

**JOÃO MARCOS DE AZEVEDO DELOU**

INTERAÇÃO ENTRE ANGIOTENSINA, LOSARTANA  
E DOXORRUBICINA: POSSÍVEL USO NA  
QUIMIOTERAPIA DO CÂNCER

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (FISIOLOGIA)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

JOÃO MARCOS DE AZEVEDO DELOU

INTERAÇÃO ENTRE ANGIOTENSINA II, LOSARTANA E DOXORRUBICINA:  
POSSÍVEL USO NA QUIMIOTERAPIA DO CÂNCER

VOLUME ÚNICO

**Dissertação submetida ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ visando à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas – Fisiologia.**

UFRJ – Mestrado em Ciências  
Biológicas – Fisiologia

Orientadora: Márcia Alves Marques Capella  
Doutor

IBCCF  
2008

## FICHA CATALOGRÁFICA

Delou, João Marcos de Azevedo  
Interação entre Angiotensina II, Losartana e Doxorubicina:  
possível uso na quimioterapia do câncer / João Marcos de  
Azevedo Delou. – Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2008.  
xiii, 110 f. : il. ; 29,7 cm.

Orientador: Márcia Alves Marques Capella  
Dissertação (mestrado) – UFRJ, IBCCF, 2008.

Ref. Bibliográficas: f. 96-110.

1. Cancer. 2. Hipertensão. 3. Interação medicamentosa.  
4. Doxorubicina 5. Angiotensina II. 6. Losartana. 7. Resistência  
a múltiplas drogas. I. Capella, Márcia Alves Marques II.  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF. III. Título.

**À MINHA FAMÍLIA**

## AGRADECIMENTOS

A educação é o bem mais precioso da vida. Devemo-la, especialmente, aos pais, mas também aos professores, mestres, amigos, parentes, irmãos, tios, tias, avôs, avós e freqüentemente, a alguma religião também. Entretanto, a influência dos pais na educação dos filhos e o poder dos seus exemplos são, inquestionavelmente, marcantes, mesmo quando este exemplo é o da ausência. Disto, não posso me queixar. Filho de pais corujas, tive o privilégio, e a responsabilidade, de ser instruído e amado. Apesar de não ser muito emotivo em família, jamais serei grato o bastante quanto à educação, ao carinho, ao cuidado e à ética moral que recebi das palavras e exemplos de pais dedicados. Enquanto não posso retribuir, humildemente agradeço e espero o momento adequado de demonstrar esta gratidão através de atos, pois mais do que aquilo que falamos, somos o que fazemos.

Como não poderia deixar de ser, se grato sou aos meus pais, não posso esquecer daqueles que foram os responsáveis maiores pelos pais que tenho. Alcides, Célia, Edith e Mario (em ordem alfabética), obrigado. Que minhas preces sejam maiores que minhas palavras. Saibam que, de mim, tendes o reconhecimento e o respeito pelo que são e foram na Terra, pois não há lembrança mais forte que a do bom exemplo durante a infância e, disso, tive muitos, e de todos. Fiquem com Deus. Aqui ou onde estiverem.

Diante das novas perspectivas de vida, novos desafios surgem. Pequenas promessas tornam-se compromissos, renovados a cada dia. Discussões são oportunidades de aprendizado para um convívio duradouro. Aquela que, inicialmente, parecia tímida, difícil de ser conquistada, tornou-se namorada sincera e, recentemente, futura noiva. Que, apesar do tempo, não percamos a singela doçura e sinceridade do sentimento que mantém os eternos enamorados. Sabes que te amo. Disto, não duvides. Mas, quando cansardes de mim, esquece-me por alguns instantes e lembra-te daquele rapaz que conheceste te conquistaste, e ao olhar-

me, tu o verás escondido, em meio a uma neblina de preocupações e esquecimentos e envolto numa turba de compromissos e ansiedades dos quais salvar-me-ás apenas com teu sorriso.

Durante qualquer processo de aprendizado, é natural encontrarmos professores brilhantes. A estes, nutrimos mais do que a pura admiração profissional, e freqüentemente, o carinho e admiração se confundem nas conversas informais, mas que não devemos perder o senso de quem é que ensina. Em uma atualidade em que a banalização da figura do Professor é patente, alguns heróis e heroínas se mantêm fiéis ao dever de instruir, ao prazer de ensinar e a caridade de educar.

Dentre os que conheci, não poderia deixar de prestar homenagens à Vivian Rumjanek, à Denise Pires, ao Gilbesrto Weissmüller, ao Newton de Castro, à Irina Serova, à Márcia Capella, ao Inácio Silva-Neto e a Letícia, à Regina Goldenberg, ao Pedro Pascutti, ao Fernando Costa e Silva, enfim a todos que, em algum momento, me receberam em seus laboratórios ou disciplinas, como estagiário e/ou como aluno, mas que, sobretudo, me ensinaram um pouco sobre o que é ser cientista.

Dentre os mestres, então, não há maior do que o orientador. Aquele que nos vê e nos acompanha todos os dias, bons e ruins. Sabe dos nossos pontos fortes e tenta fortalecer os fracos. Cada aluno tem um tipo de orientador, eu tive uma que sabe a hora de me deixar caminhar por passos próprios, mas que supervisiona para que não me perca no meio da minha própria dispersão. Em relação aos meus pontos fracos, é imperativo aprender a ser organizado, disciplinado e objetivo. Aí estão meus objetivos como aluno pelos próximos quatro anos. Espero escolher os métodos adequados e atingir os resultados esperados, mas não posso ser cobrador cruel, pois o desânimo é inimigo freqüente na longa estrada até o tão aguardado emprego de Professor/Pesquisador. A desesperança impede o vislumbre dos novos horizontes a serem desbravados e enfraquece os sonhos em construção.

Felizmente, sempre há amigos a nos renovarem o ânimo. Amigos de escola, de faculdade, de lida, de religião, de crises e etc. Poupo nomes para não cometer injustiças. É triste lembrar dos amigos que se foram. É bom ver o sucesso de amigos outros e, melhor ainda, participar de alguma forma. Infelizmente, durante o mestrado não tive muitas oportunidades de valorizar os amigos, e vendo o exemplo dos colegas, percebo quão raras são as oportunidades de rever àqueles a quem dedicamos nossos votos de sucesso e preces. Espero que, um dia, a fraternidade permita que não haja mais a diferença entre colega e amigo, mas, por enquanto, amigos ainda são um dos mais valiosos tesouros da vida.

Cada pessoa possui, de acordo com a sua história de vida, a sua fé. Alguns na ciência, outros na religião e há aqueles que tentam encontrar um equilíbrio entre ambas. A minha história é ligada a Ciência, a Filosofia e a Religião Espírita, e mesmo que alguns digam que a ciência é materialista, a história possui inúmeros cientistas espíritas, dos quais destaco Sir William Crookes. Não é impossível ser cientista religioso, nem ser Monoteísta e ao mesmo tempo contra o Design Inteligente, é preciso distinguir fé, de explicação e de política. Não podemos justificar fenômenos através do místico e incontrolável, mas se é verdade que os espíritos existem, então, há de até mesmo as pedras falarem. Ainda não compreendo suficientemente bem o meu Deus ao ponto de explicá-lo em poucas linhas, mas sei que ele há, e isso tem me bastado. Por isso, obrigado.

Finalmente, àqueles que lerem este trabalho, obrigado pela atenção.

Ósculos e amplexos.

## RESUMO

DELOU, João Marcos de Azevedo. **Interação entre angiotensina II, losartana e doxorubicina: possível uso na quimioterapia do câncer.** Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Câncer e hipertensão são duas doenças de alta prevalência, mortalidade e custo do tratamento. Estudos anteriores sugerem que a angiotensina II (ANG), o principal hormônio associado à hipertensão, seja um importante agente mitogênico e que a losartana potássica (LOS), um antagonista do receptor de ANG (AT1), reverta este efeito. Nosso objetivo foi investigar possíveis relações entre a quimioterapia do câncer de mama concomitante ao uso de anti-hipertensivos em um modelo de células de câncer de mama humano, MCF-7. Tanto a contagem de células em câmara de Neubauer quanto o ensaio de MTT mostraram efeito proliferativo de ANG, revertido por LOS, confirmando dados da literatura (CTR  $4,1 \pm 1,5$ ; ANG  $7,4 \pm 2,4$ ; "LOS+ANG"  $2,8 \pm 1,7$ ,  $p < 0,05$ ). Além disso, observamos que LOS potencializou o efeito citotóxico da doxorubicina (DOX), somente em presença de ANG (DOX  $1,4 \pm 0,7$ ; "DOX+ANG"  $1,1 \pm 0,37$ ; "DOX+LOS+ANG"  $0,11 \pm 0,05$ ,  $p < 0,05$ ). A microscopia óptica mostrou marcado efeito sobre a morfologia e o número de células, confirmando esses resultados. Experimentos de acúmulo de DOX por citometria de fluxo mostraram aumento do percentual de células com alto acúmulo de DOX na presença de "LOS+ANG" (DOX  $50,5 \pm 0,5$ ; "DOX+LOS+ANG"  $38,6 \pm 2,1$ ,  $p < 0,01$ ). Ensaio de expressão dos transportadores de efluxo da doxorubicina não apresentaram alterações na expressão destes transportadores. Nossos resultados revelaram uma importante interação entre a medicação antitumoral e anti-hipertensiva, que ocorreu somente na presença de ANG. Os efeitos de LOS combinados a DOX sugerem um possível uso adjuvante de medicamentos anti-hipertensivos na quimioterapia do câncer. Entretanto, ainda não sabemos se essa interação ocorre em células não tumorais e, portanto, desconhecemos os possíveis efeitos indesejados da associação destes medicamentos. Assim, o uso de LOS para o tratamento da hipertensão em pacientes de câncer de mama deve ser avaliado com cautela, devido a um possível aumento de toxicidade. Pretendemos continuar investigando os mecanismos moleculares desta interação medicamentosa, assim como avaliar os efeitos do uso concomitante de anti-hipertensivos durante o tratamento quimioterápico do câncer de mama em seres humanos.

Financiamento: FAPERJ, CNPq, Programa de Oncobiologia – FAF/ONCO II.

## ABSTRACT

DELOU, João Marcos de Azevedo. **Interaction among angiotensin II, losartan and doxorubicin: possible use in cancer chemotherapy.** Rio de Janeiro, 2008. Dissertation (Master of Sciences in Biology - Physiology) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Cancer and hypertension are two diseases of high prevalence, mortality and cost of treatment. Previous studies suggested that angiotensin II (ANG), the main hormone associated with hypertension, is an important mitogenic agent and that losartan (LOS), an antagonist of the ANG receptor (AT1), reverses this effect. Our objective was to investigate a possible relationship between breast cancer chemotherapy and anti-hypertensive treatment in a cellular model of human breast cancer, MCF-7. The proliferative activity of ANG, reversed by LOS, was observed using the MTT assay and counting the cells in a Neubauer hemocytometer, confirming data from literature (CTR  $4,1 \pm 1,5$ ; ANG  $7,4 \pm 2,4$ ; "LOS+ANG"  $2,8 \pm 1,7$ ,  $p < 0,05$ ). Moreover, we have observed that LOS increased the cytotoxic effect of doxorubicine (DOX), but only in the presence of ANG (DOX  $1,4 \pm 0,7$ ; "DOX+ANG"  $1,1 \pm 0,37$ , "DOX+LOS+ANG"  $0,11 \pm 0,05$ ,  $p < 0,05$ ). Optic microscopy showed marked effects on cell morphology and number, confirming these results. Flow cytometry experiments showed an increase in the percentage of cells with high accumulation of DOX in the presence of "LOS+ANG" (DOX  $50,5 \pm 0,5$ ; "DOX+LOS+ANG"  $38,6 \pm 2,1$ ,  $p < 0,01$ ). However, we did not observed alteration in the expression of the efflux transporters of doxorubicin (ABCC1 or ABCG2). Our results revealed an important interaction between the antitumoral treatment and the anti-hypertensive medication, which only occurred in the presence of ANG. The effect of the combination of LOS and DOX suggested a possible adjuvant use of anti-hypertensives in the chemotherapy of cancer. However, we still do not know whether this interaction occurs in non-tumoral cells and, therefore, we do not know the possible undesirable effects of this interaction. Thus, the use of LOS for the treatment of hypertension in patients of breast cancer must be evaluated with caution, in order to avoid a possible increased toxicity. We intend to continue investigating the molecular mechanisms of this interaction, as well as to evaluate the concomitant use of anti-hypertensive drugs during the chemotherapeutic treatment of breast cancer in humans.

Financing: FAPERJ, CNPq, Programa de Oncobiologia – FAF/ONCO II.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1 – O CÂNCER DE MAMA NO BRASIL.....</b>	<b>4</b>
<b>FIGURA 2 – ESTRUTURA MOLECULAR DA DOX.....</b>	<b>8</b>
<b>FIGURA 3 – RESISTÊNCIA TUMORAL.....</b>	<b>11</b>
<b>FIGURA 4 – ESTRUTURA DOS TRANSPORTADORES ABC CONHECIDOS POR CONFERIR A RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS.....</b>	<b>16</b>
<b>FIGURA 5 – NÚMERO DE HOSPITALIZAÇÕES POR DOENÇA CARDIOVASCULAR NO BRASIL (2000-2004).....</b>	<b>19</b>
<b>FIGURA 6 – SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA CLÁSSICO.....</b>	<b>25</b>
<b>FIGURA 7 – SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA.....</b>	<b>26</b>
<b>FIGURA 8 – ESTRUTURA MOLECULAR DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR 1 DE ANG, LOS.....</b>	<b>31</b>
<b>FIGURA 9 – CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS.....</b>	<b>50</b>
<b>FIGURA 10 – EFEITO DA DOX SOBRE A VIABILIDADE DE MCF-7.....</b>	<b>52</b>
<b>FIGURA 11 – EFEITO DA ANG NA VIABILIDADE DE CÉLULAS MCF-7 EM FASE ESTACIONÁRIA.....</b>	<b>53</b>
<b>FIGURA 12 – EFEITO DA ANG NA VIABILIDADE DE CÉLULAS MCF-7 EM FASE DE CRESCIMENTO.....</b>	<b>54</b>
<b>FIGURA 13 – EFEITO PROLIFERATIVO DE ANG EM CÉLULAS MCF-7 EM FASE DE CRESCIMENTO.....</b>	<b>55</b>
<b>FIGURA 14 – CONTAGEM DE CÉLULAS TRATADAS COM ANG.....</b>	<b>57</b>
<b>FIGURA 15 – CONTAGEM DE CÉLULAS.....</b>	<b>58</b>
<b>FIGURA 16 – EFEITO DE ANG SOBRE A CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR DOX.....</b>	<b>60</b>
<b>FIGURA 17 – HISTOGRAMA REPRESENTATIVO DO EFEITO ANG E LOS NO ACÚMULO DE DOX.....</b>	<b>61</b>
<b>FIGURA 18 – EFEITO DE ANG E LOS SOBRE O PERFIL DE ACÚMULO DE DOX.....</b>	<b>63</b>
<b>FIGURA 19 – FOTOMICROGRAFIAS DE EPIFLUORESCÊNCIA DE CÉLULAS MCF-7 INCUBADAS COM DOX.....</b>	<b>64</b>
<b>FIGURA 20 – WESTERN BLOT DE MCF-7 PARA BCRP/ABCG2, MRP1/ABCC1 E P-GP/ABCB1.....</b>	<b>65</b>
<b>FIGURA 21 – HISTOGRAMAS REPRESENTATIVOS DAS IMUNOMARCAÇÕES PARA BCRP/ABCG2 E MRP1/ABCC1 EM MCF-7.....</b>	<b>66</b>
<b>FIGURA 22 – EXPRESSÃO DE BCRP E MRP1 EM CÉLULAS MCF-7 TRATADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANG.....</b>	<b>67</b>
<b>FIGURA 23 – EXPRESSÃO DE BCRP E MRP1 EM CÉLULAS MCF-7 TRATADAS COM ANG E/OU LOS.....</b>	<b>68</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABC – *ATP-Binding Cassette*

ABCB1 – Primeiro Membro da Família B de Proteínas ABC

ABCC1 – Primeiro Membro da Família C de Proteínas ABC

ABCG2 – Segundo Membro da Família G de Proteínas ABC

ANG – Angiotensina II

ANP – Peptídeo Atrial Natriurético

AT1 – Receptor 1 de Angiotensina II

AT2 – Receptor 2 de Angiotensina II

ATP – Trifosfato de Adenosina

BCRP – Proteína de Resistência do Câncer de Mama

CIT – Células Iniciadoras de Tumor, ou Células Tronco-Tumorais

DATAFOLHA – Datafolha Instituto de Pesquisas

DATASUS – Banco de Dados do Sistema Único de Saúde

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DO – Densidade Óptica

DOX – Hidrocloreto de Doxorrubicina

ECA – Enzima Conversora de Angiotensina

EUA – Estados Unidos da América

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetraacético sal di-sódico

HEPES – Ácido [4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico]

INCA – Instituto Nacional do Câncer

ISH – Sociedade Internacional de Hipertensão

MDR – Resistência a Múltiplas Drogas

MRP1 – Proteína Associada à Resistência a Múltiplas Drogas 1

MTT – Brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium

NHLBI – *National Heart, Lung and Blood Institute*

NOS – Espécies Reativas de Nitrogênio

OMS – Organização Mundial de Saúde

ONG – Organização Não-Governamental

LOS – Losartana potássica

PBS – Tampão Salina-Fosfato, ou Salina Tamponada e Fosfatada

PBS-T – Tampão Salina-Fosfato com Tween 20

P-gp – Glicoproteína P

RAS – Sistema Renina-Angiotensina

RNA – Ácido Ribonucléico

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SAC – Sociedade Americana do Câncer

SBC – Sociedade Brasileira de Cardiologia

SBH – Sociedade Brasileira de Hipertensão

SBN – Sociedade Brasileira de Nefrologia

SFB – Soro Fetal Bovino

SUS – Sistema Único de Saúde

TRIS – 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol

UICC – União Internacional Contra o Câncer

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
1.1	CÂNCER.....	2
1.1.1	EPIDEMIOLOGIA.....	2
1.1.2	DEFINIÇÃO E ETIOLOGIA .....	5
1.1.3	TRATAMENTO.....	7
1.1.4	HIDROCLORETO DE DOXORRUBICINA (DOX).....	7
1.1.5	RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA.....	10
1.1.6	RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS (MDR) .....	12
1.2	HIPERTENSÃO.....	18
1.2.1	EPIDEMIOLOGIA.....	18
1.2.2	DEFINIÇÃO E ETIOLOGIA .....	20
1.2.2.1	SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (RAS).....	24
1.2.2.1.1	RECEPTORES E METABÓLITOS DE ANGIOTENSINA .....	28
1.2.3	TRATAMENTO.....	31
1.2.4	ANGIOTENSINA II, ANTI-HIPERTENSIVOS E CÂNCER DE MAMA.....	32
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	37
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
3.1	REAGENTES.....	39
3.2	CULTURA DE CÉLULAS .....	39
3.3	ENSAIOS DE AZUL DE TIAZOL (MTT).....	41
3.4	VIABILIDADE CELULAR POR CONTAGEM DE CÉLULAS COM AZUL DE TRYPAN .....	43
3.5	MEDIDAS DO ACÚMULO DE DOX.....	44
3.6	MICROSCOPIA ÓPTICA E DE FLUORESCÊNCIA .....	45
3.7	EXPRESSÃO DOS TRANSPORTADORES MDR: <i>WESTERN BLOT</i> .....	46
3.8	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS MDR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	47

3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	48
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
4.1	CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS.....	50
4.2	CITOTOXICIDADE DA DOX EM MCF-7 .....	51
4.3	EFEITO DE ANG NO CRESCIMENTO DE CÉLULAS MCF-7 .....	52
4.4	MICROSCOPIA ÓPTICA DO EFEITO PROLIFERATIO DE ANG .....	55
4.5	CONTAGEM DE CÉLULAS COM AZUL DE TRYPAN.....	56
4.6	INTERAÇÃO ENTRE ANGIOTENSINA II, LOSARTANA E DOXORRUBICINA .....	57
4.7	MICROSCOPIA ÓPTICA DA INTERAÇÃO ANG, LOS E DOX .....	59
4.8	ANÁLISE DO ACÚMULO DE DOX .....	61
4.9	MICROSCOPIA ÓPTICA DO ACÚMULO DE DOX.....	63
4.10	EXPRESSÃO DOS TRANSPORTADORES MDR: <i>WESTERN BLOT</i> .....	64
4.11	ALTERAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS TRANSPORTADORES MDR .....	66
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>84</b>

## INTRODUÇÃO

**O segredo de progredir é começar.  
O segredo de começar é dividir as tarefas árduas e  
complicadas em tarefas pequenas e fáceis de executar,  
e depois começar pela primeira.**

**Mark Twain**

# 1 INTRODUÇÃO

O câncer e a hipertensão arterial são, atualmente, os principais problemas de saúde pública em todo o mundo. Portanto, é de se esperar que uma parte considerável dos pacientes com câncer seja também hipertensa. No entanto, pouco se sabe sobre uma possível interação entre os medicamentos utilizados no tratamento destas doenças. É possível que estes pacientes necessitem de um acompanhamento diferenciado, dada a possibilidade do tratamento de uma das doenças influenciar o curso da outra.

Nesta dissertação são apresentados alguns efeitos da angiotensina II, o principal hormônio associado à hipertensão, e da losartana potássica, um dos medicamentos mais comuns para o tratamento humano da hipertensão arterial, na sensibilidade de células de câncer de mama em cultura ao tratamento com hidrocloreto de doxorubicina, um dos quimioterápicos mais utilizados na quimioterapia deste tipo de câncer no Brasil.

## 1.1 CÂNCER

### 1.1.1 EPIDEMIOLOGIA

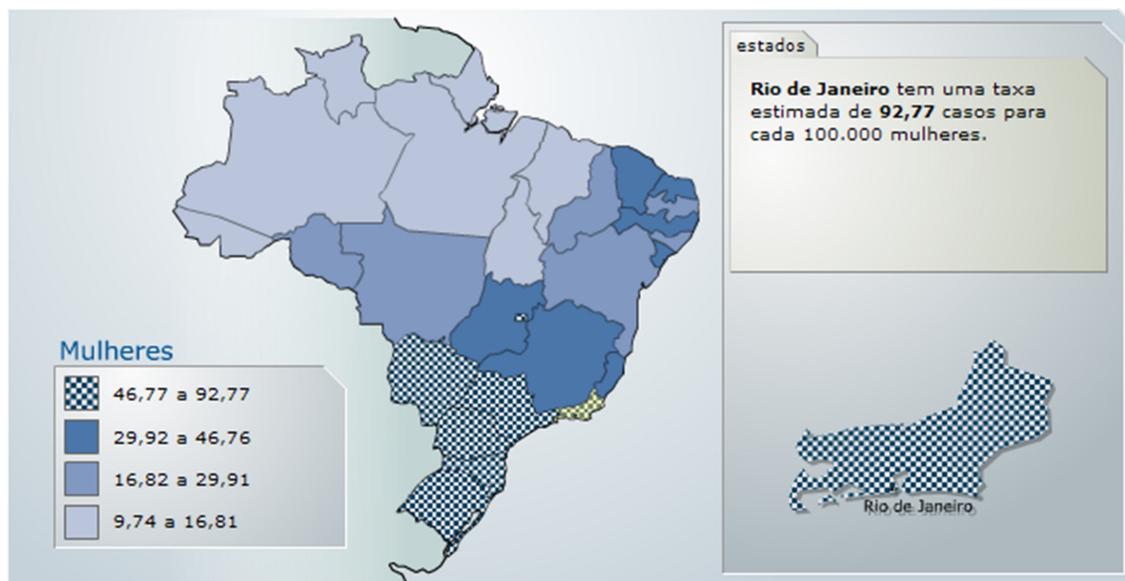
O câncer é atualmente um problema de saúde pública mundial. Segundo dados da Organização Não-Governamental (ONG) União Internacional Contra o Câncer (UICC), estima-se que, desde 2002, mais de 11 milhões de diagnósticos de câncer sejam realizados no mundo a cada ano e mais de 7 milhões de pessoas morram a cada ano. Estima-se que em 2020 estas taxas sejam de 16 milhões de novos casos ao ano e 10 milhões de óbitos em todo o mundo. Em 2004, a mortalidade por câncer no mundo representou 12,5% da mortalidade mundial (OMS, 2005), valor muito próximo aos 13% encontrados pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) para o Brasil em 2005 (INCA, 2007).

Nos Estados Unidos, onde o controle sobre as notificações clínicas é mais eficiente e, conseqüentemente, a qualidade da informação epidemiológica é melhor, o câncer representa a primeira causa de morte por doença desde 1999, superando as doenças associadas ao sistema circulatório (JEMAL *et al.*, 2008). De acordo com a Sociedade Americana do Câncer (SAC), metade dos homens americanos e um terço das mulheres desenvolverão câncer durante a vida (SAC, 2008a), sendo que uma em cada oito mulheres norte-americanas (12,3%) terá câncer de mama (SAC, 2008b).

De acordo com o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), o câncer é a segunda causa de morte por doenças no Brasil desde 1998. A cada ano, a taxa bruta de mortalidade por câncer aumenta no país. Ao se comparar o número de óbitos devidos a câncer por ano, no período de 1979 a 2003, verifica-se que este número subiu de 57 mil para 135 mil casos, o que representa um crescimento nacional na mortalidade associada ao câncer de 8 para 13,5% neste período (DATASUS, 2005).

Desde 1995, o INCA realiza e publica as estimativas de câncer para o Brasil. A partir de 2005, o levantamento passou a ser bienal. De acordo com a previsão estatística para os anos de 2008 e 2009, espera-se que sejam relatados mais de 460 mil novos casos de câncer no país por ano, dentre os quais o câncer de mama será o mais prevalente entre as mulheres de todas as regiões do país, com média nacional de 51 casos em cada 100.000 mulheres (INCA, 2007). O estado do Rio de Janeiro é onde se espera o pior panorama, com aproximadamente 93 casos em cada 100.000 mulheres (Figura 1).

Apesar das estimativas de incidência de câncer não representarem dados tão consistentes quanto as estatísticas de mortalidade, elas apresentam uma visão mais próxima do impacto que esta doença tem sobre a população brasileira e sobre o custo do tratamento aos cofres públicos, já que o tratamento oncológico retira das estatísticas de mortalidade, mesmo que temporariamente, um grande número de pacientes (INCA, 2007).



**Figura 1 – O câncer de mama no Brasil.** Esquema com estimativas do Instituto Nacional do Câncer para a incidência de câncer de mama para cada 100.000 mulheres em todos os estados do Brasil no ano de 2008. Em destaque, está o estado com maior incidência do país, o Rio de Janeiro (INCA, 2007).

Os gastos do SUS com assistência oncológica mais que dobraram no período de 2000 a 2005, passando de 570 milhões de reais ao ano para 1 bilhão e 160 milhões de reais ao ano. Em 2005, o Sistema Único de Saúde (SUS) teve uma média mensal de 128 mil pacientes de quimioterapia e 98 mil pacientes de radioterapia, totalizando 2,7 milhões de tratamentos neste ano, apenas em quimio e radioterapia. Estes números apresentam bem a magnitude que o câncer representa atualmente para os cofres públicos (DATASUS, 2005). Um estudo retrospectivo realizado pelo INCA, referente ao período 1979-1999, mostrou que as taxas de incidência e de mortalidade do câncer não apresentam indícios de desaceleração, apesar das campanhas de prevenção e diagnóstico precoce, assim como dos avanços no tratamento (INCA, 2002).

No Brasil, não há um levantamento completo sobre a expectativa de vida dos pacientes de câncer, mas sabe-se que ela é tão variada quanto no restante do mundo. Segundo a SAC, a média de todos os cânceres de sobrevida livre de doença nos primeiros cinco anos é

de 66% (SAC, 2008). Dados não publicados do Hospital Sírio Libanês, considerado o hospital com melhor centro oncológico de São Paulo pela comunidade médica (DATAFOLHA, 2007), apresentam taxas de sobrevida livre de doença em cinco anos que variam entre 3 e 83% (informação oral),<sup>1</sup> semelhante ao que vem sendo publicado nos EUA, 2 a 89% (SAC, 2008).

### **1.1.2 DEFINIÇÃO E ETIOLOGIA**

Câncer é uma palavra singular que compreende um conjunto de mais de cem doenças. De forma geral, câncer é uma doença em que se observa o crescimento descontrolado e desordenado de células de um determinado tecido, a inibição de mecanismos de morte, a capacidade de invasão de tecidos e/ou órgãos próximos, assim como a colonização de outros tecidos e órgãos distantes, o que é chamado de metástase. O câncer pode se manifestar na forma de tumores sólidos malignos, mas também no sangue (leucemias) através das células do sistema circulatório (OMS, 2005).

Acredita-se que as causas do câncer estejam associadas à perda do controle dos processos de divisão e/ou morte celular, levando a célula à: (i) proliferação, mesmo na ausência de fatores de crescimento; (ii) proliferação, mesmo na presença de fatores inibitórios; (iii) evasão dos mecanismos de morte celular programada; (iv) ativação de angiogênese local; (v) ativação de mecanismos de reparo de DNA, necessários a imortalidade celular (como telomerasas); (vi) capacidade de invasão e formação de metástases e, por fim, mas não menos importante, (vi) evasão do sistema imune. Todas estas etapas são fundamentais à formação de cânceres potencialmente fatais (HAHN, WEIMBERG, 2002).

---

<sup>1</sup> Informação oral obtida em palestra proferida pelo Dr. Frederico Perego Costa, do Hospital Sírio-Libanês/SP, durante o *IV International Congress of Oncology and Immunobiomodulation*, realizado no Centro FECOMERCIO, na cidade de São Paulo, Brasil, entre os dias 6 e 9 de setembro de 2006.

Inicialmente, acreditava-se que os tumores eram formados por massas de células homogêneas, originadas de uma única célula inicial transformada, e as demais seriam cópias, clones desta célula inicial. Entretanto, inúmeros experimentos têm mostrado que isto não é verdade. Mesmo quando o câncer tem sua origem em uma única célula, diversos mecanismos, como a divisão assimétrica e a diferenciação celular, fazem com que haja heterogeneidade tumoral, mesmo ao ponto em que nem toda célula do câncer é, obrigatoriamente, tumorigênica (BERGSAGEL, VALERIOTE, 1968; FIALKOW, 1976; HAMBURGER, SALMON, 1977; HEPPNER, 1984; WEISENTHAL, LIPPMAN, 1985).

Esta mudança de paradigma levou à criação do conceito de célula-tronco tumoral, ou célula iniciadora de tumor (CIT), nomenclatura preferível, pois não se sabe se há relação entre a célula que inicia um câncer e a população de células-tronco normais (DEAN *et al.*, 2005; SOGN, 2005). A identificação da CIT já foi comprovada em leucemias e linfomas, alguns tumores sólidos, como mama e cérebro, e mesmo em linhagens celulares (WULF *et al.*, 2001; REYA *et al.*, 2003 LAPIDOT *et al.*, 1994; AL-HAJJ *et al.*, 2003; KONDO, SETOGUCHI, TAGA, 2004).

Tanto na leucemia, quanto em cânceres sólidos, acredita-se que 99% das células cancerosas não sejam tumorigênicas. Estas células não são capazes de invadir tecidos e formar metástases e, de maneira geral, não são elas as responsáveis pela morte dos pacientes. Entretanto, o 1% restante, que é a população tumorigênica também é resistente à quimioterapia e, por isso, é tão difícil de ser eliminada (WULF *et al.*, 2001; LOU, DEAN, 2007; LOEBINGER, 2008).

Desta forma, alguns pesquisadores acreditam que a eliminação da população CIT seria a forma ideal de tratamento da doença, eliminando o mal pela raiz e levando o paciente à cura (DEAN, FOJO, BATES, 2006; LOU, DEAN, 2007; LOEBINGER, 2008).

### 1.1.3 TRATAMENTO

Os três tratamentos disponíveis para o câncer são a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. Metade dos pacientes de câncer não pode utilizar a cirurgia nem a radioterapia como alternativas de tratamento, devido às características intrínsecas do tumor como tamanho, localização e resistência à radioterapia, restando apenas a quimioterapia como opção de tratamento. Entretanto, mesmo a quimioterapia apresenta dificuldades e a maior delas é a resistência do câncer aos fármacos (GOTTESMAN, 2002).

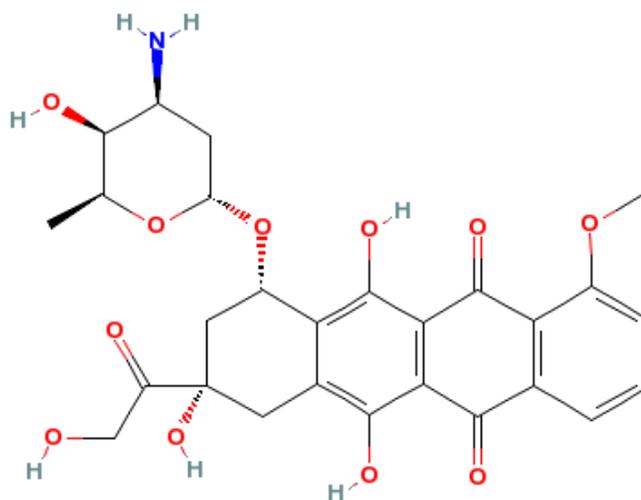
Há, também, disponíveis como tratamentos adjuvantes (que não podem ser utilizados isoladamente) a hormônio-terapia, para pacientes de tumores responsivos a hormônios (como o câncer de mama); o transplante de medula óssea, para pacientes de leucemias, linfomas, mieloma múltiplo e melanoma que encontram doadores compatíveis (sendo aplicada após a ablação total da medula óssea do paciente por radioterapia) e a imunoterapia, que durante os últimos 110 anos em que vem sendo estudada e desenvolvida, ainda não encontrou um protocolo terapêutico satisfatório, sendo ainda um tema muito controverso (WALDMANN, 2003; PARISH, 2003).

### 1.1.4 HIDROCLORETO DE DOXORRUBICINA (DOX)

O hidrocloreto de doxorubicina, ou simplesmente doxorubicina (DOX), é um agente antitumoral largamente utilizado no tratamento do câncer há cerca de quarenta anos, mas que, apesar disto, ainda não teve seu mecanismo de ação totalmente esclarecido.

A DOX é um antibiótico que foi descrito pela primeira vez em 1969. Pertence à classe das antraciclinas, substâncias derivadas de culturas de fungos *Streptomyces peucetius* (DI MARCO, GAETANI, SCARPINATO, 1969). A cepa original produz um antibiótico de cor

avermelhada, chamada daunorrubicina, descoberto na década de 50 e utilizado para tratamento de leucemias e linfomas (DI MARCO *et al.*, 1964). Entretanto, em 1967, foi descrito que a daunorrubicina poderia levar à morte por cardiotoxicidade severa (TAN *et al.*, 1967). Dois anos se passaram até a obtenção de uma cepa variante denominada *Streptomyces peucetius caesius* capaz de produzir um outro “corante”, também avermelhado, e que foi identificado como sendo um antitumoral mais potente e menos cardiotóxico, a adriamicina, atualmente chamada de doxorrubicina e cuja estrutura molecular se encontra ilustrada na Figura 2 (DI MARCO, GAETANI, SCARPINATO, 1969; ARCAMONE *et al.*, 1969).



**Figura 2 – Estrutura molecular da DOX.** Imagem obtida de *PubChem Compound*<sup>2</sup>, registro 31703.

Por ser um intercalante de DNA que se liga às purinas, a DOX é capaz de inibir a biosíntese de macromoléculas (proteínas, RNA e DNA). Acredita-se que a maior parte de seus efeitos antitumorais seja mediado pela inibição de topoisomerases tipo II (enzimas que consertam erros na estrutura do DNA), mas ela também é um potente agente oxidante, formador de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem, por si só, causar danos ao DNA,

<sup>2</sup> [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=31703&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=31703&loc=ec_rcs)

ao RNA e às proteínas. Apesar de não se conhecer totalmente seus efeitos sobre o metabolismo celular, sabe-se que ela inibe a síntese de macromoléculas e o sistema de reparo de DNA. Desta forma, a DOX funciona como um agente “desorganizador” do metabolismo de macromoléculas e do ciclo celular (MOMPARLER, 1976; CUTTS *et al.*, 2005).

Apesar de ser menos tóxica que a daunorrubicina (que só pode ser utilizada em regime de internato), a DOX ainda é cardiotoxicidade e seu efeito é cumulativo, havendo orientações acerca de sua dosagem máxima recomendada de acordo com a idade e peso. Seu efeito cardiotoxicidade pode ser exacerbado, dependendo de outros medicamentos utilizados em combinações. Entretanto, o mecanismo responsável por esta cardiotoxicidade ainda não foi adequadamente descrito. Sugere-se, atualmente, que o principal mediador do dano cardíaco seja a formação de ROS ou de espécies reativas de nitrogênio (NOS), havendo grande interesse na elucidação dos mecanismos de proteção ao estresse oxidativo associado ao dano induzido por DOX (TOKARSKA-SCHLATTNER *et al.*, 2006; NITHIPONGVANITCH *et al.*, 2007).

Neste trabalho, escolhemos a DOX para o tratamento das células de câncer de mama em cultura por ser este um medicamento largamente empregado na quimioterapia deste tipo de câncer em nosso país, especialmente pelo seu baixo custo.

Apesar de seu uso clínico, as antraciclinas, como a DOX, possuem importantes efeitos cardiotoxicos. Doses de 300mg/Kg, ou maiores, administradas em bolo podem levar a um quadro de lesão cardíaca aguda fatal, enquanto que pequenas doses levam, de forma cumulativa e crônica, à insuficiência cardíaca congestiva (BUJA, FERRANS, 1975; MENNA *et al.*, 2008). Entretanto, os mecanismos pelos quais as antraciclinas provocam estas lesões cardíacas ainda não estão bem esclarecidos.

Uma importante evidência de que estes mecanismos apresentam diferenças entre seu efeito agudo (altas doses) ou crônico (baixas doses cumulativas) foi demonstrado pela

modulação de expressão de um importante fator protetor cardíaco, a produção de peptídeo atrial natriurético (ANP). Uma dose única intravenosa de 10mg/Kg de DOX leva à diminuição de ANP, enquanto doses intravenosas de 3mg/Kg dadas uma vez por semana levam ao aumento de ANP (BERNARDINI *et al.*, 1992). Além disso, parece que outros peptídeos natriuréticos também estão envolvidos na lesão aguda de DOX e de forma até mais sensível que o ANP (CHEN, GARAMI, GARDNER, 1999).

Trabalhos iniciais de histopatologia demonstraram que as antraciclina possuem efeitos tóxicos ao tecido cardíaco, mesmo em doses sub-clínicas, e que isto não parecia ser mediado por lesões isquêmicas ou inflamatórias, mas por efeito sobre os cardiomiócitos (BILLINGHAM *et al.*, 1978).

### **1.1.5 RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA**

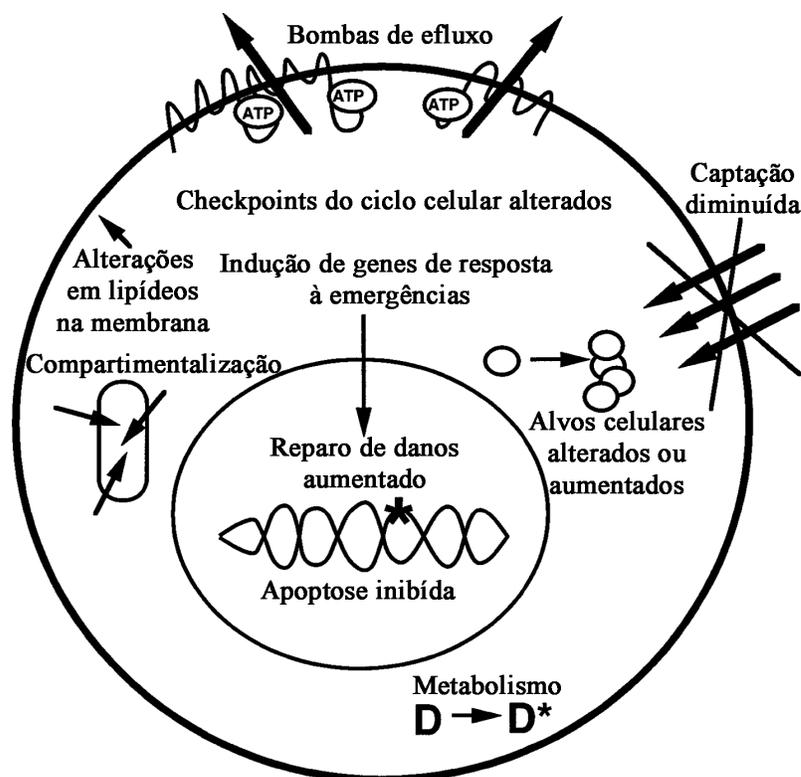
A resistência aos medicamentos utilizados na quimioterapia do câncer é relativamente comum e, freqüentemente, acomete pacientes que jamais haviam sido expostos a estes medicamentos. Podem-se classificar as formas de resistência de duas maneiras: quanto à sua exposição prévia ao medicamento e quanto a sua especificidade.

Em relação à exposição ao fármaco, há dois tipos: (i) intrínseca, apresentada por células jamais expostas àqueles quimioterápicos antes; (ii) adquirida, que surge ao longo do tratamento, seja pela exposição ao medicamento, seja induzida por outros medicamentos.

Quanto à especificidade, a resistência também pode ser classificada em duas: (i) específica (curto espectro), restrita a um determinado fármaco; (ii) inespecífica (largo espectro), que abrange um grande número de medicamentos (ROBERT, JARRY, 2003). A resistência específica é mais simples de ser evitada e tratada, pois a simples troca do medicamento é suficiente (GOTTESMAN, 2002). A resistência de largo espectro,

caracterizada pela ausência de resposta a quimioterápicos que diferem entre si em estrutura e função, é também conhecida como resistência a múltiplas drogas ou MDR (do inglês *Multidrug Resistance*). Esta, por sua vez, é mundialmente conhecida por ser a principal dificuldade do tratamento de pacientes com quimioterapia, seja no câncer, quanto em doenças parasitárias, bacterianas ou virais (LARSEN, ESCARGUEIL, SKLADANOWSKI, 2000).

A resistência celular a fármacos pode ser conferida por diversos mecanismos, como: (1) expressão de bombas de efluxo; (2) diminuição da captação do quimioterápico; (3) alterações em lipídeos de membrana; (4) compartimentalização do fármaco; (5) alteração dos alvos celulares; (6) alterações dos pontos de checagem (*checkpoints*) do ciclo celular; (7) indução de genes de respostas de emergência; (8) aumento do sistema de reparo; (9) inibição dos mecanismos de morte celular programada e (10) detoxificação do fármaco (Figura 3).



**Figura 3 – Resistência tumoral.** Esquema com os possíveis mecanismos de resistência específicos e inespecíficos apresentados por células tumorais (adaptado de GOTTESMAN, 2002).

### 1.1.6 RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS (MDR)

O termo “resistência a múltiplas drogas” (MDR) faz referência a um padrão de resistência encontrado em células (sejam elas de mamíferos, vegetais, bactérias ou protozoários) que não respondem ao tratamento com fármacos de estruturas, mecanismos de ação e alvos celulares distintos e não-relacionados (GOTTESMAN, FOJO, BATES, 2002). A presença de mecanismos de resistência nas populações de células tumorais faz com que diversos protocolos de quimio e radioterapia sejam necessários até a completa eliminação de todas as sub-populações de células transformadas que possam vir a dar origem a um novo câncer (DEAN, FOJO, BATES, 2005), sendo o fenótipo MDR a principal causa de óbitos durante o tratamento de pacientes em quimioterapia (LARSEN, ESCARGUEIL, SKLADANOWSKI, 2000).

O grande impacto clínico no tratamento do câncer e de outras doenças tem movimentado uma quantidade imensa de recursos públicos e privados na busca de estratégias de prevenção e combate à MDR.

A caracterização da MDR *in vitro* tornou-se possível com o advento da cultura de células, principalmente de explantes, nas décadas de 40 e 50. Assim, foi possível realizar biópsias de tumores e fazer o cultivo primário de células tumorais em laboratório. Na década de 1970, estudos dos efeitos de quimioterápicos em cultura de células demonstraram que algumas linhagens celulares apresentavam resistência cruzada a outros medicamentos aos quais elas não haviam sido previamente apresentadas, de forma semelhante ao que ocorria com pacientes (BIEDLER, RIEHM, 1970; RIEHM, BIEDLER, 1971; DANO, 1971, 1972). Entretanto, nada se compreendia sobre o fenômeno. Apesar da carência de dados, alguns trabalhos sugeriram possíveis mecanismos para esse fenômeno (DANO, 1973; LANGELIER, SIMARD, BRAILOVSKY, 1974; LING, THOMPSON, 1974). Foi descrito, por exemplo, que

células MDR apresentavam menores concentrações intracelulares de quimioterápicos, sugerindo que isto ocorresse por meio de um mecanismo de transporte ativo contra gradiente, pois na presença de inibidores competitivos e metabólicos esta diferença era abolida, o que já representava o primeiro indício do envolvimento de proteínas transportadoras neste fenômeno (DANO, 1973).

Três anos depois, a partir de estudos com células de uma linhagem MDR selecionada por tratamento químico, foi possível identificar uma proteína presente nestas células, ausente na sua parental e cuja expressão se correlacionava com os níveis de resistência (JULIANO, LING, 1976). Juliano e Ling utilizaram uma técnica de marcação de carboidratos de superfície celular em células MDR desenvolvidas a partir dos estudos de Biedler e Riehm, de 1970. Assim, chegaram à identificação de uma glicoproteína, de 165 KDa, que estava presente nas células MDR, mas que faltava nas células sensíveis. Como Ling acreditava que o mecanismo da MDR fosse devido à alteração da permeabilidade celular (LING, THOMPSON, 1974), ele nomeou-a Glicoproteína P (“P” de permeabilidade, em inglês *P-glycoprotein*, ou simplesmente P-gp).

Diversos estudos posteriores, com células MDR animais e humanas, identificaram o gene da P-gp, clonaram-no, seqüenciaram-no, transfectaram-no em células sensíveis e a capacidade desta proteína em conferir a resistência através da diminuição da concentração de fármacos no interior das células foi verificada, confirmando a hipótese de Dano. Assim, foi verificado que a P-gp tratava-se de um transportador presente na membrana plasmática, capaz de realizar o transporte ativo de saída de inúmeras substâncias, entre elas os quimioterápicos do câncer, e que, através deste mecanismo, protegia as células da ação dos medicamentos (DEBENHAM *et al.*, 1982; FOJO *et al.*, 1987; GROS *et al.*, 1986; CHEN *et al.*, 1986; CORNWELL, PASTAN, GOTTESMAN, 1987; UEDA *et al.*, 1986; UEDA *et al.*, 1987).

Durante quase trinta anos, acreditou-se que a P-gp fosse a única glicoproteína associada a multiresistência, o que criou um conceito de que a MDR, através do transporte mediado pela P-gp, é um padrão de resistência a fármacos de classes distintas, sem semelhanças estruturais, nem de alvos celulares ou mecanismos de ação, de forma semelhante ao que é observado em inúmeros pacientes (MOSCOW *et al.*, 2003).

Em 1987 foram identificadas células humanas de câncer de pulmão, H69, selecionadas com doses crescentes de DOX, que não apresentavam P-gp, nem mesmo seu RNA mensageiro, mas eram MDR (MIRSKI *et al.*, 1987; COLE, MOHAMDEE, MIRSKI, 1990). Assim, em 1992, chegou-se a descoberta de uma segunda glicoproteína, semelhante a P-gp, mas diferente em diversos aspectos (COLE *et al.*, 1992), que foi chamada Proteína Associada à Resistência a Múltiplas Drogas (MRP, do inglês *Multidrug Resistance-associated Protein*).

Em pouco tempo, percebeu-se que a MRP possui um espectro diferente de medicamentos aos quais ela confere resistência, e neste contexto, a resistência causada pela P-gp chamada, então, de “MDR clássica”, foi ampliada, deixou de estar unicamente vinculada à presença da P-gp e passou a ser utilizada mais em referência ao mecanismo de efluxo de fármacos mediado por transportadores localizados na membrana plasmática (NIELSEN *et al.*, 1996; MOSCOW *et al.*, 2003; TEODORI *et al.*, 2006).

Com o tempo, foram sendo identificadas outras proteínas com semelhanças gênicas e estruturais a MRP, e que também realizam transporte de substâncias. Durante o encontro de Gosau, em 1997, Marcel Kool estabeleceu a família MRP, inicialmente com 5 membros e que hoje já conta com pelo menos 13 membros identificados em humanos (KOOL *et al.*, 1997; BORST *et al.*, 1999). A proteína MRP foi, então, renomeada MRP1.

Com a percepção de que a P-gp não era a única proteína capaz de conferir MDR clinicamente relevante, iniciou-se uma grande busca por outras proteínas associadas a MDR. Desta forma, com o passar do tempo, outras células MDR que não expressavam P-gp nem

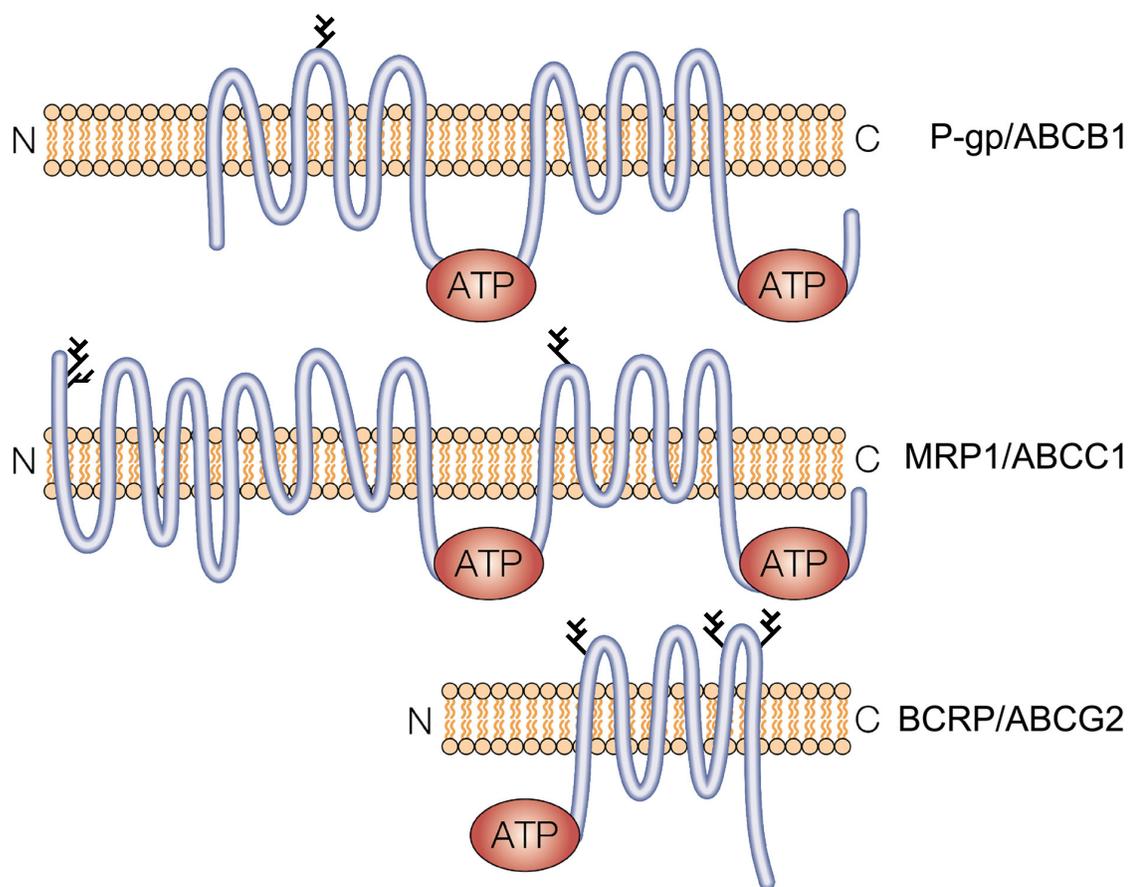
MRP1/ABCC1 foram sendo identificadas e outras proteínas, descobertas. Dentre elas, se destaca a Proteína de Resistência do Câncer de Mama (do inglês, *Breast Cancer Resistance Protein*, BCRP), que apresenta um terceiro padrão de resistência, com diversas semelhanças com a P-gp e a MRP1, mas com a diferença de que apenas ela é capaz de conferir resistência a mitoxantrona (DOYLE *et al.*, 1998; DEAN, RZHETSKY, ALLIKMETS, 2001).

Estas três proteínas são membros da superfamília ABC (*ATP binding cassette*) de proteínas ligadoras de ATP, também conhecida como superfamília de transportadores ABC. Esta é uma importante família de proteínas integrais com mais de 375 membros e, pelo menos, 52 transportadores em humanos, dos quais pelo menos 6 já foram identificados como capazes de transportar fármacos e, assim, conferir resistência *in vitro* (DEAN, 2002).

Recentemente, todas as proteínas desta superfamília foram renomeadas. Assim, a P-gp foi chamada de ABCB1, a MRP1 foi renomeada para ABCC1 e, finalmente, a BCRP foi renomeada ABCG2 (DEAN, 2002). Como essas moléculas ainda são bastante conhecidas pelos seus antigos nomes, elas serão citadas com os dois nomes: P-gp/ABCB1, MRP1/ABCC1 e BCRP/ABCG2. As maiores diferenças entre essas proteínas estão no número de domínios transmembranares e no número de sítios de ligação ao ATP (Figura 4). Na figura 4, estão representados três esquemas das três proteínas ABC com relevância clínica. A letra N representa o terminal amino da proteína e a letra C representa terminal carboxil da proteína. Como são todas proteínas integrais, a membrana lipídica está representada em amarelo e o esqueleto da proteína em azul. Na cor de ferrugem estão representados os sítios de ligação e clivagem de ATP, enquanto em preto estão representadas as localizações dos radicais glicídicos ligados aos aminoácidos, conhecidos como glicosilações (Figura 4).

Apesar de existirem outras proteínas capazes de transportar fármacos, poucas funcionaram em modelos de transfecção ou tiveram sua atividade associada à resistência clínica; assim, para ser reconhecida como MDR, além do transporte de fármacos, a proteína

deve ser capaz de conferir resistência clínica a fármacos com estruturas, alvos e funções diferentes. Desta forma, apesar de terem sido descritas outras proteínas transportadoras de fármacos, as únicas com relevância clínica ainda são a P-gp/ABCB1, a MRP1/ABCC1 e a BCRP/ABCG2 (BORST *et al.*, 1999). A figura 4 apresenta um modelo simplificado da estrutura destes transportadores integrais de membrana. O esqueleto da proteína se encontra em azul, com seus terminais amino (N) e carboxil (C) representados em cada ponta, ao lado da bicamada lipídica da membrana plasmática representada pelos fosfolipídeos em amarelo. Os sítios ATPásicos de cada proteína estão representados em rosa-avermelhado. Cada proteína apresenta em preto os sítios de glicosilação característicos das glicoproteínas.



**Figura 4 – Estrutura dos transportadores ABC conhecidos por conferir a resistência a múltiplas drogas.** Adaptado de GOTTESMAN, FOJO, BATES, 2002; KUCHLER, THORNER, 1992; MULLER *et al.*, 2002; DIOP, HRYCYNA, 2005.

Recentemente, a MDR têm se tornado um tema ainda mais debatido em câncer, especialmente após a identificação da BCRP/ABCG2, simultaneamente, por dois grupos distintos como um marcador de células embrionárias e possivelmente de CIT (KIM *et al.*, 2002; SCHARENBERG *et al.*, 2002). O elo entre MDR e CIT já havia sido sugerido por experimentos anteriores, que mostravam que há a presença de células MDR na doença residual mínima, e que estas células são responsáveis pelo reaparecimento da doença (SHTIL, 2002). Ainda não há comprovação de que estes transportadores estejam envolvidos com o processo de geração das CIT (tumorigênese), mas esta é uma hipótese em discussão, já que a presença destes transportadores nas células-tronco normais já foi confirmada (BUNTING, 2002; ZHOU *et al.*, 2002).

Freqüentemente, pacientes de câncer apresentam mais de um transportador expresso em suas células doentes, o que dificulta a estratégia de quimioterapia a ser escolhida, já que diferentes bombas transportam diferentes quimioterápicos. Este fato também dificulta a predição dos fatores independentes que possam alterar o prognóstico clínico (BURGER *et al.*, 2003; RYBÁROVÁ *et al.*, 2006). Já que são encontrados diferentes perfis de expressão de transportadores, é possível que seja necessário adotar diferentes protocolos de quimioterapia. Apesar de haver três transportadores com importância clínica bem identificada (P-gp/ABCB1, MRP1/ABCC1 e BCRP/ABCG2), outros podem estar sendo negligenciados.

A linhagem de células de câncer de mama humano MCF-7, utilizada no presente trabalho, expressa constitutivamente as proteínas MRP1/ABCC1 e BCRP/ABCG2 (VAN LUYN *et al.*, 1998; DOYLE *et al.*, 1998), que são os dois transportadores ABC mais freqüentes em cânceres de mama humanos (RYBÁROVÁ *et al.*, 2006).

## 1.2 HIPERTENSÃO

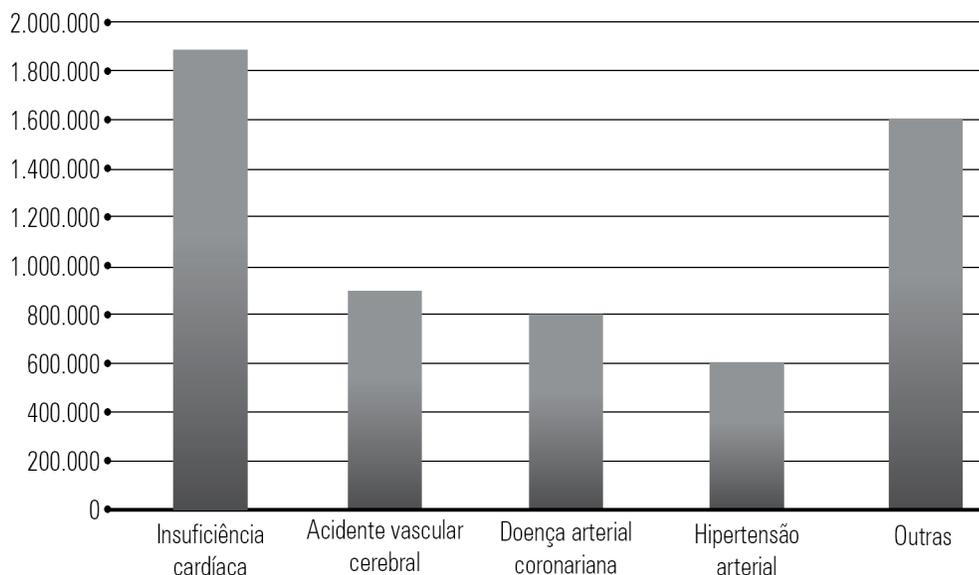
### 1.2.1 EPIDEMIOLOGIA

De acordo com o Relatório Mundial de Saúde, publicado em 2003 pela OMS, as duas maiores causas de morte no mundo são infarto e derrame, 12,6 e 9,7%, respectivamente. Somadas, elas causam quase treze milhões de mortes no mundo anualmente. Nesse relatório, a hipertensão respondeu por quase um milhão de mortes ao ano, ficando em décimo terceiro lugar (OMS, 2003). Recentemente, a Sociedade Internacional de Hipertensão relatou que a análise retrospectiva da mortalidade e morbidade associadas à hipertensão demonstrou que 54% dos derrames e 47% dos infartos, no ano de 2001, estavam diretamente associados à hipertensão, o que a torna a maior causa de mortalidade e morbidade mundial, com cerca de 7,6 milhões de óbitos ao ano (LAWES *et al.*, 2008).

No Brasil, a hipertensão arterial sistêmica é a entidade clínica de maior representatividade, atingindo uma em cada cinco pessoas. Sabe-se que o risco aumenta com a idade, de modo que se estima que cerca de 60% dos indivíduos idosos sejam hipertensos (SBC, SBH, SBN, 2006).

Segundo estimativas do Ministério da Saúde, a hipertensão arterial já atinge 16,8 milhões de pessoas apenas no Brasil, sendo 7,7 milhões são cadastrados no SUS e recebem medicação gratuitamente. Acredita-se que 39% dos hipertensos e 20% dos óbitos relacionados à hipertensão estão na faixa etária mais produtiva (de 20 a 49 anos). No Brasil, a hipertensão causa mais mortes por ano que a soma dos óbitos devidos a câncer de mama, próstata e leucemia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005, 2006a, 2006b).

De acordo com as Sociedades Brasileiras de Cardiologia (SBC), de Hipertensão (SBH) e de Nefrologia (SBN), a hipertensão arterial foi responsável por mais de 600.000 hospitalizações no Brasil no período de 2000 a 2004 (Figura 5).



**Figura 5 – Número de hospitalizações por doença cardiovascular no Brasil (2000-2004).** Retirado de V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (SBC, SBH, SBN, 2006).

Em 2004, o INCA realizou um inquérito domiciliar sobre doenças não-transmissíveis em todos os estados, em 15 capitais e no Distrito Federal, no qual estimou-se a prevalência referida de hipertensão arterial em: 22,2% na Região Norte; 25,9% na Região Nordeste; 24,4% na Região Centro-Oeste; 27,7% na Região Sul e 26,5% na Região Sudeste. Esta abordagem tem a desvantagem de não identificar os indivíduos que desconhecem a sua doença e portanto, subestima a incidência real (INCA, 2004).

Um estudo realizado no Estado do Paraná revelou que, em indivíduos adultos, metade dos hipertensos desconheciam a sua doença (50,8% sabiam ser hipertensos) Entre os hipertensos, apenas 40,5% estavam em tratamento e apenas 10,4% tinham realmente conseguido controlar a pressão arterial através de medicamentos (GUS *et al.*, 2004)

Inquéritos populacionais realizados em algumas cidades brasileiras, como Araraquara/SP e Porto Alegre/RS, mostraram a prevalência de hipertensão arterial entre 22,3 e 44% (SBC, SBH, SBN, 2006). Segundo informações do Ministério da Saúde, em 2005

ocorreram 1.180.184 internações por doenças cardiovasculares, com custo global de R\$ 1.323.775.008,28. Em 2003, a rede básica da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro realizou 1.413.739 consultas em clínica médica, sendo a hipertensão arterial o principal motivo em 56% dos atendimentos (DATASUS, 2007).

Devido a sua elevada incidência, os medicamentos para hipertensão estão na lista dos mais vendidos, não só no Brasil, mas em todo o mundo. Em 2004, o SUS gastou cerca de R\$ 24 milhões com o tratamento de pacientes com hipertensão, 10% a mais que os recursos destinados em 2003, sendo o tratamento da hipertensão o segundo mais custoso do país, atrás apenas do diabetes, e seguido pelo câncer (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

## **1.2.2 DEFINIÇÃO E ETIOLOGIA**

A hipertensão arterial, hipertensão arterial sistêmica, ou simplesmente hipertensão, é uma doença do sistema circulatório caracterizada por freqüente pressão arterial sistólica, diastólica, ou ambas, acima dos valores considerados normais para a população em geral, quando aferida por um esfigmomanômetro (WHITWORTH, OMS, ISH, 2003).

Por convenção, deve-se referir primeiro à pressão sistólica e, em seguida, a diastólica, sendo que a unidade pode ser simplificada para centímetros de mercúrio e ser omitida, ficando, então, subentendida, como por exemplo em 12x8 (leia doze por oito) ou permanecer em mmHg, 120x80 (WHITWORTH, OMS, ISH, 2003).

Segundo a OMS e a Sociedade Internacional de Hipertensão (ISH), os valores aceitos como normais são de 110 a 140 mmHg para a pressão sistólica ou 60 a 90 mmHg para a pressão diastólica. Valores de 130-139 ou 85-90 mmHg são considerados limítrofes (ou pré-hipertensão) e maiores que 140 ou 90 mmHg são valores de um paciente hipertenso (WHITWORTH, OMS, ISH, 2003).

No Brasil, os valores adotados como referência foram elaboradas, em conjunto, pelas Sociedades Brasileiras de Cardiologia, de Hipertensão e de Nefrologia, em 2006, publicando-as nas V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Nelas, os valores adotados são os mesmos das diretrizes da OMS/ISH de 2003, mas apenas quando aferidas pelo mesmo médico em dois episódios com intervalo de pelo menos dois meses (SBC, SBH, SBN, 2006).

Nos Estados Unidos, os valores e critérios são semelhantes aos da OMS, com a distinção de que pacientes em pré-hipertensão já podem receber medicação. A pré-hipertensão é uma condição em que a chance da pessoa desenvolver hipertensão é maior, já que sua pressão apresenta tendências de elevação (WHITWORTH, OMS, ISH, 2003; NHLBI, 2008).

Episódios hipertensivos são normais e importantes para o correto funcionamento do sistema circulatório e da bomba cardíaca ao longo da vida, de modo que o sangue possa atender a demanda periférica por nutrientes e oxigênio, especialmente durante a prática de exercício físico. Entretanto, a manutenção da pressão arterial em níveis aumentados durante o repouso pode levar a inúmeras doenças, como: aterosclerose, acidente vascular cerebral, infarto agudo do miocárdio, insuficiência renal, retinopatias, assim como aumentar a predisposição a outras doenças como diabetes tipo 2 (SBC, SBH, SBN, 2006).

A hipertensão arterial é considerada uma doença silenciosa, pois na maioria dos casos não são observados quaisquer sintomas no paciente. Quando estes ocorrem, são vagos e comuns a outras doenças, tais como: dores de cabeça, tonturas, cansaço, enjôos, falta de ar e sangramentos nasais (SBC, SBH, SBN, 2006).

A maioria dos pacientes apresenta hipertensão arterial primária, idiopática ou essencial, ou seja, a causa da doença é desconhecida e a hipertensão é tratada como uma doença *per se*. Este tipo representa 95% dos diagnósticos realizados. Os demais cinco por cento representam os casos em que a hipertensão é claramente consequência de uma outra condição, como no aldosteronismo primário, na gravidez, no câncer, durante o uso de certos

medicamentos, ou outros motivos. Nestes casos, ela é chamada de hipertensão arterial secundária, pois se modificado o quadro principal, a hipertensão desaparece (SBC, SBH, SBN, 2006).

As causas da hipertensão arterial primária ainda são obscuras e muito discutidas. Frequentemente, as causas clínicas da hipertensão arterial são inferidas tendo por base o espectro de fármacos aos quais o paciente é responsivo, o que não esclarece a causa primária da hipertensão, mas permite o seu tratamento (SBC, SBH, SBN, 2006).

Em 2002, Weinberger verificou que a sensibilidade ao sal, uma condição em que a pressão arterial de certos indivíduos acompanha a ingestão de sal, está diretamente associada a uma maior mortalidade por doenças cardiovasculares na população normotensa, semelhante ao que ocorre com o hipertenso. Portanto, a restrição salina tem sido recomendada como uma medida de prevenção de doenças cardiovasculares (WEINBERGER, 2002). Por outro lado, por ser um quadro com forte componente hereditário e familiar, o perfil genético da hipertensão primária tem sido largamente estudado. As pesquisas, neste campo, têm apresentado diversos candidatos, dentre os quais, as mutações em componentes do sistema renina-angiotensina (RAS) são as mais promissoras (PUDDU *et al.*, 2007).

Como a manutenção da pressão arterial é fundamental ao equilíbrio orgânico, existem diversos mecanismos de curto e longo-prazo, neurais e endócrinos, responsáveis pelo seu controle. A pressão arterial é influenciada principalmente por três sistemas neuro-hormonais: o sistema simpático, o RAS e a secreção de hormônio antidiurético (CAMPBELL, 1986).

De forma sucinta, o sistema simpático se encarrega das oscilações momentâneas da pressão arterial, o RAS se encarrega de controlar a tendência das oscilações, regulando a pressão a longo prazo, enquanto que o hormônio antidiurético é responsável pelo balanço hídrico do organismo, essencial à disponibilidade de água para o plasma e tecidos (CAMPBELL, 1986).

Recentemente, Johnson *et al.* publicaram uma revisão histórica, analisando as causas propostas para a hipertensão essencial desde que ela foi descrita, no século XVIII, considerando o conhecimento acerca do tema em cada época. Através desta análise, eles propõem que a origem da doença encontra-se nos rins, provavelmente devido a algum estímulo vasoconstrictor na artéria renal, que leva a um desequilíbrio do RAS, iniciando-se um processo lento e gradual de lesão microvascular, até atingir um grau mais acentuado de lesão, suficiente para a liberação de fatores pró-inflamatórios. Estes fatores mobilizam linfócitos T e macrófagos circulantes para o interstício renal, levando a respostas autoimunes, estímulo à formação de angiotensina II (ANG) e de ROS. A partir deste estágio, o processo se acelera e se retro-alimenta, e o aumento na produção de ANG gera um aumento do estímulo vasoconstrictor, gerando hipóxia renal, a qual favorece a retenção de sódio e água, com o conseqüente aumento da pressão arterial. À medida que a pressão arterial se eleva, a isquemia renal pode diminuir; caso isto ocorra, o balanço de sódio pode ser restabelecido completamente (pacientes resistentes a sal), ou parcialmente (pacientes sensíveis a sal), à custa de uma curva modificada de natriurese pressórica e hipertensão persistente (JOHNSON *et al.*, 2008).

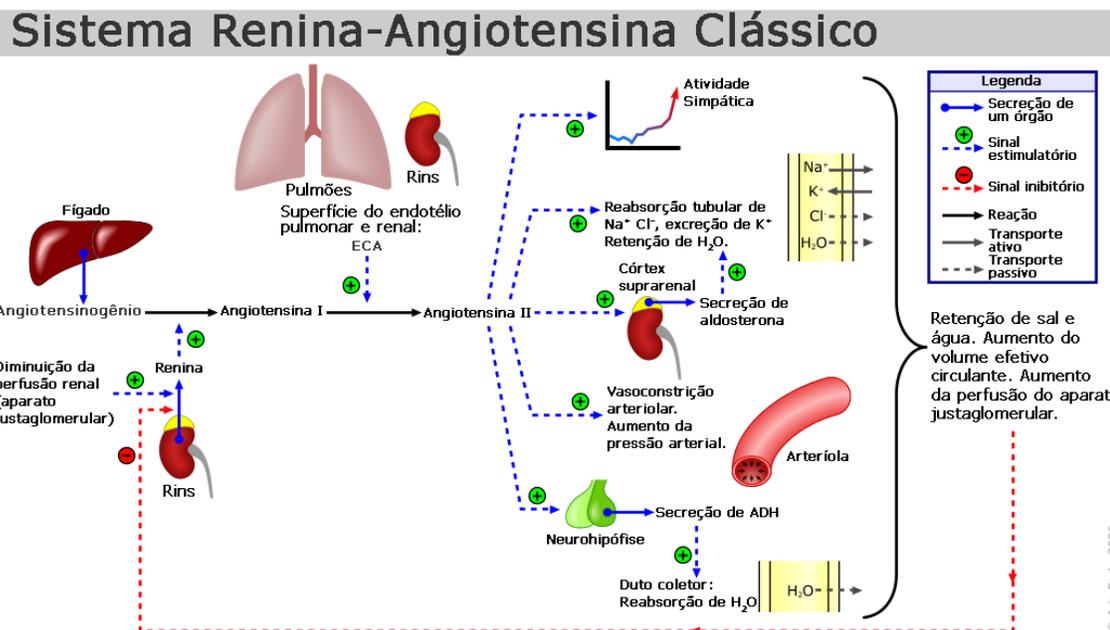
Há algum tempo a hipertensão vem sendo reconhecida como uma doença inflamatória, com efeitos importantes sobre o endotélio vascular e microvascular que, por sua vez, tem sido alvo de inúmeras pesquisas relacionadas aos mecanismos responsáveis pela hipertensão (SUEMATSU *et al.*, 2002). Um dos avanços atingidos por esta abordagem foi a identificação dos elementos do RAS em locais inesperados, como o epitélio mamário, que levaram a percepção de que há outros micro-sistemas, além do circulante, que podem consumir certos mediadores ou compensar o consumo destes por outros tecidos.

### 1.2.2.1 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (RAS)

O RAS é um sistema hormonal e, como toda a endocrinologia, vem sendo atualizado e aprofundado ao longo das últimas décadas, passando por importantes mudanças. Nos últimos anos, conceitos fundamentais, como a definição de hormônio, têm sido reformulados e atualizados. Os sistemas hormonais têm sido ampliados, tornando-se cada vez mais complexos e integrados uns com os outros (BOUILLE, 2003).

O RAS já foi considerado um sistema hormonal simples, com poucos elementos e interferências, responsável pelo controle da pressão arterial. Atualmente, ele é visto como uma complexa rede integrada, formada por inúmeros microsistemas locais que convergem no sistema circulatório. Diversos elementos foram acrescentados ao sistema clássico, tornando a correta identificação de seus mediadores cada vez mais difícil. Entretanto, o principal elemento do sistema, o mais conhecido e estudado, permanece sendo a manutenção dos níveis circulantes de angiotensina II (ANG), seu principal agente efetor (CAMPBELL, 1987, 2003).

Até a década de oitenta, o RAS era visto como um sistema hormonal simples (Figura 6), com os seguintes elementos: um pré-pró-hormônio (angiotensinogênio, produzido pelo fígado); uma enzima (renina, produzida pelos rins e responsável pela metabolização do angiotensinogênio); um pró-hormônio, a angiotensina I, produto da metabolização do angiotensinogênio pela renina e que em contato com uma segunda enzima produzida por células no pulmão, a enzima conversora de angiotensina (ECA), daria origem ao hormônio efetor, a angiotensina II (ANG) (Figura 6) que, por sua vez, seria responsável pelas diversas ações fisiológicas do sistema, importantes para a manutenção da pressão arterial. Entretanto, a partir do início década de 1980, diversos estudos deram pistas aos pesquisadores de que se faz necessário revisitarem estes conceitos e aprofundá-los (CAMPBELL, 1987).



**Figura 6 – Sistema Renina-Angiotensina Clássico.** Esquema do modelo clássico do sistema renina-angiotensina (adaptado de HOLLENBERG, 2006).

Atualmente, os sistemas hormonais são entendidos dentro dos conceitos de sinalização parácrina (local), autócrina (na própria célula) e, recentemente, intrácrina (intracelular), conceitos estes que vem sendo acompanhados e demonstrados também no RAS (Re, 2007). Além disso, diversos elementos estão sendo adicionados ao RAS na medida em que os mediadores de cada efeito são identificados com maior seletividade e precisão. Mais complexo e desafiador, o RAS parece ser menos hormonal e mais parácrino. O fígado e os rins ainda permanecem como os únicos órgãos com importância fisiológica para a produção, secreção e manutenção dos níveis circulantes de angiotensinogênio e renina, respectivamente (KRAMKOWSKI, MOGIELNICKI, BUCZKO, 2006). Entretanto, a ANG não é o único hormônio efetor conhecido do RAS. Praticamente todos os membros do sistema apresentam efeitos próprios. Já foi identificado um receptor que reconhece tanto a pró-renina quanto a renina ativa (NGUYEN *et al.*, 2002). Diversos metabólitos ativos foram descritos, diversas enzimas foram sugeridas *in vitro*, a conversão de angiotensina I em ANG não é exclusiva do pulmão, mas de todo o endotélio vascular e mesmo o endotélio não é o único tecido a



A meia-vida plasmática da ANG é relativamente curta (algo entre 10 segundos e 10 minutos) e, apesar disto, o leito venoso apresenta concentrações maiores do que o arterial, assim, vias alternativas de produção de ANG têm ganhado importância, de modo a explicar os níveis hormonais do leito venoso e a presença de ANG em animais *knock-out* para a ECA (CAMPBELL, 1987, 2003; KRAMKOWSKI, MOGIELNICKI, BUCZKO, 2006).

Após 100 anos da descoberta do RAS por Tigerstedt e Bergman, a compreensão do sistema permanece incompleta e obscura. A própria síntese de ANG é pouco compreendida. Diversas vias alternativas de produção de ANG foram sugeridas, mas a sua importância fisiológica continua incompreendida. Já foram descritas enzimas capazes de processar angiotensinogênio diretamente a ANG, sem a necessidade de síntese de angiotensina I, mas como animais nefrectomizados não apresentam níveis plasmáticos detectáveis de angiotensina II, a importância fisiológica destas vias é questionável. Além disso, outras enzimas que convertem angiotensina I a II, além da ECA, foram descritas, mas novamente, sua importância fisiológica é questionável. Se por um lado animais tratados com inibidores da ECA podem não apresentar níveis detectáveis de ANG, animais *knock-out* para a ECA apresentam ANG circulante (KRAMKOWSKI, MOGIELNICKI, BUCZKO, 2006).

Estudos recentes têm apresentado outras enzimas capazes de metabolizar a ANG e metabólitos da angiotensina I e/ou da II que apresentam diferentes efeitos e receptores. Acredita-se que alguns dos efeitos atribuídos a ANG possam ser consequências de sua metabolização em outros peptídeos efetores, como as angiotensinas III e IV geradas pela atividade das aminopeptidases A e N, respectivamente, como ilustrado na figura 7 (CAMPBELL, 2003; KRAMKOWSKI, MOGIELNICKI, BUCZKO, 2006).

### 1.2.2.1.1 RECEPTORES E METABÓLITOS DE ANGIOTENSINA

Acredita-se que existam pelo menos cinco receptores para os mediadores do RAS, mas, por enquanto, os receptores de angiotensina identificados são quatro: AT1, AT2, MAS1 (ou AT3) e IRAP (ou AT4).

O AT1 foi o primeiro receptor de angiotensina a ser descoberto, descrito, sequenciado e é o mais conhecido e estudado. AT1 é uma proteína integral de membrana do tipo receptor acoplado a proteína G. O receptor possui 359 aminoácidos, cerca de 41 KDa, e é o produto de 5 exons do gene *agtr1*, localizado no cromossomo 3 humano (CURNOW, PASCOW, WHITE, 1992). Ele é o responsável pelos efeitos clássicos do RAS na regulação da pressão arterial, no balanço hidroeletrólítico, na sede, e nos demais efeitos do sistema, geralmente, ativados em resposta a diminuição da pressão arterial ou da volemia (CAREY, SIRAGY, 2003). Ele também é o mediador do efeito proliferativo e angiogênico da ANG, tanto em células normais quanto tumorais (MUSCELLA et al, 2000; DE GASPARO et al., 2000). Sua afinidade é maior pela ANG, mas ele também é capaz de reconhecer outros metabólitos, como as angiotensinas III, IV e (1,7), por ordem de afinidade, de modo que efeitos derivados da sua ativação por estes metabólitos já foram atribuídos a ANG. O AT1 é o receptor majoritário durante a vida adulta humana, de modo que há células que o expressam em praticamente todos os tecidos humanos (DE GASPARO *et al.*, 2000).

O AT2 é um receptor normalmente associado a efeitos antagônicos aos de AT1. Ele também é um receptor acoplado à proteína G, possuindo 363 aminoácidos, cinco sítios de glicosilação, responsáveis pelas diferenças de peso molecular que variam entre 60 e 140 Kda e é o produto do gene *agtr2*, localizado no cromossomo X humano (DE GASPARO et al., 2000). O AT2 é majoritariamente expresso durante a vida embrionária (CAREY, WANG, SIRAGY, 2000). Parece que os efeitos por ele mediados são distintos durante o período

embrionário e a partir do nascimento. Durante a vida intra-uterina, ele está associado à via de um fator de transcrição chamado pax-2, que é responsável por efeitos de proliferação. A partir do nascimento, a capacidade de ativação de pax por AT2 é desfeita e, no indivíduo adulto, seus efeitos conhecidos são de vasodilatação, inibição da proliferação, ativação da apoptose, anti-angiogênese e natriurese. Quando há algum tipo de injúria tecidual e eventos de proliferação, reparo tecidual e regeneração são ativados, o AT2 volta a ser capaz de ativar pax-2 e ele se torna um receptor associado, não mais à morte, mas, sim, a regeneração (TOUYZ, BERRY, 2002; ZHANG, MOINI, INGELFINGER, 2004). Recentemente, foi demonstrado que o seu agonista principal é a angiotensina III, mas ele também é capaz de reconhecer a ANG (VAN ESCH *et al.*, 2008).

AT3 têm sido uma nomenclatura rara na literatura. Artigos mais antigos costumam citá-lo, enquanto os artigos mais recentes apenas a AT1, AT2, MAS1 e IRAP/AT4. Não fica claro se o MAS1 é o antigo AT3, mas há uma seção especial sobre o RAS na página oficial da Sigma-Aldrich, onde AT3 aparece como sendo o receptor de angiotensina<sub>1,7</sub>, e conseqüentemente, mas<sub>1</sub>.<sup>3</sup> MAS1 é uma proteína integral de membrana, acoplado a proteína G, possui 325 aminoácidos e cerca de 37 KDa (CANALS *et al.*, 2006). A angiotensina<sub>1,7</sub> é um mediador antiproliferativo, que se encontra, atualmente, em testes clínicos para o tratamento de diversos tumores.<sup>4</sup> Fisiologicamente, seus efeitos ainda não são adequadamente compreendidos, mas, farmacologicamente, ele é capaz de contrabalançar os efeitos cardíacos e baroreflexos da ANG, agindo como um vasodilatador e antidiurético endógeno (SANTOS *et al.*, 2003; GEMBARDT *et al.*, 2008).

---

<sup>3</sup> [http://www.sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Biochemicals/Enzyme\\_Explorer/Key\\_Resources/Plasma\\_Blood\\_Protein/Renin\\_Angiotensin\\_System.html](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Key_Resources/Plasma_Blood_Protein/Renin_Angiotensin_System.html)

<sup>4</sup> <http://www.clinicaltrials.gov/>, código NCT00471562.

O AT4 é mais conhecido como IRAP (*insulin-regulated membrane aminopeptidase*), mas seu nome oficial na base Entrez Gene é leucyl/cystinyl aminopeptidase (LNPEP). Ela é uma zinco-metalopeptidase com 1025 aminoácidos, cerca de 165 KDa e produto do gene *Inpep*, localizado no cromossomo 5 humano (THOMAS, MENDELSON, 2003; DE GASPARO et al., 2000). Apesar de ser conhecido como receptor de angiotensina IV, já que ela possui alta afinidade por este peptídeo, a angiotensina IV atua inibindo a atividade catalítica, aparentemente, constitutiva, desta enzima (ALBISTON et al., 2001). A inativação de AT4 pela ligação de angiotensina IV apresenta alguns efeitos antagônicos a AT1, como a liberação de óxido nítrico, com consequente redução dos fluxos sanguíneos renal e mesentérico, e elevação do fluxo sanguíneo cerebral, ou seja, a atividade basal de AT4 parece favorecer alguns dos efeitos de AT1 (DE GASPARO et al., 2000), mas ainda se sabe pouco sobre a função fisiológica desta proteína.

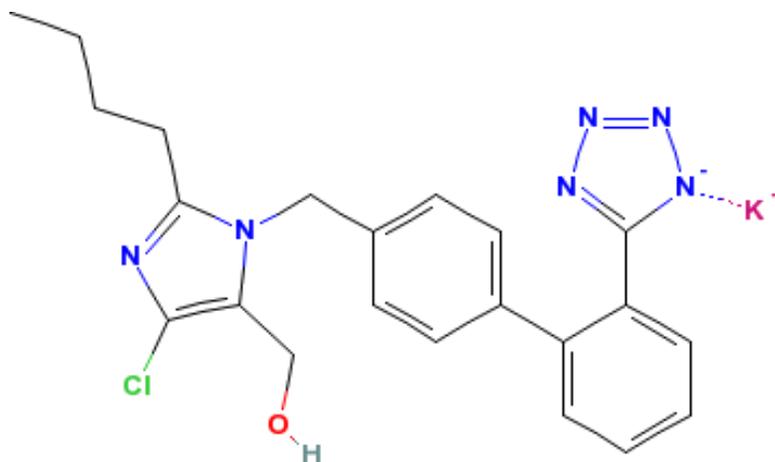
Recentemente, um novo tipo de receptor de angiotensina foi identificado no cérebro de ratos e que não corresponde a nenhum dos tipos anteriores e, portanto, um receptor ainda não-descrito que costuma ser chamado de não-AT1 e não-AT2 (KARAMYAM *et al.*, 2008).

Em nosso modelo de estudo, as células de câncer de mama MCF-7, apresentam de forma constitutiva os elementos clássicos do RAS ([pro]renina, angiotensinogênio, ECA1, AT1 e AT2) e respondem ao estímulo por ANG através do aumento da proliferação (MUSCELLA *et al.*, 2003; TAHMASEBI *et al.*, 2006). Desta forma, utilizamos a ANG no intuito de verificar uma possível ação deste hormônio sobre a resposta à quimioterapia das células MCF-7. Ainda não são conhecidos outros receptores, outras enzimas de conversão ou a produção dos metabólitos de ANG nesta linhagem, mas certamente fazem parte deste complexo sistema celular.

### 1.2.3 TRATAMENTO

O tratamento da hipertensão é baseado em algumas classes de fármacos capazes de modular a pressão arterial, seja através de seus mecanismos de curto ou longo prazo, dependendo da resposta clínica esperada. Assim, estão disponíveis: antagonistas do receptor de angiotensina do tipo 1 (AT1); inibidores da enzima conversora de angiotensina; diuréticos; bloqueadores betas ou alfa-adrenérgicos; bloqueadores de canais de cálcio; agonistas alfa-centrais; e suas possíveis combinações (SAC, 2008).

Entre os antagonistas do receptor AT1, um dos mais prescritos é a losartana potássica (LOS), cuja estrutura molecular encontra-se na figura 8, e que foi originalmente desenvolvida pela Merck Sharp & Dohme. A losartana potássica é comercializada no Brasil desde 1995 e ela movimenta um mercado de cerca de 160 milhões de reais ao ano. Ela é considerada um medicamento barato, com poucos efeitos colaterais e bastante eficaz no controle da pressão arterial (LVBA, 2008).



**Figura 8 – Estrutura molecular do antagonista do receptor 1 de ANG, LOS.** Imagem obtida do *PubChem Compound*<sup>5</sup>, registro 11751549.

<sup>5</sup> [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=11751549&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=11751549&loc=ec_rcs)

No presente trabalho, escolhemos a LOS para avaliar a interação entre este medicamento anti-hipertensivo e um quimioterápico, por sua característica de ser um antagonista do receptor 1 da angiotensina II (AT1), o qual medeia o efeito mitogênico da ANG em células de câncer de mama em cultura (MUSCELLA *et al.*, 2002).

#### **1.2.4 ANGIOTENSINA II, ANTI-HIPERTENSIVOS E CÂNCER DE MAMA**

Em 1975, Dyer *et al.* relataram uma maior mortalidade de pacientes hipertensos masculinos com alguns tipos de câncer, dentre estes, o de mama. Apesar de não saber o motivo, os autores sugeriram que a medicação anti-hipertensiva utilizada pudesse ser a responsável por este fato. Desde então, inúmeros trabalhos apontam uma correlação positiva entre a hipertensão e o aumento da mortalidade por câncer, seja pela doença *per se*, seja pela medicação anti-hipertensiva (DYER *et al.*, 1975; SVÄRDSUDD, TIBBLIN, 1979; RAYNOR *et al.*, 1987; KHAW, BARRETT-CONNOR, 1984; GOLDBOURT *et al.*, 1986; TAYLOR *et al.*, 1991; CLAUSEN, JENSEN, 1992; HAMET, 1996; PEETERS *et al.*, 1998; SOLER *et al.*, 1999; CHOW *et al.*, 2000; WEIDERPASS *et al.*, 2000; GROSSMAN, MESSERLI, GOLDBOURT, 1999, 2001; FURBERG, THUNE, 2003).

O uso de medicamentos anti-hipertensivos é muito discutido. Há algum tempo tais medicamentos eram tidos como inimigos cruéis que poderiam aumentar o risco de câncer (FRASER, PHILLIPS, BEESON, 1990; TAYLOR *et al.*, 1991), entretanto, recentemente, outros estudos têm demonstrado que alguns deles podem, até mesmo, ser vistos como candidatos a adjuvantes na quimioterapia do câncer (SMITH, MISSAILIDIS, 2004, LARGENT *et al.*, 2006; MOLTENI *et al.*, 2006).

Diversos trabalhos já associaram várias classes de anti-hipertensivos ao risco de câncer, entretanto, nenhum foi confirmado em grandes estudos populacionais. Dentre estas

associações, a que parece ser mais freqüente e possivelmente verdadeira é o uso de diuréticos, especialmente os tiazídicos e os poupadores de potássio (LEE *et al.*, 2003). Por exemplo, o uso de diuréticos foi recentemente associado a maior incidência e/ou mortalidade por câncer de mama, particularmente associada à obesidade (LARGENT *et al.*, 2006). No entanto, os defensores do uso de diuréticos afirmam que, mesmo que eles estejam associados a um pequeno aumento no risco de câncer (inclusive o de mama), isto não é comparável aos benefícios obtidos com o controle da pressão arterial, especialmente em relação à diminuição da mortalidade por doenças cardiovasculares (SYTKOWSKI *et al.*, 1996; GOON , MESSERLI, LIP, 2006).

Entre as demais classes de anti-hipertensivos, os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) já foram associados a um maior risco de câncer (apud HAMET, 1996), enquanto estudos recentes utilizando captopril têm demonstrado um efeito antiproliferativo importante, chegando a testes clínicos como adjuvante na quimioterapia do melanoma (MOLTENI *et al.*, 2006). Assim, por enquanto, os antagonistas do receptor 1 da angiotensina II parecem ser a única classe de anti-hipertensivos a não estarem associados a um maior risco de câncer, e vêm sendo associados à inibição do crescimento e/ou morte das células de câncer, inclusive, de mama (MOLTENI *et al.*, 2006).

Em 1997, foi identificada a presença de receptores 1 e 2 para ANG em amostras de tecido mamário normal e tumoral obtidos de pacientes internados no Hospital *Queen Mary*, no Reino Unido (INWANG *et al.*, 1997). No ano seguinte, foi identificada a presença de transcritos do gene da (pro)renina em tecido mamário normal e neoplásico, não só um forte indicativo da existência de um RAS mamário, mas também da sua importância para o câncer de mama (TAHMASEBI *et al.*, 1998).

O efeito proliferativo da ANG foi confirmado, de forma indireta, através da inibição do crescimento de células tumorais injetadas em camundongos pelo tratamento com LOS, um

medicamento anti-hipertensivo, antagonista do receptor AT1 (RIVERA *et al.*, 2001). Além disto, foi verificado o aumento da expressão de integrina  $\beta$ 1 em células MCF-7, de câncer de mama humano, tratadas com ANG (BERRY *et al.*, 2000), apesar de não se saber o receptor responsável pelo efeito observado. O mesmo grupo identificou, através de um ensaio de invasão que utiliza células de câncer de mama humano, que o bloqueio específico de integrina  $\beta$ 1 com anticorpos monoclonais impede a invasão tecidual, o que correlaciona a expressão desta proteína, assim como o seu aumento induzido por ANG, à uma maior malignidade tumoral (BERRY, 2003).

Em 2002, o grupo de Marsigliante demonstrou, na mesma linhagem MCF-7, a presença dos receptores AT1 e AT2 (MUSCELLA *et al.*, 2002). O receptor AT1 é o principal receptor expresso ao longo da vida adulta, enquanto o receptor AT2 é majoritariamente expresso na vida embrionária (GRADY *et al.*, 1991; AKISHITA *et al.*, 1999).

Em 2006, Tahmasebi *et al.* publicaram o trabalho que encerra a discussão sobre a presença de um possível RAS mamário, localizando todos os seus elementos (angiotensinogênio, (pro)renina, ECA, AT1 e AT2) em tecido humano normal, tumoral e em células MCF-7, demonstrando que as funções do sistema RAS vão muito além da homeostase de sódio, potássio e do controle da pressão arterial.

Recentemente, um anticorpo contra o receptor AT1 foi desenvolvido e testado em três linhagens de câncer de mama, MCF-7, MDA-MB-231 e T47D. Os resultados apresentaram uma inibição do crescimento celular comparativamente mais eficaz que os atuais antagonistas deste receptor e estes autores pretendem avaliar seu potencial clínico contra o câncer de mama (REDONDO-MÜLLER *et al.*, 2008).

Em uma revisão recente, Molteni e colaboradores compararam seus dados com diversos trabalhos anteriores, no intuito de justificar o início de ensaios clínicos em humanos

para o uso de inibidores da ECA e de antagonistas dos receptores de ANG como adjuvantes na quimioterapia do câncer (MOLTENI *et al.*, 2006).

Pelo que foi visto acima, o uso de inibidores da ECA e de antagonistas de ANG tem sido utilizado experimentalmente no tratamento de câncer de mama com resultados promissores. Como uma parte considerável dos pacientes com câncer é também hipertensa, o uso de tais medicamentos poderia ajudar no combate às duas doenças simultaneamente. No entanto, pouco se sabe sobre uma possível interação entre esses medicamentos e a quimioterapia do câncer, especialmente em pacientes com níveis elevados de ANG.

## **OBJETIVOS**

**Pedi, e dar-se-vos-á;  
buscai e achareis;  
batei e abrir-se-vos-á...**

**Jesus  
(Mateus, 7:7)**

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Nosso objetivo foi estudar as possíveis interações, positivas ou negativas, entre o DOX, a ANG e a LOS, com o intuito de verificar se esta medicação anti-hipertensiva interfere na resposta celular ao quimioterápico, utilizando um modelo celular de câncer de mama.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Tendo em vista observar as interações entre um inibidor do antagonista AT1 (LOS) e um antitumoral (DOX), faz-se necessário confirmar o efeito proliferativo da ANG em células tumorais e o efeito citotóxico conhecido da DOX, assim, verificaremos se:

- DOX é capaz de diminuir a viabilidade celular, mimetizando a quimioterapia;
- ANG aumenta a proliferação das células MCF-7 em nossas condições experimentais;
- LOS é capaz de reverter o efeito proliferativo da ANG;
- ANG altera a resposta das células de câncer de mama à quimioterapia;
- LOS é capaz de alterar a sensibilidade das células tumorais à quimioterapia com DOX;
- há uma interação entre LOS e/ou ANG com DOX e qual o seu provável mecanismo.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

**O mundo é um lugar perigoso de se viver,  
Não por causa daqueles que fazem o mal,  
Mas sim, por causa daqueles que observam  
E deixam o mal acontecer.**

**Albert Einstein**

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES

Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), soro fetal bovino, tripsina-EDTA, penicilina e estreptomicina foram comprados da Invitrogen do Brasil (São Paulo/SP, Brasil).

FACST<sup>TM</sup> Lysing Solution e tubos Falcon foram comprados de BD Biosciences (San Jose, California, EUA).

LOS foi comprada de Merck, Sharp & Dohme do México (Colônia Xotepingo, Distrito Federal, México).

Azul de tiazol (MTT), ANG, DOX, trizma base, HEPES, tween 20, dodecil sulfato de sódio (SDS), ditiotretol, 2-mercaptoetanol, azul de bromofenol e bicarbonato de sódio foram comprados de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

Cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio monobásico foram comprados de Reagen Quimibrás Indústrias Químicas S.A. (Rio de Janeiro/RJ, Brasil).

O anticorpo policlonal A23 (anti-MRP1, coelho), o anticorpo monoclonal BXP-21 (anti-BCRP, camundongo) e o monoclonal C219 (anti-P-gp, camundongo) foram comprados da AXXORA, através da distribuidora Bioagency (São Paulo/SP, Brasil). Os anticorpos secundários fluorescentes: Alexa 488 (camundongo e coelho), padrão de peso molecular *Full-Range Rainbow* e membrana de nitrocelulose Immobilon-P Millipore foram comprados da Invitrogen do Brasil (São Paulo/SP, Brasil).

#### 3.2 CULTURA DE CÉLULAS

A linhagem celular MCF-7 (Banco de Células do Rio de Janeiro, registro CR119) é a mais estudada e mais bem caracterizada linhagem celular humana de câncer de mama. Ela foi

obtida do fluido pleural de uma paciente caucasiana de 69 anos, em pós-menopausa, que já havia sido previamente tratada com duas mastectomias, sessões de radioterapia e terapia hormonal anti-estrogênica com tamoxifeno (SOULE *et al.*, 1973).

As células de câncer de mama MCF-7 foram cultivadas em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), na presença de penicilina e estreptomicina, suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37°C.

As passagens foram realizadas a cada 2-3 dias usando tripsina-EDTA. O subcultivo foi realizado lavando-se as células duas vezes com salina tamponada fosfatada (PBS: 8,0 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 2,17 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), adicionando-se 1mL de tripsina-EDTA 1X e incubando-se por 5 min., a 37°C, para as células se soltarem da garrafa de cultura. Após a incubação, foram adicionados 3 mL de DMEM 10% SFB, de modo a inativar a tripsina. O volume contendo as células foi transferido a tubos Falcon de 15mL que foram, então, centrifugados por 3 min a 2500 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuspensão e homogeneizado em 4 mL de DMEM 10% SFB. Este volume foi dividido em duas partes: 1mL foi devolvido à garrafa de cultura para continuação da linhagem, enquanto os 3 mL restantes foram utilizados para cultivo em placas, de modo a serem utilizados nos devidos experimentos. Uma alíquota de 10µL foi retirada do tubo Falcon para contagem em câmara melhorada de Neubauer, de acordo com as orientações do fabricante.

Após a contagem das células, a concentração celular foi ajustada à necessidade de cada experimento e as células foram transferidas para placas de cultura de 96, 24 ou 6 poços, dependendo do experimento.

Em todos os experimentos, as incubações foram realizadas em uma câmara úmida colocada dentro de uma estufa de células a 37°C com meio de cultura tamponado com HEPES

e bicarbonato de sódio, a fim de manter o pH em torno de 7,4 e evitar a evaporação do meio, o que alteraria a osmolaridade do meio e concentração dos seus solutos.

### 3.3 ENSAIOS DE AZUL DE TIAZOL (MTT)

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de azul de tiazol (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolium, ou MTT) (MOSMANN, 1983).

O MTT mede a viabilidade celular baseado na redução do sal de MTT (amarelo) e conseqüente produção de cristais de formazana (azul-violáceo) pelas células viáveis. O mecanismo celular responsável pela sua redução ainda é discutido, mas a técnica é considerada um método de avaliação da quantidade de células viáveis (MOSMANN, 1983; LIU *et al.*, 1997; BERNAS, DOBRUCKI, 1999, 2002, 2004).

Inicialmente, foi realizada uma curva de concentração de células, de modo a avaliar as concentrações de células ideais para cada condição desejada. Diferentes concentrações de células por poço ( $5 \times 10^2$ ,  $10^3$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $10^5$  células por poço) foram plaqueadas em triplicata em poços de placas de 96 poços, em DMEM contendo 10% de SFB, incubados em estufa a 37°C. Após 24h, o meio de cultura foi renovado e a cada 24 h um novo experimento de MTT foi realizado, de modo que se obtiveram dados até 72h após a troca do meio. Deste modo, foi possível estabelecer o tempo e as concentrações de células para os demais experimentos de MTT.

O critério empregado na classificação das células MCF-7 como células em fase de crescimento foi a maior diferença positiva de densidade óptica encontrada entre dois experimentos consecutivos, ou seja, subtraindo-se a densidade óptica de um determinado ponto da curva pelo seu correspondente anterior. O critério de definição como células em fase

estacionária foi a presença de um platô, identificado pela menor diferença de densidade óptica entre os três tempos consecutivos.

Para cada experimento, as células ( $10^4$ ,  $2 \times 10^4$  ou  $5 \times 10^4$  células por poço) foram distribuídas em placas de 96 poços, em triplicatas, e incubadas por 24 horas para assegurar uma adesão uniforme das células. No dia seguinte, foram preparadas soluções intermediárias de DOX e ANG concentradas 2X. No MTT com DOX, as soluções intermediárias foram preparadas em DMEM com 10% de SFB, enquanto no MTT com ANG as soluções foram preparadas em DMEM sem soro, de modo a observar a atividade proliferativa de ANG independente de soro fetal. O meio de cultura foi retirado e as células foram gentilmente lavadas com 200  $\mu$ L de PBS por cerca de um minuto. O PBS foi descartado e acrescentou-se 100  $\mu$ L de meio de cultura aos poços (no MTT com DOX, o meio utilizado foi DMEM com 10% de SFB e no MTT com ANG, DMEM sem soro). Em seguida, 100  $\mu$ L de solução de DOX ou ANG 2x concentradas foram adicionados aos poços, totalizando 200  $\mu$ L de volume total. Assim, as triplicatas foram tratadas com diferentes concentrações de ANG ( $10^{-6}$  a  $10^{-11}$  M), DOX (50 nM a 1  $\mu$ M) ou veículo (DMEM 10% SFB ou DMEM sem soro), pelo período de tempo desejado (24, 48 ou 72 h).

Após a incubação, iniciou-se o ensaio de MTT propriamente dito, que consiste na adição de 20  $\mu$ L de solução de MTT (5 mg/mL) diluída em PBS estéril a cada poço da placa. Esta placa é mantida no escuro, a 37 °C, por 4 horas, que é o tempo necessário à metabolização do sal de MTT e, conseqüente, formação dos cristais de formazana, que conferem a cor azul-violácea característica do ensaio. Após este tempo, os sobrenadantes foram removidos e os cristais de formazana foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). A densidade óptica dos poços foi medida em leitor de placas (Benchmark, BioRad), a 570 nm tendo por referência o filtro de 630 nm.

### **3.4 VIABILIDADE CELULAR POR CONTAGEM DE CÉLULAS COM AZUL DE TRYPAN**

Para avaliar os possíveis efeitos de proliferação, inibição do crescimento e/ou morte celular, realizamos o ensaio de contagem de células na presença de azul de Trypan, de modo a avaliar as possíveis interações entre as substâncias estudadas e seus efeitos sobre as células.

A contagem de células é a técnica mais confiável de avaliação dos fenômenos de proliferação e inibição da proliferação, já que ela contabiliza o número total de células presentes em um poço após um determinado período de tempo.

O azul de Trypan é um corante azul e hidrofílico, que funciona como um marcador de morte celular, principalmente por necrose. Por ser um cátion, ele é incapaz de atravessar a membrana de células viáveis. Durante o processo de morte celular por necrose, ou durante a apoptose tardia, a membrana plasmática é permeabilizada, o que permite que o corante penetre nas células e se ligue com grande afinidade aos radicais negativos presentes nas proteínas intracelulares. Dessa forma, esta técnica permite a quantificação da morte celular durante a contagem de células.

Para esses experimentos, as células foram cultivadas em placas de 24 poços ( $10^4$  cels/poço) e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas em DMEM 10% SFB. O meio de cultura foi, então, substituído por 460  $\mu\text{L}$  de DMEM sem soro. As diluições de DOX, ANG e LOS referentes a cada poço foram, então, preparadas concentradas 2 vezes, ou seja,  $2 \times 10^{-9}$  M de ANG e/ou LOS, e 800 nM de DOX, assim como suas possíveis combinações. Após o preparo das diluições, 500  $\mu\text{L}$  do volume do respectivo tubo contendo as soluções intermediárias, previamente preparadas, foram adicionados aos poços. Cerca de 20 a 30 minutos após a adição das substâncias de interesse, 40  $\mu\text{L}$  de SFB foram adicionados aos poços, atingindo a concentração final de 2% de SFB, suficiente para garantir a viabilidade do experimento por

pelo menos 72 h. Após a incubação de 72 h, o meio de cultura foi transferido para microtubos de fundo cônico, para a recuperação das células mortas, que ficam soltas no sobrenadante. Os poços foram gentilmente lavados com PBS por um minuto, que também foi recuperado em microtubos de fundo cônico, e as células aderidas foram incubadas por 15 min em tripsina-EDTA na presença de azul de Trypan 0,4%. Durante a incubação da placa, os microtubos foram centrifugados por 6 minutos a 2500 rpm, o meio e o PBS foram descartados e os precipitados foram ressuspensos na mesma solução de tripsina-azul de Trypan utilizada para soltar as células dos poços. Assim, esperava-se reunir todas as células de cada poço, viáveis ou não, em uma única solução, cujas alíquotas foram contadas pelo menos duas vezes em câmara melhorada de Neubauer.

### **3.5 MEDIDAS DO ACÚMULO DE DOX**

A DOX é uma substância citotóxica naturalmente fluorescente, que apresenta picos de excitação e emissão de 470 e 590 nm, respectivamente, o que permite que a fluorescência celular seja utilizada como uma medida de sua concentração intracelular.

Trabalhos anteriores de Cullinane et al, em 2000, demonstraram que a entrada de DOX em células MCF-7 ocorre aproximadamente nas primeiras 4 h de incubação com o quimioterápico, enquanto a formação de ligações cruzadas de DOX com o DNA nuclear e mitocondrial somente atinge sua saturação por volta de 8 h após o início do tratamento. A cinética de formação de adutos de DNA foi semelhante à formação de ligações cruzadas, indicando que as principais lesões ocorrem durante o processo de incorporação da DOX ao DNA, portanto, utilizamos as medidas de acúmulo de DOX após às primeiras 4 h como um indicador de acúmulo intracelular total, enquanto a medida de 24 h considera que as células já atingiram a total saturação do DNA (CULLINANE et al, 2000).

As células foram cultivadas em placas de 24 poços numa concentração de  $5 \times 10^5$  células por poço, em DMEM com 10% de SFB e incubadas a 37°C por 24 h. No dia seguinte, o meio de cultura foi substituído por 500  $\mu$ L de DMEM sem soro, ao qual foram adicionados outros 500  $\mu$ L de soluções intermediárias de ANG ( $2 \times 10^{-9}$  M); LOS ( $2 \times 10^{-9}$  M); DOX (800 nM) e/ou suas combinações, para incubação a 37°C por 4 ou 24 h. Após o tempo desejado, as células foram removidas dos poços com tripsina-EDTA, transferidas para tubos Falcon específicos para citometria de fluxo e levadas para análise em um citômetro BD FACScan. A quantificação do acúmulo intracelular de DOX foi medida em canal FL-3, com excitação em 488 nm e filtro de emissão de amplo espectro LP 650.

### **3.6 MICROSCOPIA ÓPTICA E DE FLUORESCÊNCIA**

Os experimentos de microscopia óptica foram realizados seguindo-se os mesmos passos que os demais experimentos nos quais eles foram baseados, tanto o de contagem de células quanto o de acúmulo de DOX, de modo que pudessem ser um retrato fiel da morfologia das células, mas com a diferença que, após o tempo de incubação desejado, as células não foram retiradas da placa de 24 poços por tripsinização, para a perfeita observação ao microscópio.

No experimento equivalente à contagem de células a placa foi levada a um microscópio Zeiss Axiovert 100 próprio para fotomicrografias em placas, com objetiva de 40x com correção para distorção causada pelo plástico. Acoplado ao microscópio óptico, existe uma câmera fotográfica digital Zeiss AxioCam, que permite o registro das imagens.

No experimento de localização do acúmulo de DOX, as células foram cultivadas sobre lamínulas redondas dentro dos poços de placas de 24 poços. Ao final da incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas por 30 min em formalina e as lamínulas foram

colocadas sobre lâminas e vedadas com esmalte. As lâminas foram levadas a um microscópio Axiovert 100 adequado à captação de imagens de epifluorescência, com objetiva de 40x e as fotomicrografias foram realizadas por uma câmera digital Kontron.

### **3.7 EXPRESSÃO DOS TRANSPORTADORES MDR: WESTERN BLOT**

Realizamos um immunoblotting para verificar a expressão dos transportadores da superfamília ABC que viriam a ser posteriormente estudados. Para tanto, células MCF-7 ( $1 \times 10^6$  por poço) foram cultivadas em placas de 6 poços contendo DMEM 10% SFB por 24 horas. Após esta incubação, o meio de cultura foi substituído por meio novo e re-incubado por mais 48 h. Após este tempo, as células foram lisadas em 50  $\mu$ L de tampão de amostra de Laemmli (4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol e 0.125 M Tris HCl, pH aproximado de 6,84), dos quais 10  $\mu$ L foram diluídos em solução tampão para dosagem de proteína (94  $\mu$ L de SDS 5%, 2  $\mu$ L de azul de bromofenol 0,04% e água ultra-pura qsp 150  $\mu$ L) pelo Método de Lowry (LOWRY, 1951).

A corrida foi realizada em gel desnaturante de poliacrilamida 7 %. Foram adicionados 100  $\mu$ g de proteína por poço, calculados a partir da dosagem de proteína pelo método de Lowry.

Para a corrida e transferência foi utilizado o kit Mini-PROTEAN Bio-Rad. A corrida foi feita a 120mV, à temperatura ambiente, por aproximadamente 80 minutos e utilizando-se um padrão de peso molecular *Full-range Rainbow*.

Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (350 mA, -20°C) por duas horas. Após a transferência, as proteínas foram incubadas em solução de bloqueio (usando-se o kit Western Breeze, Invitrogen) por 30 minutos, à temperatura ambiente. Ao final, foram lavadas duas vezes com água deionizada por 5 minutos

e incubadas com 2 mL de anticorpo primário para cada proteína de interesse, diluídos 1:200 em solução de bloqueio, por uma hora. Após incubação com anticorpo primário, as membranas foram lavadas três vezes, por cinco minutos, em solução de lavagem própria do kit. Em seguida, as membranas foram incubadas com 3 mL de anticorpo secundário do próprio kit, (coelho ou camundongo), por trinta minutos.

Após o anticorpo secundário, as membranas foram novamente lavadas em solução de lavagem três vezes, cinco minutos cada, e, em seguida, novamente lavagens com 20 mL de água deionizada, por cinco minutos cada lavagem. As membranas foram reveladas incubando-se com 2 mL de solução cromogênica (fosfatase alcalina) do próprio kit, pelo tempo necessário à adequada visualização.

### **3.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS MDR POR CITOMETRIA DE FLUXO**

As células foram cultivadas em placas de 24 poços numa concentração de  $5 \times 10^5$  células por poço em DMEM 10% SFB e incubadas a 37 °C por 24 h, de modo a assegurar uma adesão homogênea das células ao poço. No dia seguinte, o meio de cultura foi substituído por 1 mL de DMEM sem soro adicionado de 1 mL de ANG ( $2 \times 10^{-6}$  a  $2 \times 10^{-10}$  M); LOS ( $2 \times 10^{-9}$  M), e com a combinação previamente preparada de ANG ( $2 \times 10^{-9}$  M) e LOS ( $2 \times 10^{-9}$  M). A placa foi incubada a 37 °C, por 48 h. Ao final da incubação, as células foram gentilmente lavadas duas vezes com 5 mL de PBS, removidas dos poços com tripsina-EDTA, transferidas para microtubos de 1,6 mL e centrifugadas a 2500 rpm por 5 min. Os sobrenadantes foram descartados e foram acrescentados 200 µL de solução de fixação e permeabilização (1X BD FACS Lysing Solution). Após 30 min à temperatura ambiente, para a adequada fixação e permeabilização das células, foram acrescentados 1 mL de solução de bloqueio (PBS+5%

SFB). Após 30 min. à temperatura ambiente, as células foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. O precipitado de células foi incubado e homogeneizado com 10 µL de solução do anticorpo primário, não conjugado, diluído 1:100 em PBS+2% SFB. Após incubação de 1h com o anticorpo primário, as células foram lavadas com 1 mL de PBS Tween 0,05 % (PBS-T), centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas por 30 min. em 10 µL de solução de anticorpo secundário (Alexa 488, anti-mouse, diluído 1:1000 em PBS+2% SFB). Após este tempo, adicionou-se 1 mL de PBS-T, centrifugou-se, o sobrenadante foi descartado e as células foram transferidas em 150µL de PBS para microtubos Falcon específicos para aquisição das amostras por um citômetro de fluxo (BD FACScan). A fluorescência do anticorpo Alexa 488 foi detectada no canal FL-1.

### **3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todos os experimentos foram analisados utilizando-se o teste de análise de variâncias (*one-way* ANOVA), com intervalos de confiança de 99%, seguidos de pós-teste de Dunnett ou de Bonferroni todos contra todos.

## **RESULTADOS**

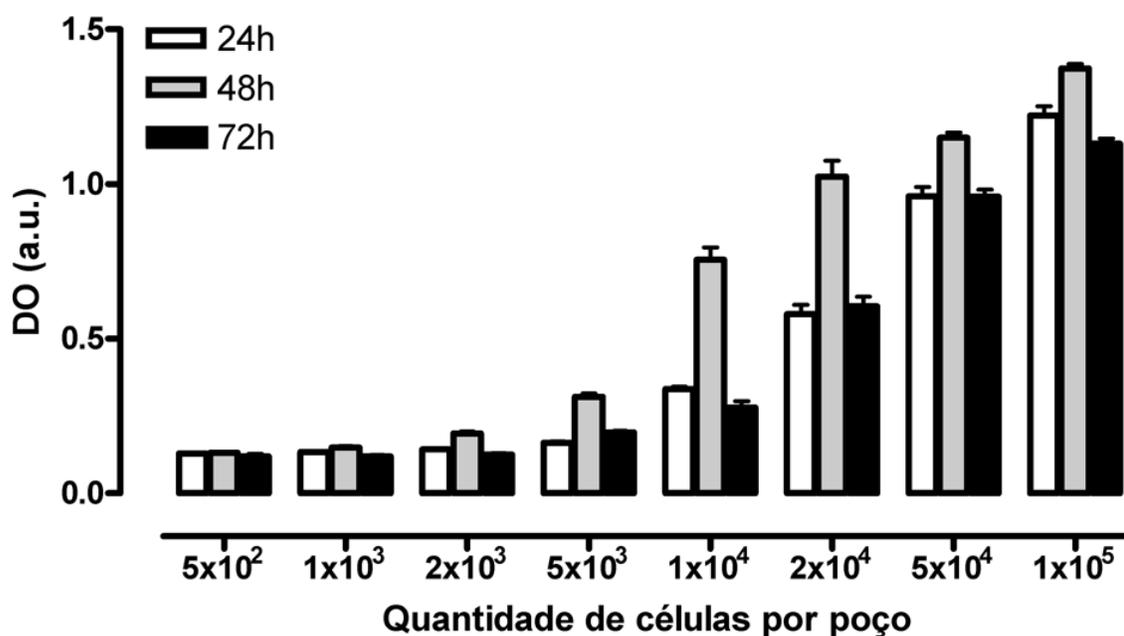
**Se quiseres que uma coisa se faça,  
Encarrega-a a uma pessoa ocupada.**

**(provérbio chinês)**

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS

As concentrações de células e o tempo do ensaio de MTT foram determinados através de um experimento piloto realizado com diferentes concentrações de células incubadas apenas em meio de cultura com 10% de SFB por até 72h após a troca do meio, ou seja, 96 horas após o plaqueamento, como descrito no item 3.3. Após cada incubação desejada, foi realizado um ensaio de MTT (Figura 9).



**Figura 9 – Curva de concentração de células.** Diferentes quantidades de células por poço foram plaqueadas em placas de 96 poços, o meio de cultura foi trocado, e as placas foram incubadas a 37°C por até 72 h. Experimento piloto (n=1). As barras de erro representam o erro padrão da triplicata.

Como observado na figura 9, as concentrações de células menores que  $1 \times 10^4$  células por poço não apresentaram aumento da densidade óptica em nenhum dos tempos observado, sugerindo que as células estejam em fase lag de crescimento nestas condições.

As concentrações de  $1$  e  $2 \times 10^4$  células por poço apresentaram aumento perceptível da densidade óptica entre os tempos de 24 e 48 h, seguida de uma queda brusca de viabilidade entre 48 e 72 h, sugerindo que, nestas condições, as células estejam em intensa proliferação (fase de crescimento) durante as primeiras 48 h, após o qual, haja um esgotamento dos nutrientes do meio, e as células, então, entram em fase de declínio. Ao final da fase de crescimento (48 h), a concentração de  $2 \times 10^4$  células por mL apresentou uma DO mais próxima do valor ideal de 1,0.

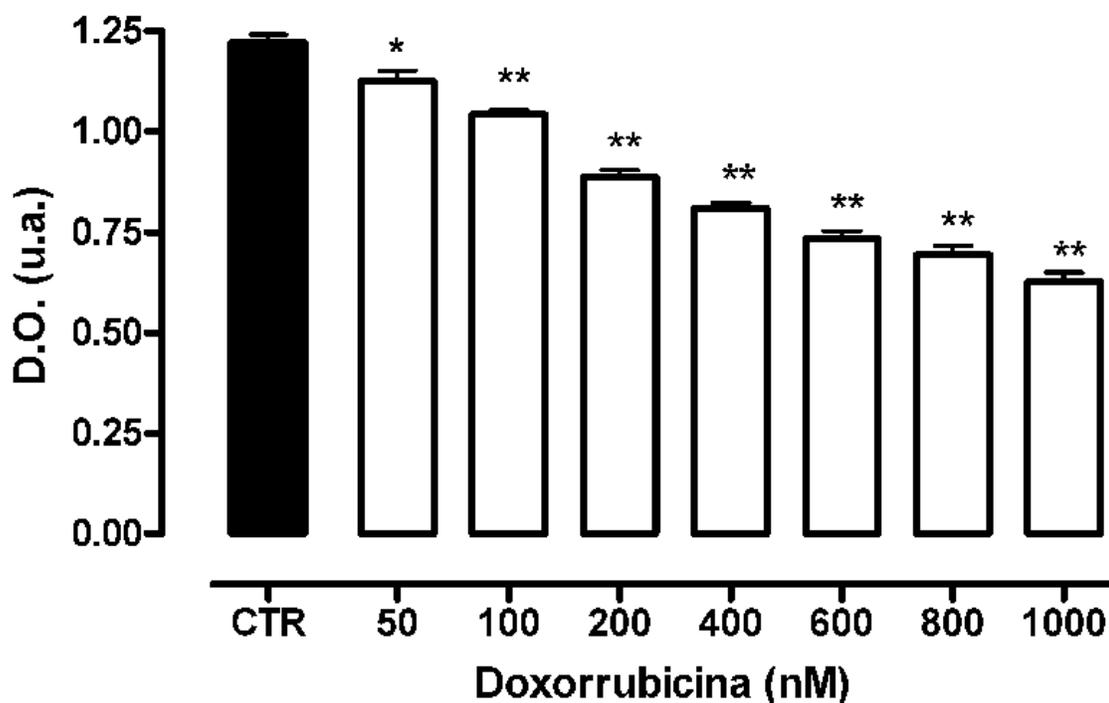
As concentrações de  $5 \times 10^4$  e  $1 \times 10^5$  células por poço apresentaram discreta variação da viabilidade celular, sugerindo que estas sejam células permaneçam em fase estacionária, com um menor metabolismo.

## 4.2 CITOTOXICIDADE DA DOX EM MCF-7

A citotoxicidade da DOX foi avaliada pelo ensaio de MTT, como descrito no item 3.3. As células MCF-7 ( $2 \times 10^4$  células por poço) foram cultivadas por até 96 horas, tendo seu meio de cultura trocado após as primeiras 24 h, quando foram incubadas com o quimioterápico ou veículo (DMEM+SFB 10 %). A viabilidade foi medida, então, 48 e 72 horas após a incubação com DOX (Figura 10).

Os resultados obtidos mostraram que a DOX diminuiu a viabilidade celular de forma dose-dependente. A partir deste experimento, foi estabelecido que, para analisar possíveis interações entre a quimioterapia e a presença de ANG e LOS, seria utilizada a dose de 400 nM. Esta é uma dose em que houve cerca de 30% de redução da viabilidade, portanto, não compromete o número de células do experimento, apesar de haver uma diminuição significativa da viabilidade celular. Sendo esta uma condição em que se obtém um valor intermediário de DO, ela permite que, numa situação de interação com outras substâncias,

sejam observadas as possíveis variações da viabilidade celular em resposta aos diferentes estímulos proocados tanto no sentido de aumento quanto de diminuição da viabilidade celular (Figura 10).



**Figura 10 – Efeito da DOX sobre a viabilidade de MCF-7.** Células ( $2 \times 10^4$  células por poço) tratadas com diferentes concentrações de DOX por 48 h e cuja viabilidade foi medida pelo ensaio de MTT. CTR refere-se ao veículo (DMEM com 10% de SFB). Médias de cinco experimentos em triplicata, barras representam o erro padrão da média. \*  $p < 0,01$  \*\*  $p < 0,001$ ; obtidos pelo teste de *one-way ANOVA* com pós-teste de Bonferroni. Controle em preto, tratados em branco.

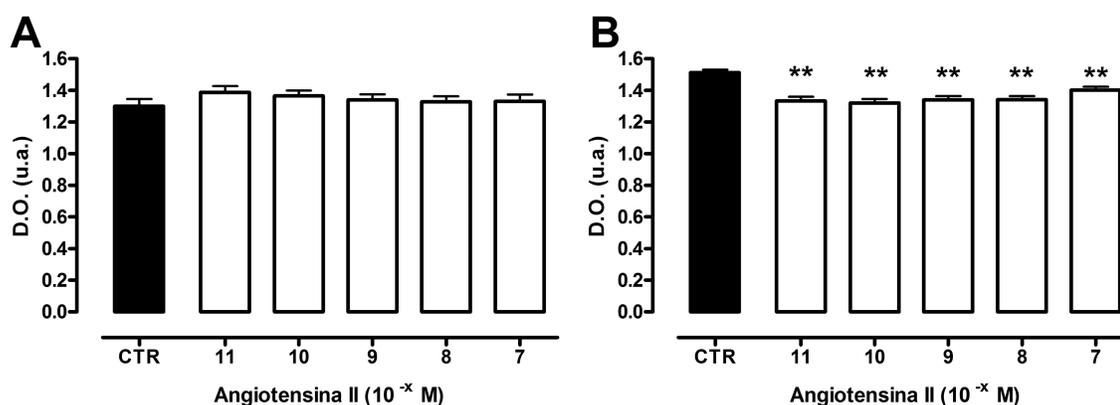
#### 4.3 EFEITO DE ANG NO CRESCIMENTO DE CÉLULAS MCF-7

As células foram plaqueadas ( $2 \times 10^4$  ou  $5 \times 10^4$  células por poço) e após 24 horas, o meio de cultura foi trocado e as mesmas foram incubadas com diferentes concentrações de ANG por 24 ou 48 h, quando foi realizado o MTT.

As células em confluência apresentam maior número de interações e ligações entre si, assim, esperava-se que esta fosse uma condição mais próxima do que possa ocorrer *in vivo*,

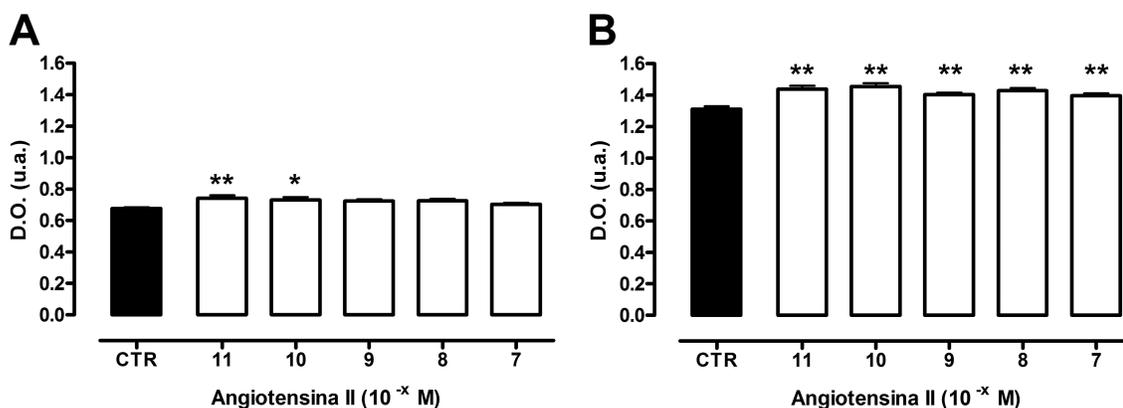
entretanto, tendo em vista o interesse em um efeito proliferativo de ANG, é mais fácil observar este efeito em células predispostas à proliferação, enquanto as células em fase estacionária podem não possuir as condições apropriadas para proliferar.

Na figura 11, observa-se o efeito de ANG na viabilidade de células em fase estacionária ( $5 \times 10^4$  células por poço) incubadas por 24 h (Figura 11A) e 48 h (Figura 11B). Na figura 11A não houve efeitos perceptíveis de ANG sobre a viabilidade celular, entretanto, quando as células foram incubadas por 48 h (Figura 11B) houve uma diminuição significativa da densidade óptica, apesar de pequena (cerca de 10%), o que sugere que haja a ativação de vias de morte ou de inibição da proliferação/metabolismo celular nas células em fase estacionária expostas a ANG. Apesar de este ser um resultado inédito e interessante, ele não representa parte dos objetivos deste trabalho e, portanto, não será aprofundado neste momento, mas, certamente, no futuro.



**Figura 11 – Efeito da ANG na viabilidade de células MCF-7 em fase estacionária.** Células ( $5 \times 10^4$  por poço) tratadas com diferentes concentrações de ANG por 24 (A) ou 48 h (B) e cuja viabilidade foi medida pelo MTT. CTR refere-se ao veículo (DMEM sem soro). Média de quatro experimentos em triplicata, barras representam o erro padrão da média. \*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$ ; obtidos pelo teste de *one-way ANOVA* com pós-teste de Dunnett, controles em preto.

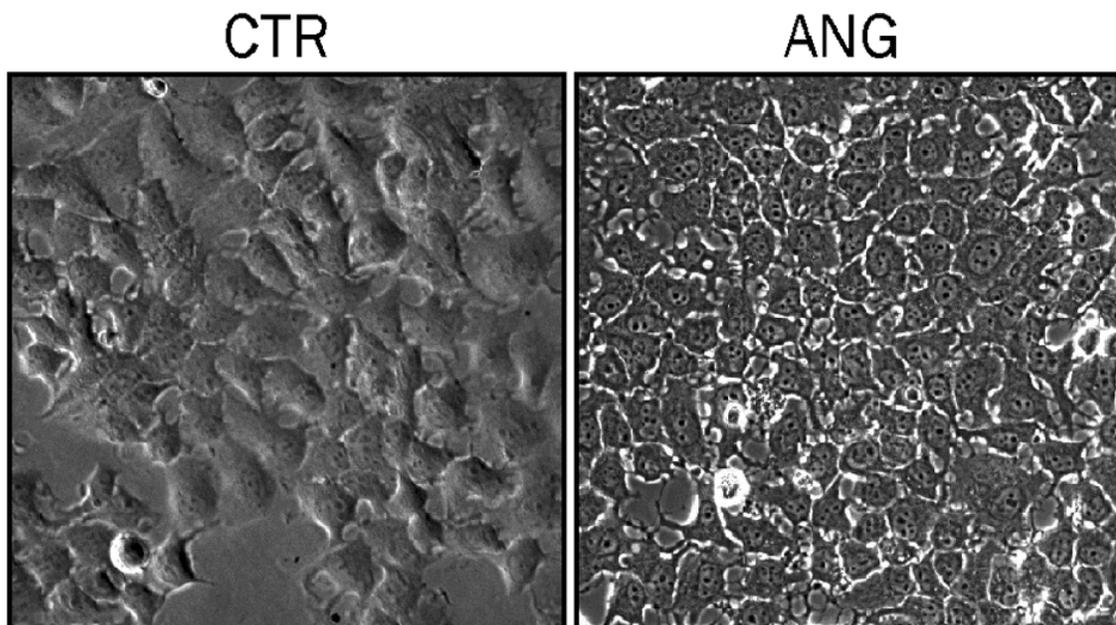
Em células em fase de crescimento ( $2 \times 10^4$  células por poço), o tratamento com diversas concentrações de ANG ( $10^{-11}$  a  $10^{-7}$  M) apresentou um aumento significativo da densidade óptica, apesar de discreto, tanto em 24 quanto em 48 h (Figura 12). O efeito proliferativo da ANG foi mais perceptível em 48 h (Figura 12B), apesar de também ter sido observado em 24 h, nas concentrações de  $10^{-11}$  e  $10^{-10}$  M (Figura 12A). Em 48 h, o aumento da viabilidade celular de células em fase de crescimento tratadas com hormônio foi de cerca de 10%. Este efeito sugere que a ANG possa, de alguma forma, aumentar o número de células em proliferação e/ou acelerar o ciclo celular das células que já estão em processo de divisão celular.



**Figura 12 – Efeito da ANG na viabilidade de células MCF-7 em fase de crescimento.** Células ( $2 \times 10^4$  por poço) tratadas com diferentes concentrações de ANG por 24 (A) ou 48 h (B) e cuja viabilidade foi medida pelo MTT. CTR refere-se ao veículo (DMEM sem soro). Médias de quatro experimentos em triplicata, barras representam o erro padrão da média. \*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$ ; obtidos pelo teste de one-way ANOVA com pós-teste de Dunnett, controles em preto.

#### 4.4 MICROSCOPIA ÓPTICA DO EFEITO PROLIFERATIVO DE ANG

Apesar de termos observado um discreto aumento, mas, significativo, da viabilidade celular das células em proliferação através do MTT, a observação ao microscópio óptico sugeriu que o efeito proliferativo pudesse estar subestimado, pois o aumento no número de células era bastante perceptível, com aparente diminuição do volume celular e freqüente formação de grumos, como observado na Figura 13. Estas observações nos levaram a questionar a precisão do MTT, pois, sendo um ensaio metabólico, ele pode subestimar o número de células se houver uma diminuição do metabolismo celular.



**Figura 13 – Efeito proliferativo de ANG em células MCF-7 em fase de crescimento.** Fotomicrografias de campo claro de células MCF-7 ( $2 \times 10^4$  por poço) tratadas na ausência (CTR) ou presença de 1 nM de ANG por 48 h em DMEM sem soro.

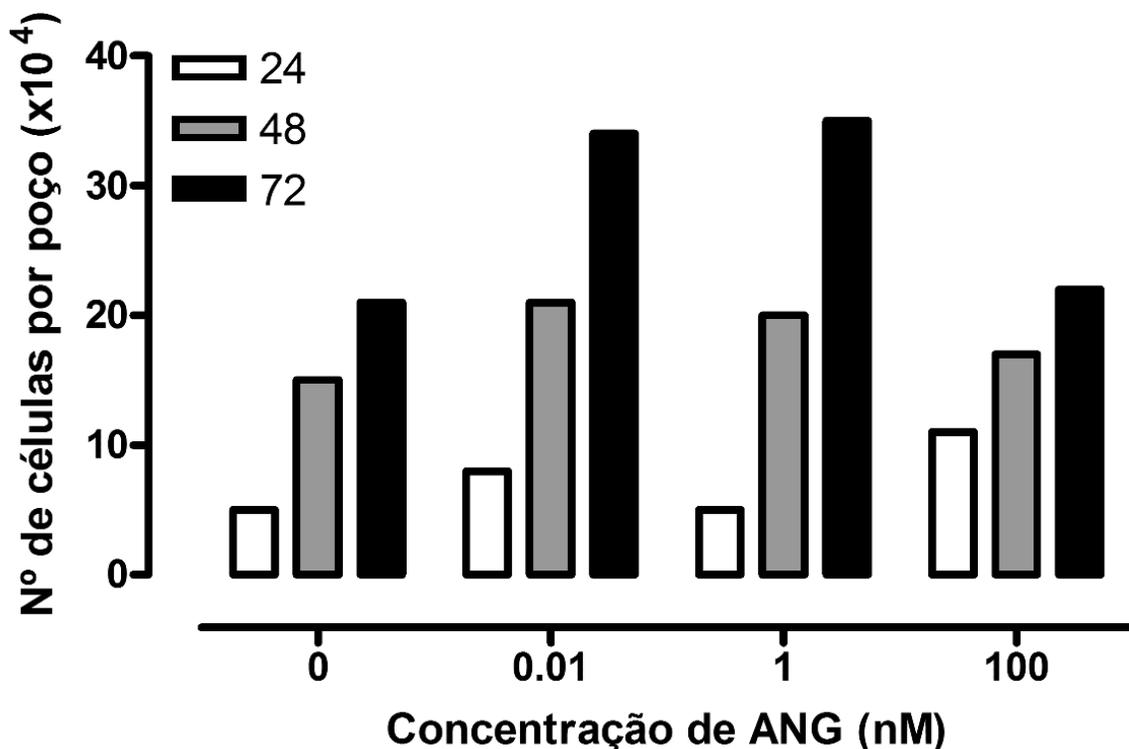
Dessa forma, consideramos a utilização de um método mais confiável de avaliação da proliferação celular, que pudesse confirmar ou confrontar os resultados obtidos pelo MTT e quantificar de forma mais adequada os efeitos de ANG sobre a proliferação celular.

Escolhemos, assim, a contagem de células, capaz de quantificar efeitos sobre a proliferação celular (indução ou inibição), com o auxílio da marcação pelo Azul de Trypan, de modo a avaliar efeitos sobre a morte celular, principalmente, por necrose.

#### **4.5 CONTAGEM DE CÉLULAS COM AZUL DE TRYPAN**

Inicialmente, foi preciso verificar se a ANG é realmente capaz de aumentar o número de células, como descrito por Muscella et al., e que se acreditava observar na microscopia ótica para, em seguida, realizar a interação de ANG com DOX e LOS, de preferência com uma concentração fisiológica de ANG. Foi realizado um experimento piloto, com  $5 \times 10^4$  células por poço, em placa de 24 poços, incubadas em DMEM 10% SFB por 24 h, após o qual o meio de cultura foi trocado para DMEM 2% SFB na presença de ANG e incubadas a 37° C por até 72 h. Ao final do experimento, as células foram tripsinizadas e contadas.

As concentrações fisiológicas de  $10^{-9}$  M (1 nM) e  $10^{-11}$  M (0,01 nM) apresentaram um aumento mais perceptível do número de células após 72 h de incubação, mas também provocaram um aumento perceptível do número de células com 48 h (Figura 14). Dessa forma, o experimento piloto foi considerado suficiente para notar que as concentrações fisiológicas de ANG (0,01 a 1 nM) aumentam a proliferação celular tanto após 48 h quanto 72 h de incubação em nossas condições experimentais.



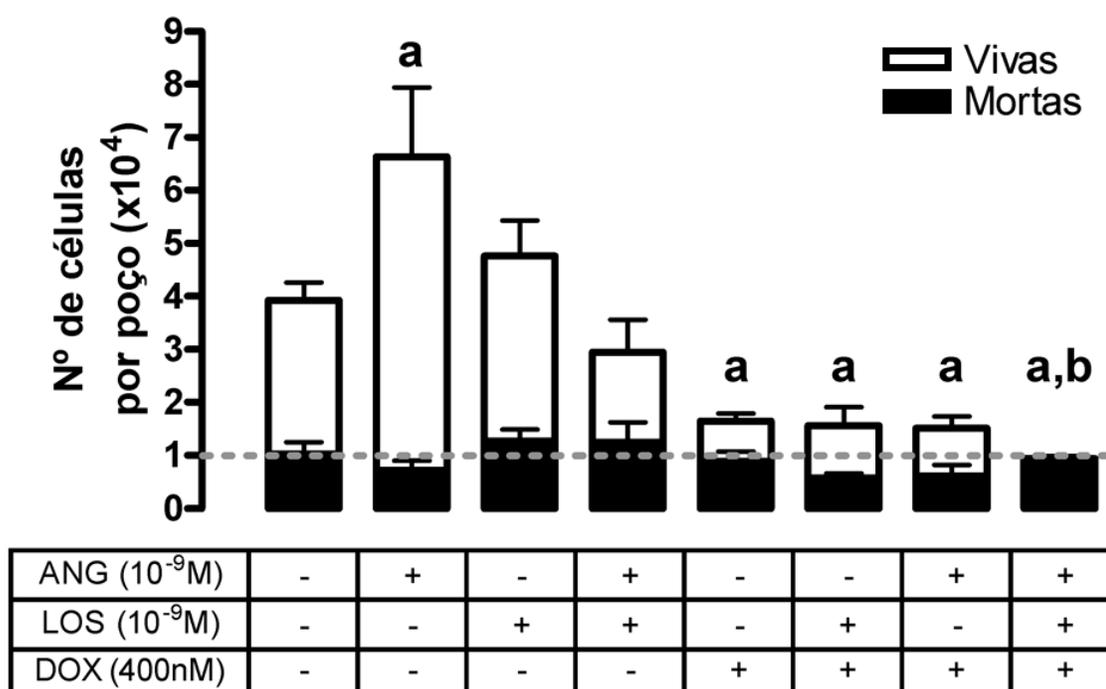
**Figura 14 – Contagem de células tratadas com ANG.** Células tratadas com diferentes concentrações de ANG ( $10^{-7}$ ,  $10^{-9}$  e  $10^{-11}$  M) por 24 (branco), 48 (cinza) ou 72 h (preto) em DMEM 2% SFB. Experimento piloto (n=1).

#### 4.6 INTERAÇÃO ENTRE ANGIOTENSINA II, LOSARTANA E DOXORRUBICINA

Com base nos resultados anteriores (Figuras 12, 13 e 14), optamos por avaliar a interação entre ANG, LOS e DOX através do método de contagem de células com azul de Trypan por duas razões: poder avaliar o número total de células vivas e mortas, ao final do experimento, e utilizar o tempo de 72 h de incubação, diferentemente do MTT que indicava redução de viabilidade nesta condição.

Os dados obtidos pela contagem de células se encontram representados na figura 15, onde as barras pretas representam as células mortas e acima delas, em branco, as células viáveis. É possível visualizar, claramente, o efeito proliferativo de ANG. Enquanto no

controle, após 72h de incubação, obtivemos  $(2,9 \pm 0,3) \times 10^4$  células viáveis por poço (cv/p), após tratamento com ANG obteve-se, aproximadamente, o dobro  $(5,9 \pm 1,3) \times 10^4$  de células viáveis por poço. A incubação com  $10^{-9}$  M de LOS foi suficiente para reverter o efeito proliferativo da ANG  $(1,7 \pm 0,6$  cv/p), e a incubação apenas com LOS não foi promoveu alterações significativas em relação ao controle  $(3,5 \pm 0,7$  cv/p). Verificou-se, ainda, que a toxicidade da DOX  $(0,76 \pm 0,1$  cv/p) não foi alterada pela presença de ANG  $(0,9 \pm 0,2$  cv/p), nem de LOS  $(0,97 \pm 0,3$  cv/p) isoladamente, mas quando ambos foram adicionados ao quimioterápico, o número de células viáveis diminuiu drasticamente  $(0,14 \pm 0,05$  cv/p).



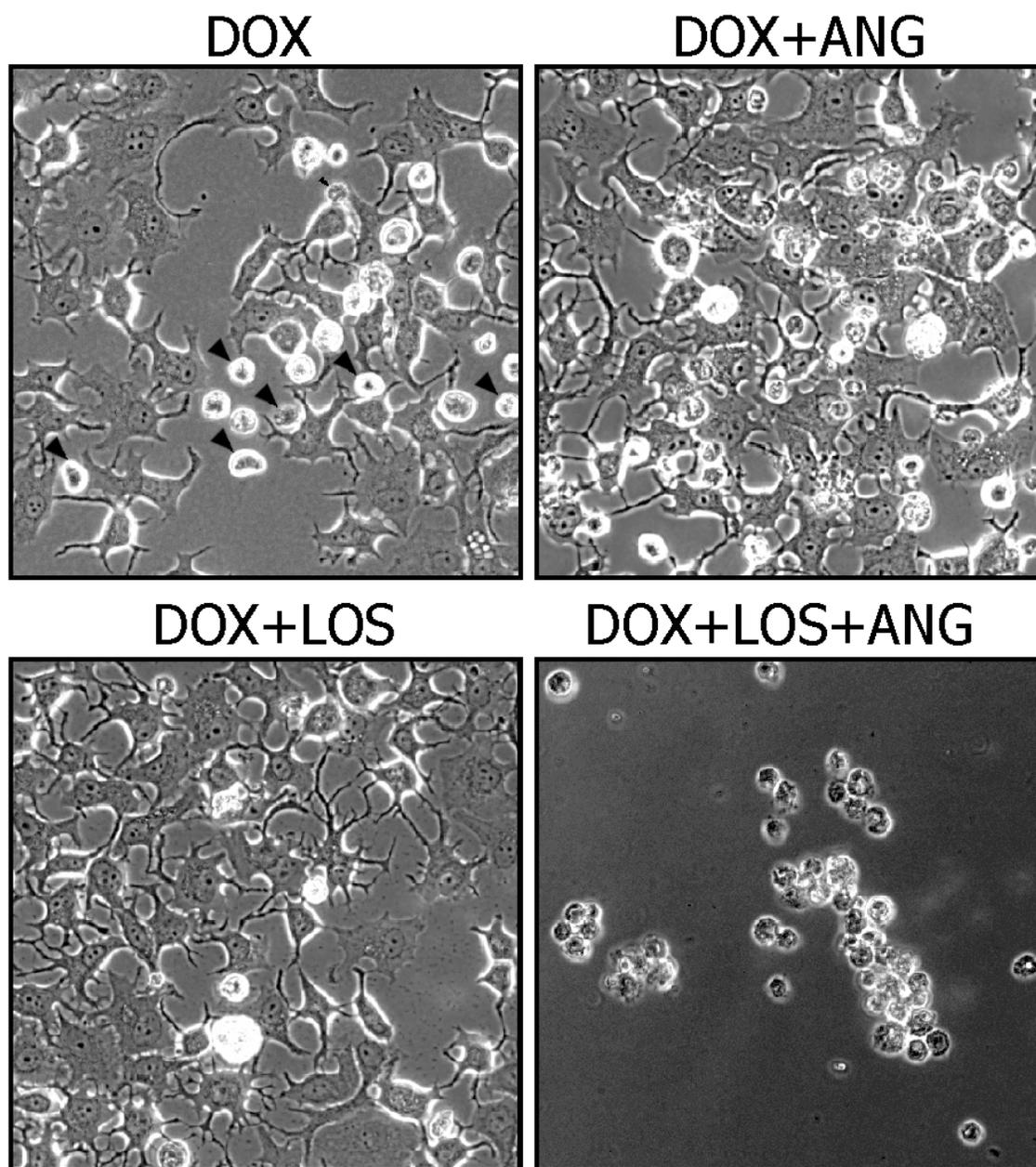
**Figura 15 – Contagem de células.** Células tratadas com diferentes combinações de ANG ( $10^{-9}$  M), DOX (400 nM) e LOS ( $10^{-9}$  M) por 72 h. As barras pretas representam as células mortas e as brancas representam as células viáveis. Médias de três experimentos, barras representam o erro padrão da média. Os indicadores “a” significam  $P > 0,05$  entre si e  $P < 0,05$  em relação ao controle sem tratamento, “b” significa  $P < 0,05$  em relação ao tratado apenas com DOX, obtidos pelo teste de *one-way ANOVA* com pós-teste de Dunnett. A linha tracejada em cinza representa a quantidade de células plaqueadas por poço.

#### **4.7 MICROSCOPIA ÓPTICA DOS EFEITOS CELULARES DA INTERAÇÃO ANG, LOS E DOX**

Os resultados do experimento de contagem de células foram confirmados pela microscopia óptica (Figura 16). As fotomicrografias foram obtidas da região central dos poços onde as células foram cultivadas, momentos antes da contagem com azul de Trypan.

É possível observar que a incubação com DOX isoladamente alterou a morfologia natural desta linhagem, aumentando o número de projeções de membrana encontradas, semelhantes a pseudópodos, além de diminuir a densidade celular encontrada no poço em relação ao controle apresentado na figura 13. As setas pretas indicam alguns exemplos de células com formato esféricas e/ou amorfas, em suspensão, e que foram consideradas mortas. Nas condições DOX, “DOX+LOS” e “DOX+ANG”, é possível identificar algumas células que apresentam vesículas intracelulares translúcidas, como as encontradas em uma célula do canto inferior direito da fotomicrografia com DOX, e que parecem ser visualmente semelhantes a autofagossomos, pois não são encontradas no controle, mas o são nas demais condições de tratamento com DOX. Não houve diferenças perceptíveis entre os tratamentos com DOX, “DOX+LOS” ou “DOX+ANG” (Figura 16).

Diferente das demais condições, o tratamento com “DOX+LOS+ANG” levou ao total desaparecimento das células pavimentosas, presença de células esféricas em suspensão e quase ausência de células aderidas (as poucas encontradas eram esféricas), enquanto que nos poços que receberam DOX, “DOX+ANG” e “DOX+LOS” houve um número considerável de células pavimentosas e com poucas diferenças entre elas.

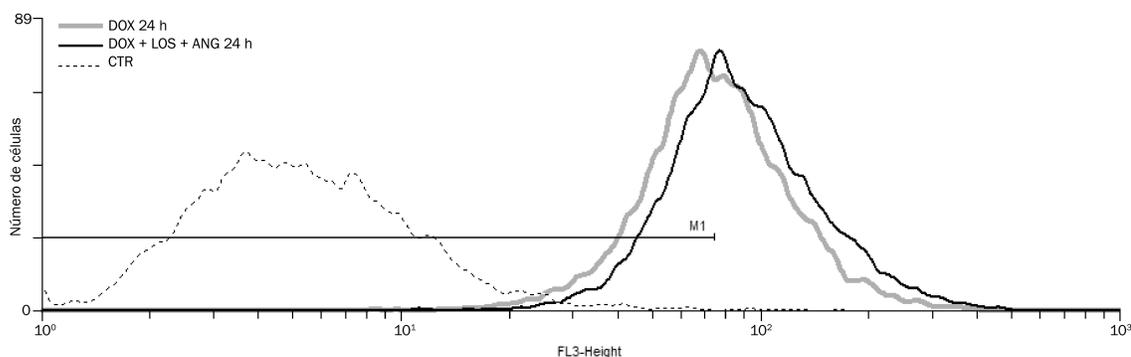


**Figura 16 – Efeito de ANG sobre a citotoxicidade induzida por DOX.** Células sem tratamento ou tratadas com 400 nM de DOX, na presença ou ausência de 1 nM de ANG e/ou 1 nM de LOS por 48 h. Fotomicrografias obtidas em um microscópio Zeiss Axiovert 100, com objetiva de 40x e câmera Zeiss AxioCam. As setas indicam exemplos de células que foram consideradas mortas.

#### 4.8 ANÁLISE DO ACÚMULO DE DOX

Analisando o gráfico apresentado na figura 15 e as fotomicrografias da figura 16, levantamos a hipótese de que o tratamento simultâneo “DOX+LOS+ANG” pudesse aumentar as concentrações intracelulares de DOX, sensibilizando-as, assim, aos efeitos do quimioterápico. Como a DOX é uma molécula naturalmente fluorescente, foi feita uma quantificação da fluorescência intracelular nas células tratadas DOX em presença de LOS e/ou ANG por citometria de fluxo.

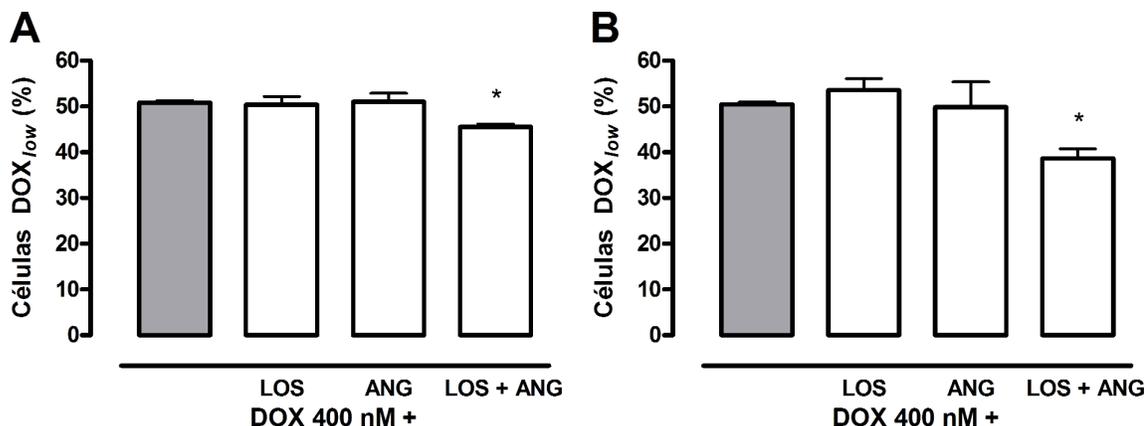
As incubações foram realizadas com 4 ou 24 horas de incubação. Nos histogramas obtidos (Figura 17) separamos uma região de células com baixa intensidade de fluorescência (M1 – DOX<sub>low</sub>), que indica baixa concentração intracelular de DOX. A razão dessa escolha é a hipótese de que esta população pudesse representar a população de células mais resistentes ao quimioterápico, observadas na figura 15. O critério adotado para o estabelecimento da linha de corte foi a mediana do histograma de acúmulo de DOX.



**Figura 17 – Histograma representativo do efeito ANG e LOS no acúmulo de DOX.** Células tratadas 400 nM de DOX, na presença ou ausência de 1nM de ANG e 1nM de LOS por 24 h. M1 representa a mediana de DOX, que marca a região de baixo acúmulo de DOX.

A figura 17 é um histograma representativo dos resultados obtidos ao final da incubação de 24 h de DOX, onde a intensidade de fluorescência está representada em escala logarítmica. A curva pontilhada representa a autofluorescência celular em que a maior parte das células apresenta intensidade de fluorescência entre  $2 \times 10^0$  e  $10^1$ . Após 24 h de incubação com DOX, a fluorescência intracelular da população aumenta e a curva se desloca para a direita, com a moda próxima a  $10^2$ . Quando a incubação de DOX foi realizada na presença de LOS e ANG, a curva obtida encontra-se em preto, onde se percebe que a curva do perfil de fluorescência da população se deslocou ainda mais para a direita, indicando uma maior concentração intracelular de DOX.

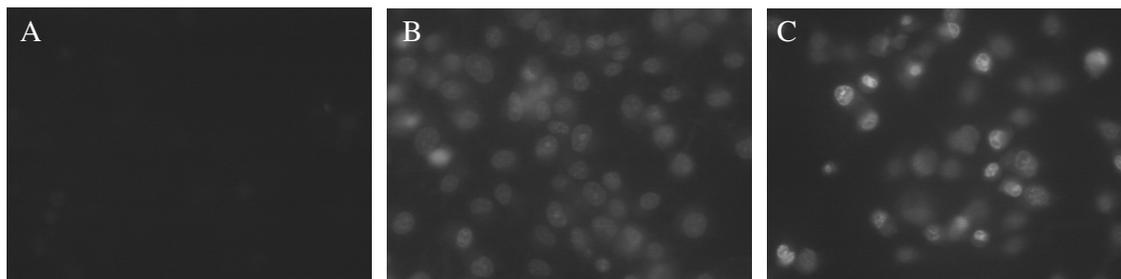
A quantificação do efeito de LOS e ANG sobre o acúmulo de DOX foi realizada através do marcador M1 e a porcentagem de células encontradas na região de baixa fluorescência de DOX em cada condição (DOX, “DOX+LOS”, “DOX+ANG”, “DOX+LOS+ANG”). Os resultados da quantificação de células  $DOX_{low}$  encontram-se na figura 18, que representa a porcentagem de células de baixa intensidade de fluorescência ( $DOX_{low}$ ) após os diversos tratamentos. Em cinza estão representados os controles de incubação apenas com 400 nM de DOX por 4 ou 24 h. A porcentagem de células  $DOX_{low}$  não foi alterada pela presença de ANG ou de LOS, isoladamente, mas nas células expostas ao tratamento com quimioterápico na presença concomitante de ANG e LOS, o deslocamento da curva para a direita promoveu uma diminuição significativa do número de células  $DOX_{low}$ , conseqüentemente um aumento do percentual de células com maior acúmulo de DOX (Figura 18). O efeito do tratamento com LOS e ANG foi maior no tratamento por 24 h que no tratamento por 4 h, sugerindo que este é um efeito cumulativo.



**Figura 18 – Efeito de ANG e LOS sobre o perfil de acúmulo de DOX.** Células tratadas com 400 nM de DOX, na presença ou ausência de 1 nM de ANG e/ou 1 nM de LOS por 4 h (A) e 24 h (B). Média de seis experimentos, barras representam o erro padrão da média. \*  $p < 0,05$ ; obtido pelo teste de *one-way ANOVA* com pós-teste de Dunnett, controles em cinza.

#### 4.9 MICROSCOPIA ÓPTICA DO ACÚMULO DE DOX

O aumento do acúmulo de DOX em células tratadas com LOS e ANG foi confirmado pela observação ao microscópio de fluorescência (Figura 19). As células sem tratamento apresentam autofluorescência muito baixa, quase indetectável (Figura 19A), as células tratadas apenas com DOX apresentam uma marcação nuclear bastante homogênea entre as diferentes células. A formação de núcleo picnóticos ou de condensação nuclear não foi investigada devido a baixa resolução da câmera e do pequeno aumento da objetiva. As células tratadas com “DOX+LOS+ANG” apresentaram marcação nuclear bastante heterogênea, com alguns núcleos fortemente marcados e outros tão marcados quanto os encontrados quando utilizada apenas a DOX (Figuras 19B e 19C). Além disto, as células tratadas com as três substâncias não estavam tão bem aderidas quando comparadas às células tratadas apenas com DOX (Figura 19C).



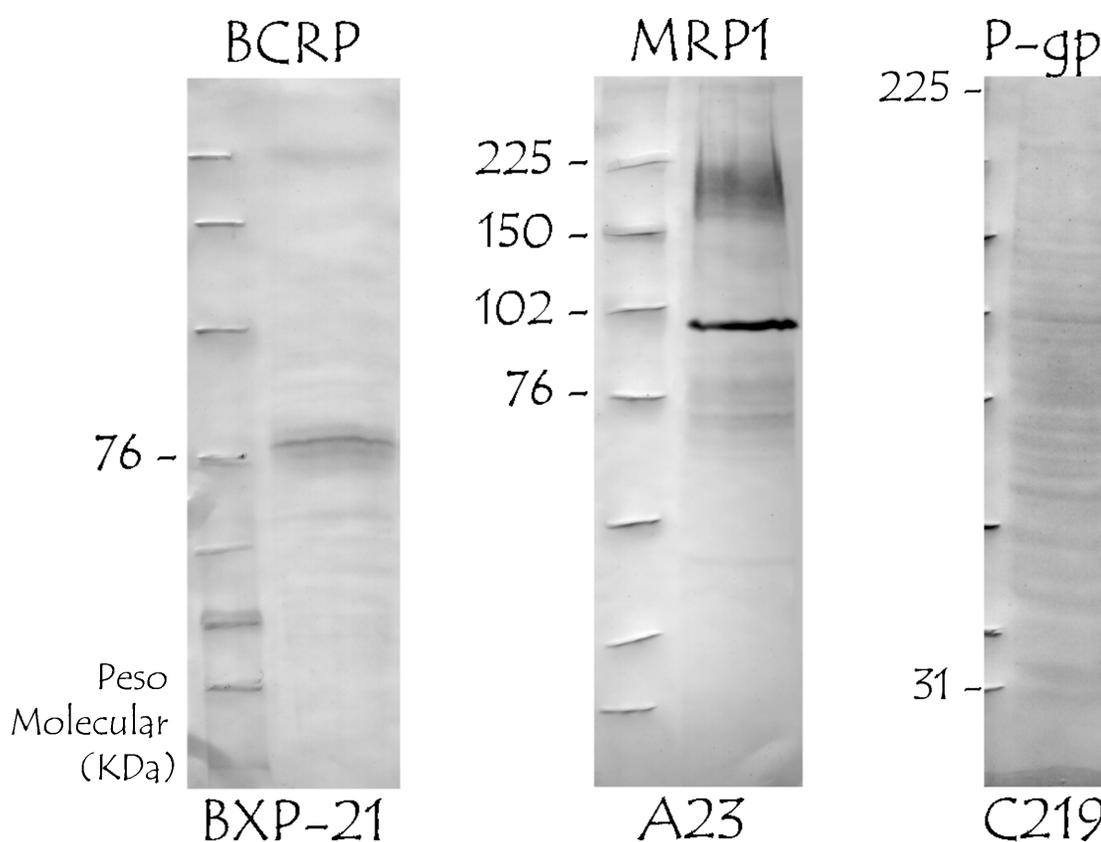
**Figura 19 – Fotomicrografias de epifluorescência de células MCF-7 incubadas com DOX.** (A) Células sem tratamento, (B) células tratadas com 400 nM de DOX por 24 h e (C) células tratadas com 400 nM de DOX na presença de  $10^{-9}$  M de LOS e  $10^{-9}$  M de ANG por 24h.

O fato de haver aumento da citotoxicidade de DOX na presença concomitante de LOS e ANG, sugere uma possível alteração nos mecanismos de transporte de DOX através da membrana plasmática. Como as células MCF-7 apresentam os transportadores ABCC1 e ABCG2, ambos envolvidos no efluxo de DOX (VAN LUYN *et al.*, 1998; DOYLE *et al.*, 1998; SCHELLENS *et al.*, 2000), primeiramente foi investigado se essas células, em nossas condições experimentais, expressam estes transportadores. Para isto, foi realizado um *immunoblotting*.

#### 4.10 EXPRESSÃO DOS TRANSPORTADORES MDR: *WESTERN BLOT*

As membranas obtidas ao final do *immunoblotting* confirmam dados anteriores da literatura (VAN LUYN *et al.*, 1998; DOYLE *et al.*, 1998), mostrando que a linhagem de câncer de mama humano MCF-7 apresenta bandas correspondentes aos pesos moleculares das proteínas MRP1/ABCC1 e BCRP/ABCG2, quando incubadas com anticorpos específicos para cada proteína A23 e BXP-21, respectivamente, e a ausência de marcação para a P-gp/ABCB1 marcada com anticorpo específico, C219.

A membrana tratada com anticorpo contra MRP1, A23, apresentou duas bandas de pesos moleculares próximos à 95 e 65 KDa. Estas bandas já foram encontradas por outros grupos utilizando este mesmo anticorpo e outros monoclonais contra a MRP1/ABCC1 e é sugerido que elas sejam formadas a partir da degradação parcial da proteína MRP1 (FERNETTI *et al.*, 2001; KRISHNAMACHARY *et al.*, 1994; REGINA *et al.*, 1998; MAO *et al.*, 2002). Estas bandas não são encontradas nas demais membranas.

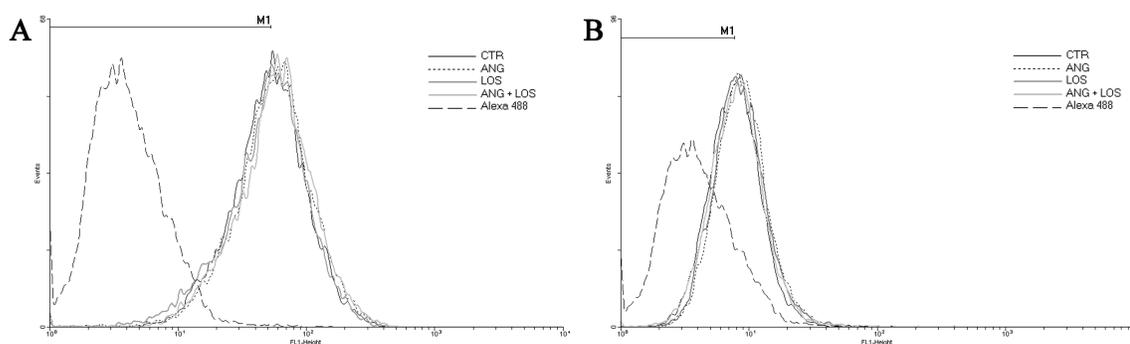


**Figura 20 – Western blot de MCF-7 para BCRP/ABCG2, MRP1/ABCC1 e P-gp/ABCB1.** Fotografias de membranas de nitrocelulose com 100 µg de proteínas marcadas com anticorpos contra: (A) BCRP/ABCG2 (BXP-21), (B) MRP1/ABCC1 (A23 e MRPM6) e (C) P-gp/ABCB1 (C219).

#### 4.11 ALTERAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS TRANSPORTADORES MDR

A possível alteração da expressão dos transportadores BCRP/ABCG2 e MRP1/ABCC1, foi avaliada por imunomarcção e citometria de fluxo. Foram realizados dois experimentos: curva de concentração de ANG e a interação angiotensina-losartana. As células foram previamente tratadas com o hormônio e/ou seu antagonista e após 48 horas de incubação, as células foram ressuspensas e marcadas com anticorpos monoclonais para as proteínas de interesse, como descrito no item 3.8.

A figura 21 é um histograma representativo dos resultados obtidos. Como pode ser visto, não houve alterações perceptíveis nem no perfil de expressão dos transportadores, nem na intensidade de fluorescência das células tratadas com ANG, LOS, ou ambas, em comparação com as células não tratadas.

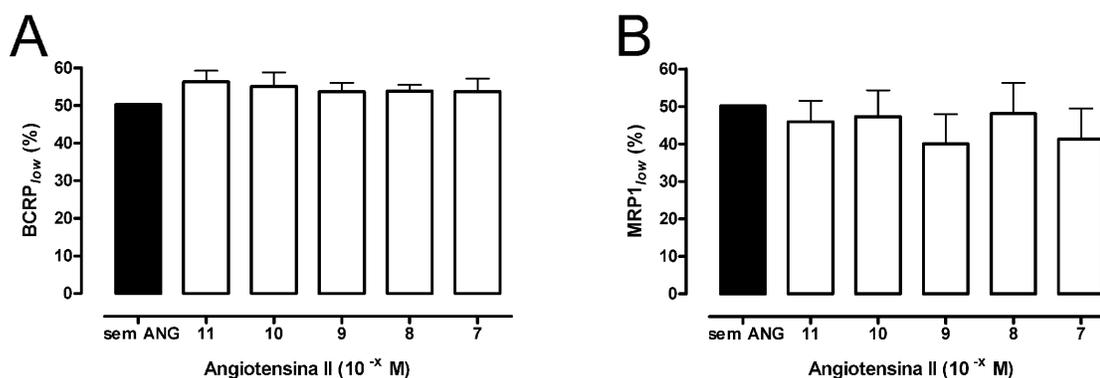


**Figura 21 – Histogramas representativos das imunomarcções para BCRP/ABCG2 e MRP1/ABCC1 em MCF-7.** Células MCF-7 ( $5 \times 10^5$  células por poço) tratadas com ANG e/ou LOS, ambas  $10^{-9}$ M, por 48h.

Para a quantificação da intensidade de fluorescência das células, que nos dá uma estimativa da expressão dessas proteínas, foi feita a análise dos percentuais de células presentes na região M1 nos histogramas de fluorescência, como descrito nos experimentos de

acúmulo de DOX. Novamente, o critério empregado para delimitar a região M1 foi a mediana do histograma de fluorescência do controle sem tratamento.

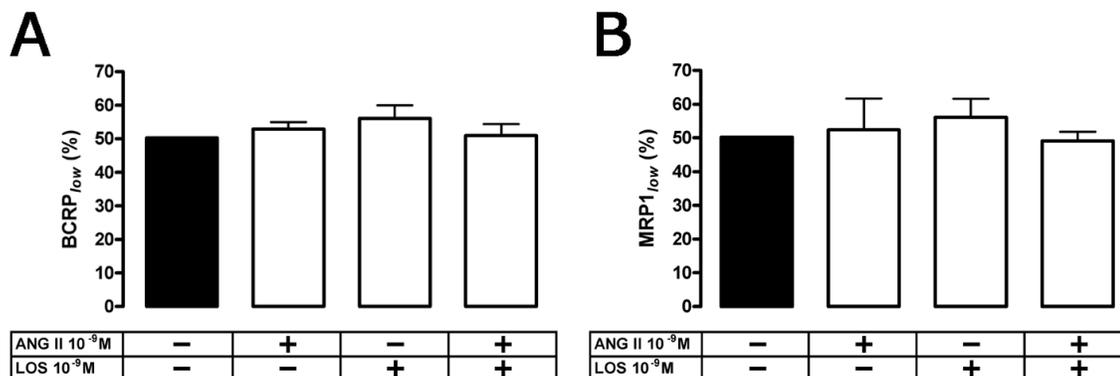
Primeiramente, foi realizada uma curva de concentração de ANG em que as células foram tratadas por 48 h e, posteriormente, marcadas com anticorpos específicos para BCRP/ABCG2 (Figura 22A) ou MRP1/ABCC1 (Figura 22B).



**Figura 22 – Expressão de BCRP e MRP1 em células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações de ANG.** Células MCF-7 ( $5 \times 10^5$  células por poço) tratadas com ANG ( $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  ou  $10^{-11}$  M) por 48h e posteriormente marcadas com anticorpos BXP-21 (anti-BCRP) ou MRPM6 (anti-MRP1), como descrito em 3.8. Médias de seis experimentos, barras representam o erro padrão da média. Ambos com  $P > 0,05$ ; *one-way ANOVA* com pós-teste de Dunnett. Controle sem ANG em preto.

Como pode ser visto na figura 22, não houve alteração significativa da expressão dos transportadores BCRP/ABCG2 e MRP1/ABCC1 pelo tratamento com ANG. As subpopulações BCRP<sub>low</sub> e MRP1<sub>low</sub> não apresentaram variações estatisticamente significativas, entretanto, enquanto a tendência do tratamento com ANG era de diminuir a expressão de BCRP, independente da concentração testada (Figura 22A), o tratamento também tendia a aumentar a expressão de MRP1, especialmente nas concentrações de  $10^{-9}$  M e  $10^{-7}$  M (Figura 22B). Apesar de não haver alteração da expressão destes transportadores em nenhuma concentração de ANG, havia a possibilidade de que a LOS isoladamente ou a sua combinação com ANG pudessem alterar a expressão dos transportadores. Para isto, foi feita a marcação

das células incubadas com as mesmas concentrações de ANG e LOS capazes de alterar o acúmulo de DOX,  $10^{-9}$  M de cada (Figura 23).



**Figura 23 – Expressão de BCRP e MRP1 em células MCF-7 tratadas com ANG e/ou LOS.** Células MCF-7 ( $5 \times 10^5$  células por poço) tratadas com ANG e/ou LOS, ambas  $10^{-9}$  M, por 48h e posteriormente marcadas com anticorpos BXP-21 (anti-BCRP) ou MRPM6 (anti-MRP1), como descrito em 3.8. Médias de seis experimentos, barras representam o erro padrão da média. Ambos com  $P > 0,05$ ; *one-way ANOVA* com pós-teste de Dunnett. Controle sem ANG em preto.

Como pode ser observado na figura 23, não houve alterações significativas na quantidade de células presentes na região M1, tratadas com ANG ou LOS isoladamente, e nem pela combinação de “ANG+LOS”, sugerindo que a expressão das proteínas ABCC1 e ABCG2 não tenha sido alterada pelos tratamentos.

Finalmente, a partir dos resultados de viabilidade e morfologia das células MCF-7, e da atividade e expressão dos transportadores ABC, estes resultados podem ser discutidos com base na literatura.

## **DISCUSSÃO**

**Quanto mais vastos forem os vossos conhecimentos,  
Mais fáceis e mais perfeitas serão as vossas obras.**

**Charles Kingsley**

## 5 DISCUSSÃO

Este trabalho investigou o efeito da ANG e da LOS sobre a citotoxicidade da DOX em células de câncer de mama humano MCF-7, assim como sobre as proteínas BCRP/ABCG2 e MRP1/ABCC1, que reconhecidamente fazem o efluxo desse quimioterápico (VAN LUYN *et al.*, 1998; SCHELLENS *et al.*, 2000).

A citotoxicidade da DOX foi observada pelo MTT (Figura 10), pela contagem de células marcadas ou não com azul de Trypan (Figura 15) e pela microscopia óptica (Figura 16). O efeito proliferativo de ANG também foi observado por MTT (Figura 12), pela contagem com azul de Trypan (Figuras 14 e 15) e confirmado pela microscopia óptica (Figura 13). Esses resultados confirmam dados anteriores que mostravam aumento da proliferação de MCF-7 incubadas com ANG (MUSCELLA *et al.*, 2002) assim como em outras células tumorais e não tumorais (RODGERS *et al.*, 2000; TYBITANCLOVA, 2005). No entanto, a redução de viabilidade de células em fase estacionária tratadas com ANG, como observamos na figura 11, ainda não tinha sido descrita pela literatura e representa, portanto, um efeito novo a ser explorado.

Apesar do MTT ser um método largamente empregado em estudos de citotoxicidade de substâncias em culturas de células, os resultados obtidos não refletiram adequadamente o grau do efeito observado ao microscópio óptico (Figuras 12 e 13). Sendo o MTT um ensaio suscetível a variações do metabolismo celular, entendemos que os resultados da contagem de células com azul de Trypan apresentaram-se mais confiáveis do que os obtidos pelo MTT.

Em 2002, Muscella *et al.* realizaram experimentos de MTT e de contagem de células semelhantes aos aqui descritos para ANG. Em seu trabalho, o MTT revelou um aumento significativo da densidade óptica, dose-dependente, nas primeiras 24 h de incubação (30 % de aumento a 1 nM de ANG) e que foi revertido pela presença do antagonista AT1, DuP 753. A

contagem de células em câmara de Thomas confirmou o aumento da quantidade de células, entretanto, eles só utilizaram a dose de 100 nM de ANG, que apesar de ter sido a que apresentou maior efeito no MTT é uma alta concentração de ANG e que, provavelmente, não é atingida no plasma.

Em nosso trabalho, o MTT realizado com células em sub-confluência após 48 h confirmou o aumento de DO observado por Muscella *et al.*, mas não foi dose-dependente (Figura 12) e não sabemos se há algum tipo de diferença temporal entre 24 e 48 h que justifique este fato. A contagem de células também apresentou aumento da proliferação celular, após 72h, o que foi mais visível nas concentrações fisiológicas de  $10^{-7}$  e  $10^{-9}$  M (Figuras 14 e 15), e que foi revertido pela presença de um antagonista AT1 (Figura 15). Dessa forma, em ambos os trabalhos, as células em sub-confluência apresentaram respostas proliferativas ao estímulo de ANG, e a presença de um antagonista AT1 reverteu este efeito em ambos os trabalhos.

Outro resultado importante é que o efeito proliferativo de ANG, isoladamente, não foi capaz de suplantiar o efeito citotóxico da DOX (Figura 13). Este é um resultado importante, pois a ANG foi recentemente associada a um efeito protetor contra a indução de apoptose pela DOX (ZHAO *et al.*, 2008). Este trabalho merece especial atenção, devido a algumas similaridades com o nosso. Foi utilizada a linhagem MCF-7, tratada com 100 nM de DOX (4 vezes menos do que em nosso estudo) na presença ou ausência de diversas concentrações de ANG e/ou 100 nM de LOS (concentração 100 vezes maior do que a utilizada neste trabalho), PD123319 (antagonista AT2 específico) e LY123319 (inibidor da fosfatidilinositol 3-cinase). Apesar de não estudarmos a ativação da apoptose induzida pela DOX, o efeito protetor não foi confirmado pelo nosso grupo, já que a incubação com ANG  $10^{-9}$ M não alterou a viabilidade ou a mortalidade das células MCF-7 tratadas com 400 nM de doxorubicina. Uma explicação possível é a de que em nossos estudos a concentração de DOX utilizada (400 nM)

seja alta demais e, aparentemente, sobriariam apenas as células resistentes à DOX. Talvez a concentração de 100 nM, sendo menos tóxica, seja crucial para a visualização desse fenômeno. Portanto, será necessário repetirmos, em nossas condições experimentais, a interação entre “DOX+ANG” e “DOX+LOS+ANG” utilizando 100 nM do quimioterápico para avaliarmos a possibilidade de existirem dois fenômenos antagônicos. Como nossos resultados sugerem que células em estado proliferativo e estacionárias respondem de forma diferente à ANG, essa é uma possibilidade que merece mais atenção.

Uma diferença entre os métodos é que Zhao *et al.* observaram o efeito em 24 h e nós avaliamos o efeito em 72 h, assim, alguns dos efeitos ocorridos em 24 h podem não ter prosseguimento. Outra possibilidade, ainda, é a de que os autores observaram, segundo eles, apenas a porcentagem de células apoptóticas, enquanto em nosso estudo avaliamos o número de células mortas, sem separar a apoptose tardia da necrose. No entanto, uma observação mais detalhada do trabalho de Zhao *et al.* nos fez levantar algumas críticas quanto à metodologia utilizada. Os autores combinaram substâncias fluorescentes incompatíveis: doxorubicina e iodeto de propídeo (PI). A intenção de se utilizar o iodeto de propídeo era marcar o núcleo de células que tivessem perdido a integridade de membrana (apoptose tardia ou necrose). Entretanto, o PI e a DOX competem pelos mesmos sítios do DNA e sua fluorescência é detectada pelo mesmo canal FL3 do citômetro, sem que fossem apresentados os devidos controles de compensação necessários à interpretação do experimento. A concentração de DOX por eles utilizada é relativamente baixa, 100 nM, mas, segundo eles, suficiente para induzir apoptose. A concentração de LOS é de  $10^{-5}$ M, uma concentração que poderia inibir também o receptor AT2, que tem baixa afinidade por essa droga (DOUGLAS, HOPFER, 1994; NISHIMURA *et al.*, 1994), mas isto é negligenciado pelos autores, que afirmam que há inibição específica de AT1. Assim, os parâmetros utilizados pelo grupo parecem não terem sido confiáveis, comprometendo a interpretação dos resultados encontrados.

Apesar de algumas diferenças, os resultados do grupo de Zhao *et al.* (2008) e os nossos concordam que existe a possibilidade de haver uma interferência no tratamento do câncer com DOX pelo aumento de ANG, como encontrado no plasma de pacientes hipertensos, ou pelo tratamento da hipertensão com antagonistas do receptor AT1, como a LOS.

De acordo com a Figura 15, a situação “DOX+LOS+ANG” parece ser a única condição em que podemos afirmar que o efeito de DOX foi citotóxico, já que a quantidade de células plaqueadas não se alterou após as 72 h de incubação, além de todas as células estarem coradas com azul de Trypan. Nas demais condições de tratamento com DOX ainda se encontraram células viáveis (provavelmente resistentes à DOX) e capazes de proliferar (barra branca acima da linha cinza). Podemos sugerir, então, duas hipóteses: (i) a população é homogênea, logo, há um efeito citostático geral, mas que não impediu totalmente a proliferação, ou (ii) há uma população heterogênea, em que a parcela resistente a DOX continua a proliferar a despeito da parcela sensível que morreu.

Existem algumas propostas, não-excludentes, que poderiam explicar o efeito sinérgico encontrado na interação “DOX+LOS+ANG”: (1) favorecimento de vias de morte celular, (2) repressão de vias de sobrevivência, (3) saturação dos sistemas de reparo ao estresse oxidativo, quer sejam os sistemas de proteção citoplasmáticos como nucleares e/ou (4) alteração do transporte de DOX através da membrana e conseqüente aumento do acúmulo intracelular de DOX.

A primeira e a segunda hipótese, o favorecimento de vias de morte e a repressão de vias de sobrevivência, tratam a ANG como uma molécula sinalizadora e, portanto, podem ser consideradas complementares. A ANG é capaz de ativar diversas vias intracelulares através de seus receptores, os quais apenas o 1 e o 2 foram demonstrados na linhagem MCF-7, mas já foram descritos 4 receptores. Além disso, como descrito por Tahmasebi *et al.*, em 2006, esta

linhagem possui a enzima 1 conversora de angiotensina II, a ECA, e conseqüentemente, pode produzir outros metabólitos que também possuem atividade biológica. Dessa forma, seja ela mesma, ou alguma outra angiotensina derivada dela (angiotensina IV, por exemplo), é possível que a inibição de AT1 por LOS favoreça a ligação de ANG em algum outro receptor, ou que a ativação da via intracelular seja favorecida pela inibição da sua via antagônica.

O estudo dos efeitos de mediadores formados a partir da ANG é recente e ainda é pouco compreendido. A presença de outras enzimas de conversão, além da ECA, ainda não foi investigada em células de tecido mamário. Ainda não há relatos do papel das angiotensinas III ou IV sobre células de tecido mamário ou sobre células de câncer de mama. Faz-se necessário a busca pela expressão de ECA2, MAS1 e AT4, assim como a identificação dos metabólitos, presentes ao final da incubação, para um detalhamento maior das possíveis vias que estejam sendo ativadas. A possibilidade de que haja outros mediadores, sejam derivados de ANG (angiotensinas III e/ou IV) e/ou de outros receptores de angiotensina (receptores 2, 3 ou 4) é de grande interesse biológico e pretendemos investigá-la.

Alguns trabalhos têm demonstrado o envolvimento do RAS, especialmente do receptor AT1, no remodelamento cardíaco (HARADA, 1999; YAMAMOTO, 2007). Em 2002, Toko *et al.* descreveram o envolvimento da ativação do receptor AT1 na lesão cardíaca induzida por DOX, o que parece ter maior importância no mecanismo agudo da doença (TOKO *et al.*, 2002). Por outro lado, um estudo recente, utilizando “microarray”, mostrou que a expressão do receptor AT2 está aumentada em pacientes com fibrilação atrial crônica (KIM *et al.*, 2005). Portanto, é tentador sugerir que a tendência de aumento de morte pela incubação de células MCF-7 com “LOS+ANG” (Figura 13), assim como a redução de viabilidade observada no MTT realizado com células estacionárias incubadas com ANG (Figura 11) sejam reflexos da atividade do receptor AT2, que é sabidamente expresso por esta linhagem (MUSCELLA *et al.*, 2002) durante a inibição da ativação de AT1 por LOS.

A terceira hipótese (saturação dos sistemas de reparo ao estresse oxidativo) é decorrente de estudos que sugerem que o mecanismo de morte induzido por DOX envolve a formação de ROS, NOS e de adutos de DNA (CUTTS *et al.*, 2005). Imagina-se que haja o envolvimento direto das proteínas MDR neste caso, pois tanto a MRP1/ABCC1 quanto a BCRP/ABCG2, além de serem capazes de realizar o efluxo de DOX (VAN LUYN *et al.*, 1998; SCHELLENS *et al.*, 2000), são também transportadores de glutathione, um importante agente redutor intracelular. A presença de glutathione no citoplasma é essencial à defesa contra agentes oxidantes, assim, a inibição das bombas de efluxo apresenta um dilema paradoxal, pois ao mesmo tempo em que iria diminuir a detoxificação de DOX, ela também aumentaria o potencial redutor intracelular. Inibidores da MRP1/ABCC1 já foram associados a um efeito bifásico sobre o transporte de glutathione celular (EVERS *et al.*, 2000; HIRRLINGER, SCHULZ, DRINGEN, 2002; FRANCO, CIDLOWSKI, 2006; MINICH *et al.*, 2006). Assim, dependendo da concentração utilizada de modulador, a célula pode reter ou vazar glutathione, protegendo ou sensibilizando, respectivamente, a célula a danos oxidativos.

Existe a possibilidade de que a inibição destes transportadores leve a maior concentração de DOX e, simultaneamente, à depleção citoplasmática de glutathione, o que poderia justificar a maior morte celular. Entretanto, este efeito ainda é pouco conhecido e foi descrito apenas na presença de pequenas concentrações de moduladores, como o MK571 (EVERS *et al.*, 2000; HIRRLINGER, SCHULZ, DRINGEN, 2002; FRANCO, CIDLOWSKI, 2006; MINICH *et al.*, 2006). É possível que LOS seja um substrato/modulador destas proteínas, pois ele já foi identificado como sendo um substrato para a P-gp/ABCB1 que possui semelhanças de transporte tanto com a BCRP/ABCG2 quanto com a MRP1/ABCC1. Mesmo assim, se isto for verdade, ainda permanece a dúvida do porquê este efeito não foi observado com a incubação de DOX e LOS isoladamente.

Um outro grupo, utilizando a mesma dose aguda de DOX verificou que a expressão de MRP1/ABCC1 em cardiomiócitos é aumentada em resposta ao tratamento com DOX, possivelmente na tentativa de proteger o coração do dano oxidativo induzido por este quimioterápico (JUNGSUWADEE *et al.*, 2006). Sabe-se, inclusive, que a expressão de MRP1/ABCC1 é essencial à hipertensão induzida por ANG e a sua conseqüente lesão vascular, sugerindo que a ativação de AT1 poderia levar ao aumento de ROS e de MRP1/ABCC1 em modelos agudos de lesão cardíaca, que seria favorecida pela diminuição de ANP (BERNARDINI *et al.*, 1992; TOKO *et al.*, 2002; WIDDER *et al.*, 2007). Entretanto, estes dados não explicam os mecanismos crônicos da lesão induzida por DOX e nem a dicotomia apresentada pelos tratamentos agudo e crônico com antraciclina. Atualmente, acredita-se que a expressão de MRP1/ABCC1 seja essencial ao balanço redox do tecido cardíaco e a sua proteção contra danos oxidativos (KRAUSE *et al.*, 2007). Como as células por nós utilizadas também expressam essa proteína, mais uma vez ressaltamos a necessidade de fazermos uma curva temporal para expressão de MRP1/ABCC1 e de avaliarmos a atividade desta proteína, bem como a concentração intracelular de glutatona, após a incubação com ANG, LOS, DOX e suas combinações, para obtermos uma resposta às nossas indagações.

A quarta hipótese, finalmente, envolve os mecanismos de transporte de DOX através da membrana. Esta hipótese é sustentada pela observação de que houve aumento do acúmulo de DOX no núcleo na presença concomitante de LOS e ANG (Figuras 16, 17 e 18). O aumento de concentração intracelular de DOX sugere que LOS e ANG possam promover alterações em seu transporte. O fato de verificarmos aumento significativo na porcentagem de células com maior acúmulo de DOX em apenas quatro horas após o início do tratamento com o quimioterápico (Figura 18A) sugere que este seja um mecanismo rápido de resposta ao estímulo. Como não se conhecem os transportadores de influxo de DOX e a linhagem celular

MCF-7 expressa, de forma constitutiva, dois transportadores de efluxo de DOX, a BCRP/ABCG2 e a MRP1/ABCC1 (Figura 20), buscamos verificar se a expressão destes transportadores poderia diminuir pela presença de LOS e/ou ANG e, assim, justificar o aumento o efeito citotóxico pelo aumento da concentração intracelular de DOX.

Primeiramente, verificamos que diferentes concentrações de ANG não foram capazes de alterar a expressão dos transportadores após 48 h (Figura 22). Em seguida, utilizando as mesmas concentrações de ANG e LOS do experimento de contagem (1 nM cada) não observamos quaisquer alterações no perfil de expressão de BCRP ou de MRP1 das células tratadas com ANG e/ou LOS (Figura 23). Como houve um aumento cumulativo do percentual de células DOX<sub>high</sub> (Figura 18) e o número de células contadas com azul de Trypan, ao final das 72 h, foi o mesmo que o plaqueado por poço (Figura 15), acreditamos que o efeito citotóxico tenha ocorrido antes do primeiro ciclo de divisão das células, que é cerca de 24h (Figuras 13 e 14).

A ausência de alterações do perfil de expressão dos transportadores ao final de 24 h de incubação com LOS e/ou ANG, sugere que haja uma diminuição da atividade dos transportadores, mas não descarta a possibilidade de que as células com menor expressão dos transportadores já tenham morrido (e não foram contabilizadas pelo citômetro), ou que as células observadas ao final das 24 h, sendo as sobreviventes, apresente uma maior expressão dos transportadores.

Apesar de ser possível que haja diferenças de perfil de expressão dos transportadores, acreditamos ser mais provável que haja diferenças na atividade dos mesmos. Infelizmente, não nos foi possível avaliar a atividade destes transportadores de forma específica, devido à falta de especificidade no transporte dos substratos disponíveis para estes transportadores, dificuldade esta que acreditamos poder ser contornada pela recente aquisição de novos substratos para a BCRP/ABCG2 e de um inibidor específico, a Fumitremorgina C.

O uso de medicamentos anti-hipertensivos, especialmente os inibidores da ECA1 e os antagonistas do AT1, tem sido sugerido na quimioterapia de câncer (SMALL *et al.*, 1997; UEMURA *et al.*, 2003; LINDBERG *et al.*, 2004; MOLTENI *et al.*, 2006). Em 2004, foi proposto que o bloqueio do receptor AT1 associado a anti-inflamatórios e/ou vacinas de DNA possa ser uma nova alternativa para o tratamento de quase todos, senão todos, os cânceres sólidos. Esta proposta foi feita baseada na observação de que diversos tipos de câncer apresentam uma regulação positiva da expressão de AT1, especialmente em hipóxia e presença de estresse oxidativo, possivelmente como uma resposta protetora e mitogênica (SMITH, MISSAILIDIS, 2004).

O aumento de acúmulo de DOX pelo tratamento aqui descrito é mais um indício de que anti-hipertensivos podem ser utilizados em conjunto com a quimioterapia para o tratamento do câncer. Entretanto, sugerimos cautela, pois os experimentos aqui descritos ainda não foram testados em células não-tumorais, nem em animais normais ou hipertensos, portadores, ou não, de tumor. A possibilidade de aumento da cardiotoxicidade da DOX por anti-hipertensivos, como a LOS, não pode ser descartada e deverá ser avaliada em nossas próximas etapas. O maior acúmulo de DOX nas células tratadas com “LOS+ANG” (Figura 18) pode explicar, não só os nossos resultados de aumento de citotoxicidade (Figura 15), mas também parte do efeito cardiotóxico das antraciclinas, como a DOX e a daunorrubicina.

Finalizando, nosso estudo confirma os resultados anteriores de Muscella *et al.* 2002 e sugerem que a presença de um sistema RAS mamário, como proposto por Tahmasebi *et al.* em 2006, possa interferir com a dinâmica de crescimento do câncer de mama, aumentando a proliferação tumoral. No nosso entender, o aprofundamento dos estudos aqui iniciados será absolutamente necessário, de modo a avaliar os efeitos terapêuticos, assim como os efeitos indesejados, desse tratamento, como uma possível exacerbação da conhecida cardiotoxicidade de doxorubicina.

## **CONCLUSÕES**

**Ciência é uma questão de fé.**

**Paul Davies**

## 6 CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos, concluímos que:

- A ANG apresenta efeito proliferativo em células tumorais em cultura, confirmando dados anteriores da literatura;
- Isoladamente, ANG e LOS não alteraram o tratamento quimioterápico com doxorubicina;
- Houve um efeito inesperado da combinação de ANG e LOS sobre a citotoxicidade celular induzida por doxorubicina, o que sugere que esse efeito seja dependente do bloqueio de AT1;
- O aumento do acúmulo intracelular de DOX em presença de “LOS+ANG” se correlacionou com o aumento da citotoxicidade;
- A expressão dos transportadores relacionados ao efluxo de DOX não foi alterada pela presença isolada ou combinada de ANG e LOS;
- O aumento de acúmulo de DOX na presença de “LOS+ANG” pode estar relacionado a uma diminuição da atividade das proteínas MRP1/ABCC1 e/ou BCRP/ABCG2, mas que ainda necessita de confirmação.

De forma conjunta, nossos dados sugerem que os estudos sobre a ação de inibidores de AT1 em câncer de mama, aqui representados por LOS, devem ser aprofundados, a fim de se avaliar não somente o seu possível efeito adjuvante na quimioterapia do câncer, mas também um possível aumento de toxicidade do quimioterápico.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

**Um pouco de ciência nos afasta de Deus.  
Muito, nos aproxima.**

**Louis Pasteur**

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Em nossos estudos futuros pretendemos investigar:

- Se os efeitos observados na interação entre ANG, LOS e DOX nas células MCF-7 são exclusivos dessas substâncias ou se eles podem ocorrer com outros anti-hipertensivos e quimioterápicos, sejam ou não das mesmas classes;
- A possibilidade de ativação de outros receptores de angiotensina, especialmente, a de AT2 em células tumorais, e os efeitos por eles deflagrados;
- O envolvimento de dano oxidativo gerado:
  - por ANG, de forma independente de AT1, o que seria um efeito inédito;
  - pelo maior acúmulo de DOX, que colaboraria para os efeitos citotóxicos descritos;
- Medir o potencial modulador de LOS e ANG (e possíveis metabólitos de ANG) na atividade de MRP1/ABCC1 e de BCRP/ABCG2, o que poderia explicar o aumento de DOX intracelular;
- Avaliar a localização celular dos transportadores de DOX momentos após a adição do mesmo, de modo a verificar se há internalização dos transportadores;
- Os efeitos da incubação concomitante de “DOX+LOS+ANG” e de outros medicamentos semelhantes em células normais, de modo a verificar os riscos da utilização de anti-hipertensivos como adjuvantes do tratamento do câncer.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**Só existem dois dias do ano sobre os quais nada pode ser feito.  
Um deles se chama ontem, e o outro, amanhã.  
Portanto, hoje é o dia certo para amar, sonhar,  
ousar, produzir e, acima de tudo, acreditar...**

**Dalai Lama**

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKISHITA, M. et al. **Expression of the AT<sub>2</sub> receptor developmentally programs extracellular signal-regulated kinase activity and influences fetal vascular growth**, *Journal of Clinical Investigation*, 1999, v. 103, n. 1, p. 63-71.
- ALBISTON et al. **Evidence that the angiotensin IV (AT<sub>4</sub>) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase**, *Journal of Biological Chemistry*, 2001, v. 276, n. 52, p. 48623-6.
- AL-HAJJ, M. et al. **Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells**, *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, v. 1, n. 1007, p. 3983-8.
- ANNILO, T.; DEAN, M. **Degeneration of an ATP-binding cassette transporter gene, ABCB13, in different mammalian lineages**, *Genomics*, 2004, v. 84, n. 1, p. 34-46.
- ARCAMONE, F. et al. **Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius***, *Biotechnology & Bioengineering*, 1969, v. XI, n. 6, p. 1101-10.
- BARAN, Y. et al. **Upregulation of multi drug resistance genes in doxorubicin resistant human acute myelogenous leukemia cells and reversal of the resistance**, *Hematology*, 2007, v. 12, n. 6, p. 511-7.
- BERGSAGEL, D.E.; VALERIOTE, F.A. **Growth characteristics of a mouse plasma cell tumor**, *Cancer Research*, 1968, v. 28, n. 11, p. 2187-96.
- BERNARDINI, N. et al. **Doxorubicin cardiotoxicity is associated with alterations of plasma levels of atrial natriuretic factor**, *Journal of Endocrinological Investigation*, 1992, v. 15, n. 2, p. 79-84.
- BERNAS, T.; DOBRUCKI, J. **Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes**, *Cytometry*, 2002, v. 47, n. 4, p. 236-42.
- BERNAS, T.; DOBRUCKI, J. **Reduction of a tetrazolium salt, CTC, by intact HepG2 human hepatoma cells: subcellular localisation of reducing systems**, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, v. 1451, n. 1, p. 73-81.
- BERNAS, T.; DOBRUCKI, J.W. **Backscattered light confocal imaging of intracellular MTT-formazan crystals**, *Microscopy Research and Technique*, 2004, v. 64, n. 2, p. 126-34.
- BERNHARD, D. et al. **Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells**, *Cancer Letters*, 2003, v. 195, n. 2, p. 193-9.
- BERRIDGE, M.V.; TAN, A.S. **Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular**

**localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction**, Archives of Biochemistry and Biophysics, 1993, v. 303, n. 2, p. 474-82.

BERRY, M.G. et al. **Integrin beta1 upregulation in MCF-7 breast cancer cells by angiotensin II**, European Journal of Surgical Oncology, 2000, v. 26, n. 1, p. 25-9.

BERRY, M.G. et al. **Integrin beta1-mediated invasion of human breast cancer cells: an ex vivo assay for invasiveness**, Breast Cancer, 2003, v. 10, n. 3, p. 214-9.

BIEDLER, J.L.; RIEHM, H. **Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies**, Cancer Research, 1970, v. 30, n. 4, p. 1174-84.

BILLINGHAM, M.E. et al. **Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes**, Cancer Treatment Reports, 1978, v. 62, n. 6, p. 865-72.

BONNET, D.; DICK, J.E. **Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell**, Nature Medicine, 1997, v. 3, n. 7, p. 730-7.

BORST, P. et al. **The multidrug resistance protein family**. Biochimica et Biophysica Acta, 1999, v. 1461, v. 2, p. 347-57.

BUJA, L.M.; FERRANS, V.J. **Myocardial injury produced by antineoplastic drugs**. Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism, 1975, v. 6, p. :487-97.

BUNTING, K.D. **ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells**, Stem Cells, 2002, v. 20, n. 1, p. 11-20.

CAMPBELL, D.J. **Circulating and tissue angiotensin systems**, The Journal of Clinical Investigation, 1987, v. 79, n. 1, p. 1-6.

CAMPBELL, D.J. **The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems**, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2003, v. 35, n. 6, p. 784-91.

CANALS M et al. **Up-regulation of the angiotensin II type 1 receptor by the MAS proto-oncogene is due to constitutive activation of Gq/G11 by MAS**, Journal of Biological Chemistry, 2006, v. 281, n. 24, p. 16757-67.

CAREY, R.M., SIRAGY, H.M. **Newly Recognized Components of the Renin-Angiotensin System: Potential Roles in Cardiovascular and Renal Regulation**, Endocrine Reviews, 2003, v. 24, p. 261- 271.

CAREY, R.M., WANG, Z.Q., SIRAGY, H.M. **Role of the Angiotensin Type 2 Receptor in the Regulation of Blood Pressure and Renal Function**, Hypertension, 2000, v. 35, p. 155-163.

CHEN, C.J. et al. **Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* P-glycoprotein gene from multidrug-resistant human cells**, *Cell*, 1986, v. 47, n. 3, p. 381-9.

CHEN, S.; GARAMI, M.; GARDNER, D.G. **Doxorubicin selectively inhibits brain versus atrial natriuretic peptide gene expression in cultured neonatal rat myocytes**, *Hypertension*, 1999, v. 34, n. 6, p. 1223-31.

CLAUSEN, J.; JENSEN, G. **Blood pressure and mortality: an epidemiological survey with 10 years follow-up**, *Journal of Human Hypertension*, 1992, v. 6, n. 1, p. 53-9.

COLE, S.P. et al. **Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line**, *Science*, 1992, v. 258, n. 5088, p. 1650-4.

COLE, S.P.; MOHAMDEE, S.A.; MIRSKI, S.E. **A monoclonal antibody detecting cell surface epitope on some drug resistant human tumour cell lines**, *British Journal of Cancer*, 1990, v. 6, n. 1, p. 14-6.

COLE, S.P. **Patterns of cross-resistance in a multidrug-resistant small-cell lung carcinoma cell line**. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 1990, v. 26, n. 4, p.250-6

CORNWELL, M.M; PASTAN, I.; GOTTESMAN, M.M. **Certain calcium channel blockers bind specifically to multidrug-resistant human KB carcinoma membrane vesicles and inhibit drug binding to P-glycoprotein**, *Journal of Biological Chemistry*, 1987, v. 262, n. 5, p. 2166-70.

CULLINANE, C. et al. **Interstrand cross-linking by adriamycin in nuclear and mitochondrial DNA of MCF-7 cells**, *Nucleic Acids Research*, 2000, v. 28, n. 4, p. 1019-25.

CURNOW, K.M., PASCOE, L., WHITE, P.C. **Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor**, *Molecular Endocrinology*, 1992, v. 6, p. 1113-1118.

CUTTS, S.M. et al. **The power and potential of doxorubicin-DNA adducts**. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 2005, v. 57, n. 2, p. 73-81

DANO, K. **Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells**, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1973, v. 323, n. 3, p. 466-83

DANO, K. **Cross resistance between vinca alkaloids and anthracyclines in Ehrlich ascites tumor in vivo**, *Cancer Chemotherapy Reports*, 1972, v. 56, n. 6, p. 701-8.

DANO, K. **Development of resistance to daunomycin NSC-82151 in Ehrlich ascites tumor**, *Cancer Chemotherapy Reports*, 1971, v. 55, n. 2, p. 133-41.

DATAFOLHA. **Albert Einstein é, na opinião de médicos, o melhor hospital de São Paulo**. *Folha de São Paulo, Especial*, domingo, 26 de agosto de 2007.

DATASUS, 2005 - **Sistema de Informações sobre Mortalidade SIM**, Departamento de Informação e Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), Sistema de

Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Consultado em dezembro de 2005 na URL: <http://www.datasus.gov.br/>

DEAN, M.; FOJO, T.; BATES, S. **Tumour stem cells and drug resistance**. *Nature Reviews in Cancer*, 2005, v. 5, n. 4, p. 275-84.

DEAN, M. **The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily**, 1<sup>a</sup> Ed. Bethesda (MD), National Library of Medicine (EUA), NCBI; 2002.

DEAN, M.; RZHETSKY, A.; ALLIKMETS, R. **The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily**, *Genome Research*, 2001, v. 11, n. 7, p. 1156-66.

DEBENHAM, P.G. et al. **DNA-mediated transfer of multiple drug resistance and plasma membrane glycoprotein expression**, *Molecular and Cellular Biology*, 1982, v. 2, n. 8, p. 881-9.

DE GASPARO, M. et al. **The angiotensin II receptors**, *Pharmacology Reviews*, 2000, v. 52, p. 415-472.

DI MARCO, A.; GAETANI, M.; SCARPINATO, B. **Adriamycin NSC-123,127: a new antibiotic with antitumor activity**, *Cancer Chemotherapy Reports*, 1969, v. 53, n. 1, p. 33-7.

DI MARCO, A. et al. **'Daunomycin', a new antibiotic of the rhodomycin group**, *Nature*, 1964, v. 201, p. 706-7.

DIOP, N.K.; HRYCYNA, C.A. **N-Linked glycosylation of the human ABC transporter ABCG2 on asparagine 596 is not essential for expression, transport activity, or trafficking to the plasma membrane**, *Biochemistry*, 2005, v. 44, n. 14, p. 5420-9.

DOYLE, L.A. et al. **A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells**, *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, v. 95, n. 26, p. 15665-70.

DYER, A.R. et al. **High blood-pressure: a risk factor for cancer mortality?**, *Lancet*, 1975, v. 1, n. 7915, p. 1051-6.

EVERS, R. et al. **Transport of glutathione prostaglandin A conjugates by the multidrug resistance protein 1**, *FEBS Letters*, 1997, v. 419, n. 1, p. 112-6.

EVERS, R. et al. **Vinblastine and sulfinpyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export**, *British Journal of Cancer*, 2000, v. 83, n. 3, p. 375-83.

FERNETTI, C. et al. **Preparation of an antibody recognizing both human and rodent MRP1**, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, v. 288, n. 4, p. 1064-8.

- FIALKOW, P.J. **Clonal origin of human tumors**, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1976, v. 458, n. 3, p. 283-321.
- FOJO, A.T. et al. **Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues**, *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987, v. 84, n. 1, p. 265-9.
- FRANCO, R.; CIDLOWSKI, J.A. **SLCO/OATP-like transport of glutathione in FasL-induced apoptosis: glutathione efflux is coupled to an organic anion exchange and is necessary for the progression of the execution phase of apoptosis**, *Journal of Biological Chemistry*, 2006, v. 281, n. 40, p. 29542-57.
- FRASER, G.E.; PHILLIPS, R.L.; BEESON, W.L. **Hypertension, antihypertensive medication and risk of renal carcinoma in California Seventh-Day Adventists**, *International Journal of Epidemiology*, 1990, v. 1, n. 9, p. 832-837.
- FURBERG, A.S.; THUNE, I. **Metabolic abnormalities (hypertension, hyperglycemia and overweight), lifestyle (high energy intake and physical inactivity) and endometrial cancer risk in a Norwegian cohort**, *International Journal of Cancer*, 2003, v. 104, n. 6, p. 669-76.
- GOLDBOURT, U. et al. **Elevated systolic blood pressure as a predictor of long-term cancer mortality: analysis by site and histologic subtype in 10 000 middle-aged and elderly men**, *Journal of the National Cancer Institute*, 1986, v. 7, n. 7, p. 63-70.
- GOON, P.K.; MESSERLI, F.H.; LIP, G.Y. **Hypertension and breast cancer: an association revisited?**, *Journal of Human Hypertension*, 2006, v. 20, n. 10, p. 722-4.
- GOTTESMAN, M.M.; FOJO, T.E.; BATES, S.E. **Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters**, *Nature Reviews in Cancer*, 2002, v. 2, n. 1, p. 48-58
- GOTTESMAN, M.M. **Mechanisms of cancer drug resistance**, *Annual Reviews in Medicine*, 2002, v. 5, n. 3, p. 615-27.
- GRADY, E.F. et al. **Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus**, *Journal of Clinical Investigation*, 1991, v. 88, n. 3, p. 921-33.
- GROS, P. et al. **Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance**, *Nature*, 1986, v. 323, n. 6090, p. 728-31.
- GROSSMAN, E.; MESSERLI, F.H.; GOLDBOURT, U. **Antihypertensive therapy and the risk of malignancies**, *European Heart Journal*, 2001; v. 22, n. 15, p. 1343-1352.
- GROSSMAN, E.; MESSERLI, F.H.; GOLDBOURT, U. **Carcinogenicity of cardiovascular drugs**, *Current Hypertension Reports*, 1999, v. 1, n. 3, p. 212-8.
- GUS, I. et al. **Prevalence, awareness, and control of systemic arterial hypertension in the state of Rio Grande do Sul**, *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 2004, v. 83, n. 5, p. 429-33.

HAHN, W.C.; WEINBERG, R.A. **Rules for making human tumor cells**, New England Journal of Medicine, 2002, v. 347, n. 20, p. 1593-603.

HAMBURGER, A.W.; SALMON, S.E. **Primary bioassay of human tumor stem cells**, Science, 1977, v. 197, n. 4302, p. 461-3.

HAMET, P. **Cancer and hypertension. an unresolved issue**, Hypertension, 1996, v. 28, p. 321-324.

HARADA, K. et al. **Angiotensin II type 1A receptor knockout mice display less left ventricular remodeling and improved survival after myocardial infarction**, Circulation, 1999; v. 100, p. 2093-2099.

HEPPNER, G.H. **Tumor heterogeneity**, Cancer Research, 1984, v. 44, n. 6, p. 2259-65.

HIRSCHMANN-JAX, C. et al. **A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells**, The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, v. 101, n. 39, p. 14228-33.

HIRRLINGER, J.; SCHULZ, J.B.; DRINGEN, R. **Glutathione release from cultured brain cells: multidrug resistance protein 1 mediates the release of GSH from rat astroglial cells**, Journal of Neuroscience Research, 2002, v. 69, p. 318-26.

HOLLENBERG, N.K. **Diabetes, nephropathy, and the renin system**, Journal of Hypertension, 2006, v. 24, p. S81-87.

HOLYOAKE, T. et al. **Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia**, Blood, 1999, v. 94, n. 6, p. 2056-64.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Atlas de mortalidade por câncer no Brasil 1979-1999**, Rio de Janeiro: INCA, 2002. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/atlas/>

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativas 2006: Incidência de Câncer no Brasil**, Rio de Janeiro: INCA, 2005. Disponível em: [www.inca.gov.br/estimativa/2006/](http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/)

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil**, Rio de Janeiro: INCA, 2007. Disponível em: [www.inca.gov.br/estimativa/2008/](http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/)

INWANG, E.R. et al. **Angiotensin II type 1 receptor expression in human breast tissues**, British Journal of Cancer, 1997, v. 75, n. 9, p. 1279-83.

JEMAL, A. et al. **Cancer statistics, 2008**, CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2008, v. 58, n. 2, p. 71-96.

JOHNSON, R.J. **Pathogenesis of essential hypertension: historical paradigms and modern insights**, Journal of Hypertension, 2008, v. 26, n. 3, p. 381-91.

JULIANO, R.L.; LING, V. **A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants**, Biochimica et Biophysica Acta, 197, v. 455, n. 1, p. 152-62.

JUNGSUWADEE, P. et al. **Increase in Mrp1 expression and 4-hydroxy-2-nonenal adduction in heart tissue of Adriamycin-treated C57BL/6 mice**, *Molecular Cancer Therapy*, 2006, v. 51, n. 1, p. 2851-60.

JUNGSUWADEE, P. **Increase in Mrp1 expression and 4-hydroxy-2-nonenal adduction in heart tissue of Adriamycin-treated C57BL/6 mice**, *Molecular Cancer Therapy*, 2006, v. 5, n. 11, p. 2851-60.

KARAMYAN et al. **Characterization of the brain-specific non-AT(1), non-AT(2) angiotensin binding site in the mouse**, *European Journal of Pharmacology*, 2008, v. 590, n. 1-3, p. 87-92.

KHAW, K.T.; BARRETT-CONNOR, E. **Systolic blood pressure and cancer mortality in an elderly population**, *American Journal of Epidemiology*, 1984, v. 120, n. 4, p. 550-558.

KIM, N.H. et al. **Altered patterns of gene expression in response to chronic atrial fibrillation**, *International Heart Journal*, 2005, v. 46, n. 3, p. 383-95.

KOOL, M. et al. **Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines**, *Cancer Research*, 1997, v. 57, n. 16, p. 3537-47.

KONDO, T.; SETOGUCHI, T.; TAGA, T. **Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line**, *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, v. 101, n. 3, p. 781-6.

KRAMKOWSKI, K.; MOGIELNICKI, A.; BUCZKO, W. **The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production**, *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2006, v. 57, n. 4, p. 529-39.

KRAUSE, M.S. et al. **MRP1/GS-X pump ATPase expression: is this the explanation for the cytoprotection of the heart against oxidative stress-induced redox imbalance in comparison to skeletal muscle cells?**, *Cell biochemistry and function*, 2007, v. 251, p. 23-32.

KRISHNAMACHARY, N. et al. **Analysis of MRP gene expression and function in HL60 cells isolated for resistance to adriamycin**, *Oncology Research*, 1994, v. 6, n. 3, p. 119-27.

KUCHLER, K.; THORNER, J. **Functional expression of human mdr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae***, *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, v. 89, n. 6, p. 2302-6.

LANGELIER, Y.; SIMARD, R.; BRAILOVSKY, C. **Mechanism of actinomycin resistance in SV40-transformed hamster cells**, *Differentiation*, 1974, v. 25, p. 261-7.

LAPIDOT, T. et al. **A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice**, *Nature*, 1994, v. 367, n. 6464, p. 645-8.

LARGENT, J.A. et al. **Hypertension, diuretics and breast cancer risk**, Journal of Human Hypertension, 2006, v. 20, n. 10, p. 727-32.

LARSEN, A.K.; ESCARGUEIL, A.E.; SKLADANOWSKI, A. **Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents**, Pharmacology & Therapeutics, 2000, v. 853, p. 217-29.

LAWES, C.M. et al. **Global burden of blood-pressure-related disease, 2001**, Lancet, 2008, v. 371, n. 9623, p. 1513-8.

LEE, S.Y. et al. **Does hypertension increase mortality risk from lung cancer? A prospective cohort study on smoking, hypertension and lung cancer risk among Korean men**, Journal of Hypertension, 2002, v. 20, p. 623-628.

LI, C.I.; et al. **Relation between use of antihypertensive medications and risk of breast carcinoma among women ages 65–79 years**, Cancer, 2003, v. 98, n. 7, p. 1504–1513.

LINDBERG, H. **Angiotensin converting enzyme inhibitors for cancer treatment?**, Acta Oncologica, 2004, v. 43, n. 2, p. 142-52.

LING, V.; THOMPSON, L.H. **Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine**, Journal of Cell Physiology, 1974, v. 83, n. 1, p. 103-16. .

LIU, Y.; et al. **Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction**, Journal of Neurochemistry, 1997, v. 69, n. 2, p. 581-93.

LOEBINGER, M.R. et al. **Squamous cell cancers contain a side population of stem-like cells that are made chemosensitive by ABC transporter blockade**, British Journal of Cancer, 2008, v. 98, n. 2, p. 380-387.

LOU, H.; DEAN, M. **Targeted therapy for cancer stem cells: the patched pathway and ABC transporters**, Oncogene, 2007, v. 26, n. 9, p. 1357–1360.

LOWRY, O.H. et al. **Protein measurement with the Folin phenol reagent**, Journal of Biological Chemistry, 1951, v. 193, n. 1, p. 265-75.

LVBA COMUNICAÇÃO. **Press Release. EMS apresenta medicamento contra hipertensão e insuficiência cardíaca**, 2008. Disponível em: [http://www.lvba.com.br/portugues/imprensa/release/ems\\_0815.php](http://www.lvba.com.br/portugues/imprensa/release/ems_0815.php)

MAO, Q. et al. **GSH-dependent photolabeling of multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1) by [125I]LY475776. Evidence of a major binding site in the COOH-proximal membrane spanning domain**, Journal of Biological Chemistry, 2002, v. 277, n. 32, p. 28690-9.

MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; MINOTTI, G. **Cardiotoxicity of Antitumor Drugs**. Chemical Research in Toxicology, 2008, v. 21, n. 5, p. 978–989.

MINICH, T. et al. **The multidrug resistance protein 1 Mrp1, but not Mrp5, mediates export of glutathione and glutathione disulfide from brain astrocytes**, Journal of Neurochemistry, 2006, v. 97, n. 2, p. 373-84.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Hipertensão e diabetes: Saúde propõe reduzir preço de medicamentos - 12/05/2005**. Publicado pela Agência Saúde, Assessoria de Imprensa do Ministério da Saúde e acessado em junho de 2007 na URL:  
[http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias\\_detalhe.cfm?co\\_seq\\_noticia=15428](http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias_detalhe.cfm?co_seq_noticia=15428)

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Governo anuncia expansão do Farmácia Popular - 23/03/2006**. Agência Saúde, Assessoria de Imprensa do Ministério da Saúde, 2006a. Acessado em junho de 2008, disponível na URL:  
[http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias\\_detalhe.cfm?co\\_seq\\_noticia=28304](http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias_detalhe.cfm?co_seq_noticia=28304)

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Farmácia Popular do Brasil auxilia diabéticos a controlar a doença - 13/11/2006**, Agência Saúde, Assessoria de Imprensa do Ministério da Saúde, 2006b. Acessado em junho de 2008, disponível na URL:  
[http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias\\_detalhe.cfm?co\\_seq\\_noticia=24733](http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias_detalhe.cfm?co_seq_noticia=24733)

MIRSKI, S.E.; GERLACH, J.H.; COLE, S.P. **Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin**, Cancer Research, 1987, v. 47, n. 10, p. 2594-8.

MOLTENI, A. et al. **Potential deployment of angiotensin I converting enzyme inhibitors and of angiotensin II type 1 and type 2 receptor blockers in cancer chemotherapy**, Anticancer Agents in Medicinal Chemistry, 2006, v. 6, n. 5, p. 451-60.

MOMPARLER, R.L. et al. **Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells**, Cancer Research, 1976, v. 36, n. 8, p. 2891-5.

MOSCOW, J.; MORROW, C.S.; COWAN, K.H. **Drug Resistance and Its Clinical Circumvention**, Cancer Medicine, BC Decker, Hamilton (Canadá), 2003, 6ª Ed, Seção 11, Capítulo 48.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**, Journal of Immunological Methods, 1983, v. 65, n. 1-2, p. 55-63.

MULLER, M. et al. **Evidence for the role of glycosylation in accessibility of the extracellular domains of human MRP1 ABCB1**, Biochemistry, 2002, v. 41, n. 31, p. 10123-32.

MUSCELLA, A. et al. **Angiotensin II stimulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase activity and cell growth by calcium-independent pathway in MCF-7 breast cancer cells**, Journal of Endocrinology, 2002, v. 173, n. 2, p. 315-23.

MUSCELLA, A. et al. **PKC-zeta is required for angiotensin II-induced activation of ERK and synthesis of C-FOS in MCF-7 cells**, Journal of Cell Physiology, 2003, , v. 19, n. 71, p. 61-8.

NGUYEN G, et al. **Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin**. Journal of Clinical Investigation, 2002, v. 109, n 11, p. 1417-27.

NIELSEN, D.; MAARE, C.; SKOVSGAARD, T. **Cellular resistance to anthracyclines**, General Pharmacology, 1996, v. 27, n. 2, p. 251-5.

NITHIPONGVANITCH, R. et al. **Mitochondrial and nuclear p53 localization in cardiomyocytes: redox modulation by doxorubicin Adriamycin?**, Antioxidants & Redox Signaling, 2007, v. 9, n. 7:1001-8.

INTITUTO NACIONAL DO CORAÇÃO, PULMÃO E SANGUE. **High Blood Pressure**, National Heart, Lung And Blood Institute, National Institute of Health, .Acessado em junho de 2008 na URL:  
[http://www.nhlbi.nih.gov/health/dci/Diseases/Hbp/HBP\\_WhatIs.html](http://www.nhlbi.nih.gov/health/dci/Diseases/Hbp/HBP_WhatIs.html)

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **World Health Report 2003: shaping the future**, Geneva (Suíça), WHO, 2003, disponível em: <http://www.who.int/whr/2003/en/>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE E UNIÃO INTERNACIONAL CONTRA O CÂNCER. **Global Action Against Cancer 2005**, Geneva (Suíça),WHO, 2005, disponível em: <http://www.who.int/cancer/media/GlobalActionCancerEnglfull.pdf>

PARISH, C.R. **Cancer immunotherapy: the past, the present and the future**, Immunology & Cell Biology, 2003, v. 81, n. 2, p. 106-13.

PEETERS, P.H.M. et al. **Hypertension, antihypertensive drugs and mortality from cancer among women**, Journal of Hypertension, 1998, v. 16, n. 7, p. 941-947.

PRIEBE, W. et al. **Doxorubicin- and daunorubicin-glutathione conjugates, but not unconjugated drugs, competitively inhibit leukotriene C4 transport mediated by MRP/GS-X pump**, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, v. 247, n. 3, p. 859-63.

PUDDU, P. et al. **The genetic basis of essential hypertension**, Acta Cardiologica, 2007, v. 62, n. 3, p. 281-93.

RAYNOR, W.J. et al. **High blood pressure and 17-year cancer mortality in the Western Electric health study**, American Journal of Epidemiology, 1987, v. 113, n. 4, p. 371-377.

REDONDO-MÜLLER, M.A. et al. **Anti-cancer actions of a recombinant antibody R6313/G2 against the angiotensin II AT1 receptor**, Endocrine-Related Cancer, 2008, v. 15, n. 1, p. 277-88.

REGINA, A. et al. **Mrp1 multidrug resistance-associated protein and P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells**, *Journal of Neurochemistry*, 1998, v. 71, n. 2, p. 705-15.

REYA, T. et al. **A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells**, *Nature*, 2003, v. 42, n. 3, p. 409-414

RIEHM, H.; BIEDLER, J.L. **Cellular resistance to daunomycin in Chinese hamster cells in vitro**, *Cancer Research*, 1971, v. 31, n. 4, p. 409-12.

RIVERA, E. et al. **AT1 receptor is present in glioma cells; its blockage reduces the growth of rat glioma**, *British Journal of Cancer*, 2001, v. 85, n. 9, p. 1396-9.

ROBERT, J., JARRY, C. **Multidrug resistance reversal agents**, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2003, v. 462, n. 3, p. 4805-17.

RODGERS, K.E. **Effect of angiotensin II on hematopoietic progenitor cell proliferation**, *Stem Cells*, 2000, v. 18, n. 4, p. 287-94.

RYBÁROVÁ, S. et al. **Expression of MDR proteins in breast cancer and its correlation with some clinical and pathological parameters**, *Neoplasma*, 2006, v. 53, n. 2, p. 128-35.

SANTOS RA et al. **Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas**, *Proceedures of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, v. 100, n. 14, p. 8258-63.

SOCIEDADE AMERICANA DO CÂNCER. **Cancer Facts & Figures 2008**, Atlanta: American Cancer Society, 2008, disponível em:  
<http://www.cancer.org/downloads/STT/2008CAFFfinalsecured.pdf>

SCHARENBERG, C.W.; HARKEY, M.A.; TOROK-STORB, B. **The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors**, *Blood*, 2002, v. 99, n. 2, p. 507-12.

SCHELLENS, J.H. et al. **Transport of topoisomerase I inhibitors by the breast cancer resistance protein. Potential clinical implications**, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000, v. 922, p. 188-94.

SHTIL, A.A. **Emergence of multidrug resistance in leukemia cells during chemotherapy: mechanisms and prevention**, *Journal of Hematother Stem Cell Research*, 2002, v. 112, p. 231-41.

SLATER, T.F.; SAWYER, B.; STRAEULI, U. **Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. Iii, Points of coupling of four different tetrazolium salts**, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1963, v. 77, p. 383-93.

SMALL, W. JR. et al. **Captopril modulates hormone receptor concentration and inhibits proliferation of human mammary ductal carcinoma cells in culture**, *Breast Cancer Research and Treatment*, 1997, v. 443, p. 217-24.

SMITH, G.R.; MISSAILIDIS, S. **Cancer, inflammation and the AT1 and AT2 receptors**, *Journal of Inflammation (London)*, 2004, v. 1, n. 1, p. 3.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. V **Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial**, publicadas em 2006. Disponível em: <http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2006/VDiretriz-HA.pdf>

SOGN, J.A.; ANTON-CULVER, H.; SINGER, D.S. **Meeting report: NCI think tanks in cancer biology**, *Cancer Research*, 2005, v. 65, n.20, p. 9117-20.

SOLDNER, A. et al. **Active transport of the angiotensin-II antagonist losartan and its main metabolite EXP 3174 across MDCK-MDR1 and caco-2 cell monolayers**, *British Journal of Pharmacology*, 2000, v. 129, n. 6, p. 1235-43.

SOLER, M. et al. **Hypertension and hormone-related neoplasms in women**, *Hypertension*, 1999, v. 34, n. 2, p. 320-325.

SOULE, H.D. et al. **A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma**, *Journal of the National Cancer Institute*, 1973, v. 51, n. 5, p. 1409-16.

SPYROULIAS, G.A. et al. **Comparison of the solution structures of angiotensin I & II. Implication for structure-function relationship**, *European Journal of Biochemistry*, 2003, v. 270, n. 10, p. 2163-73.

SUEMATSU, M. et al. **The inflammatory aspect of the microcirculation in hypertension: oxidative stress, leukocytes/endothelial interaction, apoptosis**, *Microcirculation*, 2002, v. 94, p. 259-76.

SVÄRDSUDD, K.; TIBBLIN, G. **Mortality and morbidity during 13.5 years' follow-up in relation to blood pressure. The study of men born in 1913**, *Acta Medica Scandinavia*, 1979, v. 205, n. 6, p. 483-92.

SYTKOWSKI, P.A. et al. **Secular trends in long-term sustained hypertension, long-term treatment and cardiovascular mortality, The Framingham Heart Study 1950 to 1990**, *Circulation*, 1996, v. 93, p. 697-7031.

TAHMASEBI, M. et al. **Localisation of renin-angiotensin system (RAS) components in breast**, *British Journal of Cancer*, 2006, v. 95, n. 1, p. 67-74.

TAHMASEBI, M. et al. **Transcription of the prorenin gene in normal and diseased breast**, *European Journal of Cancer*, 1998, v. 34, n. 11, p. 1777-82.

TAN, C. et al. **Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia**, *Cancer*, 1967, v. 20, n. 3, p. 333-53.

TAYLOR, J.A. et al. **Blood pressure and mortality risk in the elderly**, *American Journal of Epidemiology*, 1991, v. 134, p. 489-501.

TEODORI, E. et al. **The functions and structure of ABC transporters: implications for the design of new inhibitors of Pgp and MRP1 to control multidrug resistance (MDR)**, *Current Drug Targets*, 2006, v. 7, n. 7, p. 893-909.

TOKARSKA-SCHLATTNER, M. et al. **New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: the critical role of cellular energetic**, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2006, v. 413, p. 389-405.

TOKO, H. et al. **Angiotensin II type 1a receptor mediates doxorubicin-induced cardiomyopathy**, *Hypertension Research*, 2002, v. 25, n. 4, p. 597-603.

THOMAS, W.G., MENDELSON, F.A. **Angiotensin receptors: form and function and distribution**, *International Journal of Biochemistry and Cellular Biology*, 2003, v. 35, p. 774-779.

TOUYZ, R.M.; BERRY, C. **Recent advances in angiotensin II signaling**, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2002, v. 35, p. 1001-15.

TYBITANCLOVA, K. et al. **AT1 receptor and ACE mRNA are increased in chemically induced carcinoma of rat mammary gland**, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2005, v. 244, n. 1-2, p. 42-6.

UEDA, K. et al. **Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine**, *The Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1987, v. 84, n. 9, p. 3004-8.

UEDA, K. et al. **The mdr1 gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein**, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1986, v. 141, n. 3, p. 956-62.

UEDA, K. et al. **Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone**, *Journal of Biological Chemistry*, 1992, v. 267, n. 34, p. 24248-52.

UEMURA, H. et al. **Angiotensin II receptor blocker shows antiproliferative activity in prostate cancer cells: a possibility of tyrosine kinase inhibitor of growth factor**, *Molecular Cancer Therapeutics*, 2003, v. 2, n. 11, p. 1139-47.

VAN ESCH JH, et al. **Effects of angiotensin II and its metabolites in the rat coronary vascular bed: is angiotensin III the preferred ligand of the angiotensin AT2 receptor?**, *European Journal of Pharmacology*, 2008, v. 588, n. 2-3, p. 286-93.

VAN LUYN, M.J. et al. **Transport of glutathione conjugates into secretory vesicles is mediated by the multidrug-resistance protein 1**, *International Journal of Cancer*, 1998, v. 761, p. 55-62.

VELLENGA, E. et al. **Interleukin-6 production by activated human monocytic cells is enhanced by MK-571, a specific inhibitor of the multi-drug resistance protein-1**, *British Journal of Pharmacology*, 1999, v. 1272, p. 441-8.

VELLONEN, K.S.; HONKAKOSKI, P.; URTTI, A. **Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity**, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004, v. 23, n. 2, p. 181-8.

WALDMANN, T.A. **Immunotherapy: past, present and future**, Nature Medicine, 2003, v. 93, p. 269-77.

WEIDERPASS, E. et al. **Body size in different periods of life, diabetes mellitus, hypertension, and risk of postmenopausal endometrial cancer (Sweden)**, Cancer Causes Control, 2000, v. 11, n. 2, p. 185-92.

WHITWORTH, J.A.; WORLD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL SOCIETY OF HYPERTENSION WRITING GROUP. **2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension**, Journal of Hypertension, 2003, v. 21, n. 11, p. 1983-92.

EINBERGER, M.H. **Salt sensitivity is associated with an increased mortality in both normal and hypertensive humans**, Journal of Clinical Hypertension (Greenwich), 2002, v. 44, p. 274-6.

WEISENTHAL, L.M.; LIPPMAN, M.E. **Clonogenic and nonclonogenic in vitro chemosensitivity assays**, Cancer Treatment Reports, 1985, v. 69, n. 6, p. 615-32.

WIKIPEDIA. **Sistema Renina-Angiotensina**. Acessado em maio de 2008 e disponível na URL: [http://pt.wikipedia.org/wiki/Sistema\\_renina-angiotensina](http://pt.wikipedia.org/wiki/Sistema_renina-angiotensina)

WILLINGHAM, M.C. et al. **Single cell analysis of daunomycin uptake and efflux in multidrug-resistant and -sensitive KB cells: effects of verapamil and other drugs**, Cancer Research, 1986, v. 4611, p. 5941-6.

WULF, G.G. et al. **A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia**, Blood, 2001, v. 98, p. 1166-1173.

YAMAMOTO, R. et al. **Angiotensin II type 1a receptor signals are involved in the progression of heart failure in MLP-deficient mice**, Circulation Journal, 2007, v. 71, n. 12, p. 1958-64.

YANG, Z. et al. **Development and characterization of a recombinant madin-darby canine kidney cell line that expresses rat multidrug resistance-associated protein 1 rMRP1**, American Association of Pharmaceutical Scientists Journal, 2004, v. 61, p. 77-85.

ZHAO, Y. et al. **Angiotensin II suppresses adriamycin-induced apoptosis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in human breast cancer cells**, Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai), 2008, v. 40, n. 4, p. 304-10.

ZHOU, S. et al. **Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo**, The Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2002, v. 99, n. 19, p. 12339-44.

# 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](#)