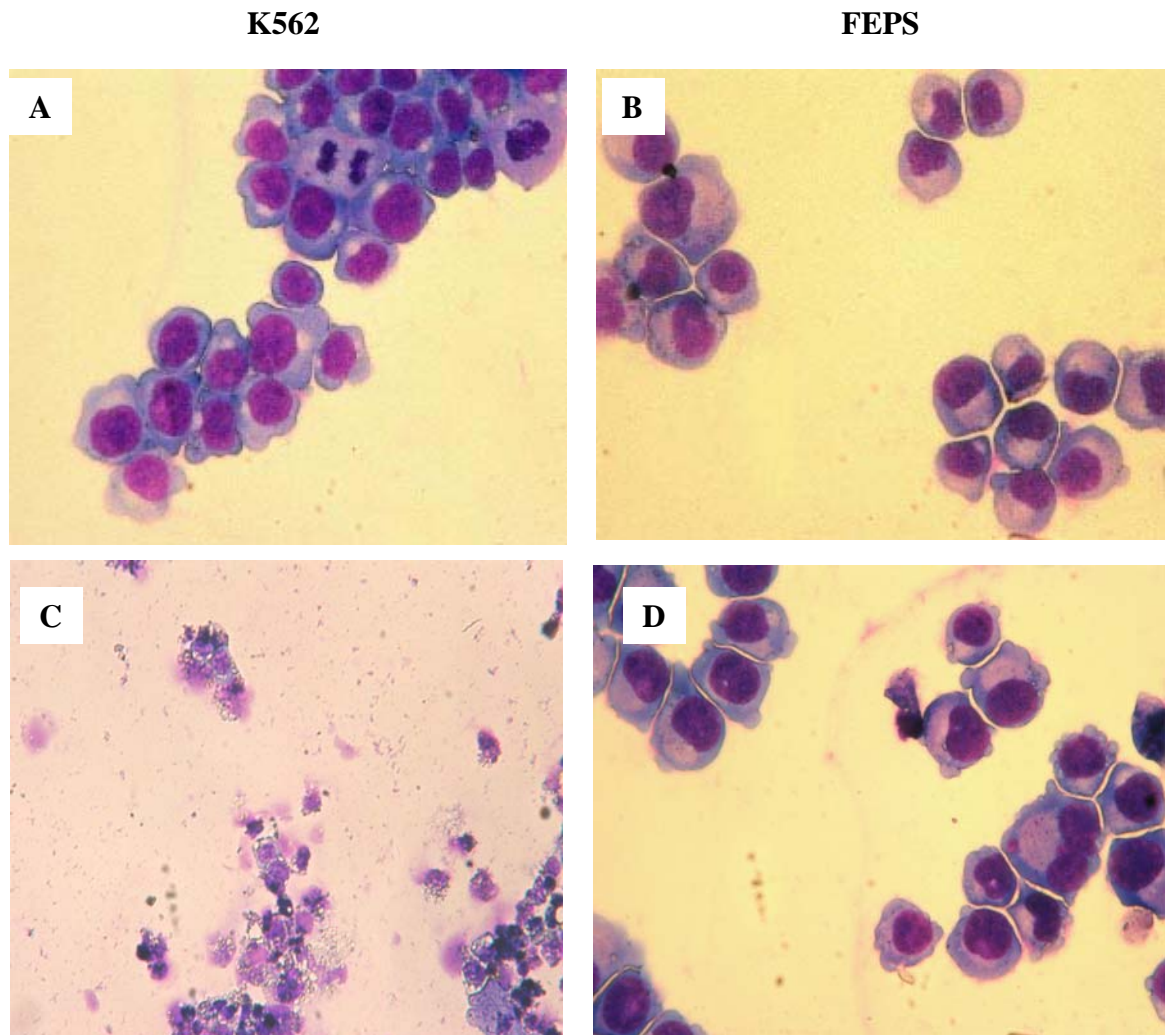
Para verificar morte por apoptose induzida por várias substâncias, utilizou-se o ensaio de marcação por anexina V ligada à fluoresceína. As moléculas de anexina se ligam a fosfatidil serina, que é exposta na face externa da membrana plasmática no caso de apoptose. Para verificar necrose utilizou-se iodeto de propídeo (PI). Os experimentos foram feitos de

acordo com as instruções contidas no kit para detecção de apoptose e a leitura foi realizada em citômetro de fluxo.

## **4. Resultados**

#### 4.1. Seleção e caracterização da nova linhagem FEPS

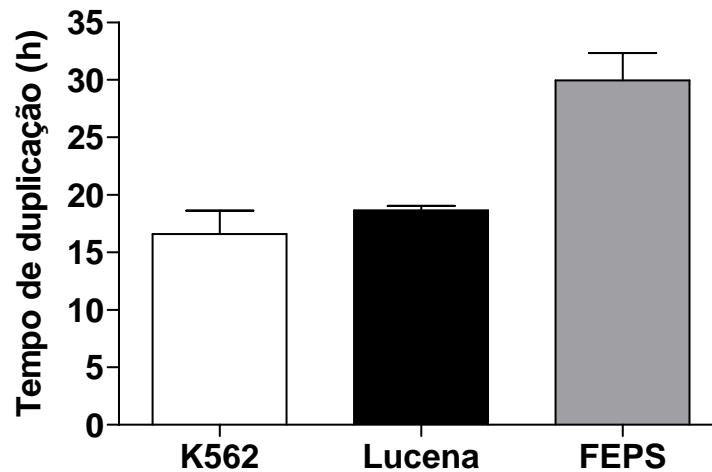
A linhagem celular FEPS foi selecionada, a partir da linhagem parental K562, adicionando-se ao meio de cultura o quimioterápico da família das antraciclinas daunorrubicina (DNR) na concentração inicial de 9,4nM. Essa concentração foi sendo aumentada em 2nM a cada duas semanas, durante o repique das células, até as células se tornarem resistentes a 466nM de DNR, podendo ser mantidas em meio com essa concentração do quimioterápico. A **Figura 9** mostra a morfologia das duas linhagens.



**Figura 9. Foto das linhagens K562 e FEPS.** (A) K562 controle, (B) FEPS controle, (C) K562 + DNR, (D) FEPS + DNR. A concentração de 466nM de DNR é a mesma concentração em que é mantida a FEPS. Aumento de 600X.

#### 4.1.1. Comportamento proliferativo da linhagem FEPS

Após a seleção mediou-se o tempo de duplicação das três linhagens; a linhagem parental K562, uma linhagem MDR Lucena 1 e a linhagem FEPS. O tempo de duplicação foi baseado na contagem do número de células e, podemos observar na **Figura 10**, que não houve diferença significativa entre as linhagens K562 e Lucena 1 ( $16,6 \pm 2,0$  e  $18,6 \pm 0,4$ h, respectivamente). Já a linhagem FEPS possui o tempo de duplicação mais longo de  $29,9 \pm 2,4$ h.

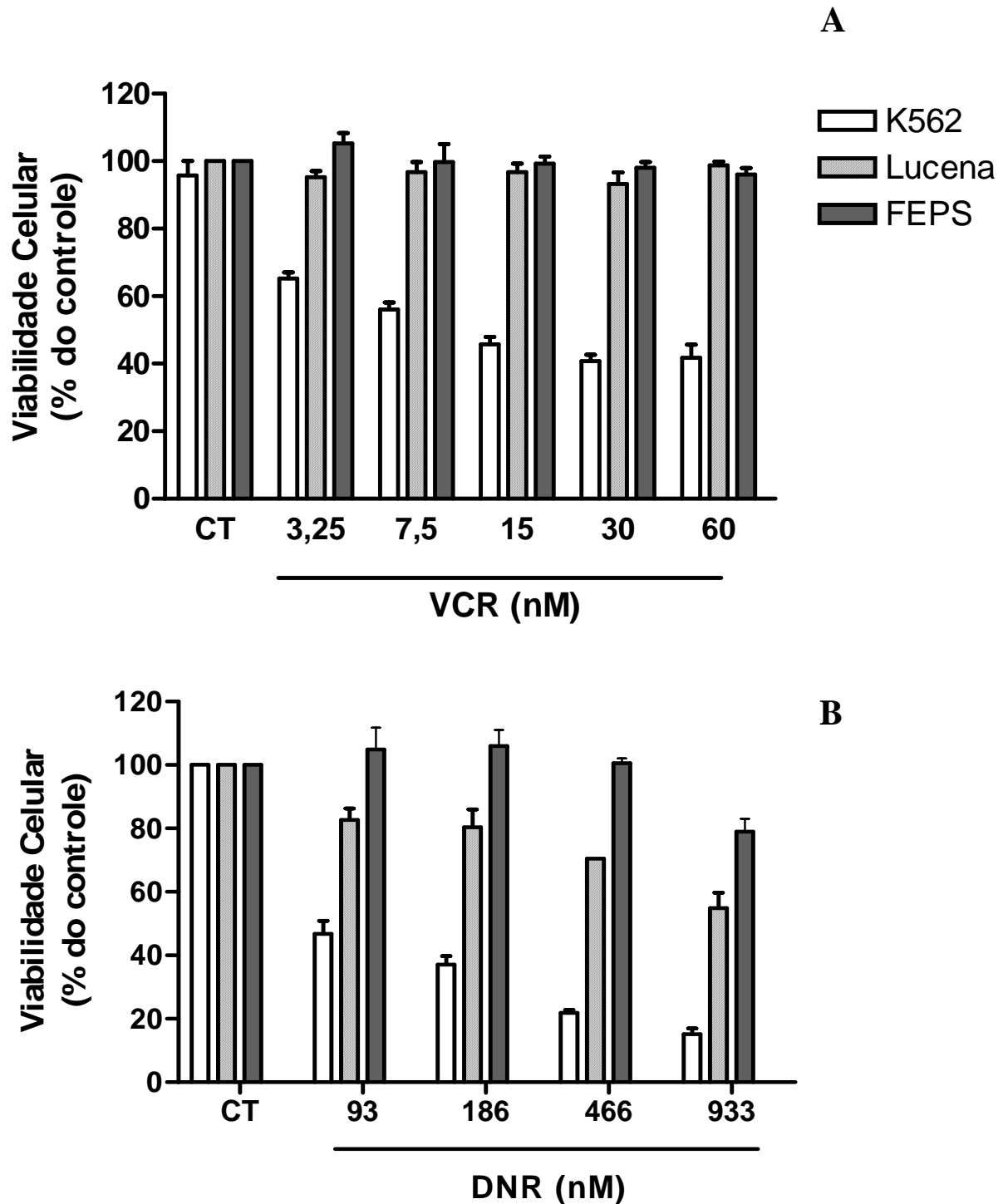


**Figura 10.** Tempo de duplicação (em horas) das células K562, Lucena 1 e FEPS. Esse gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos 3 experimentos.

#### 4.1.2. Perfil de resistência

Para verificar se a linhagem celular FEPS se tornou resistente somente a antraciclina ou a múltiplas drogas, foi utilizado um quimioterápico da família do alcalóide da vinca, a vincristina (VCR), e como parâmetro de comparação a linhagem celular Lucena 1, desenvolvida em nosso laboratório, que se caracteriza por ser resistente a VCR apresentando fenótipo MDR, com superexpressão de Pgp (RUMJANEK e col., 2001).

As linhagens K562 (parental), Lucena 1 (MDR) e FEPS foram incubadas com DNR e VCR durante o período de 72h. Os resultados mostram que a linhagem FEPS é resistente a ambos os quimioterápicos: DNR e VCR (**Figura 11**). A sua viabilidade somente sofreu redução na concentração de 933nM de DNR, demonstrando ser mais resistente que as linhagens K562 e Lucena 1, para esse quimioterápico. Com relação à VCR tanto a FEPS quanto a Lucena 1 foram totalmente resistentes à concentração de 60nM.



**Figura 11. Viabilidade celular.** A viabilidade foi analisada por MTT nas células K562, Lucena 1 e FEPS na presença de: (A). Vincristina (VCR), (B) Daunorubicina (DNR), após o período de 72h em cultura. Resultado representa a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos.

#### **4.1.3. Determinação da expressão e atividade dos transportadores ABC na linhagem FEPS**

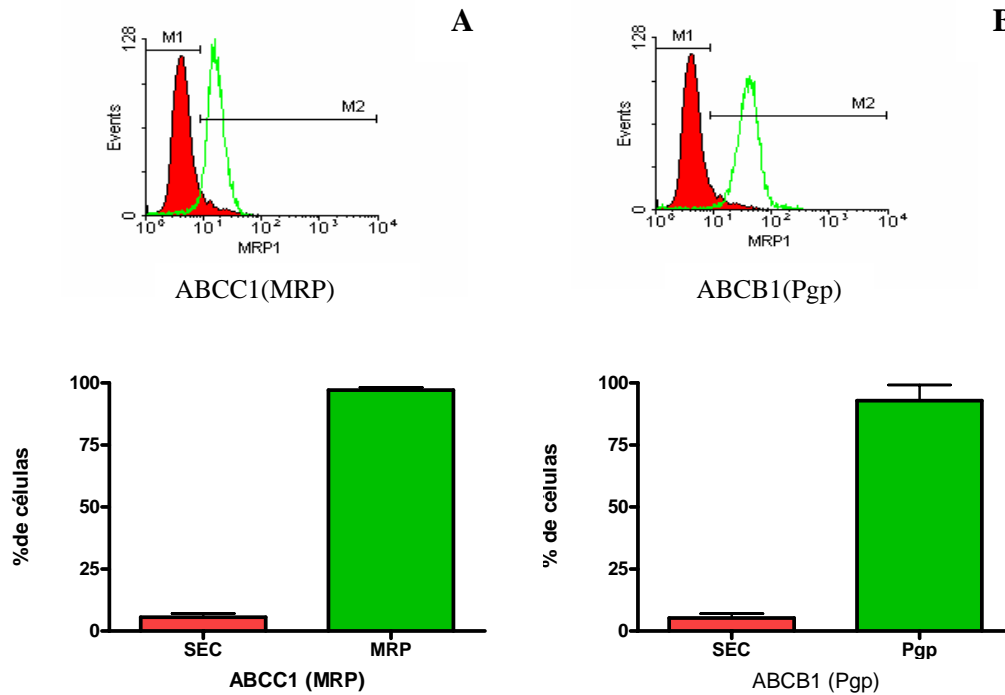
Os resultados anteriores sugeriram um fenótipo MDR para a linhagem FEPS. Posteriormente, tentou-se elucidar se um transportador da família ABC estaria atuando no processo de resistência a múltiplas drogas nessa linhagem. Para isso, verificou-se a expressão de 2 proteínas ABCB1 e ABCC1. Utilizando-se os anticorpos anti-ABCC1 (MRP1) e anti-ABCB1 (Pgp), foi observado que a linhagem FEPS expressa ambas as proteínas (**Figura 12**). Mais tarde para confirmar a presença da proteína ABCC1 foi feito um Western blotting que comprovou o resultado obtido por citometria (**Figura 13**).

Para verificar se além de estarem expressas essas proteínas apresentavam atividade funcional, realizou-se na linhagem FEPS um ensaio de atividade de ambas as proteínas, através de acúmulo de substratos fluorescentes. Para tal, a linhagem FEPS foi incubada com Rodamina123 (Rho), um substrato fluorescente específico para ABCB1 ou com diacetato de carboxi-fluoresceína (CFDA), substrato fluorescente para detecção de ABCC1.

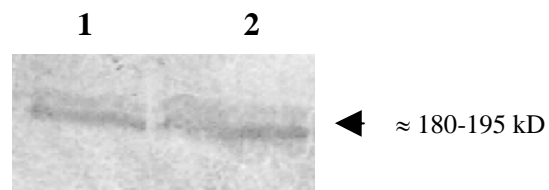
Como se pode observar na **Figura 14**, as células FEPS controle são capazes de bombear praticamente toda Rho visto que não acumulam fluorescência, já as células tratadas com verapamil (VP) 50 $\mu$ M e 1 $\mu$ M de ciclosporina (CSA), inibidores de ABCB1 (Pgp), obtiveram um percentual de 20 por cento de células positivas para Rho. (**Figura 14A**). Entretanto concentrações menores de VP (5 e 10 $\mu$ M) e CSA (0,2 $\mu$ M) não foram capazes de reverter o efluxo da bomba. Essas concentrações mais baixas revertem Pgp (ABCB1) na linhagem Lucena1.

No ensaio com CFDA ambos os reversores, indometacina (Indo 300 $\mu$ M) e probenecide (PRB 2,5mM) modularam a ação da MRP1 (ABCC1) em mais de 70% das células (**Figura 14B**). Esses resultados sugerem que ambas as proteínas estão presentes e ativas.

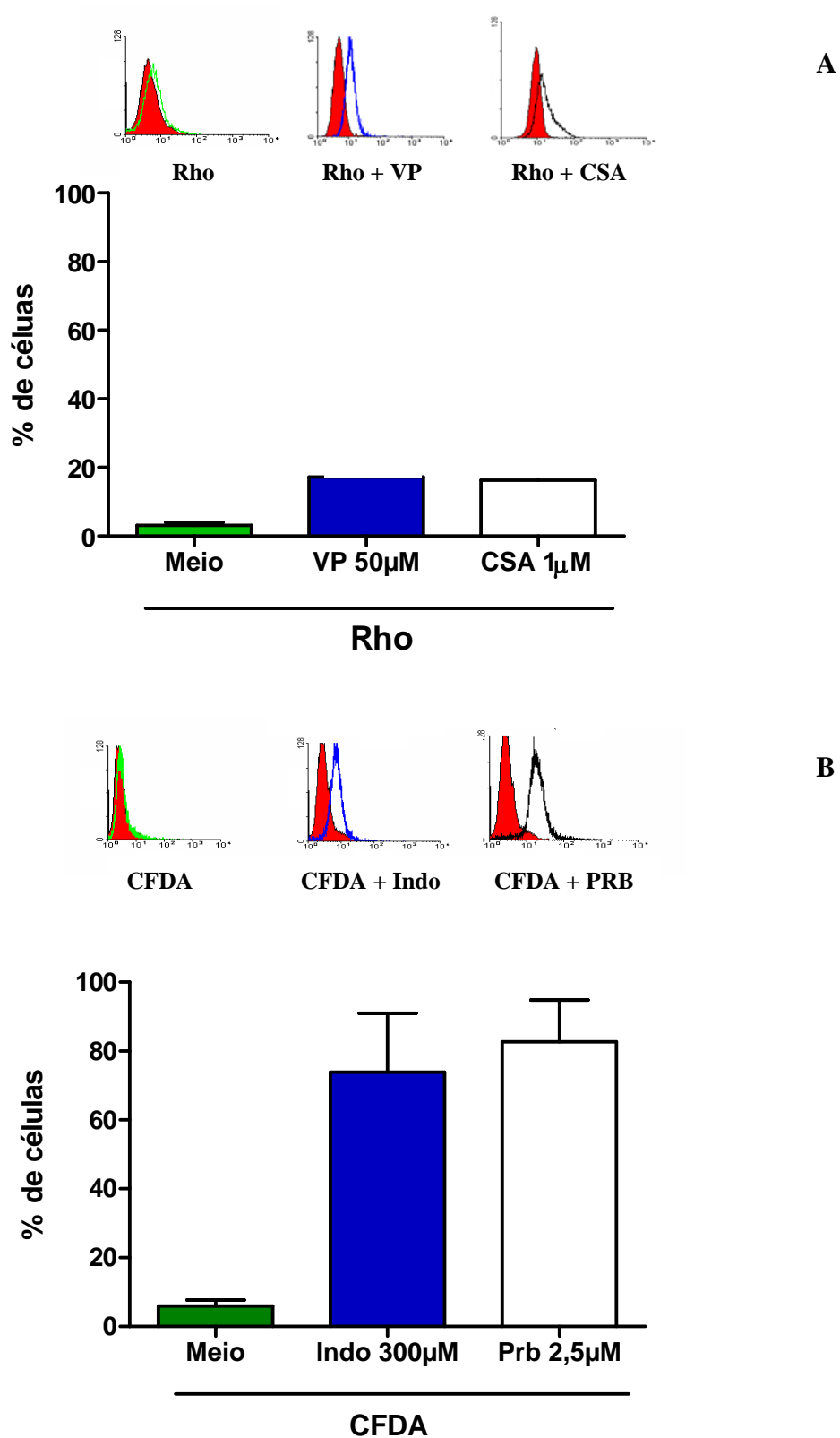




**Figura 12. Expressão das proteínas ABCC1 e ABCB1.** Percentual de expressão das proteínas ABCC1 (A) e ABCB1 (B) na linhagem FEPS. M1= fluorescência do anticorpo secundário (SEC). M2= fluorescência obtida com anticorpo primário e secundário. O percentual de células representa a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos 3 experimentos.



**Figura 13. Expressão da proteína ABCC1 na linhagem celular FEPS por Western Blot .** O blot foi marcado com anti-MRP1 (ABCC1) (1:50). Os sinais foram obtidos após incubação com NBT e BCIP. Linha 1 FEPS 25 $\mu$ g/ml, linha 2 controle linfócito humano (50 $\mu$ g/ml).

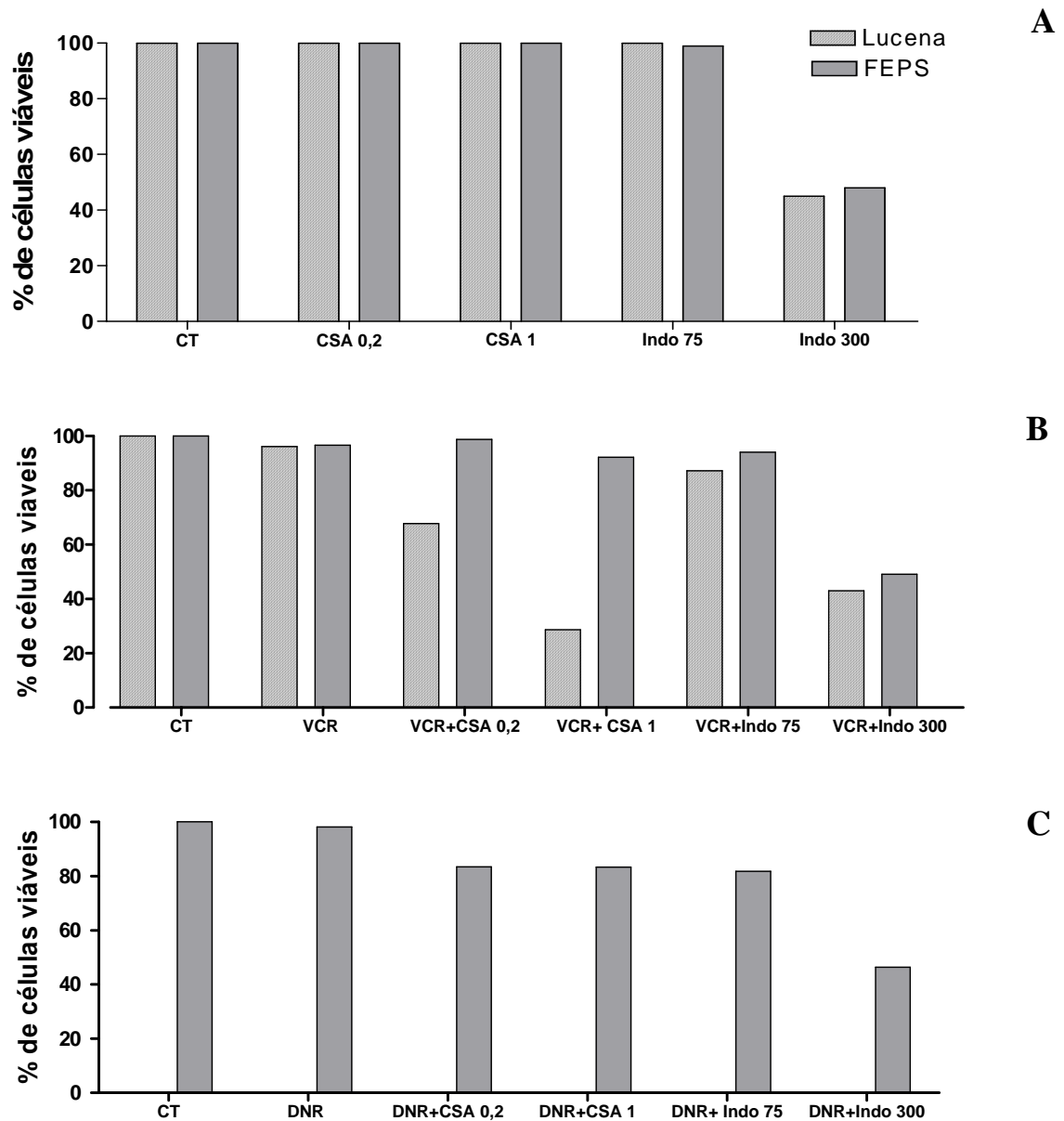


**Figura 14. Ensaio de atividade das proteínas Pgp (ABCB1) e MRP (ABCC1) na linhagem FEPS.**  
 A. Células incubadas com Rodamina (Rho) e os reversores verapamil (VP) e Ciclosporina-A (CSA). Resultado representa 1 experimento  
 B. Células incubadas com CFDA e os moduladores Indometacina (Indo) e Probenecide (PRB). Resultado representa média de 3 experimentos.

#### **4.1.4. Determinação da viabilidade celular no tratamento com moduladores da MDR na linhagem FEPS**

Para determinar o efeito dos reversores da Pgp (ABCB1) e da MRP (ABCC1) na viabilidade celular foi feito um experimento nas células Lucena 1 e FEPS, na presença e ausência dos dois moduladores, CSA e Indo, associados a um quimioterápico. O reversor indometacina (Indo) na concentração de 300 $\mu$ M já produziu por si só diminuição de viabilidade nas duas linhagens. A viabilidade foi determinada após 72h em cultura pelo método de MTT (**Figura 15 A**).

Para inibir o efeito da Pgp (ABCB1) utilizamos as concentrações de 200nM e 1 $\mu$ M de CSA e observamos que a célula Lucena 1 sofreu uma diminuição na viabilidade celular na presença de CSA quando exposta a VCR e a Daunorrubicina. Essa queda da viabilidade foi mais efetiva na dose de 1 $\mu$ M de CSA. A linhagem FEPS não foi modulada por nenhuma das concentrações testadas. (**Figura 15B**) Utilizamos também, o inibidor da MRP (ABCC1), Indometacina (Indo) nas concentrações de 75 $\mu$ M e 300 $\mu$ M. Mais uma vez a viabilidade celular da FEPS não foi alterada nas concentrações de 75 e 300 $\mu$ M de Indo, na presença de 466nM de DNR (**Figura 15C**). O resultado obtido com DNR e Indo na concentração de 300 $\mu$ M se assemelhou ao efeito de Indo sozinho.

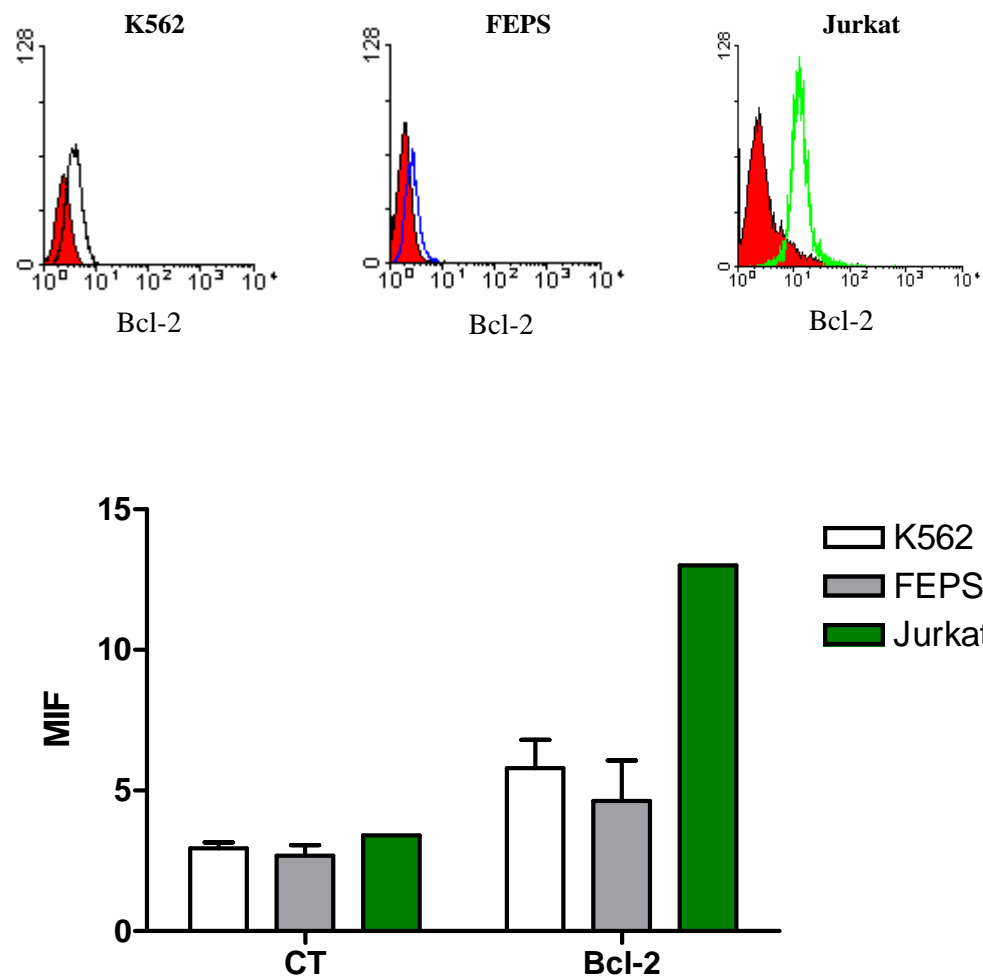


**Figura 15. Viabilidade celular com os moduladores Ciclosporina (CSA) e Indometacina (Indo).** (A) Células tratadas somente com os moduladores CSA 0,2 e 1 $\mu$ M e Indo 75 e 300 $\mu$ M (B) células tratadas com os moduladores na presença de 60nM de VCR (C) Células tratadas com 466nM de daunorrubicina na presença dos moduladores nas culturas de 72h. Resultado representa média de 2 experimentos

#### 4.1.5. Expressão de Bcl-2

Comparamos também a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 nas linhagens, visto que um aumento desta proteína induz resistência em alguns tumores (**Figura 16**). As linhagens K562 e FEPS foram comparadas, utilizando como controle positivo a linhagem celular Jurkat, que sabidamente expressa níveis elevados de Bcl-2 (ADAMS e CORY., 1998).

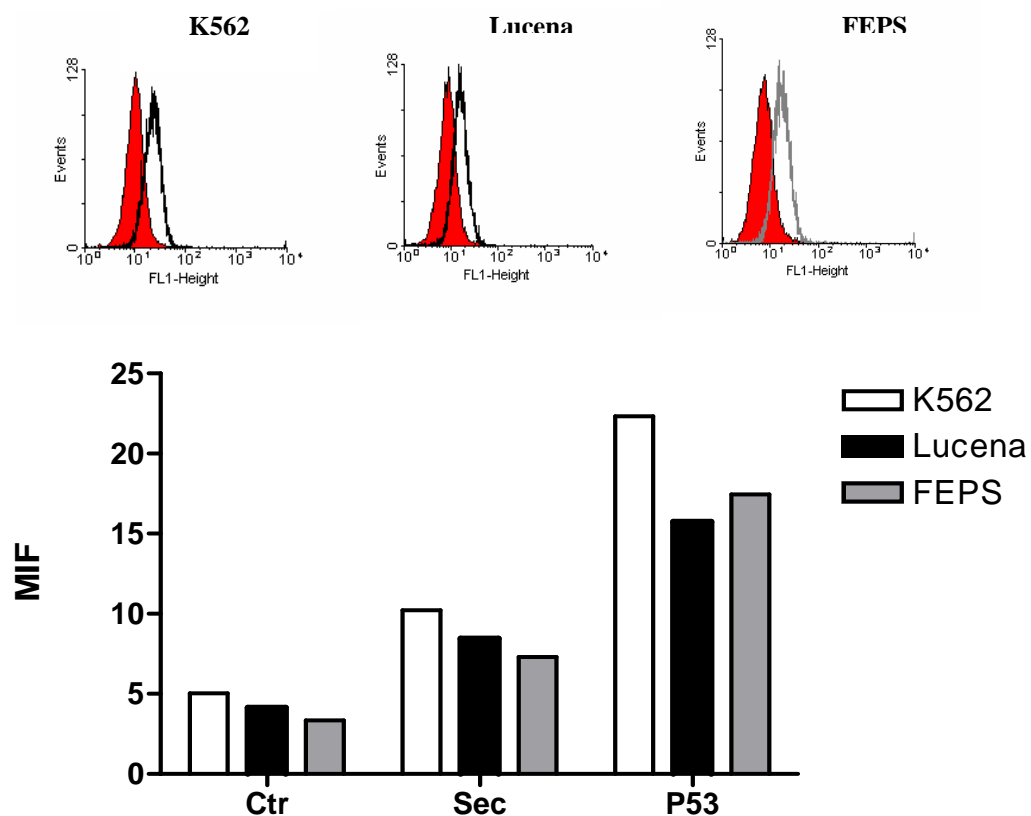
Não foram observadas diferenças significativas entre as duas linhagens ao passo que Jurkat, como esperado, apresentou uma expressão elevada de Bcl-2.



**Figura 16. Expressão da proteína Bcl-2.** Média da intensidade de fluorescência do anticorpo anti-Bcl-2 entre as linhagens K562, FEPS e Jurkat. Resultado representa a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos 3 experimentos.

#### 4.1.6. Expressão de P53

A proteína P53 tem uma meia vida curta, mas muitas mutações diminuem a sua degradação, além de tornarem essa proteína não funcional. Comparamos a expressão dessa proteína nas três linhagens K562, Lucena e FEPS. As três linhagens apresentam expressão de P53, não havendo diferenças significativas entre as linhagens.



**Figura 17. Expressão da proteína P53.** Média da intensidade de fluorescência (MIF) do anticorpo anti-P53 entre as linhagens K562, Lucena e FEPS. Resultado representa a média 2 experimentos. Em vermelho o perfil das células com o anticorpo secundário (Sec).

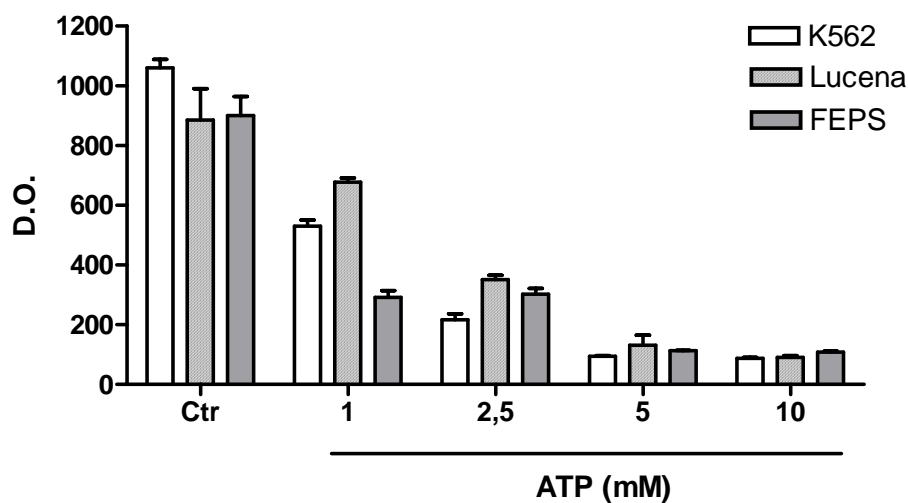
#### 4.2. Efeito de ATP extracelular em linhagens resistentes

Níveis milimolar (mM) de ATP são capazes de induzir morte em várias células através da ativação de receptores purinérgicos. Um dos nossos objetivos foi verificar se células MDR expressando transportadores ABC seriam igualmente sensíveis ao ATP extracelular.

#### 4.2.1. Efeito do ATP na viabilidade celular

Investigou-se se as linhagens celulares que apresentam um fenótipo de resistência a múltiplas drogas, Lucena 1, que superexpressa Pgp (ABCB1) e FEPS, que superexpressa Pgp (ABCB1) e MRP1(ABCC1), apresentariam sensibilidades diferentes aos efeitos deletérios do ATP extracelular ( $ATP_0$ ), quando comparados com a linhagem parental K562.

Não foram encontradas diferenças significativas entre as 3 linhagens com relação à morte celular induzida por  $ATP_0$  no período de 72h nas concentrações de 1-10 mM  $ATP_0$  (**Figura 18**). Como as 3 linhagens foram sensíveis ao  $ATP_0$  utilizamos nos próximos experimentos somente as linhagens K562 e Lucena 1 para aprofundar o mecanismo de morte em linhagens bem caracterizadas.



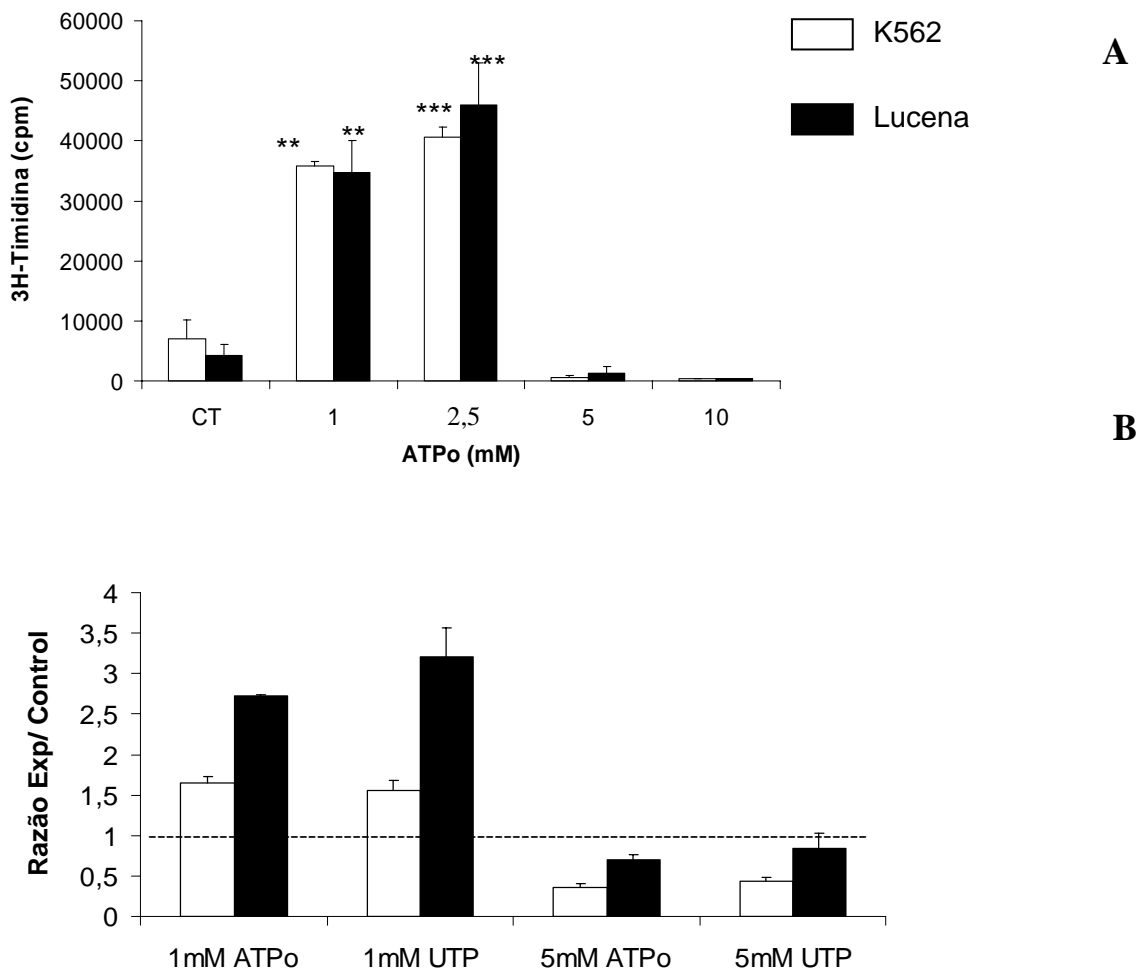
**Figura 18. Viabilidade celular na presença de  $ATP_0$ .** A viabilidade das linhagens K562, Lucena 1 e FEPS na presença de ATP extracelular foi medida por MTT, após um período de 72h em cultura. D.O. - Densidade ótica. Os valores se referem à média  $\pm$  desvio padrão da média (n=3).

#### 4.2.2. Efeito da adição extracelular de nucleotídeos na incorporação de [ $^3H$ ]-timidina no DNA das linhagens K562 e Lucena 1

O ensaio de MTT pode representar morte ou inibição de proliferação celular ou diminuição do metabolismo celular. Após 72h de incubação com  $ATP_0$ , ambas as células K562 e Lucena 1 mostraram uma diminuição na incorporação de timidina nas concentrações

de 5 e 10 mM de ATP (**Figura 19A**). Entretanto, nas concentrações de 1 e 2,5 mM ocorreu um aumento na incorporação de timidina quando comparado ao controle (células sem ATP<sub>0</sub>).

Quando comparamos o efeito do UTP<sub>0</sub> nas duas linhagens celulares, observamos um efeito semelhante ao do ATP<sub>0</sub>, nas concentrações de 1 e 5 mM (**Figura 19B**), isto é aumento de incorporação na concentração menor e inibição na maior.



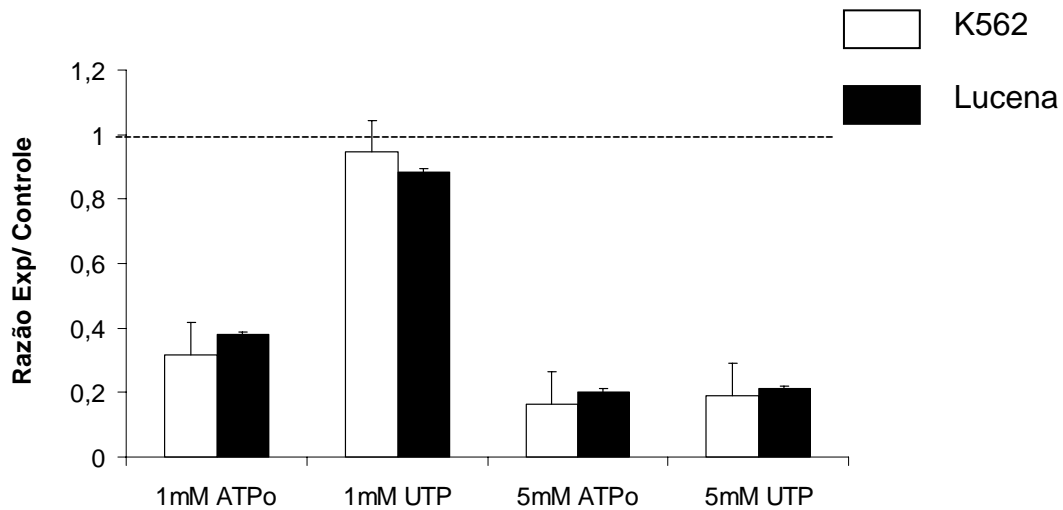
**Figura 19. Efeito da exposição de diferentes doses de ATP<sub>0</sub> e UTP<sub>0</sub> na incorporação de <sup>3</sup>H timidina das células K562 e Lucena I.** (A)  $2 \times 10^4$  células/ml foram incubadas na presença ou ausência de ATP<sub>0</sub> (1-10mM) e ao final de 72h as células receberam <sup>3</sup>H Timidina. (B) Comparação dos efeitos produzidos pelo ATP<sub>0</sub> e UTP<sub>0</sub> na proliferação celular. Os valores se referem à razão dos níveis de incorporação de timidina em relação aos seus respectivos controles (controle=1). Cada valor representa a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos diferentes. \*\*\*P<0.001 indica diferença significativa entre o controle e as células tratadas.



### 4.2.3. Viabilidade celular após o tratamento com o nucleotídeo UTP<sub>0</sub>

Semelhante ao que havia sido observado com ATP<sub>0</sub> (Seção 4.2.1) seria provável que a incorporação baixa observada com 5mM de UTP<sub>0</sub> representasse morte celular. Para averiguar tal possibilidade, foram realizados experimentos usando o método MTT e após 72h de cultura foi determinado o número de células viáveis nas linhagens K562 e Lucena1 (**Figura 20**).

Quando 5mM de UTP<sub>0</sub> foi utilizado, foi observada uma diminuição na densidade ótica compatível com queda na viabilidade celular semelhante ao efeito de ATP<sub>0</sub>, no entanto 1mM de UTP não produziu nenhum efeito, o que contrasta com a diminuição produzida pela mesma concentração de ATP<sub>0</sub> (**Figura 21**). Foram testados, também, 1 e 5 mM de UDP e UMP mas não se observou nenhum efeito (dados não mostrados).

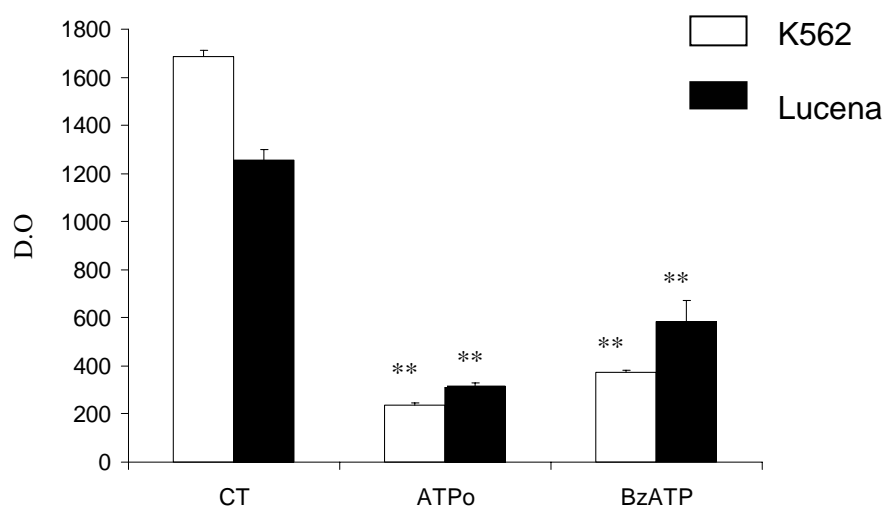


**Figura 20. Comparação do efeito do UTP<sub>0</sub> e ATP<sub>0</sub> na viabilidade celular das linhagens K562 e Lucena 1.** Ambas as células foram cultivadas por 72h com diferentes doses de ATP<sub>0</sub> e UTP<sub>0</sub> e a viabilidade medida através do método MTT. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos separados. Os valores se referem à razão da densidade ótica em relação aos seus respectivos controles (Controle=1).

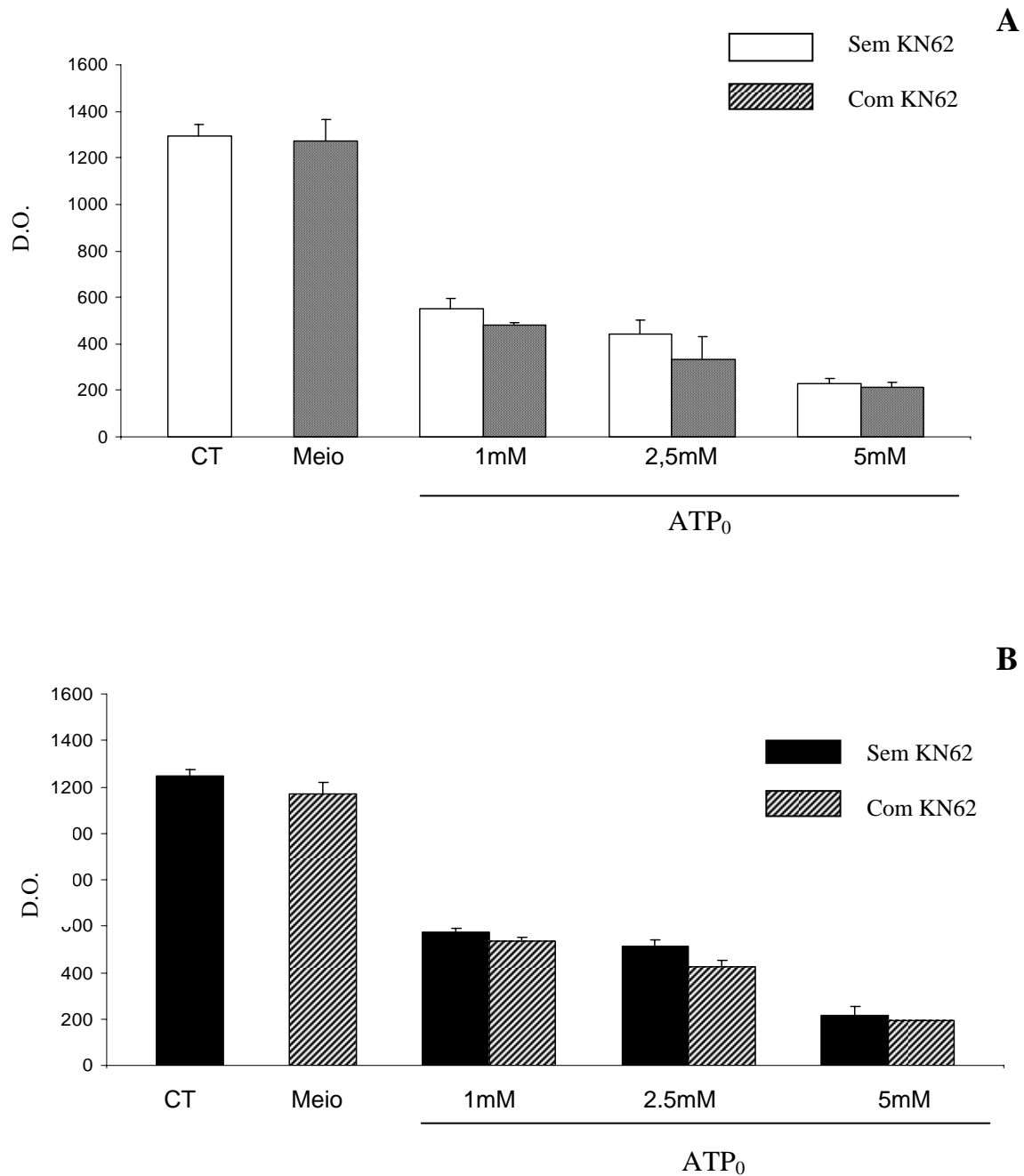
#### 4.2.4. Efeito do agonista e de antagonistas de P2x7 na viabilidade celular

O fato de ambos, ATP<sub>0</sub> e UTP<sub>0</sub>, produzirem efeitos similares sugere a ativação de mais de um receptor para nucleotídeos. Estudou-se então a participação do receptor P2X7 na morte celular induzida por ATP<sub>0</sub>. Para isso foi utilizado BzATP, um potente agonista do receptor P2X7. Leituras de absorbâncias mostraram uma diminuição significativa do número de células após 72h de incubação com 1mM de BzATP, quando comparado com células não tratadas. A redução no número de células viáveis expostas a ATP<sub>0</sub> 5mM serviu como controle positivo (**Figura 21**), sugerindo um possível papel desse receptor no efeito citotóxico observado.

Foi então estudado o efeito de antagonistas para o receptor P2X7 : OxATP (300 μM) e KN62 (5μM). O OxATP por si só produziu uma toxicidade inaceitável (dados não mostrados). Estudou-se então o antagonista KN62 adicionando-o à cultura das células 10min antes da adição do ATP<sub>0</sub>. Nossos resultados mostraram que KN62 não foi efetivo no aumento da sobrevivência celular (**Figura 22**), sugerindo um não envolvimento do receptor P2X7.



**Figura 21. Efeito do BzATP na viabilidade celular das linhagens K562 e Lucena 1.** As células foram incubadas com BzATP por 72h, e a viabilidade medida utilizando o ensaio de MTT. Foi usado ATP<sub>0</sub> 5mM como controle positivo. Resultados representam a média ± desvio padrão de 3 experimentos separados. Significância entre controle e condições tratadas \*\* P<0.001. D.O= densidade ótica

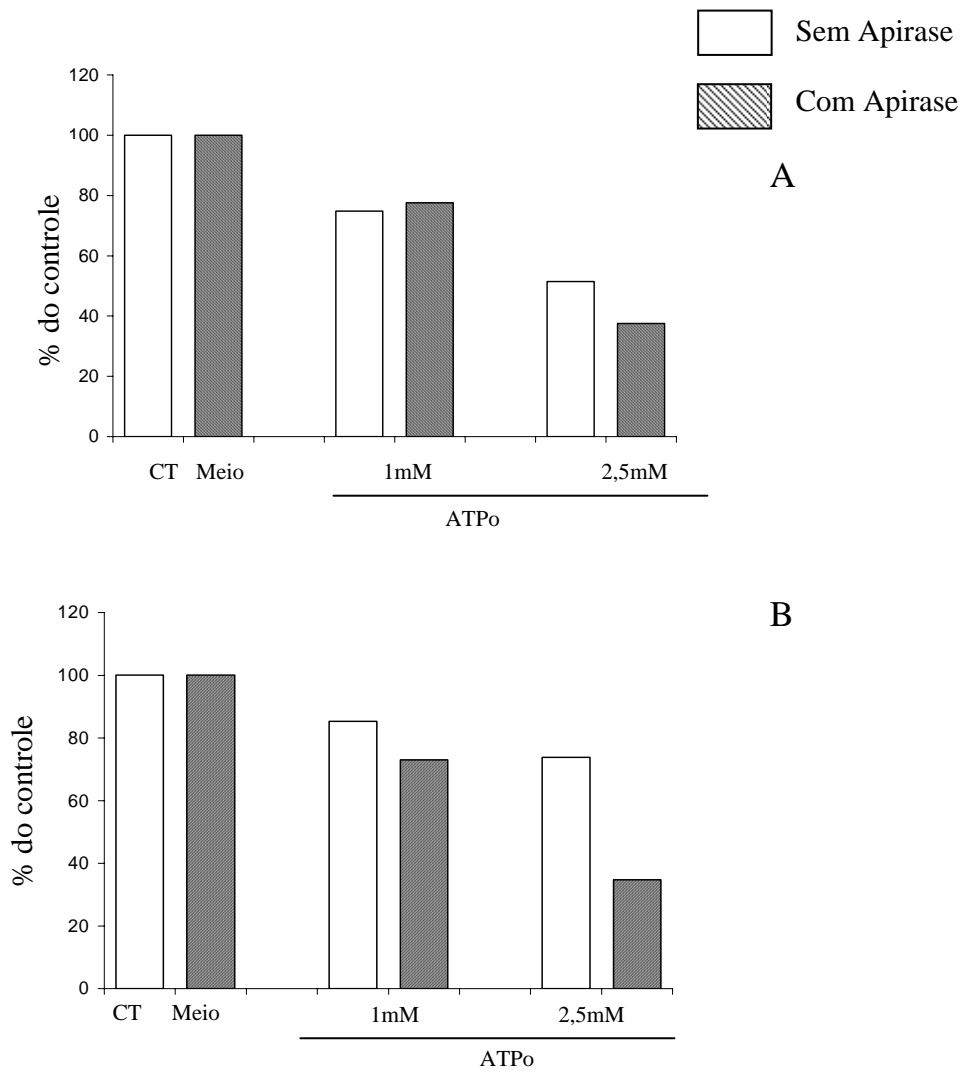


**Figura 22. Antagonista do receptor de ATP (KN62) não impede a morte induzida pelo ATP.** Células K562 (A) e Lucena 1 (B), ambas na concentração de  $2 \times 10^4$  céls/ml, foram incubadas na presença ou ausência de ATP<sub>0</sub> (1-5mM), com ou sem KN62 (5μM). Após 72h de exposição ao ATP<sub>0</sub> a viabilidade celular foi avaliada através do método de MTT. Resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos diferentes. D.O = densidade ótica

#### 4.2.5. Efeito da Apirase

Com a colaboração do aluno de mestrado André Luiz Fonseca de Souza, verificou-se a presença da atividade de ecto-enzimas na superfície das células K562 e Lucena 1 (BERNARDO e col., 2006). Para estudar a possibilidade de que os efeitos observados fossem devidos a produtos do ATP<sub>0</sub> por ação das ectoenzimas e não devido ao próprio ATP, foram adicionadas ao meio 3U (unidades) de apirase, um componente que hidrolisa ATP<sub>0</sub> (**Figura 23**).

Não foi observada uma inibição da atuação do efeito ATP<sub>0</sub> no meio com apirase, ao contrário nas concentrações maiores potenciou a citotoxicidade produzida por ATP, sugerindo a participação de produtos da hidrólise do ATP<sub>0</sub> no processo de morte dessas células.

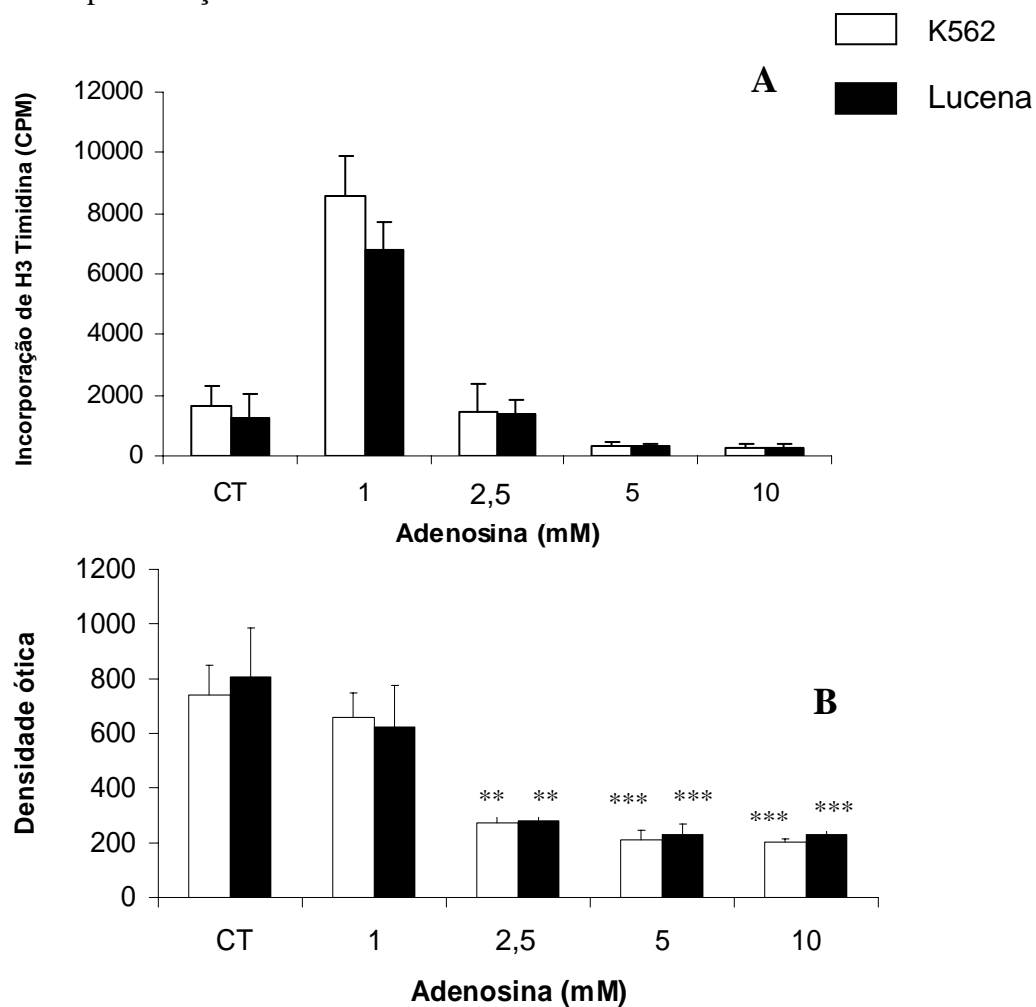


**Figura 23. Efeito da Apirase sobre a morte induzida pelo ATP<sub>0</sub>.** As células K562 (A) e Lucena 1 (B), ambas na concentração de  $2 \times 10^4$  céls/ml, foram incubadas na presença ou ausência de ATP<sub>0</sub> (1 e 2,5 mM), com ou sem Apirase (3 Unidades). Após 72h a viabilidade celular foi avaliada através do método de MTT. Resultados representam a porcentagem do controle e são relativos a um experimento.

#### 4.2.6. Efeito de adenosina no crescimento celular

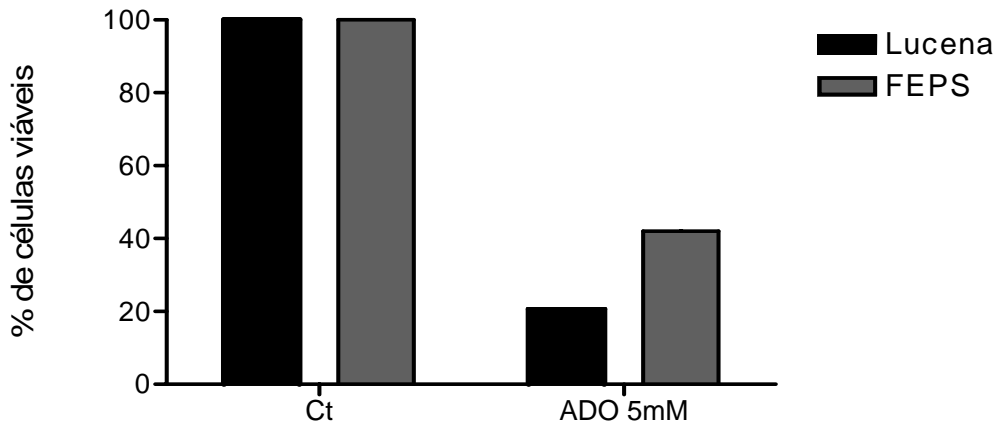
A presença de ecto-enzimas ativas na superfície das células e o fato de apirase não ter inibido ATP<sub>0</sub>, levou-nos a investigar o efeito da adenosina, o último produto da hidrólise do ATP<sub>0</sub>, no nosso sistema.

Como mostramos na **Figura 24A**, o perfil bifásico da incorporação de <sup>3</sup>H-timidina também foi observado com uso de adenosina e é comparável àquele obtido após o tratamento de ATP<sub>0</sub>. No entanto, semelhante ao efeito produzido por ATP<sub>0</sub>, adenosina não aumentou o número de células viáveis nas duas linhagens (**Figura 24B**), sugerindo que não houve um aumento na proliferação celular.



**Figura 24.** Efeito da adenosina na proliferação e viabilidade celular. Incorporação de <sup>3</sup>H-timidina (A) e viabilidade celular (B) após 3 dias de cultura na presença de diferentes concentrações de adenosina. Viabilidade foi medida por MTT. Resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos separados. Significância entre controle e condições tratadas \*\*\*P <0,001; \*\* P<0,01.

Como os resultados com adenosina se assemelhavam àqueles obtidos com ATP<sub>0</sub> nas linhagens K562 e Lucena 1, fomos verificar se adenosina seria capaz de induzir morte na linhagem FEPS, que expressa também MRP1 (ABCC1) **Figura 25**.



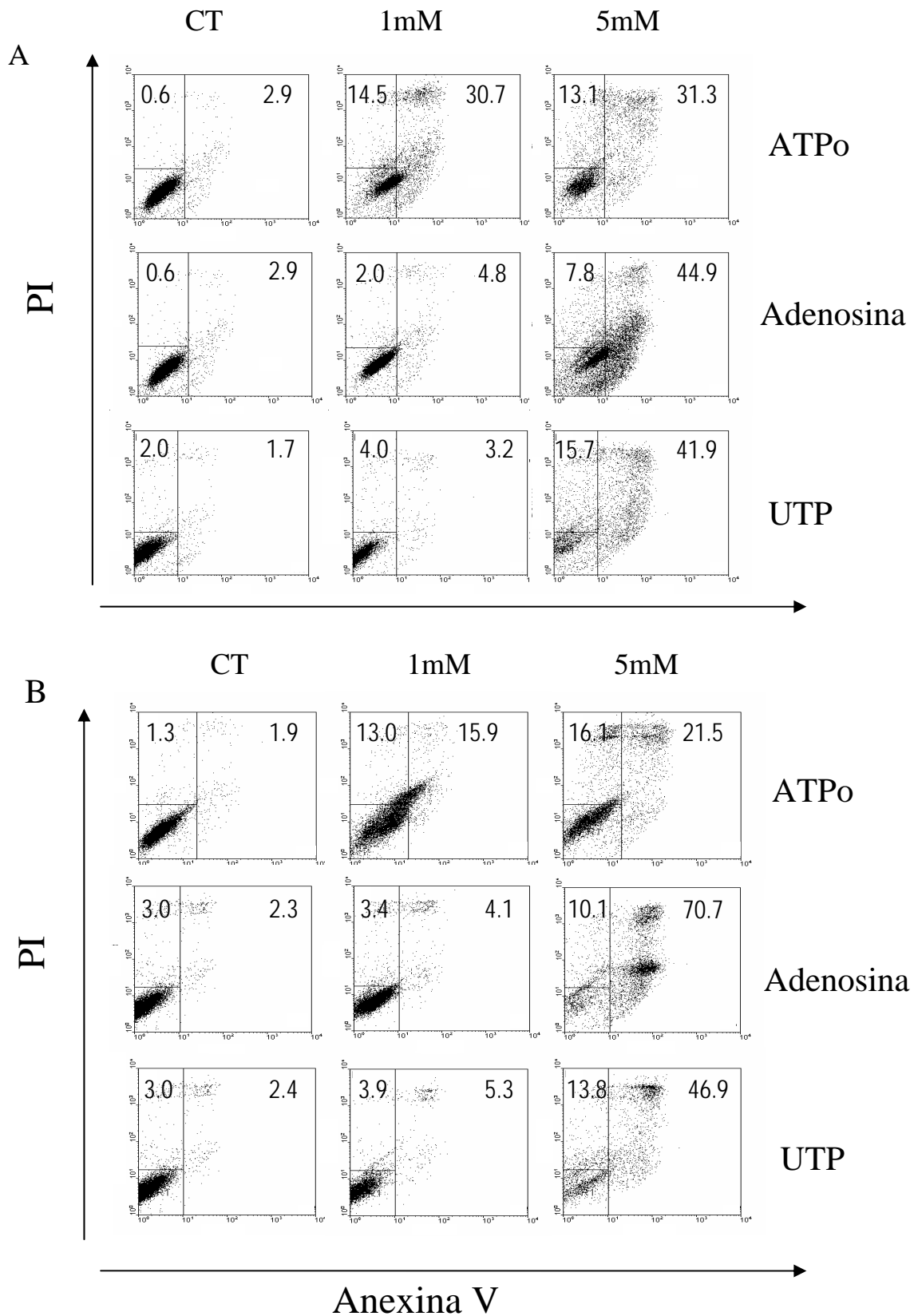
**Figura 25.** Comparação entre as linhagens FEPS e Lucena 1. Ambas as linhagens tiveram uma diminuição de viabilidade. Resultado representa o percentual do controle. ADO-Adenosina. Média de 2 experimentos.

#### 4.2.7. Efeito de ATP<sub>0</sub>, UTP<sub>0</sub> e adenosina na indução de apoptose

Os efeitos contraditórios observados no ensaio de incorporação de <sup>3</sup>H-timidina e MTT nos levaram a estudar outro método de verificação de morte celular.

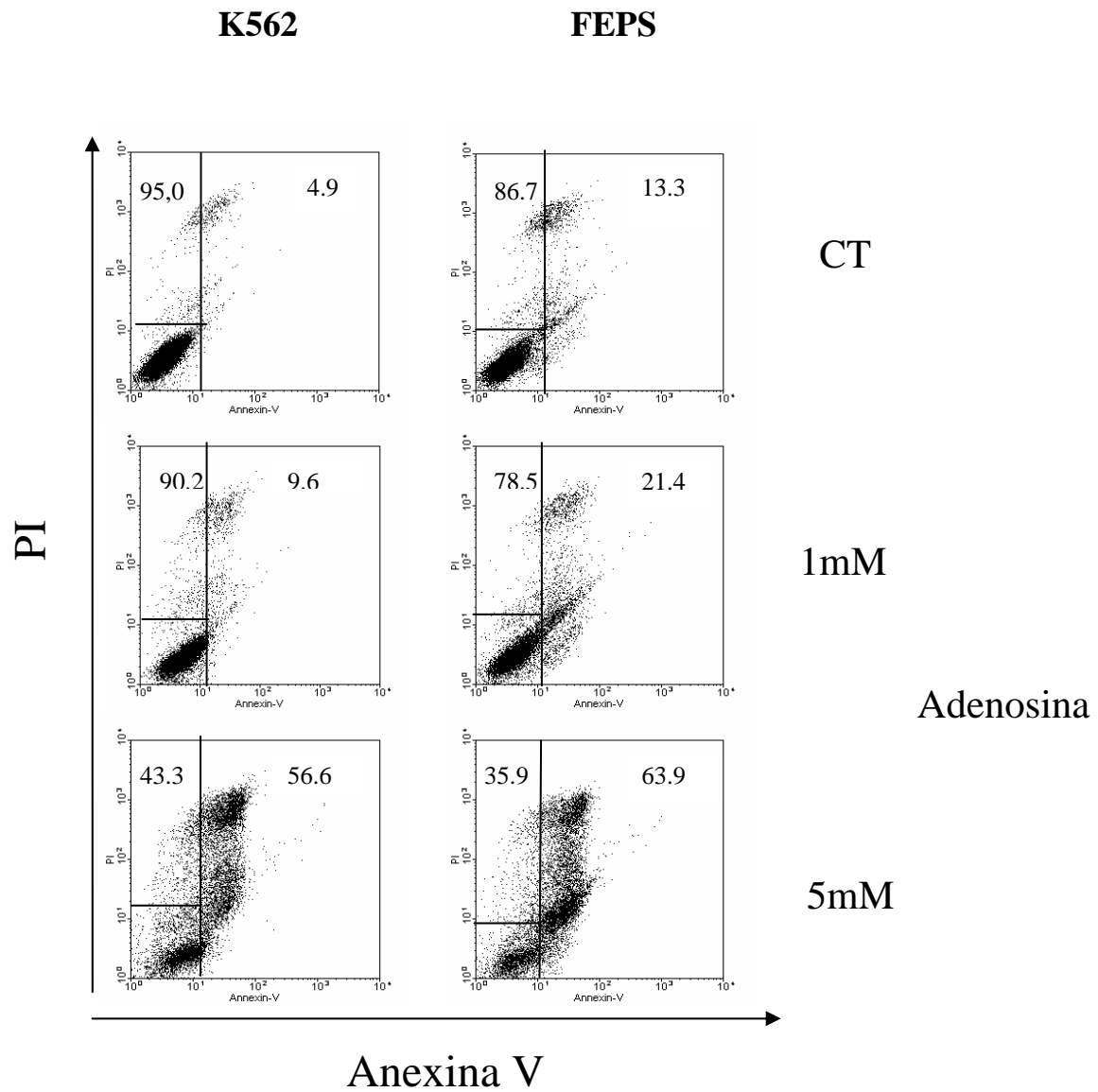
A citotoxicidade produzida por ATP<sub>0</sub>, UTP<sub>0</sub> e adenosina tornaram-se evidentes após experimentos de indução de apoptose, medida pelo ensaio de anexina V (**Figura 26**). Pode-se verificar que ocorreu um aumento no número de células apoptóticas conforme a concentração crescente de ATP<sub>0</sub>, adenosina e UTP<sub>0</sub>.

De forma semelhante, a adenosina, nas concentrações de 1mM e 5mM, foi capaz de induzir apoptose e necrose secundária na linhagem FEPS (**Figura 27**)



**Figura 26. Efeito de ATP<sub>0</sub>, adenosina e UTP<sub>0</sub> na indução de apoptose e necrose nas linhagens K562 (A) e Lucena (B).** As células foram mantidas na presença das drogas por 72h., após esse período as células foram marcadas com Anexina-FITC e PI. A figura é representativa de 3 experimentos feitos nas mesmas condições





**Figura 27. Efeito de Adenosina na indução de apoptose e necrose nas linhagens K562 e FEPS.** As células foram mantidas na presença de Adenosina por 72h., após esse período as células foram marcadas com Anexina-FITC e PI.

## **5. Discussão**

O uso de linhagens para o estudo do fenômeno MDR vem ocorrendo desde a descrição do mesmo, e tem se mostrado extremamente útil para analisar a fundo esse problema e para buscar quimioterápicos ativos na resistência. A seleção de linhagens através de doses crescentes de quimioterápicos (TSURUO e col., 1981) é um modelo mais fidedigno ao que acontece *in vivo*. Essas linhagens podem possuir mais de um transportador relacionado com a MDR, o que não é encontrado em células transfectadas mas pode ser encontrado em tumores de pacientes (VASCONCELLOS e col., 2007). No presente trabalho fomos capazes de induzir resistência múltipla utilizando o quimioterápico daunorrubicina em células da leucemia humana K562.

O fenótipo MDR é multifatorial e pode ser conferido pela extrusão dos quimioterápicos, via transportadores dependentes de ATP, ou por vários outros mecanismos intrínsecos, como por exemplo aqueles que afetam a via de indução de apoptose. Neste trabalho, após o estabelecimento da linhagem nomeada FEPS, a qual é capaz de resistir *in vitro* a antraciclina e alcalóides da vinca, procuramos caracterizá-la quanto a seus mecanismos de resistência.

Fomos capazes de demonstrar que a linhagem FEPS superexpressava tanto Pgp (ABCB1) quanto MRP1 (ABCC1). Neste ponto diferia de uma outra linhagem MDR, obtida no laboratório, Lucena 1, que só superexpressa Pgp (ABCB1) (RUMJANEK e col., 2001). A superexpressão de mais de um transportador ABC por uma mesma célula tumoral já havia sido descrita anteriormente, em estudo com células obtidas de pacientes com leucemia (VASCONCELLOS e col., 2007). A linhagem FEPS mostrou ser mais resistente que células Lucena 1 na modulação da atividade da Pgp (ABCB1) por reversores (CSA e VP), resultado confirmado através de experimento de viabilidade com os moduladores da Pgp (ABCB1) e MRP (ABCC1) na presença de quimioterápicos. Este resultado poderia estar acontecendo em virtude da co-expressão de dois transportadores ou uma maior expressão de Pgp (ABCB1) na

linhagem FEPS e, de fato, ensaios medindo expressão através de citometria mostraram que esta linhagem expressa cerca de 2 vezes mais Pgp que a linhagem Lucena 1 (YUNES, 2007).

Dentre os vários mecanismos de multirresistência tumoral, um bastante importante é o da superexpressão de Bcl-2. Esta possibilidade foi abordada neste trabalho, mas não encontramos nenhuma diferença entre a expressão desta proteína em células K562 e FEPS que justificasse a resistência observada. Resultados semelhantes foram descritos com relação a Lucena 1, a qual também não possui uma expressão alterada de Bcl-2, quando comparada com a sua parental K562 (WAGNER SOUZA e col., 2003).

Embora não tenham sido observadas alterações nos níveis de Bcl-2, seria possível que além da superexpressão de Pgp (ABCB1) e MRP1 (ABCC1) a linhagem FEPS apresentasse algum bloqueio na indução da via apoptótica.

Estudos mostraram que, de fato, células selecionadas com daunorrubicina apresentam um sistema de reparo que evita a morte por apoptose. Dentre outros efeitos, a daunorrubicina induz uma maior produção de espécies ativas de oxigênio, que leva a um aumento na expressão da proteína supressora de tumor, p53, além de diminuição dos níveis da proteína Bax. Esses eventos, em conjunto, previnem a indução de apoptose (LOTHSTEIN e col., 2001). P53 é uma proteína pro-apoptótica mas mutações no gen p53 levando a sua perda ou inativação são as mutações mais comum no câncer. No nosso trabalho não foram encontradas diferenças entre as três linhagens estudadas em relação à expressão de P53.

Outra possibilidade seria avaliar outras moléculas importantes no controle das vias que levam à apoptose, que não fossem substratos de Pgp (ABCB1) e MRP1 (ABCC1). Já foi descrito anteriormente que nucleotídeos extracelulares, como ATP ou mesmo adenosina, são capazes de induzir tanto proliferação celular, quanto morte celular via apoptose, dependendo do tipo celular (SANCHES e col., 2002 ).

Assim sendo, em um primeiro momento partimos para investigação do efeito do ATP<sub>0</sub> na proliferação celular, comparando a linhagem parental K562 e Lucena 1 pois estas estavam melhor caracterizadas. Os primeiros resultados mostraram um aumento de incorporação de <sup>3</sup>H-timidina nas linhagens K562 e Lucena 1, nas concentrações de 1 e 2,5mM de ATP<sub>0</sub>, enquanto nas concentrações de 5 e 10mM a incorporação foi abaixo do controle. No intuito de analisar se a incorporação de <sup>3</sup>H-timidina poderia ser via ativação do receptor P2, foi utilizado no tratamento UTP<sub>0</sub>, um ligante do receptor P2Y<sub>2</sub>, na mesma concentração. Os resultados, assim como visto com ATP<sub>0</sub>, mantiveram o mesmo padrão. Ambas as linhagens obtiveram um aumento de incorporação de <sup>3</sup>H-timidina nas menores concentrações e uma diminuição nas concentrações maiores. Estes resultados estavam de acordo com a literatura, na qual ATP<sub>0</sub> age como um mitógeno através da ativação de receptor P2.

Após experimentos com incorporação de timidina resolvemos verificar se a viabilidade celular estaria sendo afetada no tratamento com nucleotídeos extracelulares. Foi observado nos experimentos de viabilidade que, ao contrário do observado nos experimentos com incorporação de <sup>3</sup>H-timidina, as linhagens K562, Lucena e FEPS diminuíram a sua viabilidade quando tratadas com ATP<sub>0</sub>. A morte observada foi dose dependente nas três linhagens tratadas e o resultado está de acordo com a contagem celular feita em microscópio óptico (dados não mostrados).

A partir desses dados, podemos inferir que o aumento de <sup>3</sup>H-timidina encontrado nas células tratadas nas concentrações de 1 e 2,5mM de ATP<sub>0</sub> e UTP<sub>0</sub> somente reflete uma tentativa de reparo de danos no DNA, o que também pode levar a uma maior incorporação de <sup>3</sup>H-timidina, embora não haja um aumento na proliferação celular.

Para verificar se a indução de morte celular poderia ser através do receptor P2X<sub>7</sub>, foi utilizado um agonista de ATP, BzATP, que, quando ativado, é capaz de abrir um poro na

membrana e permitir que ocorram mudanças na permeabilidade celular, trocando cátions monovalentes e divalentes. ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$ ) (DI VIRGILLIO e col.,2001).

Foi observado que na concentração de 1mM de BzATP ocorreu morte celular semelhante à observada na maior concentração de  $\text{ATP}_0$  (5mM–Controle). Este resultado poderia sugerir que o receptor  $\text{P2X}_7$  estaria atuando nesse processo de morte celular, nas linhagens K562 e Lucena 1. Para verificar se, de fato, os receptores  $\text{P2X}_7$  estariam exercendo papel importante na morte induzida por  $\text{ATP}_0$ , fizemos uso de um bloqueador do receptor  $\text{P2X}_7$ , KN62, descrito anteriormente na literatura como inibidor dos efeitos citotóxicos promovidos pelo  $\text{ATP}_0$ . Os resultados mostraram que não houve diferença na sobrevivência celular nas células tratadas previamente com KN62, o que nos leva a deduzir que talvez os receptores  $\text{P2X}_7$  não estariam envolvidos na morte celular induzida por nucleotídeos nas linhagens K562 e Lucena 1. Posteriormente, em colaboração com outros pesquisadores, verificamos, que  $\text{P2X}_7$  não era detectado por Western Blotting nessas células (ARTIGO EM ANEXO)

Como dito anteriormente, a relação da expressão de ecto-ATPases de membrana e Pgp já foi descrita há algum tempo por outros autores (UJHAZY e col., 1994). A partir desses resultados, fomos analisar se os subprodutos derivados da hidrólise do ATP, promovida pelas ecto-ATPases, poderiam estar influenciando diretamente na morte celular e avaliamos também se de alguma forma os efeitos desses produtos poderiam estar afetando o fenótipo MDR. Para termos certeza de que os efeitos seriam exclusivos dos subprodutos da hidrólise do ATP, utilizamos em nossos experimentos apirase, uma substância capaz de hidrolisar ATP, eliminando  $\text{ATP}_0$  do meio.

Os resultados obtidos mostraram que apirase não inibiu o efeito de  $\text{ATP}_0$  em células K562 e Lucena. Dessa forma, em virtude de na presença de apirase o  $\text{ATP}_0$  estar degradado,

fica claro que a indução de morte celular por ATP<sub>0</sub> nas linhagens K562, Lucena 1 e FEPS é devida aos produtos da hidrólise de ATP<sub>0</sub> ou UTP<sub>0</sub>.

Dentre os produtos gerados pela hidrólise do ATP<sub>0</sub>, podemos destacar a adenosina, em virtude desta estar envolvida em vários processos de sinalização celular (SAITOH e col., 2004). No trabalho atual, verificamos que adenosina induz, na concentração de 1mM, da mesma maneira que o ATP<sub>0</sub>, um aumento de incorporação de <sup>3</sup>H-timidina e também a uma diminuição na viabilidade celular das linhagens K562 e Lucena 1.

Quando se comparou a viabilidade das linhagens MDR, Lucena 1 e FEPS na presença de adenosina foi possível verificar uma tendência de maior resistência da linhagem FEPS para este nucleosídeo.

Dados da literatura revelaram que células que superexpressam Pgp, bem como células expostas à daunorrubicina, possuem um aumento na expressão de ecto-5' nucleotidase (CD73), enzima que hidrolisa ATP e gera produtos como a própria adenosina (UJHAZY e col., 1994). Como a linhagem FEPS possui níveis de expressão de Pgp muito maiores do que a linhagem Lucena 1, é possível que a linhagem FEPS apresente maior expressão de 5' nucleotidase, o que devemos analisar no futuro.

Para avaliar se a referida morte celular nas linhagens K562 e Lucena 1 seria via indução de apoptose, fizemos um experimento para medir externalização de fosfatidil serina, já que concentrações milimolares de adenosina são capazes de levar à morte celular por apoptose em outros tipos celulares (SAITOH e col., 2004). Para isso, utilizamos no experimento ATP<sub>0</sub>, adenosina e UTP. Os resultados confirmaram o que foi visto na viabilidade celular, todas as 3 substâncias induziram um aumento da exposição de fosfatidil serina, ou seja, ocorreu um aumento de células apoptóticas. Cerca de 30% das células K562 tratadas com ATP<sub>0</sub> tiveram marcação para fosfatidil serina na menor concentração testada (1mM). Já nas células Lucena 1, a mesma concentração induziu apoptose em cerca de 15% da

população. No entanto, a mesma concentração de adenosina praticamente não induziu apoptose em ambas as linhagens. Esse resultado sugere que não seria somente a adenosina a responsável pela indução de morte induzida por nucleotídeos extracelulares, mas algum outro produto da hidrólise do ATP<sub>0</sub>. No entanto, seria necessário investigar qual outro subproduto da hidrólise de ATP poderia estar afetando esse processo.

Na linhagem FEPS um percentual muito baixo apresentou apoptose com 1mM de adenosina e uma apoptose semelhante a vista em K562 e Lucena1 foi observada com 5mM, sugerindo uma resistência a baixas concentrações deste nucleosídeo.

Seleção e caracterização das linhagens *in vitro* de células resistentes a múltiplas drogas é um modelo mais próximo do que é observado em pacientes, para o estudo do fenótipo MDR. O estudo de nucleotídeos e seus produtos na indução de morte em células tumorais é uma área nova ainda muito pouco estudada. Uma definição mais precisa de qual produto do ATP seria o mais eficaz em produzir a morte celular é um importante passo na utilização de nucleotídeos para um futuro uso no tratamento local dos tumores em casos onde a quimioterapia não seja eficaz devido ao fenótipo MDR.

A reversão do fenótipo MDR ou sua utilização como uma abordagem terapêutica precisam ser exploradas na clínica para o tratamento de tumores. Para tal, é extremamente necessário o desenvolvimento de linhagens celulares bem caracterizadas, especialmente as originadas de uma linhagem sensível comum para servir de modelo comparativo. Neste contexto, o desenvolvimento da linhagem FEPS se encaixa como um novo instrumento de estudo, apresentando não apenas uma, mas pelo menos duas proteínas relacionadas com o fenótipo (Pgp e MRP1), sendo uma ferramenta poderosa para o desenvolvimento de terapias com habilidade de burlar o fenótipo MDR.



## **6. Conclusão**

Baseado nos nossos experimentos chegamos às seguintes conclusões:

- O processo de seleção celular foi realizado com sucesso, a célula não sofreu processo de diferenciação e a linhagem FEPS é capaz de ser mantida na presença de 500ng/ml DNR.
- Ensaio de viabilidade celular mostrou que a linhagem FEPS é capaz de resistir a 60nM de VCR e 933nM de DNR, sendo classificada como uma linhagem resistente a múltiplas drogas.
- O mecanismo de resistência parece ser dependente de transportadores ABC visto que: a linhagem FEPS expressa as proteínas ABCB1(Pgp) e ABCC1(MRP); ambas possuem atividade e foram revertidas com seus moduladores específicos; a atividade promovida pela ABCB1 foi parcialmente modulada por VP 5 $\mu$ M e CSA 1000ng/ml e a atividade da proteína ABCC1(MRP) foi modulada com INDO300 $\mu$ M e PRB 2,5 $\mu$ M.
- Não foram verificadas diferenças em relação à expressão da proteína Bcl-2 entre as linhagens FEPS e K562.
- Não foram encontradas diferenças na expressão de p53 nas linhagens K562, Lucena e FEPS.
- Todas as três linhagens são sensíveis ao efeito do ATP<sub>0</sub> em todas as concentrações testadas e este efeito parece ser independente do receptor P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> pelo menos nas linhagens K562 e Lucena 1.
- É provável que pelo menos parte do efeito citotóxico observado seja resultado de produtos de degradação do ATP, visto que adenosina foi tóxica para as 3 linhagens.
- Os tratamentos com ATP, UTP e adenosina, induziram morte celular via apoptose sendo que a adenosina só começa a ser tóxica na dose de 2,5mM.

- A regulação de mecanismos de resistência precisa ser melhor conhecida e para isso são necessárias linhagens bem caracterizadas, preferencialmente originadas de uma linhagem sensível comum. A utilização de ATP e adenosina nesta regulação é uma nova abordagem que necessita ser melhor explorada.

## **7. Referências**

Abraham EH, Shrivastav B, Salikhova AY, Sterling KM, Johnston N, Guidotti G, Scala S, Litman T, Chan KC, Arceci RJ, Steiglitiz K, Herscher L, Okunieff P. Cellular and biophysical evidence for interactions between adenosine triphosphate and P-glycoprotein substrates: functional implications for adenosine triphosphate/drug cotransport in P-glycoprotein overexpressing tumor cells and in P-glycoprotein low-level expressing erythrocytes. *Blood Cells Mol Dis.* 2001;27:181-200.

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998; 281:1322-6.

Adrian K, Bernhard MK, Breitinger HG, Ogilvie A. Expression of purinergic receptors (ionotropic P2X1-7 and metabotropic P2Y1-11) during myeloid differentiation of HL60 cells. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1492:127-38.

Al-Awqati O. Regulation of ion channels by ABC transporters that secrete ATP. *Science.* 1995;269:805-6.

Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* 1998; 58: 5337-9.

Almeida VL, Lopes MTP, Leitão A, Reina BC, Del LM, Alberto C, Donnici LC. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. *Quim. Nova.* 2005; 28:118-129.

Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:361-98.

Augustine LM, Markelewicz RJ, Boekelheide K, Cherrington NJ. Xenobiotic and endobiotic transporter mRNA expression in the blood-testis barrier. *Drug Metab Dispos.* 2005; 33:182-9.

Azzaria M, Schurr E, Gros P. Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Mol Cell Biol.* 1989;9:5289-97.

Bernardo AA, Pinto-Silva FE, Persechini PM, Coutinho-Silva R, Meyer-Fernandes JR, de Souza AL, Rumjanek VM. Effect of extracellular ATP on the human leukaemic cell line K562 and its multidrug counterpart. *Mol Cell Biochem.* 2006; 289:111-24.

Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:1295-302.

Boumendjel A, Baubichon-Cortay H, Trompier D, Perrotton T, Di Pietro A. Anticancer multidrug resistance mediated by MRP1: recent advances in the discovery of reversal agents. *Med Res Rev.* 2005; 25:453-72.

Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev.* 2007; 87:659-797.

- Burnstock G. Purine and Pyrimidine Receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64:1471-83.
- Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions P2 receptor subtypes in different systems. *International Review of Cytology.* 2004;240:31-304.
- Calabresi P, Chabner BA. Quimioterapia de doenças neoplásicas. Em Goodman LS, Gilman A., M Graw Hill: As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro, 1995. p.903-949, 8<sup>a</sup>. ed.
- Callaghan R, Higgins CF. Interaction of tamoxifen with the multidrug resistance P-glycoprotein. *Br J Cancer.* 1995;71(2):294-9.
- Callen DF, Bacher E, Simmers RN, Seshadri R, Roninson IB . Localization of the human multiple drug resistance gene, Mdr1, To 7q21.1. *Hum Genet.* 1987;77:142-4.
- Chaudhary PM, Roninson IB, expression and activity of P-Glycoprotein, a multidrug efflux pump in human hematopoietic stem cells. *Cell* 1991; 66: 85-94.
- Chen CJ, Chin JE, Choi K, Gros P, Housman D. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-Glycoprotein) gene from multidrug-resistant Human Cells. *Cell.* 1986;47:381-389.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science.* 1992;258:1650-4.
- Dano K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta.* 1973;323:466-83.
- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 2001;11(7):1156-66.
- Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood.* 2001; 97:587-600.
- Di Virgilio F. Purinergic mechanism in the immune system: a signal of danger for dendritic cells. *Purinergic signaling.* 2005;1:205-209.
- Drach D, Zhao S, Drach J, Mahadevia R, Gatringer C, Huber H, Andreeff M. Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistant phenotype. *Blood.* 1992;80:2729-34.
- Draper MP, Martell RL, Levy SB. Indomethacin-mediated reversal of Indomethacin-mediated reversal of multidrug resistance and drug efflux in human and murine cell lines overexpressing MRP, but not P-glycoprotein. *Br J Cancer.* 1997;75:810-5.
- Echevarria-Lima J, Kyle-Cezar F, P Leite DF, Capella L, Capella MA, Rumjanek VM. Expression and activity of multidrug resistance protein 1 in a murine thymoma cell line. *Immunology.* 2005;114(4):468-75.

Echevarria-Lima J, Rumjanek VM, Kyle-Cezar F, Harab RC, Leite DFP, dos Santos Ornellas D, Moralles MM, Araujo AQ, Andrada-Serpa MJ. HTLV-I alters the multidrug resistance associated protein 1 (ABCC1/MRP1) expression and activity in human T cells *J Neuroimmunol.* 2007;185:175-81.

Farrell RJ, Murphy A, Long A, Donnelly S, Chirikuri A, O'Toole D, Mahmud N, Keeling PW, Weir DG, Kelleher D. High multidrug resistance (P-glycoprotein 170) expression in inflammatory bowel disease patients who fail medical therapy. *Gastroenterology.* 2000. 118(2):279-88.

Fernandez SB, Hollo Z, Kern A, Bakos E, Fischer PA, Borst P, Evers R. Role of the N-Terminal transmembrane region of the Multidrug Resistance Protein MRP2 in routing to the apical membrane in MDCK II cells. *J Biol Chem.* 2002; 277(34):31048-55.

Flens MJ, Izquierdo MA, Scheffer GL, Fritz JM, Meijer CJ, Scheper RJ, Zaman GJ. Immunochemical detection of the multidrug resistance-associated protein MRP in human multidrug-resistant tumor cells by monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 1994;54(17):4557-63.

Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, van der Groep P, de Haas M, Meijer CJ, Scheper RJ. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am J Pathol.* 1996;148(4):1237-47.

Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84: 265-9.

Ford JM, Hait WN. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev.* 1990; 42:155-199.

Frolov A, Chahwan S, Ochs M, Arnoletti JP, Pan ZZ, Favorova O, Fletcher J, von Mehren M, Eisenberg B, Godwin AK. Response markers and the molecular mechanisms of action of Gleevec in gastrointestinal stromal tumors. *Mol Cancer Ther.* 2003; 2(8):699-709.

Gale RP, Butturini A. Leukemia: stem cells, preleukemia and cure. *Leukemia.* 1992; 6:80-5.

Gerlach JH, Endicott JA, Juranka PF, Henderson G, Sarangi F, Deuchars KL, Ling V. Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature.* 1986;324:485-489.

Gollapudi S, Kim CH, Tran BN, Sangha S, Gupta S. Probenecid reverses multidrug resistance in multidrug resistance-associated protein-overexpressing HL60/AR and H69/AR cells but not in P-glycoprotein-overexpressing HL60/Tax and P388/ADR cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1997;40(2):150-8.

Gothel SF, Marahiel MA – Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life.* 1999; 55:423-36.

Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu.Rev Biochem.* 1993;62:385-427.

Goudeau H, Goudeau M. Voltage dependence of the  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations system, in the  $Mg^{2+}$ -stimulated oocyte of the prawn *Palaemon serratus*. *Cell Calcium*. 2001;29:97-109.

Granstein RD. The skinny on CD39 in immunity and inflammation. *Nat Med*. 2002;8:336-8.

Gros P, Raymond M, Bell J, Housman D. Cloning and characterization of a second member of the mouse *mdr* gene family. *Mol Cell Biol*. 1988;8:2770-8

Hennessy M, Spiers JP. A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter. *Pharmacol Res*. 2007;55:1-15.

Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*. 1992;8:67-113.

INCA Instituto Nacional do Câncer. Estimativa de câncer no Brasil 2006 <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/>

Jones K, Hoggard PG, Sales SD, Khoo S, Davey R, Back DJ. Differences in the intracellular accumulation of HIV protease inhibitors in vitro and the effect of active transport. *AIDS*. 2001;15(6):675-81.

Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*. 1976;455:152-62.

Kaczmarek E, Koziak K, Sevigny J, Siegel JB, Anrather J, Beaudoin AR, Bach FH, Robson SC. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J Biol Chem*. 1996;271:33116-22.

Karwatsky J, Lincoln MC, Georges E. A mechanism for P-glycoprotein-mediated apoptosis as revealed by verapamil hypersensitivity. *Biochemistry*. 2003;42:12163-73.

Krishnamachary N, Center MS. The MRP gene associated with a non-P-glycoprotein multidrug resistance encodes a 190-kDa membrane bound glycoprotein. *Cancer Res*. 1993;53:3658-61.

Krishnamurthy P, Schuetz JD. The ABC transporter *Abcg2/Bcrp*: role in hypoxia mediated survival. *Biometals*. 2005;18:349-58.

Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*. 1988;319:990-8.

Kyle-Cezar F, Echevarria-Lima J, dos Santos Goldenberg RC, Rumjanek VM. Expression of c-kit and Sca-1 and their relationship with multidrug resistance protein 1 in mouse bone marrow mononuclear cells. *Immunology*. 2007;121:122-8.

Ledoux S, Leroy C, Siegfried G, Prie D, Moullier P, Friedlander G. Overexpression of ecto-5'-nucleotidase promotes P-glycoprotein expression in renal epithelial cells. *Kidney Int*. 1997; 52:953-61.



Legrand O, Perrot JY, Tang R, Simonin G, Gurbuxani S, Zittoun R, Marie JP. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) mRNA and protein in normal peripheral blood and bone marrow haemopoietic cells. *Br J Haematol.* 1996;94:23-33.

Leite DF, Echevarria-Lima J, Salgado LT, Capella MA, Calixto JB, Rumjanek VM. In vivo and in vitro modulation of MDR molecules in murine thymocytes. *Int Immunopharmacol.* 2006;6:204-15

Leite DF, Echevarria-Lima J, Calixto JB, Rumjanek VM. Multidrug resistance related protein (ABCC1) and its role on nitrite production by the murine macrophage cell line RAW264.7. *Biochem Pharmacol.* 2007;73:665-74.

Legrand O, Simonin G, Beauchamp-Nicoud A, Zittoun R, Marie JP. Simultaneous activity of MRP1 and Pgp is correlated with in vitro resistance to daunorubicin and with in vivo resistance in adult acute myeloid leukemia. *Blood.* 1999;94:1046-56.

Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 204:216-37.

Litman T, Brangi M, Hudson E, Fetsch P, Abati A, Ross DD, Miyake K, Resau JH, Bates SE. The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci.* 2000;113:2011-21.

Loo TW, Clarke DM. Merck Frosst Award Lecture 1998. Molecular dissection of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Biochem Cell Biol.* 1999;77:11-23.

Lothstein L, Israel M, Sweatman TW. Anthracycline drug targeting: cytoplasmic versus nuclear--a fork in the road. *Drug Resist Updat.* 2001; 4:169-77.

Lozzio BB, Lozzio CB, Bamberger EG, Feliu AS. A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1981; 166:546-50.

Mao Q, Unadkat JD. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS J.* 2005;7:E118-33.

Maraldi NM, Zini N, Santi S, Scotlandi K, Serra M, Baldini N. P-glycoprotein subcellular localization and cell morphotype in MDR1 gene-transfected human osteosarcoma cells. *Biol Cell.* 1999;91:17-28.

Marques-Santos LF, Bernardo RR, de Paula EF, Rumjanek VM. Cyclosporin A and trifluoperazine, two resistance-modulating agents, increase ivermectin neurotoxicity in mice. *Pharmacol Toxicol.* 1999 Mar;84(3):125-9.

Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, Bates SE. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* 1999;59:8-13.

- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.
- Neyfakh AA. Use of fluorescent dyes as molecular probes for the study of multidrug resistance. *Exp Cell Res*. 1988;174:168-76.
- Nielsen D, Maare C, Skovsgaard T. Cellular resistance to anthracyclines. *Gen Pharmacol*. 1996; 27: 251-5.
- Nooter K, Westerman AM, Flens MJ, Zaman GJ, Scheper RJ, van Wingerden KE, Burger H, Oostrum R, Boersma T, Sonneveld P, et al. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human cancers. *Clin Cancer Res*. 1995 ;1:1301-10.
- Nuessler V, Stötzer O, Gullis E, Pelka-Fleischer R, Pogrebniak A, Gieseler F, Wilmanns W. Bcl-2, bax and bcl-xL expression in human sensitive and resistant leukemia cell lines. *Leukemia*. 1999;13:1864-72.
- Omote H, Al-Shawi MK. Interaction of transported drugs with the lipid bilayer and P-glycoprotein through a solvation exchange mechanism. *Biophys J*. 2006;90:4046-59.
- Pastan I, Gottesman MM. Multidrug Resistance. *Annu Rev Med*. 1991;42:277-86.
- Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P, Oude Elferink RP. Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science*. 1996;271:1126-8.
- Peterson RH, O'Neil JA, Biedler JL. Some biochemical properties of Chinese hamster cells sensitive and resistant to actinomycin D. *J Cell Biol*. 1974 Dec;63(3):773-9.
- Pétriz J, Garcia-Lopez J. Flow cytometric analysis of P-Glycoprotein Function Using Rhodamine123. *Leukemia* 1977; 11:1124-1130
- Riddle RC, Taylor AF, Rogers JR, Donahue HJ. ATP release mediates fluid flow-induced proliferation of human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*. 2007;22:589-600.
- Riehm H, Biedler JL. Cellular resistance to daunomycin in Chinese hamster cells in vitro. *Cancer Res*. 1971;31:409-12.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989 Sep 8;245(4922):1066-73
- Robey RW, Medina-Perez WY, Nishiyama K, Lahusen T, Miyake K, Litman T, Senderowicz AM, Ross DD, Bates SE. Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (Mxr/BCrp/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2001 Jan;7(1):145-52.
- Rogan AM, Hamilton TC, Young RC, Klecker RW Jr, Ozols RF. Reversal of adriamycin resistance by verapamil in human ovarian cancer. *Science*. 1984;224:994-6.

Rosenbaum C, Rohrs S, Muller O, Waldmann H. Modulation of MRP-1-mediated multidrug resistance by indomethacin analogues. *J Med Chem.* 2005;48:1179-87.

Rosenberg MF, Callaghan R, Ford RC, Higgins CF. Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *J Biol Chem.* 1997;272:10685-94.

Ross DD, Karp JE, Chen TT, Doyle LA. Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia. *Blood.* 2000;96:365-8.

Rumjanek VM, Trindade GS, Wagner-Souza K, de-Oliveira MC, Marques-Santos LF, Maia RC, Capella MA. Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. *An Acad Bras Cienc.* 2001;73:57-69.

Rumjanek VM, Lucena M, Campos M, Maia R. Multidrug resistance in leukemias: the problem and some approaches to its circumvention. *Research in Oncology.* 1994;46:63-8.

Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Deneffe P, Assmann G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet.* 1999;22:352-5.

Saad-Nehme J, Bezerra AL, Fornells LA, Silva JL, Meyer-Fernandes JR. A contribution of the mitochondrial adenosinetriphosphatase inhibitor protein to the thermal stability of the FOF1-ATPase complex. *Z Naturforsch [C].* 1997;52:459-65.

Saitoh M, Nagai K, Nakagawa K, Yamamura T, Yamamoto S, Nishizaki T. Adenosine induces apoptosis in the human gastric cancer cells via an intrinsic pathway relevant to activation of AMP-activated protein kinase. *Biochem Pharmacol.* 2004;67:2005-11.

Sanches G, de Alencar LS, Ventura AL. ATP induces proliferation of retinal cells in culture via activation of PKC and extracellular signal-regulated kinase cascade. *Int J Dev Neurosci.* 2002;20:21-7.

Seelig A. A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur J Biochem.* 1998;251:252-61.

Shi Z, Liang YJ, Chen ZS, Wang XH, Ding Y, Chen LM, Fu LW. Overexpression of Survivin and XIAP in MDR cancer cells unrelated to P-glycoprotein. *Oncol Rep.* 2007;17:969-76

Slapak CA, Mizunuma N, Kufe DW. Expression of the multidrug resistance associated protein and P-glycoprotein in doxorubicin-selected human myeloid leukemia cells. *Blood.* 1994;84:3113-21.

Slater LM, Sweet P, Stupecky M, Wetzel MW, Gupta S. Cyclosporin A corrects daunorubicin resistance in Ehrlich ascites carcinoma. *Br J Cancer.* 1986; 54:235-8.

Stefkova J, Poledne R, Hubacek JA. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res.* 2004;53:235-43

Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:219-34

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:7735-8.

Trindade GS, Capella MA, Capella LS, Affonso-Mitidieri OR, Rumjanek VM. Differences in sensitivity to UVC, UVB and UVA radiation of a multidrug-resistant cell line overexpressing P-glycoprotein. *Photochem Photobiol*. 1999;69:694-9

Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res*. 1981 May;41:1967-72.

Tsuruo T, Iida H, Ohkochi E, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Establishment and properties of vincristine-resistant human myelogenous leukemia K562. *Gann*. 1983;74:751-8.

Ujhazy P, Klobusicka M, Babusikova O, Strausbauch P, Mihich E, Ehrke MJ. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) in multidrug-resistant cell lines generated by doxorubicin. *Int J Cancer*. 1994 Oct 1;59(1):83-93.

Van der Kolk DM, De Vries EG, Koning JA, Van den Berg E, Muller M, Vellenga E. Activity and expression of the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 in acute myeloid leukemia cells, tumor cell lines, and normal hematopoietic CD341 peripheral blood cells. *Clin Cancer Res*. 1998; 4:1727-36.

Van der Pol MA, Broxterman HJ, Pater JM, Feller N, van der Maas M, Weijers GW, Scheffer GL, Allen JD, Scheper RJ, van Loevezijn A, Ossenkoppele GJ, Schuurhuis GJ. Function of the ABC transporters, P-glycoprotein, multidrug resistance protein and breast cancer resistance protein, in minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2003;88:134-47.

Vasconcelos FC, Cavalcanti GB Jr, Silva KL, de Meis E, Kwee JK, Rumjanek VM, Maia RC. Contrasting features of MDR phenotype in leukemias by using two fluorochromes: implications for clinical practice. *Leuk Res*. 2007;31:445-54.

Versantvoort CH, Bagrij T, Wright KA, Twentyman PR. On the relationship between the probenecid-sensitive transport of daunorubicin or calcein and the glutathione status of cells overexpressing the multidrug resistance-associated protein (MRP). *Int J Cancer*. 1995;63:855-62.

Wagner-Souza K, Echevarria-Lima J, Rodrigues LA, Reis M, Rumjanek VM. Resistance to thapsigargin-induced intracellular calcium mobilization in a multidrug resistant tumour cell line. *Mol Cell Biochem*. 2003;252:109-16.

Yunes ND. Expressão da Glicoproteína-P relacionada ao ciclo celular em células leucêmicas. Rio de Janeiro, 2007. 72f Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade Médica). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med.* 2001;7:1028-34.

Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000;362:299-309.

## **8. Anexo**

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)